

Aus dem Institut für Anatomie und experimentelle Morphologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Udo Schumacher

**Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der
durch Integrin $\beta 4$ - und E-/P-Selektin-Depletion
induzierten Wachstumsinhibition humaner
Xenograft-Tumore**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
eingereicht an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Sandra Genduso

Hamburg, September 2021

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Professor Dr. med. Tobias Lange, PhD durchgeführt und angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Tobias Lange, PhD

2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Hartwig Lüthen

Tag der Disputation: 16.12.2021

Für Gendu

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Adhäsionsmoleküle: Pathologische und physiologische Bedeutung	1
1.1.1	Selektine	2
1.1.2	Integrine	4
1.2	Intravaskuläre Leukozytenadhäsion	8
1.3	Tumorimmunologie	10
1.3.1	Die Rolle myeloider Zellen im Tumormilieu	11
1.4	Myeloide Suppressorzellen (MDSCs)	15
1.4.1	Ontogenese	15
1.4.2	Phänotypische Marker muriner MDSCs	17
1.4.3	Expansion und Rekrutierung	17
1.4.4	Nicht-immunologische Aktivität von MDSCs	19
1.4.5	MDSCs als therapeutisches Ziel	19
1.5	Xenogene Tiermodelle der Onkologie	21
1.5.1	E-/P-Selektin- <i>knockout</i> im Tiermodell	22
1.6	Hypothese und Zielsetzung	24
2	Material	26
2.1	Versuchstiere	26
2.2	Zelllinien	26
2.2.1	Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3	26
2.2.2	Pankreaskarzinom-Zelllinie PaCa5061	27
2.2.3	Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3	27
2.2.4	Zellkulturmedien	27
2.3	Verbrauchsmaterialien	28
2.4	Chemikalien	29
2.5	Puffer und Lösungen	33

2.6	Antikörper	37
2.6.1	Antikörper für die Durchflusszytometrie	37
2.6.2	Antikörper für Western Blot	38
2.6.3	Antikörper für die Immunhistologie	38
2.7	Assays und Kits	39
2.8	Laborgeräte	40
2.9	Software	42
3	Methoden	43
3.1	Zellbiologische Methoden	43
3.1.1	Standardkulturbedingungen	43
3.1.2	Subkultivierung adhärenter Tumorzellen	43
3.1.3	Kryokonservierung von Tumorzellen	44
3.1.4	Revitalisierung kryokonservierter Tumorzellen	44
3.1.5	Bestimmung der Zellzahl	44
3.1.6	PolyHema-Beschichtung von Zellkulturflaschen	44
3.1.7	Herstellung von konditionierten Medien (CM)	45
3.1.8	Isolation von extrazellulären Vesikeln	45
3.1.9	Kolonienbildung von Tumorzellen in Softagar (<i>Softagar-assay</i>)	45
3.1.10	Identifizierung apoptotischer Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie	46
3.1.11	3D Invasion- <i>assay</i> mit humanen Makrophagen	46
3.1.12	Analyse der ITGB4-Expression auf Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie	48
3.2	Proteinbiochemische Methoden	48
3.2.1	Gewinnung von Zelllysaten	48
3.2.2	Quantifizierung von Proteinen aus Zelllysaten	49
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
3.2.4	Proteintransfer mittels Western Blot	50
3.2.5	Immundetektion	50

3.2.6	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	51
3.3	Immunhistologische Methoden	51
3.3.1	Herstellung von histologischen Präparaten	51
3.3.2	Anfärbung von Gewebeschnitten mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung)	51
3.3.3	Giemsa-Anfärbung von MACS-separierten Zellen	52
3.3.4	Immunhistologische Färbungen	52
3.4	Tierexperimentelle Methoden	53
3.4.1	Tierhaltung	53
3.4.2	Das <i>pfp</i> ^{-/-} / <i>rag2</i> ^{-/-} -Mausmodell	54
3.4.3	Xenograft-Transplantation von humanen Tumorzellen	54
3.4.4	Blut-, Knochenmark- und Organentnahme	55
3.4.5	Gewinnung von Einzelzellen aus Xenograft-Tumoren	55
3.4.6	Gewinnung von Einzelzellen aus muriner Milz	56
3.4.7	Gewinnung von Einzelzellen aus murinem Blut	56
3.4.8	Gewinnung von Einzelzellen aus murinem Knochenmark	56
3.4.9	Phänotypisierung von Immunzellen mittels Durchflusszytometrie	57
3.4.10	Magnet-aktivierte Einzelzellseparation (MACS)	58
3.5	Statistische Datenanalyse	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Xenotransplantation von ITGB4- <i>knockdown</i> - und Kontroll-Tumorzellen in E- und/oder P-Selektin-defizienten <i>pfp</i> / <i>rag2</i> -Mäusen	59
4.2	Untersuchungen zum verzögerten Wachstum von ITGB4- <i>knockdown</i> -Tumorzellen	61
4.2.1	Simulation der dreidimensionalen Kolonieformation von Tumorzellen <i>in vitro</i>	61
4.2.2	Durchflusszytometrische Untersuchung zur Apoptoseinduktion in ITGB4- <i>knockdown</i> -Tumorzellen	63

4.2.3	Untersuchungen zur leukozytären Infiltration in Xenograft-Tumoren	65
4.2.4	Chemotaktisches Potential konditionierter Tumorzell-Kulturbedien auf humane Makrophagen	66
4.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Sekretion immunologischer Mediatoren	68
4.3.1	Analyse verschiedener Chemokine in konditionierten Medien von Tumorzellen	68
4.3.2	Isolierung und Charakterisierung extrazellulärer Vesikel von Tumor- zellen	72
4.4	Lokale und systemische quantitative Änderungen von Leukozyten-Subpo- pulationen im subkutanen Xenograft-Mausmodell	73
4.4.1	Immunphänotypisierung myeloider Zellen im Knochenmark Xeno- graft-Tumor-tragender Mäuse	73
4.4.2	Immunphänotypisierung myeloider Zellen im Blut Xenograft-Tumor- tragender Mäuse	76
4.4.3	Immunphänotypisierung myeloider Zellen in der Milz von Xeno- graft-Tumor-tragenden Mäusen	78
4.4.4	Splénomegalie in E-/P-Selektin-defizienten Versuchstieren	80
4.4.5	Morphologie der Milz in Xenograft-Tumor-tragenden Mäusen	82
4.4.6	Charakterisierung Gr-1 ⁺ Immunzell-Subpopulationen in Milzen Xenograft- Tumor-tragender Mäuse	84
4.4.7	Immunhistologische Färbung Ly6G ⁺ Zellen in Milzen von Xenograft- Tumor-tragenden Mäusen	85
4.4.8	Morphologie isolierter Gr-1 ⁺ Zellen der Milz	86
4.4.9	Immunphänotypisierung myeloider Zellen in s.c. Tumoren von Xenograft- Modellen	87
4.4.10	Charakterisierung Gr-1 ⁺ Immunzell-Subpopulationen in s.c. Xenograft- Tumoren	90

4.5	Untersuchungen zur veränderten Signaltransduktion in ITGB4- <i>knockdown</i> -Tumorzellen	91
4.5.1	Untersuchungen zur STAT1-Expression	91
4.6	Untersuchungen zur leukozytären Infiltration in humanen Tumorgeweben .	93
4.6.1	Assoziation zwischen ITGB4-Expression und leukozytärer Infiltration in intraperitonealen Karzinosen von Ovarialkarzinom-Patientinnen	93
5	Diskussion	95
5.1	Bedeutung von ITGB4 und E-/P-Selektin für die Tumorentwicklung im Xenograft-Modell	95
5.2	Potentielle Rolle des ITGB4- <i>knockdowns</i> von Tumorzellen für die Attraktion von Leukozyten	100
5.3	Einfluss des ITGB4- <i>knockdowns</i> von Tumorzellen und der E-/P-Selektin-Defizienz auf Tumor-infiltrierende Immunzell-Subpopulationen	105
5.3.1	Das CD11b ⁺ F4/80 ⁺ -Infiltrat	105
5.3.2	Das CD11b ⁺ CD11c ⁺ -Infiltrat	108
5.3.3	Das CD11b ⁺ Gr-1 ⁺ -Infiltrat	109
5.4	Einfluss des ITGB4- <i>knockdowns</i> von Tumorzellen und der E-/P-Selektin-Defizienz des Tumorstromas auf die leukozytäre Zusammensetzung systemischer Organe	112
5.4.1	Das Knochenmark	113
5.4.2	Das Blut	114
5.4.3	Die Milz	115
5.5	Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT1 für die immunzelluläre Infiltration	118
5.6	Bedeutung der ITGB4-Expression für die leukozytäre Infiltration in humanen Tumorgeweben	120
6	Zusammenfassung	122
6.1	Abstract	124

Literaturverzeichnis	126
Abbildungsverzeichnis	172
Tabellenverzeichnis	174
Anhang	

1 Einleitung

1.1 Adhäsionsmoleküle: Pathologische und physiologische Bedeutung

Adhäsive Strukturen nehmen im Kontext pathologischer Zellveränderungen einen hohen Stellenwert ein. Bereits am Entstehungsort des Primärtumors beeinflussen wechselseitig adhäsive Interaktionen zwischen Tumorzellen und Zellen ihrer dreidimensionalen Umgebung, wie Stromazellen und Leukozyten, aber auch lösliche Faktoren den Verlauf der Tumorprogression sowie die Befähigung zur metastatischen Dissemination (Seager et al., 2017). Eine erfolgreiche Metastasierung von Fernmetastasen setzt voraus, dass Tumorzellen die Fähigkeit zur Invasion erwerben, was mit einem Verlust kontext-spezifischer Adhäsionsverbindungen einhergeht (Lamouille et al., 2014). In der Zirkulation unterliegen Tumorzellen in der Regel einer schnellen Eliminierung, sofern sie nicht zur Kontaktaufbildung zu vaskulären Endothelzellen befähigt sind, was die Grundlage für das Einwandern in umliegendes Gewebe bildet (Hunter et al., 2008; Mierke, 2008). Da Metastasen bis heute die häufigste Todesursache von Krebspatienten darstellen, ist es von hoher Relevanz, die molekularen Vorgänge und dynamische Plastizität von adhäsiven Zellverbindungen zu verstehen, um zukünftig gezielte therapeutische Interventionen zu ermöglichen.

Zelladhäsionsmechanismen bilden darüber hinaus die Basis vieler physiologischer Prozesse. Bereits bei der frühen embryonalen Entwicklung ist ein dynamischer Auf- und Abbau von Zellkontakten für die regulierte Organogenese entscheidend. Im adulten Organismus wird die Integrität und Stabilität von Organen und Gewebeverbänden durch die Interaktion zwischen gleichen und verschiedenartigen Zellen sowie durch den Kontakt von Zellen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM) aufrechterhalten. Neben festen Kontakten müssen zeitgleich transiente Wechselwirkungen zu nicht ortsgebundenen Zellen, wie Blut- oder Immunzellen, ausgebildet werden. Wesentlicher Bestandteil dieser Vorgänge sind auf der Zelloberfläche lokalisierte Moleküle, deren Expression oder Aktivierung

gesteigert bzw. zeitlich limitiert ist (Harjunpää et al., 2019). Entsprechend ihren molekularen Eigenschaften werden diese Zelladhäsionsmoleküle in fünf Hauptklassen unterteilt: Cadherine, Proteine der Immunglobulin-Superfamilie, Muzine, Selektine und Integrine (Harjunpää et al., 2019). In den folgenden Abschnitten werden die Selektine und Integrine näher erläutert.

1.1.1 Selektine

Selektine bilden eine Familie von strukturell und funktionell verwandten Glykoproteinen, die den heterophilen Zellkontakt zwischen Leukozyten, Blutplättchen und Endothelzellen herstellen. Als Initiatoren der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom sind sie für die Aufrechterhaltung der Homöostase und für die Regulierung inflammatorischer Prozesse von besonderer Bedeutung (Patel et al., 2002). Die charakteristische Eigenschaft von Selektinen besteht darin, fukosylierte, sialylierte oder sulfatierte Kohlenhydratliganden Calcium-abhängig zu binden (Rosen and Bertozzi, 1994; Varki, 1994). Basierend auf ihrer zellulären Lokalisation werden der Selektin-Familie drei Mitglieder zugeordnet: Endothel (E)-, Thrombozyten (P)- und Lymphozyten (L)-Selektin.

E-Selektin ist ein induzierbarer transmembranärer Adhäsionsrezeptor. Mit Ausnahme von kleinsten Blutgefäßen der Haut und des Knochenmarks, wird E-Selektin auf endothelialen Zellen nicht konstitutiv exprimiert (Schweitzer et al., 1996; Keelan et al., 1994). Die vaskuläre Expression von E-Selektin ist ein transkriptionell hoch regulierter Vorgang, dem die Sekretion inflammatorischer Cytokine, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) vorangeht (Bevilacqua et al., 1989). Nach Stimulation erfolgt die Proteinsynthese *de novo*, sodass eine maximale Expression auf der Endotheloberfläche erst nach 4 Stunden erreicht wird. Gleichzeitig wird durch eine schnelle endozytotische Internalisierung und lysosomale Degradation das basale Expressionslevel bereits nach 24 Stunden wiederhergestellt (Patel et al., 2002). Diese transiente Expression von E-Selektin dient der gezielten Rekrutierung von Leukozyten am Entzündungsort. E-Selektin vermittelt hierbei einen wichtigen Schritt der Adhäsion von Leukozyten am Endothel postkapillärer Venolen, welches spezifischer als „*Rolling*“ bezeichnet wird. Im Detail führt die Bindung an

E-Selektin zu einem langsamen Rollen (engl. *slow rolling*) von Leukozyten (Somers et al., 2001), welches die Überleitung zu einer festen Leukozyten-Endothelzellbindung bildet und die Extravasation ins umliegende Gewebe initiiert (s. Abschnitt 1.2).

P-Selektin weist zum E-Selektin eine partielle funktionale Redundanz auf (Frenette et al., 1996; Labow et al., 1994). Es handelt sich hierbei um ein Glykoprotein, welches von aktivierten Thrombozyten und endothelialen Zellen exprimiert wird. In Thrombozyten wird P-Selektin konstitutiv in α -Granula gespeichert (Berman et al., 1986; Stenberg et al., 1985). Endothelzellen verfügen über spezielle Speichergranula, die Weibel-Palade-Körperchen, in denen funktionsfähiges P-Selektin lokalisiert ist (Bonfanti et al., 1989; McEver et al., 1989). Eine induzierte Expression von P-Selektin wird durch zwei verschiedene Mechanismen realisiert. Zum einen kann P-Selektin nach aktivierender Stimulation durch inflammatorische sowie hämostatisch wirkende Mediatoren wie beispielsweise Thrombin, Plättchenaktivierender Faktor (PAF) oder Histamin, innerhalb weniger Minuten aus den Granula mobilisiert und auf der Plasmamembran exponiert werden (Bonfanti et al., 1989; Hattori et al., 1989). Bei diesem in humanen und murinen Zellen konservierten Mechanismus unterliegt P-Selektin im Gegensatz zu E-Selektin nicht der Protein-Neusynthese (Liu et al., 2010). In murinen Endothelzellen ist die mRNA-Synthese von P-Selektin durch Cytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ zusätzlich transkriptionell induzierbar (Hahne et al., 1993; Gotsch et al., 1994; Liu et al., 2010; Pan et al., 1998; Weller et al., 1992). Dieser zweite regulatorische Mechanismus ist in allen Säugetiere mit Ausnahme von Menschen und Primaten, aufgrund fehlender kanonischer Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im P-Selektin-Promotor, konserviert (Auchampach et al., 1994; Doré and Sirois, 1996; Pan and McEver, 1993; Pan et al., 1998). Die Expression von P-Selektin auf der Zellmembran ist zeitlich limitiert. Nach Internalisierung erfolgt entweder die lysosomale Degradation oder ein endosomales Recycling (Green et al., 1994). Aufgrund der Eigenschaft zur schnellen Translokation wird über P-Selektin der initiale Kontakt (engl. *Capture, Tethering*) von Leukozyten aus dem Blutstrom vermittelt (Ley et al., 1995; Mayadas et al., 1993). Des Weiteren reduziert der repetitive Wechsel zwischen Auf- und Abbau einer niedrig affinen Bindung an P-Selektin die leukozytäre Rollgeschwindigkeit. (Marshall et al.,

2003; Sundd et al., 2011)

L-Selektin wird anders als E- und P-Selektin konstitutiv auf der Zelloberfläche von zirkulierenden Leukozyten exprimiert. Als Leukozytenadhäsionsrezeptor ist L-Selektin sowohl an der Leukozytenrekrutierung auf entzündetem Gefäßendothel als auch an der Rezirkulation von Lymphozyten zwischen dem Blutgefäßsystem und peripheren lymphatischen Geweben beteiligt (Arbonés et al., 1994). Aus *In vivo*-Studien geht hervor, dass L-Selektin die initiale Anheftung und das weitere Leukozyten-Rollen über transiente Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen vermittelt (Arbonés et al., 1994; Kunkel et al., 1998; Ley and Tedder, 1995). Eine bessere Zugänglichkeit von L-Selektin für die Bindung an Liganden wird insbesondere durch eine lokale Anreicherung des Rezeptors im Bereich spezieller zellulärer Membranprojektionen, den Mikrovilli, unterstützt (Bruehl et al., 1996; Stein et al., 1999). Neben einer Interaktion zu vaskulären Liganden trägt eine Bindung von L-Selektin an den Liganden PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein-1) auch zur Ausbildung homotypischer Leukozyten-Leukozyten-Anheftungen bei. Bei diesem als „*secondary tethering*“ bezeichneten Prozess, adhären frei flotierende Leukozyten transient an bereits endothelial gebundene Leukozyten, was zur Steigerung der Rekrutierungseffizienz führt (Eriksson et al., 2001; Grailer et al., 2009).

1.1.2 Integrine

Integrine sind heterodimere transmembranöse Adhäsionsrezeptoren, die eine zelluläre Kommunikation durch Vermittlung von heterotypischen Zell-Zell-Kontakten und Verknüpfungen von Zytoskelett-Komponenten mit der EZM ermöglichen. Neben der Adhäsion sind Integrine für eine Vielzahl zellulärer Abläufe, wie Migration, Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben von profunder Bedeutung (Anderson et al., 2014). Aus diesem Grund ist eine fehlregulierte Integrinaktivität mit pathologischen Prozessen wie Autoimmunität, Inflammation oder Tumorentwicklung assoziiert (Vicente-Manzanares and Sánchez-Madrid, 2018).

Integrine sind evolutionär hoch konserviert. Mit Ausnahme von Erythrozyten werden sie von allen Zelltypen im humanen Organismus exprimiert (Arnaout, 2016). Das jeweilige

Integrin-Expressionsmuster auf der Zelloberfläche bestimmt dabei maßgeblich die Sensorik und Reaktion auf Einflüsse innerhalb der Mikroumgebung (Arun et al., 2018). Auch wenn einige Integrine auf unterschiedlichen Zellarten gleichzeitig vorkommen können, weisen verschiedene Gewebetypen ein spezifisches Set auf (Arun et al., 2018).

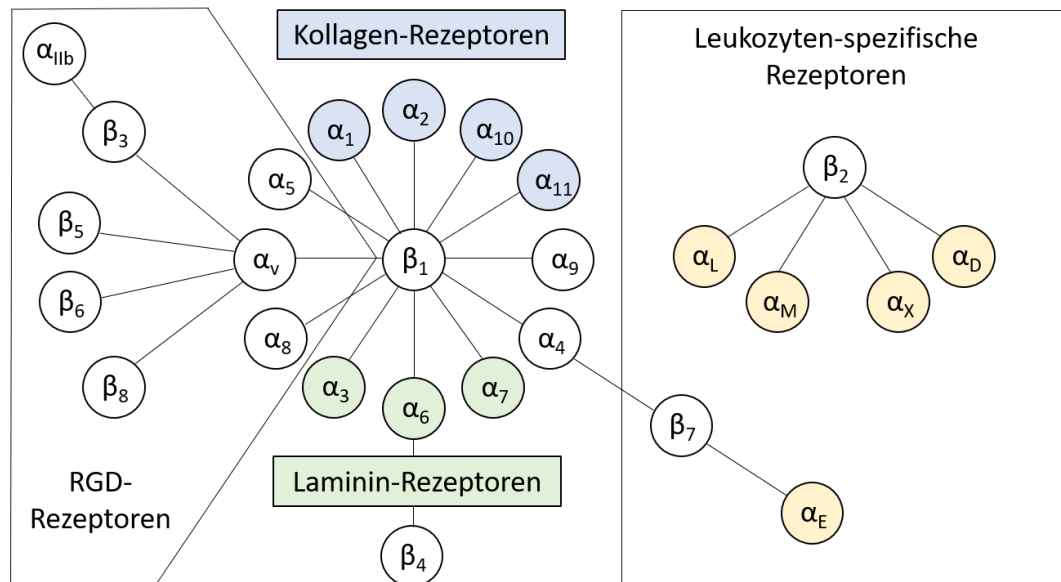


Abbildung 1.1: Illustration der Integrin-Heterodimere und deren Subfamilien. In Vertebraten beinhaltet die Integrin-Rezeptor-Familie 24 Heterodimere, die durch eine Kombination von 18 α und 8 β Untereinheiten entstehen. Zusätzlich lassen sich 4 verschiedene Subfamilien unterscheiden: Laminin-bindende Integrine (grün), Kollagen-Rezeptoren (blau), Leukozyten-spezifische Integrine (gelb) und RGD-Rezeptoren (weiß). Modifiziert nach (Hynes, 2002).

Strukturell bestehen Integrine aus einer α - und β -Untereinheit von Typ-I Transmembran glykoproteinen, die über eine nicht-kovalente Bindung miteinander assoziiert sind (Ginsberg et al., 2005; Van der Flier and Sonnenberg, 2001). Bislang sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten beschrieben, die durch mehrfache Kombination 24 unterschiedliche heterodimere Integrin-Rezeptoren ausbilden können (Takada et al., 2007)(siehe Abb.1.1). Zusätzlich lassen sich Integrine in Subfamilien unterteilen, die durch ihre Bindungsaffinität zu Proteinen der EZM wie z.B. Laminin, Kollagen oder Fibronectin charakterisiert sind. Die Liganden-Bindungspartner vieler Integrin-Heterodimere sind dabei polyspezifisch. Die β_2 - und β_7 -Untereinheiten nehmen hierbei eine Sonderstellung ein, da sie nur auf Leukozyten vorkommen.

In ihrer Eigenschaft als bidirektionale Signaltransduktoren können Integrine nicht nur durch Liganden des Extrazellularraums, sondern auch durch intrazelluläre Signale ak-

tiviert werden. Die Bindung von Matrixstrukturen bewirkt die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die die Genexpression von Proteinen modulieren, die wiederum Differenzierungsprozesse, das Zellwachstum oder Apoptose ansteuern können (*outside-in-signaling*) (Ginsberg et al., 2005). Gleichzeitig kann eine Konformationsänderung der extrazellulären Integrin-Domäne, induziert durch die Bindung von Zytoskelett-assoziierten Proteinen an die cytoplasmatische Region der β -Untereinheit, die Affinität der Ligandenbindungsstelle erhöhen (*inside-out-signaling*) (Harburger and Calderwood, 2009). Auf diese Weise „integrieren“ Integrine den intrazellulären und extrazellulären Raum und schaffen eine dynamische transmembranäre Verbindung (Loeser, 2014).

Eine spezielle Form dieser Verbindungen sind Hemidesmosomen. Darunter werden Integrinvermittelte Adhäsionsverbindungen verstanden, die sowohl die Integrität als auch die mechanische Belastbarkeit von Epithelien durch die Verankerung von Intermediärfilamenten des Zytoskeletts an die Basalmembran vermitteln (Nahidiazar et al., 2015; Walko et al., 2015). Ein wichtiger Bestandteil dieses Proteinkomplexes ist das **Integrin $\alpha 6 \beta 4$** (Downing et al., 1996; Litjens et al., 2006; Sonnenberg et al., 1991), welches als Rezeptor für das extrazelluläre Matrixprotein Laminin-332 fungiert. Es wird hauptsächlich von Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert, ist aber auch in Zellen peripherer Nerven nachweisbar (Li et al., 2017b). Seine Funktion als Verankerungs- und Stabilitätsvermittelndes Protein kommt in Patienten zum Tragen, die Mutationen im *ITGA6*- oder *ITGB4*-Gen aufweisen. Bei diesen Patienten kommt es zur Ausbildung junktionaler Epidermolysis bullosa mit Pylorusatresie (JEB-PA), die durch eine hohe Hautfragilität, verursacht durch junktionale Blasenbildung, und eine kongenitale gastrointestinale Atresie klinisch charakterisiert ist (Pulkkinen et al., 1998; Takizawa et al., 1997).

Innerhalb der Integrin-Familie kommt dem Integrin $\beta 4$, folgend als ITGB4 bezeichnet, eine gesonderte Stellung zu. Während die $\alpha 6$ -Untereinheit neben dem ITGB4 auch mit $\beta 1$ interagiert, heterodimerisiert ITGB4 selektiv mit dem $\alpha 6$ -Integrin. Zudem weist das ITGB4 eine atypisch lange cytoplasmatische Domäne auf, die über die mechanische Anheftung hinaus eine Signalfunktion ausübt (Mainiero et al., 1995). Diese zeichnet sich insbesondere durch einen erhöhten Gehalt der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin aus, die als

Phosphorylierungsstellen für aktivierte Proteinkinasen fungieren. Eine Phosphorylierung induziert die Freisetzung von Integrin $\alpha6\beta4$ aus den Hemidesmosomen, in Konsequenz dessen Signalwege moduliert werden, die Einfluss auf Zellmigration und Zellüberleben nehmen (Tyagi et al., 2015; Wilhelmsen et al., 2007). Dieser Prozess kann einerseits durch Assoziation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor(EGFR) und andererseits durch die Bindung an Laminin-332 stimuliert werden (*outside-in-signaling*) (Colburn and Jones, 2017; Mainiero et al., 1996; Mariotti et al., 2001; Rousselle and Scoazec, 2020; Stewart and O'Connor, 2015). Als Folge dieser Stimulation werden Tyrosinkinase der Src-Familie aktiv, die durch Phosphorylierung spezifischer Tyrosin-Reste der cytoplasmatischen Domäne von ITGB4 Phosphoinositid-3-Kinase- (PI3K), Mitogen-aktivierte Proteinkinase- (MAPK) oder Rho-Kinase-vermittelte Signalwege induzieren(Beaulieu, 2010; Dans et al., 2001; Kariya et al., 2018; Mainiero et al., 1997). Darüber hinaus ist das Integrin $\alpha6\beta4$ bei der Einleitung des Zelltodes nach Kontaktverlust zur EZM, der sog. Anoikis, beteiligt. Die Spaltung der Signaldomäne von Integrin $\beta4$ durch aktivierte Caspasen leitet in Keratinozyten die Anoikis ein. (*inside-out-signaling*) (Beauséjour et al., 2013; Werner et al., 2007).

Im Tumorkontext geht eine Disassemblierung von Hemidesmosomen mit der Verstärkung von Wachstumsfaktor-Rezeptor-induzierten Signalen einher, die Tumorzellproliferation, -invasion und -metastasierung fördern (Stewart and O'Connor, 2015). Dementsprechend repräsentiert eine Überexpression von ITGB4 bei einer Vielzahl maligner Tumorerkrankungen einen aggressiveren Phänotypen und führt zu einer schlechteren Überlebensprognose (Grossman et al., 2000; Kitajiri et al., 2002; Li et al., 2017b, 2020). Beim Pankreaskarzinom bedingt eine gesteigerte ITGB4-Expression eine höhere Invasivität (Cruz-Monserrate and O'Connor, 2008) und ist mit molekularen Merkmalen assoziiert, die auf eine epitheliale- mesenchymale-Transition (EMT) hinweisen (Masugi et al., 2015). Zudem fördern ITGB4 sowie dessen Phosphorylierung die Pankreaskarzinogenese (Meng et al., 2020). Für das Prostatakarzinom liegen kontroverse Daten vor. Während frühe Studien über eine reduzierte Expression von ITGB4 sowohl in prostatistischen intraepithelialen Neoplasien als auch in invasiven Prostatakarzinomen berichten (Allen et al., 1998;

Cress et al., 1995; Nagle et al., 1995; Davis et al., 2001), liegen gleichzeitig Publikationen vor, die eine Überexpression von ITGB4 in aggressiveren Prostatakarzinomen zeigen (Banyard et al., 2014; Yoshioka et al., 2013). Bisher unpublizierte Daten unserer eigenen Arbeitsgruppe zeigen ebenfalls, dass ein erhöhtes ITGB4-Level mit einem gesteigertem Metastasierungspotential von humanen Prostatakarzinomzellen im spontan metastasierenden Xenograft-Modell in Verbindung gebracht werden kann. Aus Patientenkollektiv-Analysen geht hervor, dass eine erhöhte ITGB4-Expression in serösen Ovarialkarzinomen nach Tumorresektion eine ungünstige Prognose anzeigt (Labitzky, 2018). In einer aktuellen Datensatzanalyse wird ebenfalls die prognostische Bedeutung von Integrinen im Ovarialkarzinom reflektiert: Neben Integrin $\alpha 3$ (ITGA3) wurde ITGB4 sowohl als Onkogen als auch als unabhängiger Prädiktor für ein verschlechtertes progressionsfreies Überleben identifiziert (Wu et al., 2020a).

1.2 Intravaskuläre Leukozytenadhäsion

Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Adhäsionsmoleküle spielen zum Teil eine zentrale Rolle für die zielgerichtete Rekrutierung von Leukozyten im entzündlichen Gewebe. Die Leukozyten-Endothel-Interaktion erfolgt über einen mehrstufigen Prozess, in denen Selektine und Integrine sequenziell aktiv werden (Ley et al., 2007). Dieser als Leukozyten-Adhäsionskaskade bezeichnete Vorgang beginnt mit einer Reduktion der Blutflussgeschwindigkeit (siehe Abb. 1.2). Diese ist bedingt durch eine von proinflammatorischen Mediatoren hervorgerufene Gefäßdilatation (Muller, 2002). Gleichzeitig wird die Expression von Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche angeregt und das Endothel auf diese Weise aktiviert. Dies ermöglicht den initialen Kontakt zwischen Leukozyten und Endothel, der als „*Tethering*“ bezeichnet wird. Bedingt durch die im Blutstrom vorherrschenden Scherkräfte kommt es im weiteren Verlauf zu einer Rollbewegung (engl. *rolling*) der Leukozyten auf dem aktivierten Gefäßendothel postkapillärer Venolen. Diese Schritte werden primär durch die Ausbildung schwacher Bindungen zwischen den Mitgliedern der Selektin-Familie und ihren korrespondierenden Kohlenhydrat-Liganden vermittelt (Chavakis et al., 2009). Während L- und P-Selektin die frühe Anheftung initiieren

(Ley et al., 1995; Mayadas et al., 1993), führt eine spätere Bindung an endotheliales E-Selektin zur weiteren Verlangsamung des Leukozytenrollens (Kunkel and Ley, 1996). Die Bindung an E-Selektin sowie hierdurch aktivierte intrazelluläre Signalkaskaden unterstützen die Ausbildung der nachfolgenden festen Adhäsion (Ley et al., 1998; Milstone et al., 1998; Yago et al., 2010). Als Folge der lokalen Konzentrierung von Leukozyten und der verringerten Distanz zwischen Leukozyten und Endothel kommt es zur Aktivierung von leukozytären Rezeptoren der Integrin-Familie. Hierbei führen von Endothelzellen oder Leukozyten sezernierte Chemokine über ein *Inside-out-Signaling* zu einer aktivierenden Konformationsänderung der Integrine (Alon and Shulman, 2011; Arnaout et al., 2005; Patten and Shetty, 2018). Die verstärkte Affinität und Avidität von Integrinen zu Liganden der Immunoglobulin-Superfamilie vermittelt eine feste und stationäre Arretierung der Leukozyten auf dem Endothel (Carman and Springer, 2003; Constantin et al., 2000). Fest adhärierte Leukozyten vollziehen nicht direkt eine endotheliale Transmigration, sondern patrouillieren auf der Suche nach einer geeigneten Migrationsstelle unter dem Einfluss weiterer Chemokine auf dem Endothel (Auffray et al., 2007; Mitroulis et al., 2015). Dieser durch mehrere Adhäsion und De-Adhäsion-Zyklen geprägte Prozess ist als intraluminales Crawlingverhalten beschrieben (Schmidt et al., 2016). Der finale Eintritt in den interstitiellen Raum erfolgt überwiegend parazellulär zwischen interendothelialen Adhäsionskomplexen, kann aber auch transzellulär durch den endothelialen Zellkörper erfolgen (Mitroulis et al., 2015).

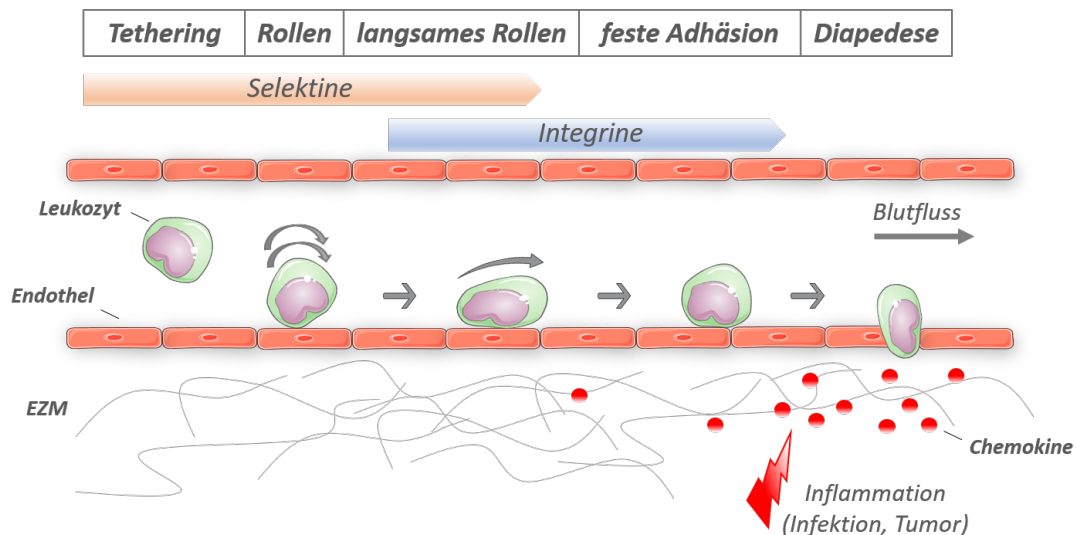


Abbildung 1.2: Die Leukozytenadhäsionskaskade. Die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom in Folge entzündlicher Reaktionen erfolgt entlang einer sequentiellen Adhäsionskaskade. Nach vorausgegangener Aktivierung des Endothels entsteht Selektin-vermittelt ein initialer Kontakt (*Tethering*) und darauf aufbauend eine rollende Bewegung von Leukozyten entlang der luminalen Gefäßoberfläche (*Rollen*). Die progressive Aktivierung leukozytärer Integrine vermittelt in Kooperation mit Selektinen eine Verlangsamung der Rollbewegung und die feste Adhäsion von Leukozyten auf dem Endothel. Dies ermöglicht die transendotheliale Migration (*Diapedese*) in das entzündete Gewebe. Modifiziert nach (Rossi and Constantin, 2008).

1.3 Tumorimmunologie

Tumore können nicht als eine homogene Ansammlung maligner Zellen simplifiziert werden. Sie umfassen vielmehr eine komplexe Tumormikroumgebung (engl. *tumor microenvironment*; TME), die neben malignen Zellen auch Stromazellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Adipozyten, Perizyten und eine Vielzahl infiltrierender Immunzellen einschließt (Galli et al., 2020; Lei et al., 2020). Ausgehend von der frühen Tumorentwicklung bis hin zur metastatischen Kolonisation ist die TME, wie auch der Tumor selbst, morphologischen und funktionellen Veränderungen unterlegen. Ausschlaggebend für die zelluläre Zusammensetzung der TME sind primär vom Tumor orchestrierte molekulare und zelluläre Signale, die in Abhängigkeit von den tumoreigenen Bedürfnissen moduliert werden (Whiteside, 2008). Entsprechend weisen verschiedene Tumorentitäten eine hohe Variabilität der TME auf (Anderson and Simon, 2020). Ein einheitliches Merkmal ist jedoch die Präsenz von Immunzellen (Thorsson et al., 2018). Bereits in der frühen Tumorentwicklung ist die rezipro-

ke Kommunikation zwischen Tumorzellen und infiltrierenden Immunzellen für die weitere Tumorprogression prägend. Innerhalb der TME können Immunzellen dichotome Funktionen wahrnehmen (Anderson and Simon, 2020), so lassen sich tumor-antagonisierende von tumor-propagierende Immunzellen abgrenzen (Lei et al., 2020). Erstere vermitteln die eigentliche Aufgabe des Immunsystems, präkanzeröse und kanzeröse Zellen anhand tumor-spezifischer Antigene zu erkennen und zu eliminieren. Dieser Prozess wird allgemein als Tumorimmunüberwachung (engl. *tumor immunosurveillance*) bezeichnet (Swann and Smyth, 2007). Dennoch manifestieren sich Tumore unter Anwesenheit eines intaktem Immunsystems und werden klinisch diagnostiziert. Darüber hinaus lässt sich eine vermehrte Infiltration durch Immunzellen für verschiedene Karzinome mit einer schlechteren Prognose in Verbindung bringen (Mahmoud et al., 2012; Xu et al., 2020; Yu et al., 2020), was die Existenz tumor-förderlicher Immunzellen nahelegt. Die Fähigkeit, einer Destruktion durch das körpereigene Immunsystem zu entgehen, ist heute ein anerkanntes Kennzeichen von Krebserkrankungen (engl. *hallmarks of cancer*) (Hanahan and Weinberg, 2011). Im Zuge des sog. *Immuneditings* sind Tumore in der Lage die eigene Tumor-Immunogenität durch Modulation der Mikroumgebung dahingehend zu verändern, dass Tumorstadium, Proliferation und Invasion gefördert werden (Janssen et al., 2017). Es kommt hierbei sowohl zu einer aktiven Re-Programmierung also auch zu einer gezielten Rekrutierung von tumor-förderlichen Immunzellen (Whiteside, 2008). In Summe entwickelt sich ein immunsuppressives und pro-inflammatorische Milieu, welches es Tumorzellen ermöglicht, einer Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen. Gleichzeitig nutzen Tumorzellen dieses Milieu für das eigene Überleben und die weitere Propagierung.

1.3.1 Die Rolle myeloider Zellen im Tumormilieu

Konzeptionell besteht das körpereigene Immunsystem aus zwei Komponenten: die angeborene und adaptive Immunität (Kather and Halama, 2019). Generell nimmt die Infiltration von Zellen beider Teile des Immunsystems Einfluss auf den Entwicklungsverlauf von Tumoren (Gajewski et al., 2013). Da in dieser Arbeit das Tumorstadium in Xenograft-Modellen (s. Abschnitt 1.5) studiert wurde, in denen Zellen des adaptiven Immunsystems

genetisch depletiert sind, wird im Folgenden nur die tumorfördernde Rolle von Zellen der unspezifischen Immunabwehr betrachtet. Die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind hauptsächlich myeloiden Ursprungs. Dazu gehören u.a. Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen. Diese vermitteln unter nicht-tumorösen Bedingungen eine frühzeitige unspezifische Abwehrreaktion als Antwort auf eingedrungene körperfremde Antigene (Schmid and Varner, 2010). Im Tumormilieu fördert das myeloide Zellkompartiment durch Sekretion angiogenetischer Faktoren, Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteasen sowohl das Tumorstadium als auch die Metastasierung und trägt durch anti-inflammatorische Signale zu einer immunsupprimierenden TME bei (Berraondo et al., 2016; Neophytou et al., 2020). Zu den prominentesten im Tumorbett zu detektierenden myeloiden Zellen gehören tumor-assoziierte Makrophagen (TAM), tumor-assoziierte dendritische Zellen und tumor-assoziierte Neutrophile (TAN). Eine weitere Population bilden myeloide Suppressorzellen, auf deren Bedeutung im Abschnitt 1.4 detaillierter eingegangen wird.

Makrophagen, die solide Tumore infiltrieren oder innerhalb der TME lokalisiert sind, werden als TAMs definiert (Lin et al., 2019). Sie stammen häufig von Monozyten im peripheren Blut oder der Milz ab, die nach der Extravasation der Tumorgefäße unter dem Einfluss von Cytokinen der TME zu TAMs differenzieren (Bingle et al., 2002; Haas and Obenaus, 2019; Van Dyken and Locksley, 2013). Der Aktivierungszustand von Makrophagen wird klassischer Weise durch das sog. M1- und M2-Polarisierungsmodell charakterisiert (Martinez and Gordon, 2014). Vereinfacht impliziert der M1-Phänotyp eine mikrobiozide und pro-inflammatorische Aktivität, während die M2-Signatur mit anti-inflammatorischen Eigenschaften assoziiert ist (Jayasingam et al., 2019). Es wird angenommen, dass TAMs M2-polarisierte Makrophagen darstellen, die durch die lokale Immunsuppression das Tumorstadium fördern und somit einen aggressiveren Tumor-Phänotypen bedingen (Benner et al., 2019; Jayasingam et al., 2019). Zur Beschreibung komplexerer Vorgänge in lebenden Organismen gilt das Modell heute als zu vereinfacht. In Anbetracht der Entwicklungsdynamik von Tumoren und ihrer TME ist davon auszugehen, dass innerhalb mikroanatomischer Nischen TAMs existieren, die nicht klar voneinander abgrenzbare Ak-

tivierungszustände aufweisen (Laviron and Boissonnas, 2019; Martinez and Gordon, 2014; Xue et al., 2014). Daneben zeigen neuere Studien, dass Makrophagen auch von embryonalen Vorläuferzellen abstammen können, die Gewebe-residente Makrophagen ausbilden (Haas and Obenauf, 2019; Laviron and Boissonnas, 2019). Sowohl von Monozyten abstammende als auch Gewebe-residente Makrophagen sind an der Tumorigenese beteiligt (Chen et al., 2017; Ma et al., 2020; Zhu et al., 2017). Die gezielte Rekrutierung von Monozyten wird von Tumorzellen oder Zellen der TME veranlasst und erfolgt in Form von sekretierten Chemokinen. CCL2 (MCP-1) ist dabei ein pro-tumorigener Faktor, der mit der Attraktion von TAMs am häufigsten in Verbindung gebracht werden kann und in Tumoren ein gesteigertes Expressionslevel zeigt (Gazzaniga et al., 2007; Loberg et al., 2007; Murdoch et al., 2008; Yang et al., 2020). Daneben erhöhen CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β) und CCL5 (RANTES) die TAM-Infiltration von Primärtumoren (De la Fuente López et al., 2018; Murdoch et al., 2008; Niwa et al., 2001). Eine starke Infiltration von TAMs korreliert mit einer schlechteren Prognose bei Brust-, Ovar- und Lungenkrebs (Qian and Pollard, 2010; Zhang et al., 2012). TAMs erfüllen multiple tumor-förderliche Funktionen. Dazu gehören eine gesteigerte Tumorangiogenese durch Sekretion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), die Modellierung der TME durch die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen sowie die Herunterregulation anti-tumorigener Signale (Lin et al., 2019; Pollard, 2004).

Dendritische Zellen (DCs) sind spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen, die als wichtige Konnektoren der angeborenen und adaptiven Immunität fungieren. Sie umfassen eine heterogene Zellpopulation, die in Mäusen und Menschen hoch konserviert ist und verschiedenste immunologische Aufgaben wahrnimmt (Wylie et al., 2019). Im Tumormilieu nehmen DCs vorzugsweise eine tumor-hemmende Funktion ein. Dennoch ist beschrieben, dass die Imbalance von Chemokinen und weiterer sekretorischer Faktoren in der TME die Reifung und Differenzierung von tumor-infiltrierenden DCs unterdrücken (Gabrilovich, 2004; Michielsen et al., 2011). So inhibieren konditionierte Medien von kultivierten humanen kolorektalen Gewebs-Explantaten, die ein gesteigertes Level an VEGF, CCL2, CXCL1 (GRO α) und CXCL5 (ENA-78) zeigen, die DC-Reifung *in vitro* (Michielsen

et al., 2011). In diesem Zustand kommt es zu einer Herunterregulation der Anti-Tumor-Immunantwort und tumor-infiltrierende DCs erwerben eine suppressiv-regulatorische Aktivität. Darüber hinaus entwickeln unreife DCs eine Toleranz gegenüber T-Zellen. Eine fehlende Co-Stimulation von T-Zellen begünstigt die Entstehung aneurer T-Lymphozyten und fördert die Produktion regulatorischer T-Zellen, die einer Aktivierung des Immunsystem weiter entgegenwirken (Berraondo et al., 2016; Toh et al., 2012).

Neutrophile Granulozyten repräsentieren im humanen Blut 50-70% der myeloiden Zellfraktion (Mukaida et al., 2020). Sie sind essentieller Bestandteil der angeborenen Immunantwort zur Abwehr von Mikroorganismen und zum Schutz gegen bakterielle Infektionen (Mortaz et al., 2018). Studien der letzten zehn Jahre haben verdeutlicht, dass TANs eine zentrale Rolle für die Tumorbilogie spielen (Powell and Huttenlocher, 2016; Shaul and Fridlender, 2019). In zahlreichen Krebserkrankungen ist eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut von Patienten mit einer schlechteren Überlebensprognose assoziiert (Shen et al., 2014). Die Rekrutierung von TANs in das Tumorgewebe erfolgt, ähnlich wie bei anderen Leukozyten, aufgrund der genomischen Instabilität des Tumors (durch DNA-Reparaturmechanismen ausgelöster genotoxischer Stress steigert inflammatorische Prozesse), durch Tumorlyse oder durch tumor-produzierte Chemokine oder Zytokine (Hajizadeh et al., 2021). In Mäusen sind CXCL1, CXCL2 (MIP-2 α) und CXCL6 (GCP-2) potente Chemoattraktanten und Aktivatoren von TANs (Masucci et al., 2019). Zu den Tumor-propagierenden Funktionen von TANs zählen die Induktion der Angiogenese (Tazzyman et al., 2013), die Immunsuppression durch Sekretion spezifischer Chemokine (Mishalian et al., 2014) sowie die Förderung eines migratorischen und invasiven Tumor-Phänotyps (El Rayes et al., 2015; Tazawa et al., 2003).

Die nachfolgend beschriebene Immunzellpopulation (myeloide Suppressorzellen) ähnelt Neutrophilen nicht nur in ihren morphologischen Eigenschaften, sondern teilt auch den gleichen Ursprung und Differenzierungsweg. Aus diesem Grund herrscht bis heute eine kontroverse Debatte über dessen genaue Identität.

1.4 Myeloide Suppressorzellen (MDSCs)

Bereits in den 1980er Jahren wurde erstmals von einem speziellen Zelltypus myeloiden Ursprungs berichtet, der in Verdacht stand, im Kontext der Karzinogenese immun-supprimierende und tumor-fördernde Eigenschaften aufzuweisen (Lee and Rosse, 1982; Buessow et al., 1984; Young et al., 1987). Seitdem ist das wissenschaftliche Interesse an dieser Zellpopulation weiter gestiegen und in zahlreichen Publikationen thematisiert. Heute wird diese Population unter der Bezeichnung myeloide Suppressorzellen (engl. *myeloid-derived suppressor cells*; MDSCs) namentlich vereinheitlicht (Gabrilovich et al., 2007) und steht mehr als zuvor im Fokus aktueller Forschungsarbeiten.

1.4.1 Ontogenese

Myeloide Zellen bilden eine der zentralen Komponenten der Immunabwehr und sind darüber hinaus für die Wundheilung und Geweberegeneration funktionell bedeutsam.

Unter physiologischen Bedingungen gehen Zellen der myeloischen Entwicklungslinien sukzessive aus hämatopoetischen Stammzellen (engl. *hematopoietic stem cells*; HSC) hervor, deren Ursprung im Knochenmark liegt (Kawamoto and Minato, 2004; Weiskopf et al., 2016) (Abb. 1.3). Aus den HSCs entstehen durch weitere Differenzierungsprozesse myeloische Progenitorzellen (engl. *common myeloid precursors*; CMP), aus denen sich wiederum unreife myeloische Vorläuferzellen (engl. *immature myeloid cells*; IMC) entwickeln. Im Blut und in den peripheren Organen reifen IMCs zu terminal differenzierten Effektorzellen, wie Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen, heran (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Dieser als Myelopoese bezeichnete komplexe biologische Prozess befindet sich dabei in einem stabilen Gleichgewicht, welches dafür sorgt, dass die Anzahl reifer Mono- und Granulozyten kontinuierlich aufrechterhalten wird (Schultze et al., 2019; Velten et al., 2017). Starke akute Entzündungsprozesse führen zu einer verstärkten Mobilisierung immunologischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, um dem gesteigerten Verbrauch am Entzündungsherd entgegenzuwirken (Ueda et al., 2005). Während dieser Notfall-Myelopoese (engl. *emergency myelopoiesis*) stimulieren pro-inflammatorische Si-

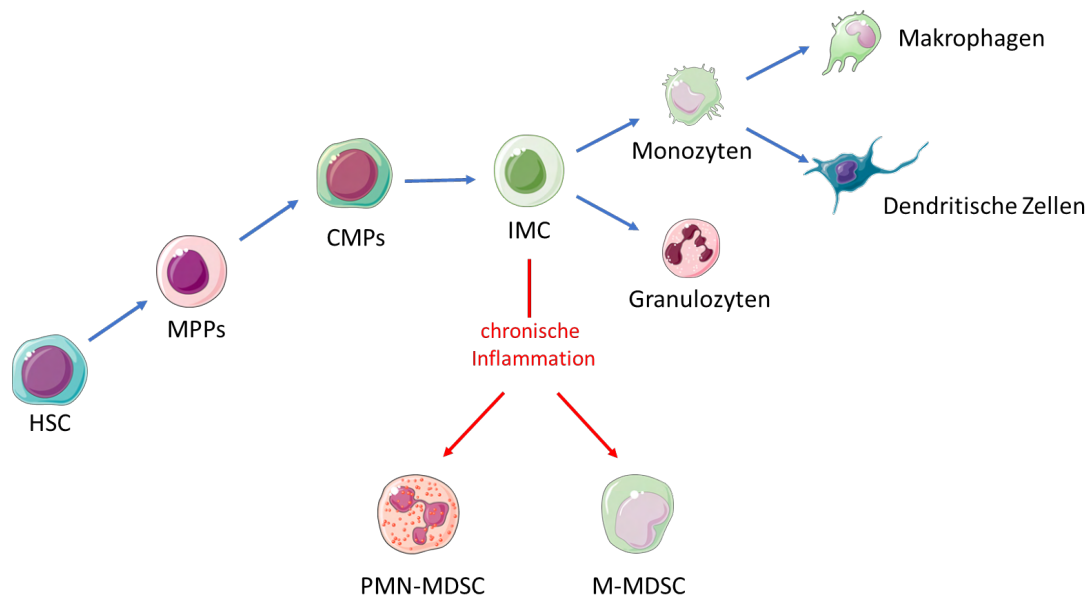


Abbildung 1.3: Ontogenese myeloider Suppressorzellen (MDSCs). Unter physiologischen Bedingungen differenzieren hämatopoetische Stammzellen (HSC) im Knochenmark über die Differenzierungsstadien der multipotenten (MPP) bzw. myeloiden Progenitorzellen (CMP) zu unreifen myeloiden Vorläuferzellen (IMC). Aus diesen entwickeln sich Neutrophile, Makrophagen und dendritische Zellen. Chronische Entzündungsprozesse bedingen eine aberrante Myelopoese, wodurch IMCs einem Differenzierungsblock unterliegen. Es kommt zur Akkumulation von MDSCs, die einen polymorphnukleären (PMN-MDSCs) oder monozytären (M-MDSCs) Phänotypen aufweisen können. Modifiziert nach (Groth et al., 2019; Tesi, 2019)

gnale wie Chemokine, Cytokine, Pathogen- oder Schaden-assoziierte spezifische Moleküle die verstärkte Differenzierung von HSCs und IMCs sowie die Aktivierung und Migration reifer Monozyten und Neutrophiler (Gabrilovich, 2017; Sica et al., 2019; Velten et al., 2017). In der Regel ist dieser Vorgang zeitlich terminiert und durch die Wiederherstellung der Homöostase geprägt (Veglia et al., 2019). Im Gegensatz dazu wird die myeloide Differenzierungsreihe bei persistierenden Entzündungsvorgängen wie z. B. bei Tumorerkrankungen, durch schwache aber chronisch aktive inflammatorische Signale moduliert (Nagaraj and Gabrilovich, 2007; Tcyganov et al., 2018; Veglia et al., 2019). Die unter diesen Umständen abnormal verlaufende Myelopoese ist gekennzeichnet durch einen Maturationsblock der IMCs, wodurch Zellen hervorgehen, die eine hohe Heterogenität, einen variablen Differenzierungsgrad sowie einen pathologischen Aktivierungszustand aufweisen (Bronte et al., 2016; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Tcyganov et al., 2018). Aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaft sowohl die angeborene als auch die adaptive Immu-

nabwehr immunsuppressiv zu beeinflussen, werden diese Zellen unter dem allgemeinen Namen MDSCs zusammengefasst (Gabrilovich et al., 2007).

1.4.2 Phänotypische Marker muriner MDSCs

Aufgrund des gut definierten Phänotyps muriner MDSCs werden in vielen Studien Tiermodelle zur funktionellen Untersuchung von MDSCs in Tumoren und Organen eingesetzt. Da sich murine von humanen MDSCs hinsichtlich der Expression zellulärer Markerproteine deutlich unterscheiden, ist es wichtig, diese im murinen Kontext klar zu definieren. Murine MDSCs sind durch die Co-Expression des myeloiden Differenzierungsmarkers Gr-1 (Glutathion-Reduktase) und des Zelladhäsionsmoleküls CD11b (Integrin α -M) einheitlich charakterisiert (Bronte et al., 1998; Kusmartsev and Gabrilovich, 2002). Im Knochenmark gesunder immunkompetenter Mäuse repräsentiert der Anteil an CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen 20-30 % aller normalen Knochenmarkzellen und 2-4 % aller Splenozyten (Ribechini et al., 2010). Das Antigen Gr-1 ist Maus-spezifisch und inkludiert zwei Epitope: Ly6C und Ly6G. Aufgrund der differentiellen Expression der beiden Marker Ly6C und Ly6G werden murine MDSCs dichotom klassifiziert. MDSCs mit monozytärem Phänotyp (M-MDSCs) sind mononukleär und definiert als CD11b⁺Ly6C⁺Ly6G⁻ Zellen mit niedrigem Seitwärtsstreulicht in der Durchflusszytometrie (*Side Scatter*; SSC). Polymorphnukleäre MDSCs (PMN-MDSCs) sind als CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{Int} Zellen mit ring-förmiger Kernmorphologie und hoher Granularität (hohem SSC) beschrieben, die in ihren phänotypischen Eigenschaften Neutrophilen ähneln (Bronte et al., 2016). Eine Expansion beider Subtypen ist unter pathologischen Bedingungen im Blut, im Knochenmark, in der Milz und in Tumoren beschrieben (de Veirman et al., 2015; Schlecker et al., 2012). Untersuchungen verschiedener Tumorentitäten zeigen hierbei, dass PMN-MDSCs mit einem Anteil von mehr als 70 % gegenüber M-MDSCs überwiegen (Kumar et al., 2016).

1.4.3 Expansion und Rekrutierung

Eine Expansion von MDSCs wird durch verschiedene Faktoren angeregt. Diese können vom Tumor selbst, von Zellen der TME oder von Stromazellen des Knochenmarks als Re-

aktion auf die vorherrschende chronische Inflammation sezerniert werden. Die konstante Abgabe inflammatorischer Stimuli bedingt hierbei eine Deregulation der normalen Myeloopoese und verstärkt die Konversion von IMCs zu MDSCs (Abb.1.3). Zu den beschriebenen Faktoren zählen häufig Wachstumsfaktoren, die an der Regulation der verschiedenen Differenzierungsstufen der Myeloopoese beteiligt sind. Dazu zählen beispielsweise der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), der Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF), der Stammzellfaktor (SCF) und Prostaglandin E2 (Neophytou et al., 2020; Zhao et al., 2016). Eine Bindung dieser Faktoren an korrespondierende Rezeptoren auf myeloiden Vorläuferzellen führt zur Aktivierung von Signalwegen, die den Transkriptionsfaktor STAT3 ansteuern (Gabilovich and Nagaraj, 2009; Gimeno and Barquinero, 2011). Dies bedingt sowohl die Förderung der Proliferation und des Zellüberlebens als auch eine verringerte Apoptose und unvollständige Differenzierung von IMCs (Gimeno and Barquinero, 2011; Ribechini et al., 2010; Veglia et al., 2019). Als Folge dieser Prozesse kommt es zur Expansion von IMCs, die funktionell aktive MDSCs ausbilden (Millrud et al., 2016). Sowohl für Patienten als auch für murine Tumormodelle ist eine Anreicherung von MDSCs im Knochenmark, im peripheren Blut und in extramedullären Organen (vornehmlich der Milz) beschrieben (Millrud et al., 2016). Unter dem Einfluss weiterer pro-inflammatorische Cytokine, Chemokine und transformierender Wachstumsfaktoren verstärkt sich das suppressive Potential akkumulierter MDSCs. Beispielsweise sind die Chemokine CXCL1 und CXCL2 für die Generierung von MDSCs des monozytären Phänotyps förderlich (Shi et al., 2018). Tumorzellen können Fibroblasten und Immunzellen zur Produktion MDSCs-expandierender und -aktivierender Faktoren veranlassen, die sich über auto- und parakrine Schleifen gegenseitig stimulieren und so die abnorme hämatopoetische Signatur aufrechterhalten (Umansky et al., 2016). Neben den Faktoren, die eine MDSC-Expansion anregen, sind zahlreiche Chemokine beschrieben, die eine gezielte Rekrutierung von MDSCs in das Tumorstroma bewirken. CCL2 und CCL5 zählen zu den Chemokinen, die am häufigsten mit der Migration von MDSCs in Verbindung gebracht wurden (Kumar et al., 2016). Entsprechend zeigt das Tumorgewebe von Brust-, Ovarial-

und Magenkrebs-Patienten in *in vitro* Analysen eine erhöhte CCL2 Sekretion im Vergleich zu gesunden Kontrollgeweben (Huang et al., 2007). Weiterhin ist die Sekretion von CXCL17, CXCL12, CCL7 und CXCL8 im Zusammenhang mit der Rekrutierung von unreifen myeloiden Zellen beschrieben (Kumar et al., 2016; Matsui et al., 2012). Zusammenfassend muss jedoch berücksichtigt werden, dass die an der Expansion und Rekrutierung von MDSCs beteiligten Faktoren nicht spezifisch einer Tumorentität zuordenbar sind und überlappende und redundante Funktionen einnehmen können.

1.4.4 Nicht-immunologische Aktivität von MDSCs

Neben ihrem Beitrag zur Etablierung einer immunsuppressiven TME durch Unterdrückung der adaptiven und angeborenen Immunabwehr üben MDSCs nicht-immunologische Funktionen aus (Fleming et al., 2018). Durch verstärkte Sekretion der Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9) tragen MDSCs zur proteolytischen Umstrukturierung von Bestandteilen der ECM bei, was die Migration von Tumorzellen aus dem Gewebeverband und somit den weiteren Invasionsprozess fördert (Lee et al., 2018; Mabuchi et al., 2021). Von MDSC stammende Mediatoren, wie der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. *basic fibroblast growth factor*, bFGF) und VEGF, tragen durch Förderung der Angiogenese zur Tumervaskularisierung bei (Murdoch et al., 2008). Weitere Studien zeigen, dass von MDSC abgeleitete Faktoren in potentiellen Metastasenorganen die Ausbildung von lokalen Mikroumgebungen schaffen, die eine spätere Ansiedlung und das Auswachsen von Tumorzellen begünstigen (pre-metastatische Nische) (Wang et al., 2019a). Für verschiedene Tumorentitäten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass MDSCs Stammzell-ähnliche Eigenschaften induzieren können, was mit einer erhöhten Toleranz der Tumorzellen gegenüber chemotherapeutischen Interventionen verbunden ist (Cui et al., 2013a; Mabuchi et al., 2021; Peng et al., 2016; Wang et al., 2019b).

1.4.5 MDSCs als therapeutisches Ziel

Therapeutische Interventionen, die spezifisch MDSCs als Zielstrukturen anvisieren, sind für verschiedenste Tumorarten beschrieben (Holmgaard et al., 2016; Sharma et al., 2012;

Stromnes et al., 2014; Yu et al., 2013). Hierbei stehen folgende Strategien im Fokus:

1. Regulation der Myelopoese bzw. Inhibition der MDSC-Entwicklung im Knochenmark
2. Blockade der MDSC-Rekrutierung und -Infiltration ins Tumorgewebe
3. Inhibition der immunsuppressiven Aktivität

Generell kann eine Reduktion der MDSC-Anzahl durch eine Normalisierung der Myelopoese oder durch Eingriff in die MDSC-Formation erzielt werden. Letzteres impliziert, dass entweder die MDSC-Reifung auf Ebene der IMCs gestoppt oder deren Differenzierung zu reiferen myeloiden Zellen vorangetrieben wird. Das Vitamin-A Derivat all-trans-Retinsäure (ATRA) zeigte in klinischen Studien entsprechende Wirksamkeit. Die Bindung von ATRA an den Retinsäure-Rezeptor blockt eine weitere Signaltransduktion, was die Differenzierung von MDSCs zu Makrophagen und DCs induziert (Heine et al., 2017; Nefedova et al., 2007). Eine Reduktion zirkulierender MDSCs durch die kombinierte Gabe von ATRA und IL-2 bzw. einer Vakzine mit p53-transduzierten dendritischen Zellen ist in Patienten mit metastasiertem Nierenkarzinom und Patienten mit kleinzelligem Bronchiolalkarzinom im Spätstadium beobachtet worden (Iclozan et al., 2013; Mirza et al., 2006). In weiteren klinischen Studien ist die reduzierte Bildung reifer MDSCs als positive Nebenwirkung von 5-Fluorouracil, Gemcitabin und Sunitinib beschrieben (Draghiciu et al., 2015; Eriksson et al., 2016; Vincent et al., 2010). Da das eigentliche Wirkungsfeld von MDSCs innerhalb der TME liegt, stellt die Blockade der MDSC-Migration und Rekrutierung ein weiteres klinisches Angriffsziel dar. Als MDSC-attrahierende Chemokine sind u.a. CCL2 und CCL5 beschrieben (Fleming et al., 2018). Der Einsatz von CCL2- und CCL5-Rezeptor-Antagonisten reduziert die Rekrutierung von MDSCs und beeinflusst das Tumorwachstum und die Invasivität in murinen Modellen positiv (Ban et al., 2017; Flores-Toro et al., 2020; Wang et al., 2018; Li et al., 2017a). Die Präsenz von MDSCs im Tumor führt zu einer unterdrückten anti-tumorigenen Immunantwort und favorisiert eine pro-inflammatorische TME, die begünstigend für das Tumorwachstum ist. Diese immunsuppressive Aktivität

von MDSCs wird von einer Vielzahl an Mediatoren vermittelt, die als potentielle therapeutische Angriffsziele fungieren können. Hierzu zählen Arginase-1 (ARG1) und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase 2 (iNOS), die Stickstoffmonoxid (NO) generiert. Als Bestandteil des Harnstoffzyklus sind beide Enzyme an der metabolischen Umsetzung von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff beteiligt. Eine Reduktion des L-Arginin-Niveaus in Kombination mit erhöhten Harnstoff-Leveln in der TME inhibieren sowohl die Funktionalität als auch die Proliferation von anti-inflammatorischen T-Zellen (Dilek et al., 2012; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Rodríguez and Ochoa, 2008). In präklinischen Mausmodellen eingesetzte Inhibitoren der Phosphodiesterase-5 (Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil) reduzieren die Expression von ARG1 und iNOS, was zu einer Wiederherstellung der anti-tumorigenen Immunität führt (Meyera et al., 2011; Serafini et al., 2006). In Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (HNSCC) und metastasierendem Melanom bestätigt sich, dass eine Behandlung mit Tadalafil die Anzahl infiltrierender MDSCs und die tumor-spezifische Immunsuppressivität reduziert (Califano et al., 2015; Hassel et al., 2017). Ein weiterer Therapieansatz ist eine Blockierung des Transkriptionsfaktors STAT3, der die immunsuppressive Funktion von MDSCs forciert (Trovato et al., 2019; Vasquez-Dunddel et al., 2013). *In vitro* konnte für den STAT3-Inhibitor Galiella-Lacton gezeigt werden, dass eine durch Prostatakarzinom-Zelllinien induzierte Generierung von MDSCs unterbleibt (Hellsten et al., 2019). Des Weiteren zeigte sich, dass eine Behandlung mittels STAT3-gerichteter siRNAs die suppressive Funktion von aus HNSCC-Patienten isolierten MDSCs aufhob (Vasquez-Dunddel et al., 2013). Aufgrund der vielfältigen Interventionsmöglichkeiten werden MDSCs auch zukünftig ein wichtiges strategisches Ziel zur Behandlung von Krebspatienten sein. Die hohe Heterogenität dieser Population und das Zusammenspiel der zahlreichen pro-tumorigenen Effektor-Moleküle bilden dabei die zentralen Herausforderungen für die wissenschaftliche Forschung.

1.5 Xenogene Tiermodelle der Onkologie

Die Translation von Erkenntnissen aus Laborstudien in klinische Therapiestrategien ist ohne den Einsatz von Tierversuchen kaum möglich. Der wesentliche Vorteil in der Ver-

wendung von Mausmodellen zur Charakterisierung maligner Erkrankungen besteht darin, dass Krebszellen innerhalb einer Mikroumgebung bestehend aus Blutgefäßen, stromalen Zellen und infiltrierenden Zellen interagieren und kommunizieren können. Tumorzellen aus Monokulturen wachsen in einer weitestgehend konstanten Umgebung, im Normalfall ohne eine Interaktion zu anderen Zellarten und ohne den Einfluss eines wechselnden Nährstoff- oder Sauerstoffangebotes (Simons and Brayton, 2017). Diese Faktoren sind jedoch für die Untersuchung wesentlicher biologischer Vorgänge in Tumoren von Patienten zu berücksichtigen und können in ihrer Komplexität nicht allein durch bestehende *in vitro* Modelle abgebildet werden. Beim sog. xenogenen Modell weisen Zellspender und -empfänger eine unterschiedliche Spezieszugehörigkeit auf. Die subkutane oder intraperitoneale Injektion von humanen Tumor-Zellen aus *in vitro*-Kultursystemen ist hierbei eine mögliche Transplantationsform. Um immunitätsbedingte Abstoßungsreaktionen zu reduzieren, werden in xenogenen Versuchen Tiere eingesetzt, die aufgrund genetischer Veränderungen einen teilweise immundefizienten Hintergrund aufweisen. Tumore, die auf diese Weise entstehen, sind entsprechend als ein Mosaik bestehend aus humanen Tumorzellen und murinen Stromazellen anzusehen (Khanna and Hunter, 2005).

1.5.1 E-/P-Selektin-*knockout* im Tiermodell

Die Auswirkungen einer genetischen Ablation von Selektinen ist in zahlreichen Studien sowohl individuell als auch in Kombination für verschiedene Mausmodelle betrachtet worden. In besonderer Weise wirkt sich die Depletion von E- und P-Selektin auf die Extravasation von Immun- und Tumorzellen aus.

E-Selektin-defiziente (*Sele*^(-/-)) Mäuse weisen im Allgemeinen keine veränderte embryonale Entwicklung oder phänotypischen Auffälligkeiten auf (Labow et al., 1994). Bei lokalisierten inflammatorischen Stimuli ausgelöst durch Chemoattraktanten ist die Expression von E-Selektin für die Adhäsion von Leukozyten jedoch von Relevanz (Ley et al., 1998). In weiteren Inflammationsmodellen zeigte sich, dass die Rekrutierung von Leukozyten durch den alleinigen Verlust von E-Selektin nicht beeinflusst ist, jedoch ein Defekt in der Migrationsfähigkeit von Neutrophilen vorliegt, wenn die P-Selektin-Expression zusätzlich genetisch

oder durch Antikörpergabe blockiert wird (Bullard et al., 1996; Frenette et al., 1996; Labow et al., 1994). Dementsprechend hat die Gabe eines blockierenden Antikörpers gegen E-Selektin in Wildtyp-Mäusen keinen Effekt auf das Rollverhalten von Leukozyten, jedoch in P-Selektin-*knockout* (*Selp*^(-/-)) Mäusen. In Bezug auf die leukozytäre Anheftung werden E- und P-Selektine daher partiell redundante Funktionen zugeschrieben (Miyasaka, 1998). P-Selektin-defiziente Mäuse zeigen ebenfalls keine phänotypischen Defekte, weisen jedoch im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Anzahl an Neutrophilen im Blut auf (Mayadas, 1995). Eine Defizienz des P-Selektin-Gens reduziert in Peritonitis-Modellen im frühen Entzündungsprozess die Befähigung von Neutrophilen aus dem Blutstrom auszutreten und inhibiert das Rollen von Leukozyten auf Endothelien von Mesenterialvenolen (Mayadas et al., 1993). Während eine E- oder P-Selektin-Einzeldefizienz moderate Effekte *in vivo* zeigen, führt der kombinatorische *knockout* zu einem schwerwiegenderen Phänotypen (Bullard et al., 1996; Frenette et al., 1996). Mäuse mit diesem Selektin-Verlust weisen eine veränderte Hämatopoese und eine ca. vierfach erhöhte Anzahl an Leukozyten im peripheren Blut auf (Frenette et al., 1996). Zusätzlich wird eine Splenomegalie mit Anzeichen einer gesteigerten extramedullären hämatopoetischen Aktivität beobachtet (Frenette et al., 1996). Dies verdeutlicht, dass E- und P-Selektine nicht nur wichtige Mediatoren für die Rekrutierung von Leukozyten darstellen, sondern auch deren Expansion und Homöostase aktiv beeinflussen.

Neben immunologischen Prozessen ist die Expression von E- und P-Selektin auch für die Progression und Metastasierung von Tumorzellen von Bedeutung. Für eine erfolgreiche und dauerhafte Ansiedlung von Tumoren in der Peripherie sind spezifische Interaktionen zwischen Tumorzellen und Strukturen der Mikroumgebung notwendig, die die Adhäsion, Extravasation und das Auswachsen im Zielorgan unterstützen. Sowohl die Expression von E- und P-Selektin-Liganden, als auch die Fähigkeit zur Adhäsion an E- und P-Selektin ist für verschiedene humane Karzinome beschrieben (Dimitroff et al., 2005; Mannori et al., 1995; Starzonek et al., 2020; Stone and Wagner, 1993; Wicklein et al., 2013). In Xenograft-Modellen des humanen Mammakarzinoms (Stübke et al., 2012), Pankreaskarzinom (Gebauer et al., 2013), Kolonkarzinom (Köhler et al., 2010) sowie in einem

humanen Leukämiemodell (Wicklein et al., 2013) reduziert die E- und P-Selektin-Defizienz die Ausbildung von Spontanmetastasen. E- und P-Selektine scheinen jedoch für die metastatische Dissemination nicht ausschließlich bzw. nicht für alle Tumorentitäten gleichsam von Bedeutung zu sein. So können Xenografts humaner Prostatakarzinom- und Neuroblastomzellen auch bei E- und P-Selektin-Doppeldefizienz Metastasen ausbilden (Lange et al., 2014; Schwankhaus et al., 2014). Die gezielte Heraufregulation von Zelladhäsionsmolekülen, darunter Integrinen, deutet darauf hin, dass diese Tumorzellen einen Selektin-unabhängigen Mechanismus für die initiale Adhäsion bei der Extravasation nutzen.

1.6 Hypothese und Zielsetzung

Die Ausbildung von Metastasen stellt bis heute die häufigste Todesursache von Krebspatienten:innen da. Die mechanistische Aufklärung der Metastasierung von Tumoren zugrunde liegenden Prozesse steht daher im Fokus wissenschaftlicher Arbeiten am Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie. Innerhalb der Metastasierungskaskade ist die Extravasation von Tumorzellen aus dem Blutstrom ein besonders kritischer Schritt, der die Voraussetzung für eine erfolgreiche Etablierung von Fernmetastasen im Zielorgan schafft. Es ist bekannt, dass Tumorzellen bei der Transmigration der endothelialen Barriere Zelladhäsionsmoleküle nutzen, die auch bei der Adhäsion von Leukozyten beschrieben sind (s. Abschnitt 1.2). Entsprechend dieser Abläufe vermitteln Selektine eine initiale Anheftung von Tumorzellen an das Endothel, welche durch eine anschließende Bindung über Integrine weiter verstärkt wird (Strell and Entschladen, 2008). In umfangreichen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte für die Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 ein Metastasierungsprozess aufgezeigt werden, der in Xenograft-Modellen unabhängig von der Expression endothelialer Selektine (E- und P-Selektin) verlief (Lange et al., 2014). Da neben Selektinen auch Integrine als Adhäsions-vermittelnde Moleküle fungieren, wurde im weiteren Verlauf deren Expression mit Hinblick auf das metastatische Potential von Prostatakarzinom-Zelllinien untersucht. Die hoch metastatische PC-3 Tumorzelllinie zeigte im Vergleich zu Zelllinien mit schwächerem Metastasierungspotential eine gesteigerte Expression des ITGB4. Weiterführende Untersuchungen zur Bedeutung

von ITGB4 für die Metastasierung erfolgte mittels ITGB4-depletierter PC-3 Tumorzellen in Selektin-kompetenten und Selektin-defizienten Mäusen. Unabhängig von potentiellen Effekten auf die Metastasierung konnte in Selektin-kompetenten Mäusen in erster Linie eine signifikante Verzögerung des Primärtumorwachstums nach ITGB4-Depletion beobachtet werden. In Versuchsgruppen mit E-/P-Selektin-Doppeldefizienz resultierte der gleichzeitige Verlust von ITGB4 auf PC-3 Tumorzellen in einer fast vollständigen Inhibition des Tumorwachstums, während der E-/P-Selektin-Doppel-*knockout* allein keinen Einfluss auf das Wachstum von Kontroll-Tumorzellen hatte. Diese synergistische Wachstumsinhibition zeigte sich darüber hinaus Tumorentitäten-übergreifend auch für die humane Pankreaskarzinom-Zelllinie PaCa5061 und die Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3. Daraus abgeleitet wurde die Hypothese entwickelt, dass dieser Effekt auf einen gemeinsamen molekularen Mechanismus zurückführbar sein könnte. Die Aufklärung der durch die ITGB4- und E-/P-Selektin-Depletion verursachten Wachstumsinhibition in humanen Karzinomen war daher Zielsetzung dieses Promotionsprojektes. Dabei wurde verstärkt adressiert, ob die immunologische Zusammensetzung der Tumormikroumgebung durch den Verlust von ITGB4 aktiv moduliert und durch Fehlen endothelialer Adhäsionsmoleküle beeinflusst wird.

2 Material

2.1 Versuchstiere

Tabelle 2.1: Versuchstiere. B6 = C57BL/6, tm = *targeted mutation*

Mauslinie	internationale Bezeichnung	Züchter
$pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$	B6.129S6- $Pfp^{tm1Clrk}$ - $Rag2^{tm1Fwa}$ N12	Taconic, Germantown, USA
$pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Sele $^{-/-}$	B6.129S6- $Pfp^{tm1Clrk}$ - $Rag2^{tm1Fwa}$ N12 /C.129S2(B6)-Sele tm1Hyn /J	eigene Zucht
$pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Selp $^{-/-}$	B6.129S6- $Pfp^{tm1Clrk}$ - $Rag2^{tm1Fwa}$ N12 /C.129S2(B6)-Selp tm1Hyn /J	eigene Zucht
$pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Sele $^{-/-}$ Selp $^{-/-}$	B6.129S6- $Pfp^{tm1Clrk}$ - $Rag2^{tm1Fwa}$ N12 /C.129S2(B6)-Sele tm1Hyn Selp tm1Hyn /J	eigene Zucht

Die Mauslinien $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$, $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Sele $^{-/-}$, $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Selp $^{-/-}$ und $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Sele $^{-/-}$ Selp $^{-/-}$ werden in den folgenden Abschnitten als pfp/rag2, Sele, Selp und Select abgekürzt.

2.2 Zelllinien

2.2.1 Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3

Die humane Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 (erworben von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig) wurde ursprünglich aus der Fernmetastase (Knochenmark) eines Prostataadenokarzinoms eines 62-jährigen männlichen Patienten generiert (Kaighn et al., 1979). PC-3-Zellen weisen ein Androgen-unabhängiges Wachstumsverhalten auf und zeigen ein hohes Metastasierungspotential. Unter Kulturbedingung wachsen PC-3-Zellen als adhärenente Monolayerkultur.

2.2.2 Pankreaskarzinom-Zelllinie PaCa5061

Die humane Pankreasadenokarzinom-Zelllinie PaCa5061 entstammt dem Primärtumorge- webe eines 63-jährigen männlichen Patienten nach erfolgter totaler Pankreatikoduodenek- tomie, durchgeführt am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Kalinina et al., 2010). In konventioneller Zellkultur bilden PaCa5061-Zellen adhärenente Kolonien mit polygonaler Morphologie aus.

2.2.3 Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3

Die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3 (erworben von ATCC, Rockville, USA, No. HTB-77) wurde aus der malignen Aszites-Flüssigkeit einer 64-jährigen weiblichen Pati- entin mit diagnostiziertem Ovarialkarzinom etabliert (Fogh et al., 1977). SKOV3-Zellen zeigen in Zellkultur ein adhärentes Wachstumsverhalten.

2.2.4 Zellkulturmedien

Tabelle 2.2: Zellkulturmedien. Alle Herstellerangaben sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen.

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium	RPMI 1640 Medium
Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3	10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
Kulturmedium	McCoy's 5A Medium
Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3	10 % FCS 1 % L-Glutamin (200 mM) 1 % Penicillin/Streptomycin
Kulturmedium	RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™
Pankreaskarzinom-Zellline PaCa5061	10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 50 nmol/ml Transferrin

Medium	Zusammensetzung
	0,01 µg/ml Insulin
	0,01 µg/ml rhFGF
	0,01 µg/ml EGF
Makrophagen-Kulturmedium	RPMI 1640 Medium 20 % humanes Serum

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Aspirations-Pipette 2 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Blutentnahmeröhrchen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Dispenser-Spitzen 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde
ELISA-Platten Nunc MaxiSorp™	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
ELISA-Platten-Siegel	R&D-Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Feindosierungsspritzen Omnifix®-F 1 ml	B.Braun, Melsungen
HistoBond Objektträger®	Marienfeld Superior™, Lauda-Königshofen
Immobilon®-P PVDF-Membran 0,45 µm	Merck KGaA, Darmstadt
Injektionskanüle Microlance 3 26 G	BD Bioscience, Heidelberg
Kryoröhrchen 1.8 mL Nunc™	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
MACS-Säule (Typ LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Membranfilter 0,22 µm	Merck KGaA, Darmstadt
Nitrozellulosemembran 0,45 µm	Santa Cruz Biotechnologie, Dallas, USA
Pipettenspitzen extra long 1250 µL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen lose 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen <i>low retention</i> 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Eppendorf, Hamburg
Reagenzreservoir	VWR, Darmstadt
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen für die Durchflusszytometrie 3,5 mL, 5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Skalpellklinge	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen
Whatman-Filterpapier	GE Healthcare, Chicago, USA
Weißkappenröhrchen 30 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellkulturplatte 6-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte 96-Well F-Boden	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellschaber 25 cm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellsieb 40 µM	BD Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

2.4 Chemikalien

Tabelle 2.4: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid 40 % (37,5:1)	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt

Bezeichnung	Hersteller
Antikörper-Diluent	Dako, Santa Clara, USA
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bovine Serum Albumin Fraction V	GE Healthcare, Chicago, USA
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
SuperSignal TM West Pico Plus	
CORNING [®] Collagen I, <i>rat tail</i>	Discovery Labware, Inc., Bredford, USA
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt
Dispase [®]	Gibco [®] by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco [®] by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Eindeckmittel Eukitt [®]	O. Kindler GmbH, Freiburg
Eosin (Erythrosin B)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol absolut	Chemsolute, Renningen
Fixierungspuffer BD Cytifix TM	BD, Heidelberg
Formaldehydlösung 37 %	Merck KGaA, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FBS)	Gibco [®] by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Humanes EGF	PeproTech GmbH, Hamburg
Humanes Transferrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Bezeichnung	Hersteller
2-Hydroxyethylagarose	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun, Melsungen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Ketamidol [®] 100 mg/ml	WDT, Garbsen
Kollagenase aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
L-Glutamin 200 mM	Gibco [®] by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
McCoy's 5A Medium	Gibco [®] by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker, Deventer, NL
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ HP ₄ · H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Paraplast Plus (Paraffin)	McCormick Scientific, Richmond, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco [®] by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Poly-(2-Hydroxyethylmethacrylat)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Protein Inhibitor Cocktail (PIC)	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Puromycin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Quantikine ELISA Wash Buffer (25x)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
RBC Lysispuffer 10x	BioLegend, San Diego, USA

Bezeichnung	Hersteller
Rekombinantes humanes FGF2	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
RPMI 1640 Medium	Gibco® by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™	Gibco® by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (HCl) 2,0 mol/l	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Schwefelsäure	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Fluka, Steinheim
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
<i>Target Retrieval Solution 10x pH 6 (S1699)</i>	Dako, Santa Clara, USA
<i>Target Retrieval Solution 10x pH 9 (S2367)</i>	Dako, Santa Clara, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Titriplex® III (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Trizma®-Base	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypanblau	Life technologies Corporation, Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA 0,05 %	Gibco® by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Tween®20	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Xylazin 20 mg/ml	WDT, Garbsen

2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.5: Puffer und Lösungen. Alle Herstellerangaben sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen.

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Citrat-Puffer	A.dest. 10 mM Citronensäure-Monohydrat pH 6
Kollagen I-Lösung	A.dest. 3 mg/ml CORNING [®] Collagen I, <i>rat tail</i> 1 % PBS (10x) 2 mM NaOH
PBS	A.dest. 13,7 mM NaCl 0,27 mM KCl 0,81 mM Na ₂ HPO ₄ 0,15 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,2-7,4
PBS (10x)	A.dest. 1,37 M NaCl 27 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PolyHema-Stock-Lösung	95 % Ethanol 120 mg/ml PolyHema
ELISA-Stopplösung	A.dest.

Puffer/Lösungen

Zusammensetzung

1 M H₂SO₄

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
ELISA-Blockpuffer	1x DPBS 1 % BSA
ELISA-Waschpuffer	1x Quantikine ELISA Wash Buffer
Erythrozytenlysepuffer	1x RBC Lysepuffer
FACS-Puffer	1x DPBS 1 % BSA 0,05 % NaN ₃
Formalin	A.dest. 0,1 M Na-Phosphatpuffer 37 % Formalin
MACS-Puffer	autoMACS [®] Rinsing Solution MACS [®] BSA Stock Solution 1:20
Na-Phosphatpuffer 0,2 M	A.dest. 160 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O 20 mM NaH ₂ HPO ₄ · H ₂ O
RIPA-Lysepuffer	A.dest. 65 mM TRIS 154 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Nonidet P40 0,1 % SDS 1 µM Natriumorthovanadat 1 % Protease Inhibitor Cocktail Set I pH 7,4
SDS-Ladepuffer (2x)	A.dest. 50 mM TRIS 0,3 M Saccharose

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
	1 M 2-Mercaptoethanol 4 % SDS 0,01 % Bromphenolblau
SDS-PAGE-Laufpuffer	A.dest. 250 mM TRIS 192 mM Glycin 0,1 % SDS
SDS-PAGE-Sammelgepuffer	A.dest. 0,5 M TRIS pH 6,8
SDS-PAGE-Trenngepuffer	A.dest. 1,5 M TRIS pH 8,8
Softagar-Stammlösung	DPBS 2,0 % 2-Hydroxyethylagarose
Tris-gepufferte Saline (TBS)	A.dest. 50 mM TRIS 150 mM NaCl pH 7,6
TBST	1x TBS 0,05 % Tween [®] 20
Tumor-Verdaumedium	RPMI Kulturmedium 1 mg/ml DNase I 2,4 U/ml Dispase 1 mg/ml Hyaluronidase 60 µg/ml Kollagenase

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Western Blot Blockpuffer	1x TBST 5 % Blotting-Grade Blocker (Milchpulver) oder 5 % BSA
Western Blot Transferpuffer	A.dest. 480 mM TRIS 390 mM Glycin 0,37 % SDS

2.6 Antikörper

2.6.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 2.6: Antikörper für die Durchflusszytometrie. APC = Allophycocyanin, BV = Brilliant Violet, Cy = Cyanin, PB = Pacific Blue, PerCP = Peridinin Chlorophyll

Epitop	Konjugat	Klon	Spezies	Hersteller	Konz. \ Verd.
CD11b	PB	M1/70.15	Ratte	Invitrogen	1 µg/ml
CD11c	APC	N418	Hamster (arm.)	BioLegend	1 µg/ml
CD16/CD32	-	93	Ratte	BioLegend	10 µg/ml
CD45	APC-Cy7	104	Maus	BioLegend	2 µg/ml
F4/80	PerCP	BM8	Ratte	BioLegend	2 µg/ml
Gr-1	BV711	RB6-8C5	Ratte	BioLegend	2 µg/ml
Integrin β 4	eFluor [®] 660	439-9B	Ratte	eBioscience	1µg/ml
Human TruStain FcX [™]	-	-	-	BioLegend	1:20

2.6.2 Antikörper für Western Blot

Tabelle 2.7: Antikörper für Western Blot. HRP = *horseradish peroxidase*, p= Phospho

Epitop	Konjugat	Spezies	Hersteller	Verd.
HSC70 (B-6)	-	Maus	Santa Cruz	1:1000
Integrin $\beta 4$	H-1	Maus	Santa Cruz	1:500
p-STAT1 (Y701)	-	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000
STAT1	-	Kaninchen	Sigma Aldrich	1:1000
anti-Kaninchen IgG	Schwein	HRP	Dako	1:4000
Sekundärantikörper				
anti-Maus IgG	Ziege	HRP	Dako	1:4000
Sekundärantikörper				

2.6.3 Antikörper für die Immunhistologie

Tabelle 2.8: Antikörper für die Immunhistologie.

Epitop	Reaktivität	Klon	Spezies	Hersteller	Verd.
CD45	Maus	30-F11	Ratte	BD Bioscience	1:25
CD45	Mensch	2B11+PD7/26	Maus	Dako	1:50
Ly6G	Maus	-	Kaninchen	MyBioSource	1:100
IgG2b	Isotypkontrolle	RTK4530	Ratte	BioLegend	1:400
IgG1	Isotypkontrolle	-	Maus	Invitrogen	1:140
IgG	Isotypkontrolle	-	Kaninchen	abcam	1:1389

2.7 Assays und Kits

Tabelle 2.9: Assays und Kits

Assay/Kit	Hersteller
Annexin V-FITC Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Human CCL2 DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human CCL5 DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human CXCL1 DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human CXCL2 DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human CXCL10/IP-10 DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human CXCL17 ELISA kit	CUSABIO TECHNOLOGY LLC, Houston, USA
Human GM-CSF DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human VEGF DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Kompensationspartikel-Set (anti-Rat/anti-Hamster)	BD Biosciences, San Jose, USA
Kompensationspartikel-Set (anti-Maus)	BD Biosciences, San Jose, USA
<i>Myeloid-Derived Suppressor Cell Isolation Kit, mouse</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Permanent AP Red Kit	Zytomed, Berlin
Pierce TM BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Protease Inhibitor Cocktail Set I	Calbiochem, Darmstadt
Vectastain ^R ABC-AP Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Zombie Green TM Fixable Viability Kit	BioLegend, San Diego, USA

2.8 Laborgeräte

Tabelle 2.10: Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe Integra Vacusafe	Integra Biosciences GmbH, Biebertal
Analysenwaage AUW220	SHIMADZU Scientific Instruments, Kyōto, Japan
BD LSRFortessa™	BD, Heidelberg
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hanau
CoolCell® Einfrierbox	Biocision, San Rafael, USA
CyFlow® Cube 8	Partec, Görlitz
Dampfsterilisator Varioklav®	HP Medizintechnik GmbH, Ober- schleißheim
DIAS Microplate Reader MAX 002	Dynex Technologies, Chantilly, USA
Eisbereiter FM-120DE	Hoshizaki Denki K.K., Toyoake, Japan
Elektrophorese Powersupply EV243	Topac Inc., Cohasset, USA
ELISA-Reader FLUOStar Omega BMG	Labtech, Ortenberg
Färbeautomat Shandon Varistain™ 24-4	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Gewebeinfiltrationsautomat TP1020	Leica Biosystems, Nußloch
Image-System Fusion Solo S	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Laborwaage Mettler PJ3000	Mettler Toledo, Columbus, USA
LightCycler®480 II	Roche, Basel, Schweiz
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Mehrkanalpipette 300 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikroplatten-Washer Hydro Flex	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Mikroskopkamera Erc 5s	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikrotom MICROM HM 430	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Mikrozentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA

Bezeichnung	Hersteller
Mini-Protean [®] 3 Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-Protean [®] Glasplatten	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-Zentrifuge ROTILABO [®]	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NanoSight LM14	Malvern Instruments, Malvern, GBR
Neubauer-Zählkammer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Optima L-100 XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 35	Carl Zeiss, Oberkochen
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Columbus, USA
Pipetten Research Plus, 5000 µl, 1000 µL, 100 µL, 10 µL, 2,5 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetus [®] Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Rollenmischer RM 5	Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Rhön
Schüttelofen	Amersham Biosciences, Freiburg
Schütteltisch REAX 3	Heidolph, Schwabach
Sterilwerkbank HeraSafe	Heraeus, Hanau
Thermoschüttler HLC	DITABIS AG, Pforzheim
Tischzentrifuge Universal 320	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Universal 320 R	Hettich, Tuttlingen
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortexer MS2 Minishaker	IKA Werke, Staufen
Wärmeschrank	BINDER Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasser-Destillierapparat G7749	Miele & Cie. KG, Gütersloh

2.9 Software

Tabelle 2.11: Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Acrobat Reader DC	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
AxioVision Rel. 4.7.2	Carl Zeiss, Oberkochen
BD FACS Diva Software 6.1	BD Biosciences, San Jose, USA
FlowJo v10	FlowJo, LLD, Ashland, USA
GraphPad Prism 5	Graph Pad Software Inc., San Diego, USA
ImageJ (Version 2006.02.01)	Wayne Rasband, public domain
Mendeley Desktop	Mendeley, Inc., New York, USA
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MiKTeX 2.9.7350	Christian Schenk, www.miktex.org
NanoDrop 1000 3.8.1	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
netScope [®] Viewer Pro	Net-Base Software GmbH, Freiburg
Revelation 4.21	Dynex Technologies, Chantilly, USA
TeXnic Center	www.TeXnicCenter.org
ZEN 2.3 slidescan	Carl Zeiss, Oberkochen

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien wurde die Integrin $\beta 4$ -Expression durch einen shRNA-vermittelten Gen-*Knockdown* herunterreguliert. Die Generierung und Validierung von Kontroll- (shControl) und ITGB4-*knockdown*- (shITGB4) Tumorzellen erfolgte durch das Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie. Diese Tumorzelllinien wurden freundlicherweise für diese Studie zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Standardkulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen an einer Raumwerkbank in Laborbereichen der Sicherheitsstufe S1 statt. Die Kultivierung erfolgte in sterilen Zellkulturflaschen bzw. Zellkulturschalen im Inkubator bei 37 °C und wassergesättigter Atmosphäre unter 5 % CO₂-Beimischung. Die Zusammensetzung des Kulturmediums variierte in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie (s. Tabelle 2.2). Bei transduzierten Zelllinien wurde zusätzlich Puromycin in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zum Medium hinzugefügt. Zelldichte und Morphologie wurden in regelmäßigen Abständen mikroskopisch kontrolliert.

3.1.2 Subkultivierung adhärenter Tumorzellen

Die Subkultivierung erfolgte bei einer Konfluenz von 80-90 % ein- bis zweimal wöchentlich. Hierzu wurden die Zellen nach Entfernen des verbrauchten Kulturmediums mit DPBS gewaschen und durch Zugabe eines geeigneten Volumens Trypsin/EDTA enzymatisch von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde in Abhängigkeit vom weiteren Verwendungszweck in Kulturmedium verdünnt und ausgesät.

3.1.3 Kryokonservierung von Tumorzellen

Für die Langzeitaufbewahrung wurden Tumorzellen einer T75-Zellkulturflasche entsprechend Abschnitt 3.1.2 trypsiniert, durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, RT) pelletiert und in 5 ml CryoSafe I-Einfriermedium resuspendiert. Kryoröhrchen mit je 1 ml Zellsuspension wurden in CoolCell[®]- Einfrierboxen bei -80 °C für 24 h eingefroren. Die weitere Aufbewahrung erfolgte in Tieftemperaturtanks mit flüssigem Stickstoff.

3.1.4 Revitalisierung kryokonservierter Tumorzellen

Zur Revitalisierung kryokonservierter Tumorzelllinien wurden diese bei 37 °C im Wasserbad unter leichtem Schwenken aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen in eine mit 5 ml vorgewärmten Kulturmedium befüllte T25-Zellkulturflasche überführt und unter Standardkulturbedingungen (s. Abschnitt 3.1.1) weiter kultiviert. Bei allen durchgeführten Experimenten wurden Zellen verwendet, die zuvor mindestens dreimal subkultiviert wurden.

3.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl von Zellsuspensionen wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Differenzierung vitaler und nicht vitaler Zellen, wurden zuvor 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt. Die Anzahl lebender Zellen ergab sich aus der Berechnung folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl Großquadrate}} \cdot \text{Kammerkonstante} (10^4)$$

3.1.6 PolyHema-Beschichtung von Zellkulturflaschen

Zur Beschichtung von Zellkulturflaschen (T75) wurden 4 ml der mit 95 % Ethanol im Verhältnis 1:10 verdünnten PolyHema-Stock-Lösung auf die Flaschen pipettiert und der Alkoholanteil bei 37 °C über 48 h vaporisiert. Auf diese Weise beschichtete Zellkulturflaschen wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.1.7 Herstellung von konditionierten Medien (CM)

Zur Gewinnung von konditionierten Zellkulturüberständen (*conditioned media*, CM) wurde aus 70-80 % konfluenten T75-Zellkulturflaschen das serumhaltige Kulturmedium abgenommen und die Zellen gründlich mit DPBS gewaschen, um Serumrückstände zu entfernen. Im Anschluss wurden die Zellen in 4 ml serumfreiem Kulturmedium für 24 h kultiviert, der Überstand geerntet und durch Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, RT) von Zellbestandteilen befreit. Aliquots zu je 500 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. CM, die für den 3D Invasion-*assay* mit humanen Makrophagen eingesetzt wurden, wurden aus serumhaltigem Kulturmedium gewonnen. Zur Herstellung von CM, welches zur Isolation von extrazellulären Vesikeln verwendet wurde, wurden Zellen in 15 ml serumfreiem Kulturmedium für 48 h kultiviert.

3.1.8 Isolation von extrazellulären Vesikeln

Zur Isolation von extrazellulären Vesikeln aus CM wurden die zu analysierenden Medien bei 4 °C aufgetaut und durch Filtration durch ein 0.22 µm Filter von Zellbestandteilen befreit. Extrazelluläre Vesikel wurden durch Ultrazentrifugation (100.000 g, 70 min bei 4 °C) pelletiert und in PBS aufgenommen. Sowohl Konzentration als auch Größe der Vesikel wurden am NanoSight LM14 nach Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:200 in PBS bestimmt. Die Datenauswertung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Dr. Franz Lennard Ricklefs und Mareike Holz (Klinik für Neurochirurgie; UKE).

3.1.9 Kolonienbildung von Tumorzellen in Softagar (*Softagar-assay*)

Um die Fähigkeit zur Kolonienformation von Tumorzellen in dreidimensionaler Kultur untersuchen zu können, wurden die Zellen in einer Softagar-Matrix (2-Hydroxyethylagarose) kultiviert (s. Abb. 3.1). Ausgehend von einer 2%igen Softagar-Stammlösung wurde durch Zugabe von Kultur- oder konditioniertem Medium eine 0,8%ige Basis hergestellt. Pro Well einer 24-Mikrotiterplatte wurde ein Gesamtvolumen von 250 µl eingesetzt und für 30 Minuten bei 4 °C auspolymerisiert. Auf die beschichteten Wells wurden weitere 250 µl

einer Tumorzellsuspension (600 Zellen/ml) mit einem Softagar-Anteil von 0,3 % pipettiert. Nach 20-minütiger Polymerisation bei 4 °C wurden die Zellen nach Standardkulturbedingungen kultiviert. Zur Versorgung der Zellen wurde nach drei Tagen 1 ml Kulturmedium oder konditioniertes Medium auf die Wells gegeben. Ein Wechsel des Mediums erfolgte einmalig nach weiteren fünf bis sieben Tagen. Anzahl und Durchmesser der Kolonien wurden mikroskopisch nach elf Tagen erfasst. Unter Verwendung der AxioVision-Software wurde der Durchmesser jeder Kolonie innerhalb des okularen Gesichtsfeldes bei 10-facher Vergrößerung gemessen und dokumentiert. Pro Well wurden insgesamt 9 okulare Gesichtsfelder mäanderförmig ausgewertet.

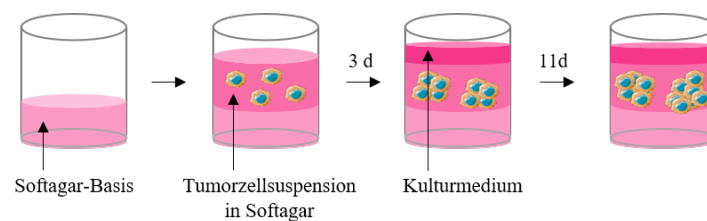


Abbildung 3.1: Schematischer Ablauf des Kolonienformations-*assay*. Auf die polymerisierte Softagar-Basis wurde eine Tumorzell-Softagar-Suspension aufgebracht. Nach dreitägiger Inkubation wurde die Matrix mit Medium überschichtet. Die finale Auswertung erfolgte an Tag 11.

3.1.10 Identifizierung apoptotischer Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Analyse apoptotischer Tumorzellen nach dreidimensionaler Kultur auf PolyHema beschichteten Zellkulturflaschen erfolgte mit dem Annexin V-FITC Kit der Firma Miltenyi Biotec entsprechend der Herstellerangaben. Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension wurde Tumorsphäroide für 20 min bei 37 °C in Trypsin-EDTA aufgeschlossen und die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt.

3.1.11 3D Invasion-*assay* mit humanen Makrophagen

Zur Messung der chemoattraktiven Potenz des CM wurde die sphärische Infiltration von humanen Makrophagen in dreidimensionaler Kultur untersucht. Die verwendeten primären humanen Makrophagen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Stefan Linder aus

dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des UKE zur Verfügung gestellt. Diese wurden zuvor durch Differenzierung humaner Monozyten, die aus dem Leukozytenfilm (*buffy coat*) von peripherem Spenderblut (Donoren) isoliert wurden, generiert (AG Prof. Linder). Für den Invasions-*assay* wurden humane Makrophagen in eine innere Matrix aus Kollagen I eingebettet, die wiederum von einer äußeren kollagenhaltigen Matrix geringerer Dichte umgeben wurde, welche das CM von Tumorzellen enthielt (s. Abb. 3.2). Für die Herstellung der inneren Matrix wurden 1×10^6 humane Makrophagen im Verhältnis 1:1 mit Kollagen I-Lösung (1,5 mg/ml) vermischt und je 100 μl auf die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte verteilt. Die Polymerisation erfolgte innerhalb von 60 min bei 37°C . Zur Beschichtung des Kulturbodens einer 24-Well-Mikrotiterplatte wurden äquivalente Volumina der Kollagen I-Lösung und des Makrophagen-Kulturmediums vermischt und 200 μl pro Well bei 37°C für 60 min polymerisiert. Im Anschluss wurde die Makrophagen-Kollagen-Matrix aus der 96-Mikrotiterplatte herausgelöst und mittig auf das beschichtete Well der 24-Mikrotiterplatte positioniert. Für die äußere Matrix wurde dem konditionierten Zellkulturüberstand bzw. dem Kontrollmedium 10 ng/ml M-CSF beigemischt und im Verhältnis 3:1 mit Kollagen I-Lösung (1,0 mg/ml) versetzt. Je 400 μl wurden auf die Makrophagen-Kollagen-Matrix pipettiert und erneut für 60 min bei 37°C polymerisiert. Zum Schutz vor Austrocknung wurden die präparierten Wells mit 400 μl Makrophagen-Kulturmedium bedeckt und bei 37°C inkubiert. Nach vierstündiger Inkubationszeit wurden pro Well vier mikroskopische Ausschnitte (10x Vergrößerung) der Invasionsfront gleichmäßig fotografiert und die Anzahl der ausgewanderten Makrophagen mittels der Software ImageJ (Version 2006.02.01) quantifiziert. Insgesamt wurden 16 Aufnahmen von zwei verschiedenen Donoren ausgewertet. Jeder der untersuchten Zellkulturüberstände wurde in vier technischen Replikaten gemessen.

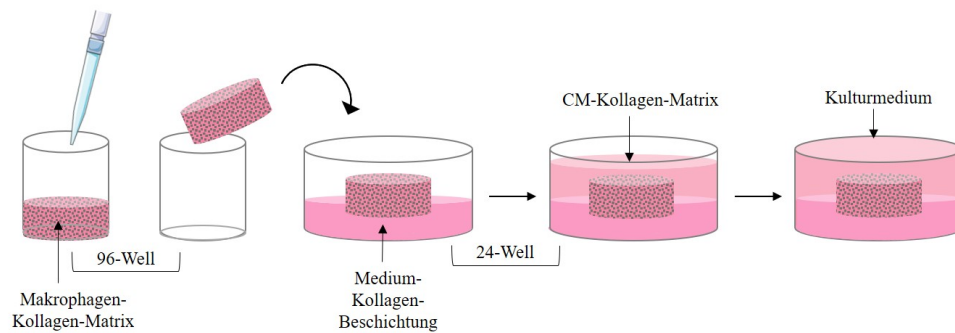


Abbildung 3.2: Schematischer Ablauf des 3D Invasions-assay mit humanen Makrophagen. Humane Makrophagen wurden in eine Matrix bestehend aus Kollagen I eingebettet und von einer weiteren Kollagen-Matrix umgeben, der konditioniertes Zellkulturmedium von adhärennten Tumorzellen beigemischt wurde. Anschließend wurde das Invasionsverhalten der Makrophagen in die äußere Matrix hinein im 3D Kontext analysiert.

3.1.12 Analyse der ITGB4-Expression auf Tumorzellen mittels

Durchflusszytometrie

Die Analyse von ITGB4 auf Tumorzellen erfolgte mit dem Durchflusszytometer CyFlow[®]Cube 8 von Partec. Hierzu wurden adhärennte Tumorzellen trypsiniert (s. Abschnitt 3.1.2) und je 1 ml der Zellsuspension in einem Reaktionsgefäß zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, RT). Das Pellet wurde in FACS-Puffer mit verdünntem Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem Antikörper resuspendiert und nach den jeweiligen Herstellerangaben inkubiert. Nach Waschen mit FACS-Puffer und erneuter Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, RT) wurde das Zellpellet in einer geeigneten Menge FACS-Puffer resuspendiert und zur Messung am Durchflusszytometer in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Differenzierung toter Zellen erfolgte durch simultane Färbung mit Propidiumiodid (1:100). Analoge Konzentrationen unspezifischer Immunglobulin-Isotypen dienten als Kontrollen für die Antikörperspezifität.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Gewinnung von Zelllysaten

Die Gewinnung von Zelllysaten für die Western Blot-Analyse erfolgte aus 80-90 % konfluenten Zellkulturflaschen. Hierzu wurde das Kulturmedium verworfen und die Zellen mit

DPBS gewaschen. Nach mechanischer Zellernte mittels Zellschabers wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C) und das Pellet in einem geeigneten Volumen RIPA-Puffer (s. Tab. 2.5) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch 30-minütige Inkubation auf Eis, wobei die Ansätze alle 10 min gevortext wurden, und abschließende Abzentrifugation (14000 rpm, 30 min, 4 °C) unlöslicher Zellbestandteile und Fragmente. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Proteinquantifizierung bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Quantifizierung von Proteinen aus Zellysaten

Die Proteinquantifizierung von gewonnenen Zellysaten erfolgte kolorimetrisch entsprechend den Herstellerangaben mit dem PierceTM BCA Protein Assay Kit. Die Methode basiert auf dem Bicinchinonsäure-Testverfahren (BCA) (Smith et al., 1985). Als Referenzprobe diente eine 2,0 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA)-Stammlösung, woraus mittels Verdünnung in RIPA-Lysepuffer eine Standardreihe (5-200 µg/ml) hergestellt wurde. Zellysate wurden in Verdünnungen von 1:100 und 1:200 als Triplikate gemessen. Die photometrische Detektion erfolgte auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte bei 550 nm.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die größenbasierte Auftrennung von Proteinen erfolgte nach der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (LAEMMLI, 1970). Extrahierte Proteine (25-30 µg) wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit SDS-Ladepuffer vermengt und im Thermoblock bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die Proteinproben sowie 10 µl Proteinstandard (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder) für die spätere Zuordnung der separierten Proteinbanden, wurden in die Taschen eines 5%-igen Sammelgels geladen. Die Acrylamidkonzentration des Trennegels variierte entsprechend der molekularen Größe des zu analysierenden Proteins. Die Elektrophorese erfolgte innerhalb einer vertikalen Gelelektrophoreseapparatur unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer bei 130 V für die Dauer von 90-120 min.

3.2.4 Proteintransfer mittels Western Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer mittels Western Blot auf eine Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membran. Der schematische Aufbau ist Abb.3.3 entnehmbar. Vor der Verwendung von PVDF-Membranen wurden diese für 5 min in Methanol aktiviert, anschließend für 5 min in bidest. Wasser gewaschen und in 1x Transferpuffer equilibriert. Nitrozellulose-Membranen ebenso wie Whatman-Filterpapiere wurden mit 1x Transferpuffer benetzt. Der Transfer erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 120 min.

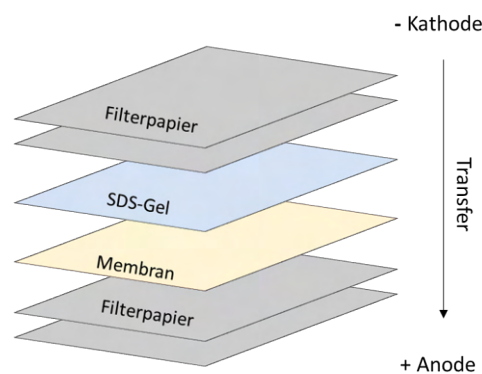


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau *semi-dry* Western Blot Transfer. Jeweils zwei in Transferpuffer äquilibrierte Filterpapiere umschließen die Membran mit dem darauf liegendem Gel. Der Proteintransfer erfolgt von der Kathode zur Anode.

3.2.5 Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für 5 min in TBST gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch die Inkubation in 5%igem Blockpuffer (60 min, RT) abgesättigt. Die jeweiligen primären Antikörper wurden in Blockpuffer verdünnt und über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf die Membran gegeben. Am nächsten Tag wurden überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen der Membran für jeweils 5 min mit TBST entfernt. Für die Detektion des Primärantikörpers wurde basierend auf dessen Spezifität ein Sekundärantikörper-Konjugat (*horseradish Peroxidase*, HRP) verwendet, welches verdünnt in Blockpuffer für 60 min bei RT auf der Membran inkubiert wurde. Nach erneutem dreimaligen Waschen für 5 min mit TBST erfolgte die Chemolumineszenz-Detektion unter Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates SuperSignal™ West Pico Plus am

Chemilumineszenz-Dokumentationssystem Fusion Solo S. Für die Immundetektion weiterer Proteine auf derselben Membran wurde die Membran für 5 min in TBST gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden entsprechend obiger Beschreibung durchgeführt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte fanden unter leichtem Schwenken der Membranen statt.

3.2.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Alle in dieser Arbeit verwendeten ELISA-Kits basierten auf dem Sandwich-ELISA-Verfahren (Engvall and Perlmann, 1971). Zur Quantifizierung der Chemokinsekretion von Tumorzellen wurden Zellkulturüberstände mittels ELISA-Kits der Firmen R&D Systems, BioLegend und IBL International untersucht. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.3 Immunhistologische Methoden

3.3.1 Herstellung von histologischen Präparaten

Für die immunhistologische Aufarbeitung erfolgte 24 h nach Formalinfixierung (s. Abschnitt 3.4.4) die Entwässerung und Paraffineinbettung des Gewebes im Gewebeeinfiltrationsautomaten. Aus den ausgehärteten Paraffinblöcken wurden 4 µm dicke Schnitte des Gewebes am Schlittenmikrotom erzeugt und auf HistoBond[®] Objektträger gezogen. Nach Trocknung über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank wurde das Gewebe vor der Färbung am Gewebefärbeautomaten Varistain[™] entparaffiniert und rehydriert (Xylol 2x 5 min, abs. Ethanol 3 min, abs. Ethanol 5 min, 96 % Ethanol 5 min, 70 % Ethanol 5 min, 50 % Ethanol 5 min, Aqua dem. 2x 2 min).

3.3.2 Anfärbung von Gewebeschnitten mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung)

Zur allgemeinen Beurteilung der Gewebemorphologie wurden nach Abschnitt 3.3.1 angefertigte Gewebeschnitte mit den Farbstoffen Hämalan und Eosin angefärbt. Die Färbung und Entwässerung erfolgte automatisiert am Gewebefärbeautomaten Varistain[™] (Hämalan 3 min, Aqua dem. 2 min, Leitungswasser 5 min, Eosin 3 min, A. dem. 30 sek, 70 % Ethanol 15 sek, 96 % Ethanol 30 sek, 96 % Ethanol 5 sek, abs. Ethanol 2x 5 sek,

Xylol 3x 5 sek). Nach Eindeckeln der Präparate mit Eukitt[®] und Trocknung über Nacht wurden diese lichtmikroskopisch begutachtet.

3.3.3 Giemsa-Anfärbung von MACS-separierten Zellen

Zur morphologischen Begutachtung MACS-separierter Zellen wurden Zytozentrifugenpräparate (Cytospins) angefertigt. Hierzu wurden je 200 µl der separierten Zellen auf Histo-Bond-Objektträger aufgebracht und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Cytospins über Nacht getrocknet. Im Anschluss erfolgte die Giemsa-Färbung für 2 min in 1:50 verdünnter Azur-Eosin-Methylenblaulösung nach Giemsa. Überschüssige Färbelösung wurde mit A.dest. abgewaschen und die Präparate in 70 % Ethanol für 2 min und 100 % Isopropanol 2x für 3 min entwässert. Nach Eindeckeln der Präparate mit Eukitt[®] und Trocknung über Nacht wurden diese lichtmikroskopisch begutachtet.

3.3.4 Immunhistologische Färbungen

Zur Visualisierung spezifischer Antigene wurden nach Abschnitt 3.3.1 hergestellte Gewebeschnitte mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Für die Epitop-Antigenrückgewinnung wurden die Gewebeschnitte in spezifischen Puffern erhitzt. Nach Abkühlung wurden die Schnitte in TBST (2x 5 min) sowie TBS (1x 5 min) gewaschen. Die Färbung der Gewebeschnitte erfolgte mit dem in Antikörper-Diluent verdünnten Primärantikörper bzw. der Isotypkontrolle für 1 h bei RT. Nach Waschen der Schnitte in TBST (2x 5 min) und TBS (1x 5min) erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 30 min bei RT. Nach erneutem Waschen (2x 5 min in TBST und 1x 5 min in TBS) erfolgte die Markierung des Sekundärantikörpers mit alkalischer Phosphatase über 30 min unter Verwendung des ABC-AP-Kits nach Herstellerangaben. Zur lichtmikroskopischen Visualisierung des Antigens wurden die Schnitte mit dem Permanent AP Red Kit inkubiert und die Farbreaktion in Leitungswasser (3 min) und A.dest. (1-2 min) unterbrochen. Die Zellkern-Gegenfärbung erfolgte in verdünntem Hämalaun für 5 sek und anschließendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Nach Entwässerung der Schnitte (s. Abschnitt 3.3.1) wurden diese in Eu-

kitt eingedeckelt und mikroskopisch begutachtet. Die spezifischen Färbeverfahren für alle verwendeten Antikörper sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Immunhistologische Färbeverfahren.

Epitop	Vorbehandlung	Entwicklung
anti-Maus CD45	S1699 pH 6, 2x 4 min Mikrowelle	Permanent AP Red Kit, 20 min
anti-Human CD45	Citratpuffer pH 6, 121 °C Drucktopf, 10 min	Permanent AP Red Kit, 9 min
anti-Maus Ly6G	S2367 pH 9, 121 °C Drucktopf, 10 min	Permanent AP Red Kit, 11 min

3.4 Tierexperimentelle Methoden

3.4.1 Tierhaltung

Die Tierhaltung und alle in dieser Arbeit durchgeführten Tierexperimente entsprachen den gesetzlichen Regelungen des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) und wurden entsprechend den Genehmigungsnummern G15/19 und G15/102 vom Hamburger Landesministerium für Gesundheit und Verbraucherschutz legitimiert. Alle Versuchstiere wurden in Einklang mit den Haltungsvorschriften in einem 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus, unter SPF-Bedingungen in IVCs (*individually ventilated cages*) in den Versuchstiereinrichtungen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten. Haltungsfutter und Wasser wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Alle Versuchstiere wurden mind. vierzehn Tage lang vor einem Versuch an die Haltungsumgebung akklimatisiert. Sofern nicht anders beschrieben, betrug das Mindestalter aller Versuchstiere acht Wochen.

3.4.2 Das $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Mausmodell

Die in dieser Arbeit verwendeten immundefizienten Mäuse (B6.129S6-Pfp^{tm1Clrk}-Rag2^{tm1Fwa}N12) wiesen einen kombinierten Defekt im pfp - und $rag2$ -Gen auf. Aufgrund einer Keimbahnmutation des Perforin (pfp)-Gens kommt es zu einer eingeschränkten Funktionalität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie zytotoxischer T-Lymphozyten (Walsh et al., 1994). Der $rag2$ -Immundefekt führt zu einer Defizienz des *recombination activating gene 2* ($rag2$), dessen Genprodukt essentieller Bestandteil der V(D)J-Rekombination zur Bildung reifer B- und T-Lymphozyten ist (Shinkai et al., 1992).

Durch Kreuzung von $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Mäusen mit E- bzw. P-Selektin-*knockout*-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) konnten zusätzlich folgende Mausmodelle generiert werden (Stübke et al., 2012): $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Mäuse mit E-Selektin-Defizienz ($pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Sele), P-Selektin-defiziente $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Mäuse ($pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Selp) und $pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Mäuse mit einer E-/P-Selektin-Doppeldefizienz ($pfp^{-/-}/rag2^{-/-}$ -Select).

3.4.3 Xenograft-Transplantation von humanen Tumorzellen

Sowohl shControl- als auch shITGB4-Zellen der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 sowie der Pankreaskarzinom-Zelllinie PaCa5061 wurden nach Standardkulturbedingungen kultiviert (s. Abschnitt 3.1.1) und für die folgende Transplantation vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst (s. Abschnitt 3.1.2). Mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Zellsuspension auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml mit serumfreien Kulturmedium verdünnt. Pro Versuchstier wurden 200 μ l der Zellsuspension subkutan oberhalb des rechten Schulterblattes injiziert. Der Eingriff erfolgte in Isofluran-Inhalationsnarkose. Im Anschluss wurde der allgemeine Gesundheitszustand der Tiere täglich visitiert und protokolliert. Zur Beurteilung des Allgemeinbefindens der Versuchstiere wurden klinische Anzeichen wie Habitus, Atmungsfrequenz, Zustand der Körperdecke, motorische Aktivität sowie Spontan- und Sozialverhalten herangezogen und in einem Scoring-System erfasst. Das Volumen subkutaner Tumore wurde durch Palpation und Vergleich mit einem Orchidometer (0.1 -1 cm³) bestimmt. Tumorumfänge von 1 cm³ oder äußere Anzeichen eines erhöhten Belas-

tungsgrades galten als Versuchsabbruchkriterien nach denen eine fachgerechte Euthanasie erfolgte. Bei Tierversuchen mit einem Zeitraum von 10 Tagen wurden äußere Anzeichen eines erhöhten Belastungsgrades als Abbruchkriterien herangezogen.

3.4.4 Blut-, Knochenmark- und Organentnahme

Bei Versuchsende oder Erreichen eines der Abbruchkriterien wurden die Versuchstiere durch eine Injektionslösung bestehend aus Ketamin (240 mg/kg KG) und Xylazin (32 mg/kg KG) final narkotisiert. Nach Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes erfolgte eine terminale Herzpunktion zur Gewinnung von ca. 800-1000 µl Blut. Das gewonnene Blut wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Vor der weiteren Organentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation euthanisiert. Für die Präparation der Organe wurde das Fell mit 70%igem Ethanol befeuchtet und die Haut durch einen Medianschnitt von caudal nach cranial inzidiert. Abdominal wurde die Milz entnommen. Die Milz wurde, sofern nicht für die Gewinnung von Einzelzellen vorgesehen, vollständig für die Histologie in 3,7%igem Formalin fixiert. Zur Isolierung von Zellen aus dem Knochenmark wurden Femur und Tibia beidseitig präpariert und an den Enden distal und proximal quer eröffnet. Das Knochenmark wurde mit 0,9%iger NaCl-Lösung ausgespült und bei 4 °C gelagert. Nach Inzision der Haut oberhalb von Xenograft-Tumoren wurde diese weitestgehend stumpf mobilisiert, entnommen, gewogen und entweder zur Gewinnung von Einzelzellen dissoziiert oder für histologische Untersuchungen fixiert.

3.4.5 Gewinnung von Einzelzellen aus Xenograft-Tumoren

Die Dissoziation von Xenograft-Tumoren erfolgte unmittelbar nach Entnahme (s. Abschnitt 3.4.4). Das Gewebe wurde hierfür in ein 6-Well mit 3 ml Tumor-Verdaumedium (s. Tab. 2.5) überführt und mittels einer Skalpellklinge mechanisch zerkleinert. Der enzymatische Verdau erfolgte bei 37 °C für 60 min im Schüttelofen. Nach der Inkubation wurden kleinere Gewebefragmente durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren weiter aufgeschlossen, die gewonnene Zellsuspension in ein Zellsieb (40 µm) überführt und der Durchlauf in

einem 50 ml Falconröhrchen aufgefangen. Im Zellsieb verbliebene Gewebereste wurden mit einem Spritzenstempel zerrieben. Zur Erhöhung der Zellausbeute wurde das Well der Zellkulturplatte und das Zellsieb mehrfach mit DPBS gespült und der Vorgang mikroskopisch kontrolliert. Nach Zentrifugation (550 g, 5 min, RT) und Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml DPBS resuspendiert und die Gesamtzellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (s. Abschnitt 3.1.5).

3.4.6 Gewinnung von Einzelzellen aus muriner Milz

Zur Vereinzelung von Zellen aus muriner Milz wurde das Organ, wie unter Abschnitt 3.4.4 beschrieben, entnommen und in DPBS auf Eis gelagert. Mittels Spritzenstempels wurde das Milzgewebe durch ein 40 µm Zellsieb passiert und das Homogenisat in einem 50 ml Falconröhrchen gesammelt. Im Zellsieb verbliebene Bindegewebsreste wurden gründlich mit DPBS gespült und die Zellsuspension durch Zentrifugation (400 g, 5 min, RT) pelletiert. Zur Lysierung von Erythrozyten wurde das Pellet in 5 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml DPBS gestoppt und die Zentrifugation (400 g, 5 min, RT) wiederholt. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 5 ml DPBS aufgenommen und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt (s. Abschnitt 3.1.5).

3.4.7 Gewinnung von Einzelzellen aus murinem Blut

Jeweils 400 µl Blut (s. Abschnitt 3.4.4) wurden zur Erythrozytenlyse mit 1 ml Erythrozytenlysepuffer versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (400 g, 5 min, RT) wurde das Pellet in 1 ml DPBS resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt (s. Abschnitt 3.1.5).

3.4.8 Gewinnung von Einzelzellen aus murinem Knochenmark

Die Generierung von Einzelzellen aus murinem Knochenmark erfolgte durch beidseitige Präparation von Femur und Tibia (s. Abschnitt 3.4.4). Ausgespülte Knochenmarkzellen wurden zentrifugiert (400 g, 5 min, RT) und das erhaltene Zellpellet zur Lysierung von

Erythrozyten in 1 ml Erythrozytenlysespuffer resuspendiert. Die Reaktion wurde nach einer Inkubationszeit von 5 min durch Zugabe von 10 ml DPBS gestoppt und die Zellsuspension durch ein 40 µm Zellsieb in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (400 g, 5 min, RT) wurde das Pellet in 2 ml DPBS resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer berechnet (s. Abschnitt 3.1.5).

3.4.9 Phänotypisierung von Immunzellen mittels Durchflusszytometrie

Die Identifizierung von Immunzellsubpopulationen in Knochenmark, Blut, Milzen und Xenograft-Tumoren erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse. Nach der Gewinnung von Einzelzellen wurde die Zellsuspension mit DPBS auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml verdünnt. Zur Bestimmung der Expression von Oberflächenmarkern wurden 100 µl der Zellsuspension entnommen und zur Lebend-Tod-Diskriminierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Zombie GreenTM für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit 1 ml FACS-Puffer (s. Tab. 2.5) und Zentrifugation (400 g, 5 min, RT) wurde das Pellet in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Zur Inhibition unspezifischer Antikörperbindungen erfolgte eine Fc-Rezeptor-Blockierung (Human TruStain FcXTM) für 10 min bei 4 °C. Im Anschluss erfolgte die spezifische Färbung der Zellen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper (s. Tabelle 2.6) für 15 min bei 4 °C. Der Wasch- und Zentrifugationsschritt wurden wiederholt und das Zellpellet durch Zugabe von 250 µl Fixierungspuffer über Nacht bei 4 °C fixiert. Am Folgetag wurde der Fixierungspuffer durch Waschen mit 1 ml FACS-Puffer und Zentrifugation (400 g, 5 min, RT) entfernt. Das gefärbte Zellpellet wurde in 450 µl FACS-Puffer aufgenommen und für die weitere Messung am BD LSRFortessaTM in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Datenauswertung und Darstellung erfolgte mit der Software FlowJo v10. Die Separation von positiv zu negativ gefärbten Zellpopulationen erfolgte anhand mitgeführter Fluoreszenz minus Eins (FMO)-Kontrollen.

3.4.10 Magnet-aktivierte Einzelzellseparation (MACS)

Die MACS-Separation von Gr-1^{Hi} Ly6G⁺ Zellen erfolgte nach Gewinnung von Einzelzellen aus murinen Milzen mit dem *Myeloid-Derived Suppressor Cell Isolation Kit* (Maus) der Firma Miltenyi Biotec entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.5 Statistische Datenanalyse

Zur statistischen Analyse der erhobenen Daten wurde die Software Graph Pad Prism 5.0 herangezogen. Die Ergebnisse sind, sofern nicht anders angegeben, als Säulen- und Streudiagramme mit Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Für die Evaluierung statistischer Signifikanz wurde bei zwei zu vergleichenden Versuchsgruppen der gepaarte oder ungepaarte t-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei Versuchen mit mehr als zwei Gruppen und nicht-parametrischer Datenverteilung erfolgte die statistische Analyse mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns Post-Test. Die Überlebenszeitanalyse erfolgte in Form von Kaplan-Meier-Kurven. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $< 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Überlebenswahrscheinlichkeiten nach Xenotransplantation von ITGB4-*knockdown*- und Kontroll-Tumorzellen in E- und/oder P-Selektin-defizienten pfp/rag2-Mäusen

Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe haben in verschiedenen Xenograft-Modellen gezeigt, dass shITGB4-Tumorzellen in einer E-/P-Selektin-defizienten Umgebung deutlich langsamer Tumore ausbilden und dies ein verlängertes Überleben der Versuchstiere bedingt. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob die synergistische Wachstumsinhibition durch E- oder P-Selektin allein vermittelt wird oder ausschließlich aus der Doppeldefizienz resultiert. Zur Untersuchung des Überlebens wurden pfp/rag2-Mäusen mit E- bzw. P-Selektin-Einzel-, E-/P-Selektin-Doppeldefizienz oder normalem Selektin-Status 10^6 shControl- bzw. shITGB4-Tumorzellen der Linie PC-3 s.c injiziert. Eine Tumorgroße von 1 cm^3 galt als primäres Abbruchkriterium. Vor Injektion wurde der ITGB4-*knockdown*-Status mittels Western Blot (Abb. 4.1, a) und Durchflusszytometrie (Abb. 4.1, b) sichergestellt. Die shITGB4-Select-Versuchsgruppe wies gegenüber allen anderen Versuchsgruppen erneut einen deutlichen Überlebensvorteil auf (Abb. 4.1, c). Bei Tieren dieser Gruppe konnte auch nach 279 Tagen (Zeitpunkt des Versuchsendes) keine Tumorentwicklung nachgewiesen werden. Während die Überlebenskurven von Selp- und pfp/rag2-Mäusen mit shITGB4-Tumoren einen ähnlichen Verlauf zeigten, wiesen Sele-Mäuse mit einer durchschnittlichen Überlebensspanne von 42 Tagen eine reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit auf. In Tieren mit shControl-Tumoren führte die E- oder P-Selektin-Einzel- oder Doppeldefizienz zu keinem Überlebensvorteil der pfp/rag2 -Tiere. Insgesamt zeigten die Resultate, dass shITGB4-Tumore in ihrer Fähigkeit zur Tumorzellkolonisation erst bei gleichzeitigen Vorliegen der E- und P-Selektin-Doppeldefizienz einer verstärkten Beeinträchtigung unterliegen und dies nicht auf eines der beiden Selektine allein zurückführbar ist.

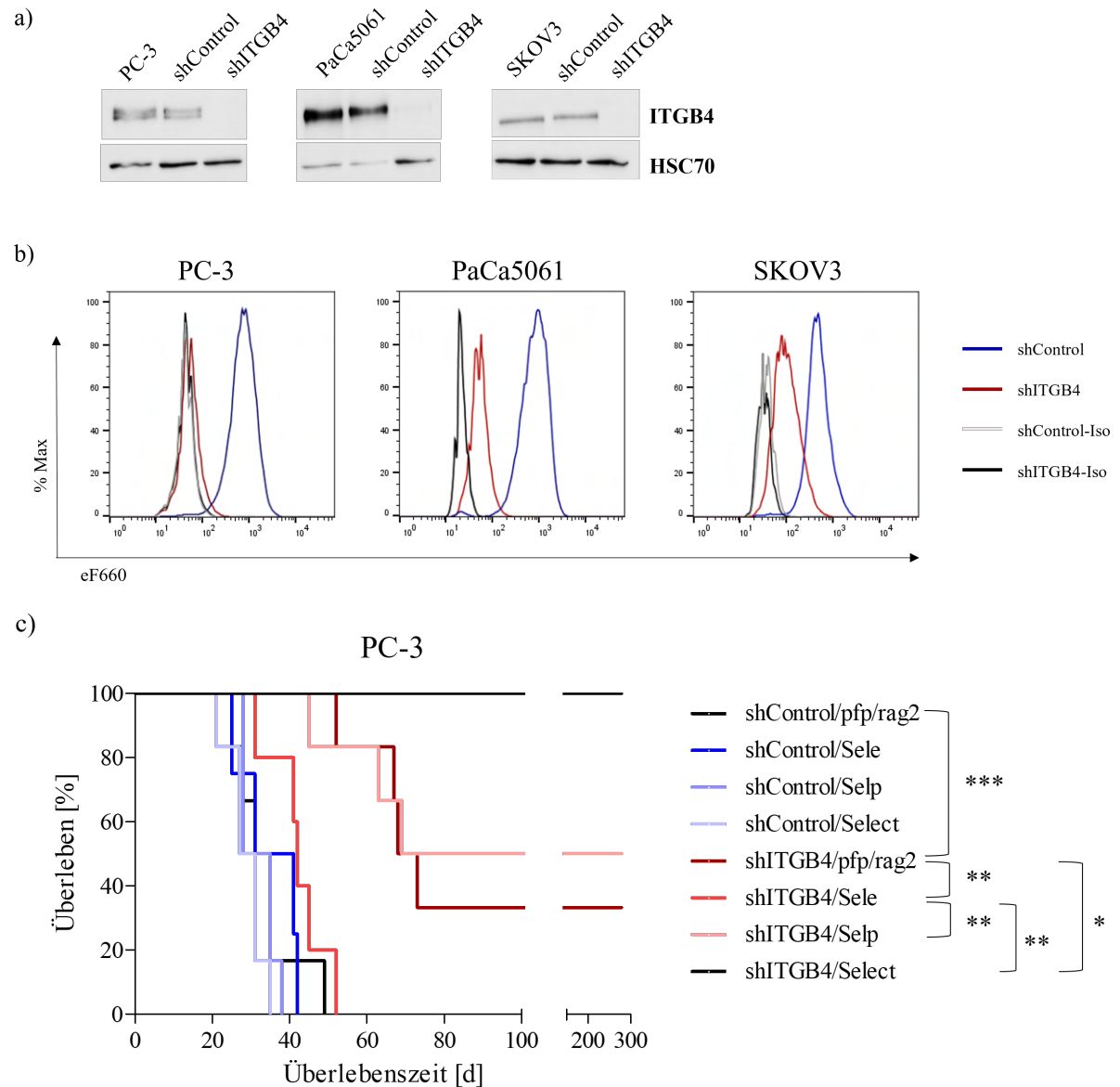


Abbildung 4.1: Analyse des ITGB4-knockdown-Status von Tumorzellen und Kaplan-Meier-Überlebenskurven. a) Repräsentative Western Blots der ITGB4-Expression (140 kDa) in Wildtyp, shControl- und shITGB4-Zellysaten der Tumorzelllinien PC-3, PaCa5061 und SKOV3. HSC70 (70 kDa) diente als Ladekontrolle. b) Durchflusszytometrische Analyse der ITGB4-Expression von shControl- und shITGB4-Tumorzellen der Linie PC-3, PaCa5061 und SKOV3. c) Überlebenszeit von pfp/rag2-, Sele-, Selp- und Select-Mäusen nach s.c. Injektion von 10^6 shControl bzw. shITGB4-Tumorzellen der Linie PC-3 ($n=6$ pro Versuchsgruppe; $n_{\text{shControl/Sele}}=4$). Eine Tumorgöße von 1 cm^3 galt als Abbruchkriterium. Versuchstiere, die aufgrund anderer Abbruchkriterien (schlechter allgemeiner Gesundheitszustand) aus dem Versuch genommen wurden, sind statistisch nicht erfasst. Statistik mittels Log-Rank- (Mantel-Cox) Test; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.2 Untersuchungen zum verzögerten Wachstum von ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen

4.2.1 Simulation der dreidimensionalen Kolonieformation von Tumorzellen *in vitro*

Aufgrund der Erkenntnis, dass Tumorzellen mit reduzierter ITGB4-Expression in drei der untersuchten Xenograft-Modelle einem verzögerten Tumorwachstum unterliegen, sollte in dreidimensionaler Zellkultur mittels Softagar-*assay* untersucht werden, ob der ITGB4-*knockdown* die Kolonieformation beeinträchtigt. Durch den Zusatz von CM sollte zusätzlich geklärt werden, ob der ITGB4-*knockdown* das Sekretom beeinflusst und ein Verlust der parakrinen Stimulation das Wachstumsverhalten negativ beeinflusst. Bei allen untersuchten Zelllinien bildeten shITGB4-Zellen in Standard-Medium signifikant kleinere Tumorzellkolonien als die korrespondierenden shControl-Zellen (Abb.4.2 a, b, c). Dies spiegelt somit auch *in vitro* das in Xenograft-Modellen gezeigte verzögerte Wachstum ITGB4-depletierter Tumorzellen wider. Sowohl shControl- als auch shITGB4-Kolonien der Linie PC-3 bildeten nach Zugabe von shITGB4-CM kleinere Kolonien aus (Abb.4.2 a). Andererseits war das shControl-CM nicht in der Lage, das Wachstumsdefizit von PC-3-shITGB4-Kolonien auszugleichen. Das shControl-CM von PaCa5061- und SKOV3-Zellen konnte die Kolonieformation von shITGB4-Zellen ebenfalls nicht signifikant steigern (Abb.4.2 b, c). Kolonien von SKOV3-shControl-Zellen waren unter shControl-CM im Vergleich zum Standard-Medium signifikant größer. Eine entsprechende Tendenz zeigte sich auch unter Wachstum mit shITGB4-CM.

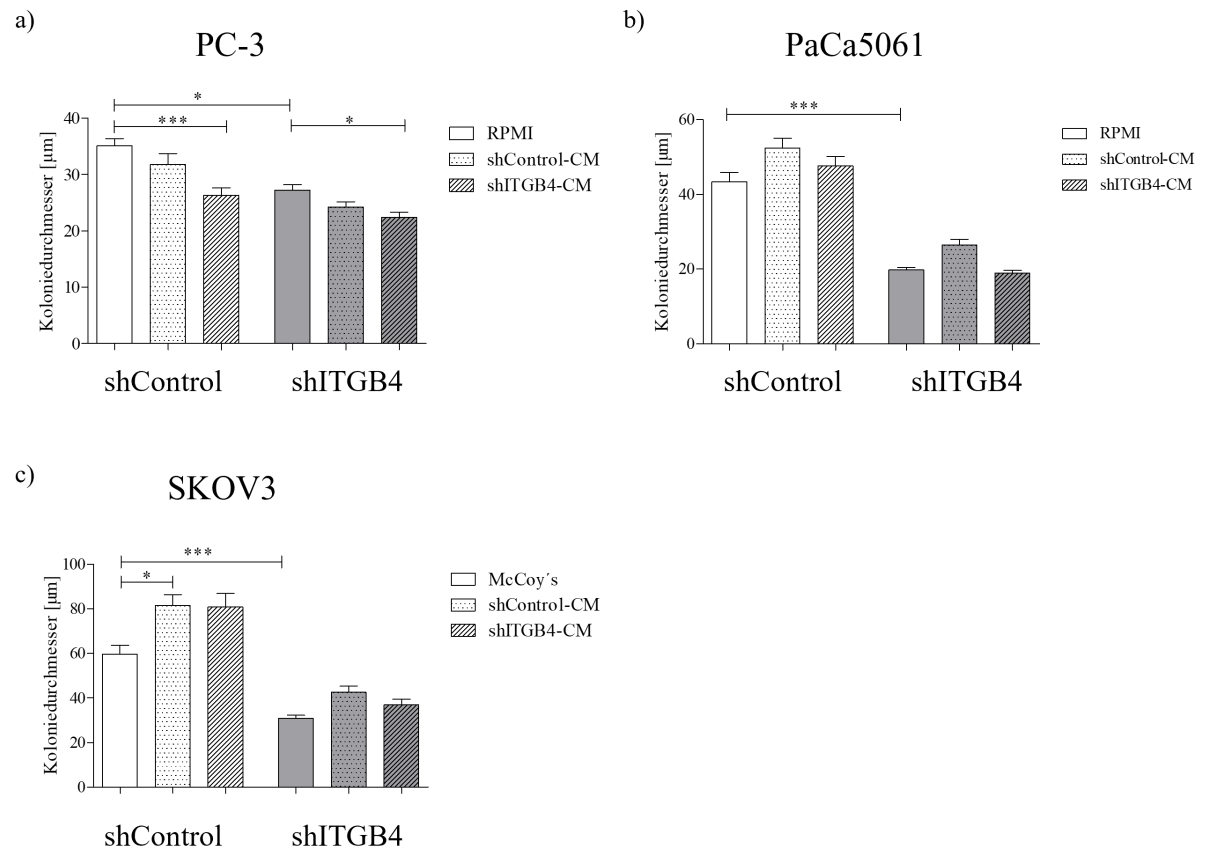


Abbildung 4.2: Analyse der dreidimensionalen Kolonieformation von Tumorzellen in Softagar. Vergleichende Analyse des Koloniedurchmessers nach 11-tägigem Wachstum von Kontroll- (shControl) und ITGB4-*knockdown* (shITGB4)- Tumorzellen der Linien a) PC-3, b) PaCa5061 und c) SKOV3 in Softagar. Die Kultivierung erfolgte sowohl in Standard-Medium (RPMI, McCoy's) als auch in konditioniertem Medium (CM) von shControl- oder shITGB4-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3$ pro Versuchsgruppe. Statistik mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunns Post-Test; * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$. Auswertung von je 4 Wells pro Versuch. Pro Well wurden 9 okulare Gesichtsfelder gemessen.

4.2.2 Durchflusszytometrische Untersuchung zur Apoptoseinduktion in ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen

Da eine Rückgewinnung von in Softagar gewachsenen Tumorkolonien für weiterführende Analysen nicht möglich war, wurden Tumorzellen alternativ auf mit Polyhydroxyethylmethacrylate (PolyHema) beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät. Die PolyHema-Beschichtung erlaubt wie Softagar ein verankerungsunabhängiges Wachstum, jedoch können Tumor-Sphäroide aufgrund der fehlenden Matrix-Einbettung direkt analysiert werden. Für die durchflusszytometrische Detektion apoptotischer Tumorzellen wurden gewachsene Tumo-Sphäroide zunächst vereinzelt und die AnnexinV-FITC/PI-Doppelfärbemethode angewendet. Hierbei können lebende (AnnexinV⁻ PI⁻; Population Q1 in Abb. 4.3), frühe apoptotische (AnnexinV⁺ PI⁻; Population Q2 in Abb. 4.3), späte apoptotische (AnnexinV⁺ PI⁺; Population Q3 in Abb. 4.3) und nekrotische (AnnexinV⁻ PI⁺; Population Q4 in Abb. 4.3) Zellen diskriminiert werden. Der Anteil AnnexinV-positiver Tumorzellen war in shITGB4-Sphäroiden der Linie PC-3 signifikant höher als in shControl Sphäroiden (Abb. 4.3, oben). Ebenso wiesen shITGB4-Tumor-Sphäroide der Linie PaCa5061 signifikant mehr apoptotische Zellen auf als Kontroll-Sphäroide (Abb. 4.3, mitte). Für die Linie SKOV3 konnte hingegen kein Unterschied im Anteil apoptotischer Tumorzellen detektiert werden (Abb. 4.3, unten).

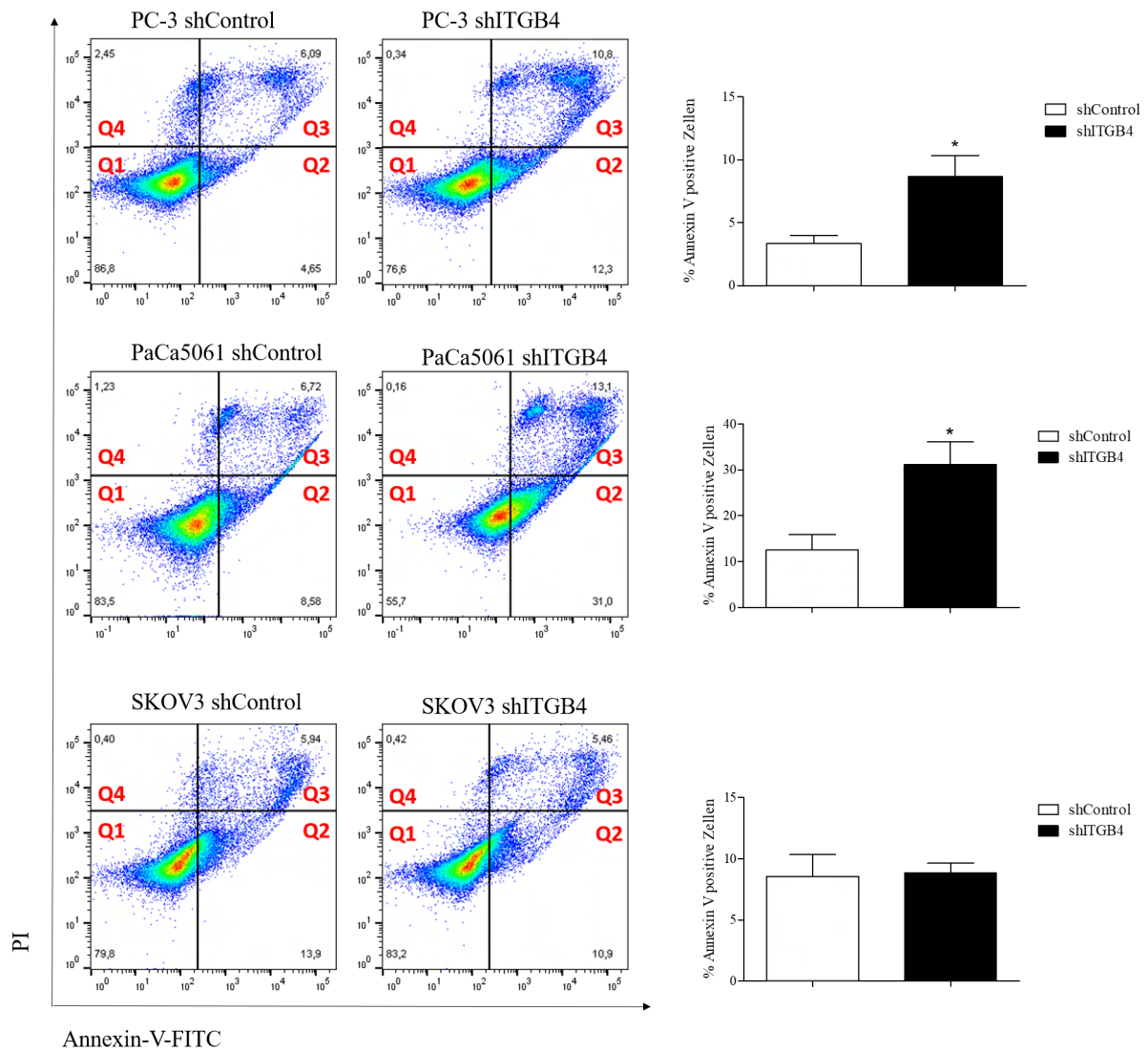


Abbildung 4.3: Durchflusszytometrische Detektion apoptotischer Tumorzellen *in vitro*. 1×10^6 shControl- und shITGB4-Tumorzellen der Linie PC-3, PaCa5061 und SKOV3 wurden auf PolyHema-beschichteten Zellkulturflaschen für 72 h inkubiert. Nach Vereinzeln der entstandenen Tumor-Sphäroide wurden apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nach dualer Anfärbung von AnnexinV-FITC und PI detektiert. Darstellung der *Gating*-Strategie anhand von Punktwolkendiagrammen und prozentuale Anteile AnnexinV-positiver Zellen an der Gesamtzellpopulation (von links nach rechts). Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3$ je Versuchsgruppe. Statistik mittels ungepaartem t-Test; * $p \leq 0.05$.

4.2.3 Untersuchungen zur leukozytären Infiltration in Xenograft-Tumoren

Die Beeinträchtigung der Kolonieformation sowie die Tendenz zur gesteigerten Apoptoseinduktion in dreidimensionaler Kultur von ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen gaben einen ersten Erklärungsansatz für das im Xenograft-Modell beobachtete verlangsamte Tumorstadium. Weiterhin ungeklärt blieb jedoch, warum eine zusätzliche E- und P-Selektin-Defizienz im Versuchstier das Tumorstadium von ITGB4-*knockdown*-Zellen nahezu vollständig inhibierte, während die Etablierung von Kontroll-Tumoren unabhängig vom E- und P-Selektin-Status verlief. Wie Eingangs beschrieben, sind E- und P-Selektin wichtige Rezeptoren für die Diapedese von Leukozyten (Abschnitt 1.2). Dies führte zur Überlegung, ob der E-/P-Selektin-*knockout* die leukozytäre Infiltration innerhalb der TME einschränkt und dies Auswirkungen auf ein verändertes Tumormikromilieu und die frühe Tumoretablierung hat. Zu diesem Zweck wurde an immunhistologischen Präparaten von shControl- und shITGB4-Tumorknoten der Linie PC-3 und PaCa5061, die bereits an Tag vier nach s.c. Injektion entnommen worden waren, der Pan-Leukozytenmarker mCD45 angefärbt (Abb. 4.4). Hierbei zeigte sich, dass shITGB4-Tumore von pfp/rag2-Mäusen im Vergleich zu shControl-Tumoren eine höhere murine Leukozytenlast aufwiesen (Abb. 4.4, B, F). Gleichzeitig war die Anfärbung mCD45⁺-Zellen in shITGB4-Tumoren aus Select-Tieren auf den äußeren Tumorrand begrenzt und nur geringfügig in vitalen Tumorzellarealen sichtbar (Abb. 4.4, D, H). Dies gab einen ersten Hinweis darauf, dass neben der ITGB4-*knockdown*-bedingten Verlangsamung der Tumorzellkolonisation auch die immunologische Zusammensetzung der TME in der frühen Phase der Tumoretablierung durch den ITGB4-*knockdown* verändert war. Um eine schlüssige Hypothese zu formulieren, war davon auszugehen, dass es sich bei den shITGB4-Tumor-infiltrierenden Leukozyten im pfp/rag2-Modell um Immunzellpopulationen handelt, die am ehesten tumorförderliche Eigenschaften vermitteln.

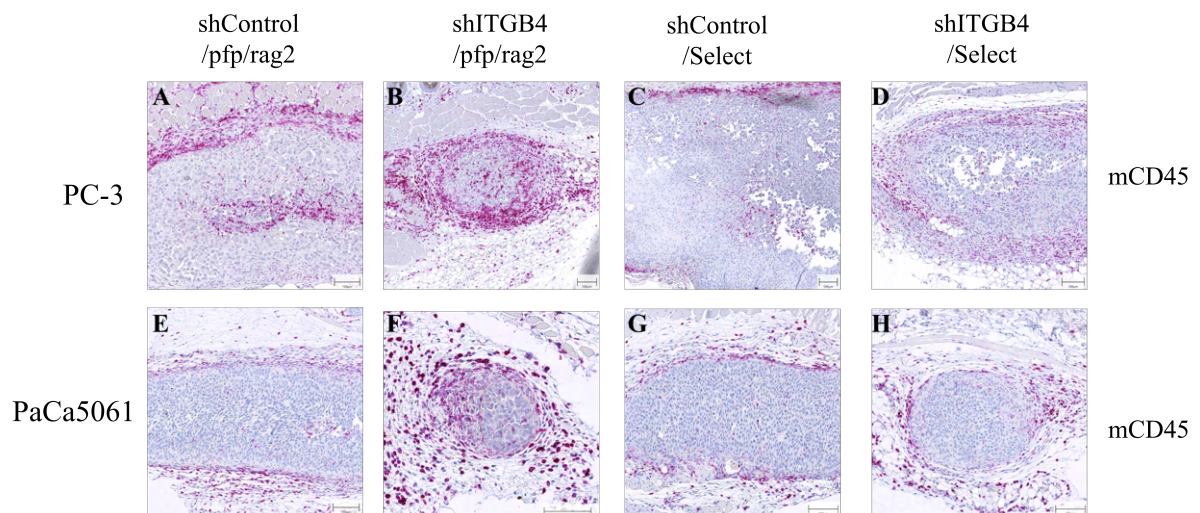


Abbildung 4.4: Immunhistologische Analyse CD45⁺ Leukozyten in frühen Xenograft-Tumoren. Vier Tage nach Inokulation wurden shControl- und shITGB4-Tumorknoten der Linie PC-3 (A-D) und PaCa5061 (E-H) aus pfp/rag2- bzw. Select-Mäusen entnommen und immunhistologisch auf den Pan-Leukozytenmarker mCD45 gefärbt. Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

4.2.4 Chemotaktisches Potential konditionierter Tumorzell-Kulturmedien auf humane Makrophagen

Die vorangegangenen Experimente ergaben Hinweise darauf, dass ITGB4-*knockdown*-Tumore in pfp/rag2-Mäusen verstärkt von murinen Leukozyten infiltriert werden und dies die Tumoretablierung positiv beeinflussen könnte. Hieraus ergab sich die Frage, ob ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen aktiv die Leukozytenattraktion fördern. Um initial zu untersuchen, ob das Migrationsverhalten von Immunzellen nicht nur im murinen Modell, sondern auch im humanen Kontext durch den ITGB4-*knockdown* von Tumorzellen beeinflusst ist, wurde mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Linder (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene; UKE) ein 3D-*assay* mit humanen Makrophagen etabliert. In Abhängigkeit von den analysierten Donoren zeigte sich, dass nicht konditioniertes Zellkulturmedium bzw. konditioniertes Medium von shControl-Zellen weniger humane Makrophagen attrahierte als konditioniertes shITGB4-Medium (Abb. 4.5, c). Dieser Befund unterstützte die Vermutung, dass ITGB4-*knockdown*-bedingte Veränderungen im Sekretom der Zellen zu einer gesteigerten Attraktion von Leukozyten führten. Der weitere Fokus lag daher auf der Identifizierung

von Leukozyten-attrahierenden Faktoren.

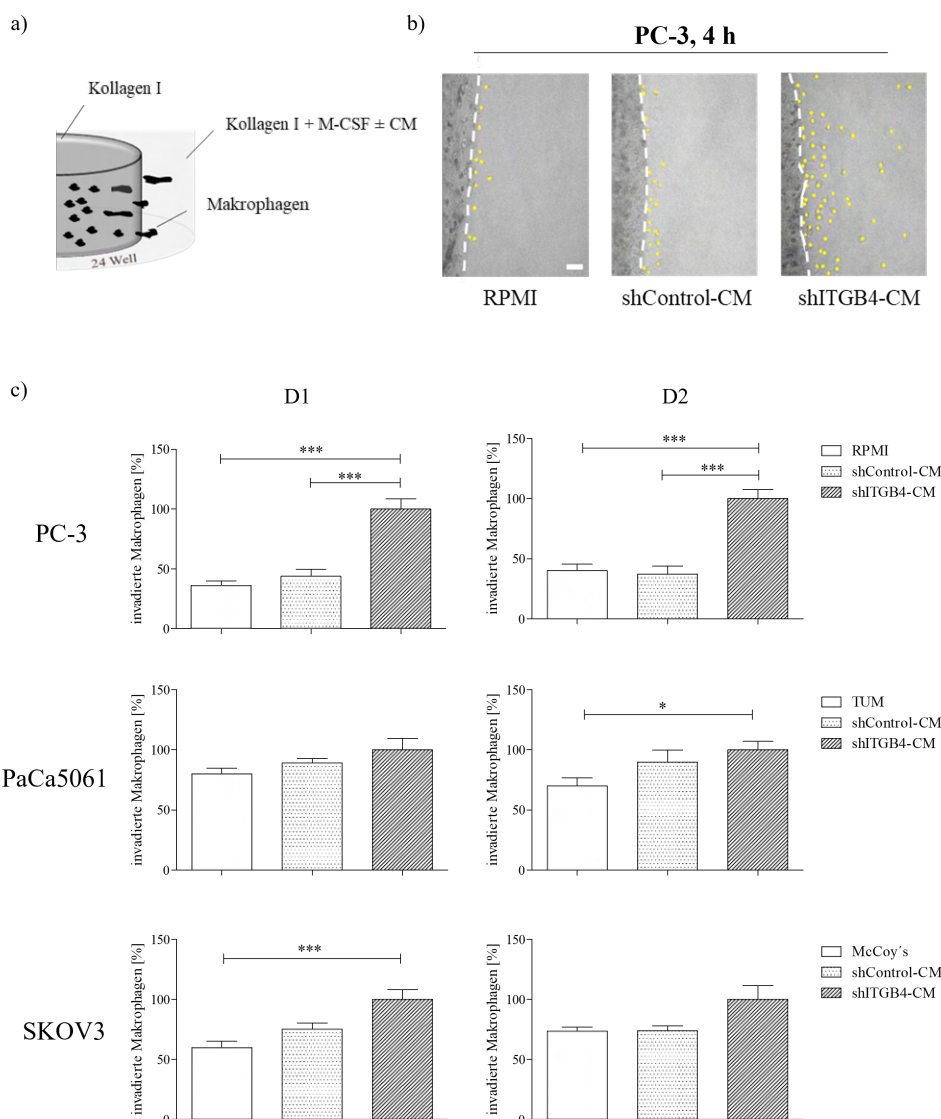


Abbildung 4.5: Konditioniertes Medium von ITGB4-depletierten Tumorzellen attrahiert verstärkt humane Makrophagen im 3D Invasions-Modell. Humane Makrophagen werden in eine Matrix aus Kollagen I eingebettet, die von einer weiteren Kollagen I Matrix geringerer Dichte umgeben wird. Dieser äußeren Matrix wurde unbehandeltes Kulturmedium (RPMI, TUM bzw. McCoy's) oder konditioniertes Medium von Kontroll- (shControl-CM) oder ITGB4-*knockdown*- (shITGB4-CM) Zellen beigemischt. Zusätzliches M-CSF führte zur Steigerung der Invasivität, was eine bessere Auswertbarkeit ermöglichte. a) Schematische Darstellung des 3D Invasionsassays. b) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen invadierter Makrophagen 4 h nach Versuchsbeginn am Beispiel der Tumorzelllinie PC-3. Die gestrichelte weiße Linie zeigt die Grenze zwischen eingebetteten und bereits ausgewanderten Makrophagen (als gelbe Punkte markiert). Maßstabsbalken entspricht 100 μm (für alle Abbildungen). c) Quantifizierung ausgewandelter Makrophagen 4 h nach Versuchsbeginn für Donor 1 (D1) und Donor 2 (D2). Werte für ITGB4-CM wurden auf 100 % gesetzt. Pro Donor wurden 4 Wells angesetzt, in denen 4 Blickfelder fotografiert und anschließend ausgewertet wurden. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler dieser 16 Messwerte. Statistik mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunns Post-Test; * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

4.3 *In vitro* Untersuchungen zur Sekretion immunologischer Mediatoren

4.3.1 Analyse verschiedener Chemokine in konditionierten Medien von Tumorzellen

VEGF und GM-CSF – Mediatoren zur Expansion und Rekrutierung myeloider Zellen

Der Wachstumsfaktor VEGF wird von Tumorzellen häufig zur Stimulation der Angiogenese sezerniert. Jedoch wirkt VEGF auch der Erkennung und Destruktion von Tumorzellen durch das Immunsystem entgegen und kann als Chemoattraktant myeloider Zellen fungieren (Ohm and Carbone, 2001). Von Tumorzellen freigesetztes GM-CSF stimuliert die Expansion, Differenzierung und Proliferation myeloider Zellen im Knochenmark (Horikawa et al., 2020; Vetsika et al., 2019; Wang et al., 2019a). Der Nachweis von VEGF und GM-CSF erfolgte in konditionierten Zellkulturmedien von shControl- und shITGB4-Tumorzellen der Linien PC-3, PaCa5061 und SKOV3 mittels Enzymimmunoassay (ELISA). Generell konnte VEGF in allen untersuchten Medien nachgewiesen werden, wobei nur SKOV3-shITGB4-Überstände im Vergleich zur korrespondierenden Kontroll-Linie geringere VEGF-Level aufwiesen (Abb.4.6, a). In shITGB4-Überständen von PaCa5061-Zellen lag die VEGF-Konzentration dagegen signifikant höher als in den shControl-Überständen (Abb.4.6, a). GM-CSF konnte ausschließlich in PC-3-Medien quantifiziert werden (Abb.4.6, b). Hierbei lag in Medien von PC-3-shITGB4-Tumorzellen signifikant weniger GM-CSF vor als in der Kontrolle.

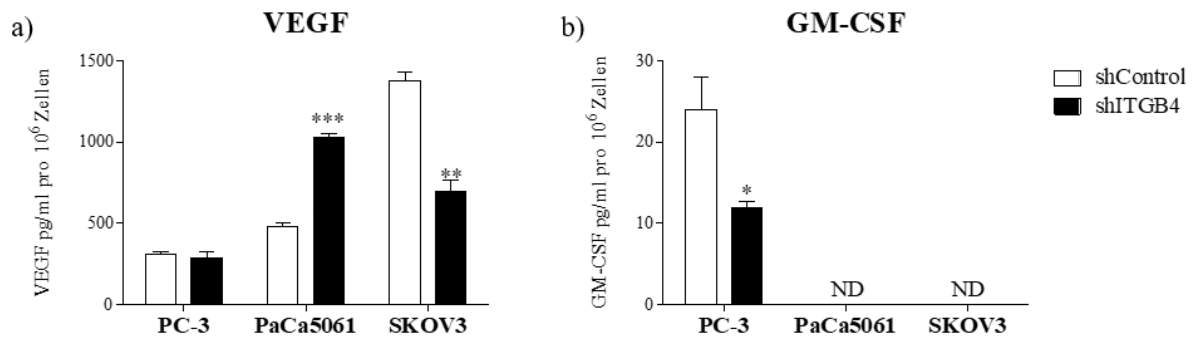


Abbildung 4.6: Quantifizierung von VEGF und GM-CSF in konditionierten Zellkulturmedien von Tumorzellen. Konditionierte Medien gewonnen aus Kulturen mit shControl- und shITGB4- Tumorzellen der Linien PC-3, PaCa5061 und SKOV3 wurden mittels Enzymimmunoassay (ELISA) auf a) VEGF und b) GM-CSF analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n = 3$ je Versuchsgruppe. Statistik mittels ungepaartem t-Test; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. ND, nicht detektiert.

CXCL1 und CXCL2 – Chemoattraktanten von Neutrophilen und MDSCs

Die Chemokine CXCL1 und CXCL2 sind mit der Rekrutierung von Neutrophilen sowie der Generierung von MDSCs im Knochenmark assoziiert (De Filippo et al., 2013; Shi et al., 2018). Die Identifizierung von CXCL1 und CXCL2 erfolgte in konditionierten Zellkulturmedien von shControl- und shITGB4-Tumorzellen der Linien PC-3, PaCa5061 und SKOV3. Konditioniertes Medium von PC-3-shITGB4-Zellen wies signifikant höhere CXCL1- und CXCL2-Level im Vergleich zu shControl-Zellen auf (Abb.4.7, a, b). CXCL1 war in PaCa5061-shControl-Medien nur in geringer Konzentration und in shITGB4-Medien nicht nachweisbar (Abb.4.7, a). Jedoch wiesen PaCa5061-shITGB4-Zellüberstände signifikant mehr CXCL2 als shControl-Medien auf (Abb. 4.7, b). SKOV3-shITGB4-Medien wiesen zu shControl-Medien keinen Unterschied im CXCL1- und CXCL2-Level auf (Abb. 4.7, a, b).

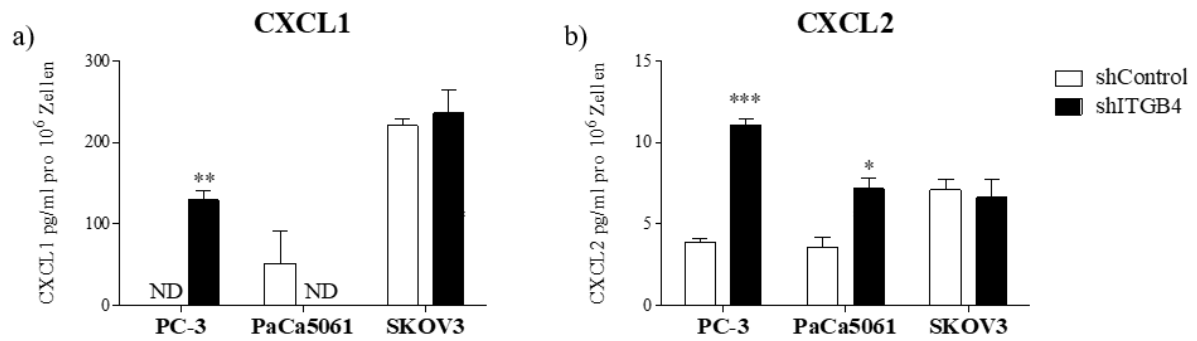


Abbildung 4.7: Quantifizierung von CXCL1 und CXCL2 in konditionierten Zellkulturmedien von Tumorzellen. Konditionierte Medien gewonnen aus shControl- und shITGB4-Tumorzellen der Linien PC-3, PaCa5061 und SKOV3 wurden mittels ELISA auf a) CXCL1 und b) CXCL2 analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3$ je Versuchsgruppe. Statistik mittels Einstichproben t-Test (PC-3 und PaCa5061 (a)) und ungepaartem t-Test; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. ND, nicht detektiert.

CCL2 und CCL5 – Mediatoren der Migration und Rekrutierung von Monozyten und MDSCs

Die Chemokine CCL2 und CCL5 werden mit der Migration von Monozyten und MDSCs am häufigsten in Verbindung gebracht (Kumar et al., 2016). Die Analyse von CCL2 und CCL5 erfolgte in konditionierten Zellkulturmedien von shControl- und shITGB4-Tumorzellen der Linien PC-3, PaCa5061 und SKOV3. Signifikant höhere Konzentrationen von CCL2 konnten nur in SKOV3-shITGB4-Medien festgestellt werden (Abb. 4.8, a). CCL5 wurde nur in Medien von PaCa5061-Zellen detektiert, wobei sich signifikant höhere Level an CCL5 in shITGB4-Medien vergleichend zu shControl-Medien finden ließen (Abb. 4.8, b).

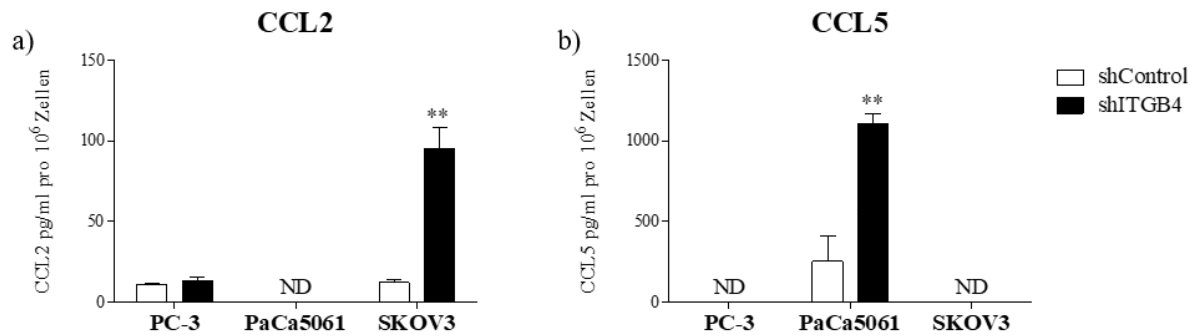


Abbildung 4.8: Quantifizierung von CCL2 und CCL5 in konditionierten Zellkulturmedien von Tumorzellen. Konditionierte Medien gewonnen aus shControl- und shITGB4-Tumorzellen der Linien PC-3, PaCa5061 und SKOV3 wurden mittels ELISA auf a) CCL2 und b) CCL5 analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3$ je Versuchsgruppe. Statistik mittels ungepaartem t-Test; ** $p \leq 0.01$. ND, nicht detektiert.

CXCL10 und CXCL17 – inflammatorische Mediatoren

Dem Chemokin CXCL10 wurde ursprünglich eine anti-inflammatorische Funktion in der TME zugeschrieben. Daneben zeigen neuere Studien, dass CXCL10 dazu beiträgt, pro-inflammatorische Signale myeloider Zellen zu amplifizieren (Zhao et al., 2017). Für das Chemokin CXCL17 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine gesteigerte Expression in Tumorzellen die Rekrutierung von $CD11b^+ Gr-1^{high} F4/80^-$ Zellen stimuliert und in Xenograft-Modellen die Angiogenese und Tumorprogression fördert (Matsui et al., 2012). In konditionierten shITGB4-Zellkulturmedien von PC-3- und PaCa5061-Tumorzellen konnten signifikant erhöhte Level an CXCL10 im Vergleich zu den jeweiligen shControl-Medien detektiert werden (Abb. 4.9, a). CXCL17 lag in konditionierten Medien von PaCa5061-shITGB4-Zellen im Vergleich zu shControl-Medien in signifikant höheren Konzentrationen vor (Abb. 4.9, b). SKOV3-shControl-Medien wiesen signifikant mehr CXCL17 auf als shITGB4-Überstände, in denen das Chemokin nicht nachweisbar war (Abb. 4.9, b).

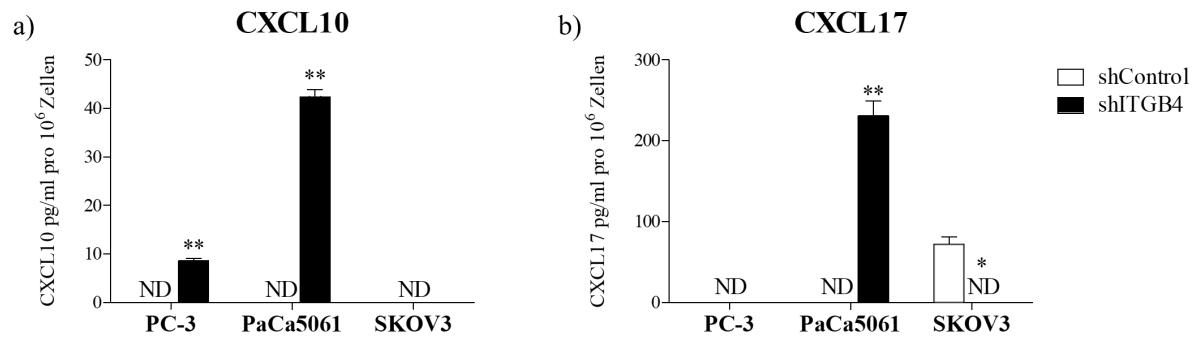


Abbildung 4.9: Quantifizierung von CXCL10 und CXCL17 in konditionierten Zellkulturmedien von Tumorzellen. Konditionierte Medien gewonnen aus shControl- und shITGB4-Tumorzellen der Linien PC-3, PaCa5061 und SKOV3 wurden mittels ELISA auf a) CXCL10 und b) CXCL17 analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3$ je Versuchsgruppe. Statistik mittels Einstichproben t-Test; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. ND, nicht detektiert.

4.3.2 Isolierung und Charakterisierung extrazellulärer Vesikel von Tumorzellen

Weiterführend wurde untersucht, ob neben der Chemokin-Sekretion auch vesikuläre Transportprozesse durch den ITGB4-*knockdown* tangiert werden. Extrazelluläre Vesikel sind von einer Lipid-Membran umhüllte Partikel, die unter physiologischen Bedingungen von Zellen als Träger biologischer Informationen freigesetzt werden. Tumorzellen exozytieren häufig eine erhöhte Anzahl dieser Vesikel, die Einfluss auf die interzelluläre Kommunikation zu anderen Tumorzellen und Zellen der TME nehmen (Atretkhany et al., 2016; Bian et al., 2019). Darüber hinaus tragen tumor-abgeleitete Vesikel zur Re-Modellierung der TME bei und können bei Zellen der angeborenen Immunantwort den Tumor-begünstigenden Phänotypen induzieren (Liu et al., 2020).

Vesikel wurden aus konditionierten Medien von shControl- und shITGB4-Tumorzellen der Linien PC-3, PaCa5061 und SKOV3 in Zusammenarbeit mit Dr. Franz Ricklefs (Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie; UKE) isoliert und mittels Nanopartikel-*Tracking*-Analyse (NTA) hinsichtlich der Größe und Anzahl untersucht (Abb. 4.10 a, b). Während die Größe der isolierten Vesikel von shControl- und shITGB4-Tumorzellen bei allen Entitäten nicht variierte (Abb. 4.10, a), ergaben sich signifikante Unterschiede in der Vesikelanzahl. Überstände von PC-3- und PaCa5061-shITGB4-Zellen enthielten im Ver-

gleich zu den jeweiligen shControl-Überständen ca. doppelt so viele Vesikel (Abb. 4.10, b). Zellkulturüberstände aus SKOV3-shControl- und shITGB4-Tumorzellen wiesen eine vergleichbare Vesikelanzahl auf (Abb. 4.10, b).

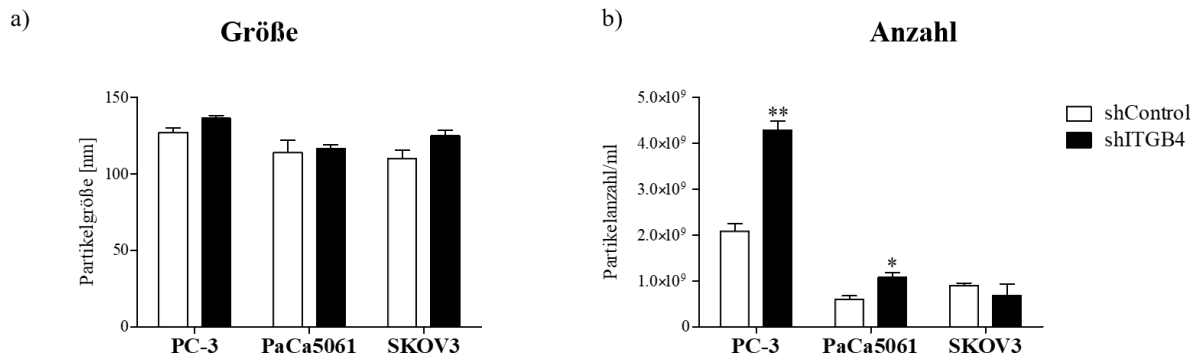


Abbildung 4.10: Analyse der Größe und Anzahl extrazellulärer Vesikel aus konditionierten Zellkulturmedien von Tumorzellen mittels Nanopartikel-Tracking. a) Größe und b) Partikelanzahl/ml von isolierten Vesikeln aus konditionierten Kulturmedien von PC-3-, PaCa5061- und SKOV3- shControl- und shITGB4-Tumorzellen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3$ je Versuchsgruppe. Statistik mittels ungepaartem t-Test; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

4.4 Lokale und systemische quantitative Änderungen von Leukozyten-Subpopulationen im subkutanen Xenograft-Mausmodell

4.4.1 Immunphänotypisierung myeloider Zellen im Knochenmark Xenograft-Tumor-tragender Mäuse

Das Knochenmark ist Bildungsort und Reservoir verschiedener Immunozyten, deren Expansion im Verlauf der Tumorentwicklung sowohl von Tumorzellen als auch von sezernierten Faktoren der TME moduliert werden kann. Um zu untersuchen, ob die quantitative Zusammensetzung von Zellen der unspezifischen Immunabwehr im Knochenmark bereits in der frühen Phase der Etablierung von Tumorzellverbänden verändert ist, wurde das Knochenmark von pfp/rag2- und Select-Mäusen 10 Tage nach s.c. Inokulation von PC-3-Tumorzellen (shControl vs. shITGB4) durchflusszytometrisch analysiert. Mit freundlicher

Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Linda Diehl (Institut für Experimentelle Immunologie und Hepatologie, UKE) wurden Immunzell-Subtypen durch simultane Detektion von fünf Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD45, CD11b, CD11c, F4/80 und Gr-1 charakterisiert. Nach Exklusion von Zelltrümmern und Dubletten wurden innerhalb der vitalen CD45⁺-Zellpopulation CD11b⁺-, CD11b⁺ Gr-1⁺-, CD11b⁺ F4/80⁺- und CD11b⁺ CD11c⁺-Zellen identifiziert (Abb. 4.11, a). Zusätzlich wurden CD11b⁺-Zellen entsprechend der Marker Gr-1 und SSC in vier Populationen unterteilt: Population A (Gr-1^{Hi} SSC^{Int}), Population B (Gr-1^{Hi} SSC^{Lo}), Population C (Gr-1^{Int-neg} SSC^{Lo}) und Population D (Gr-1^{Int} SSC^{Hi}) (Abb. 4.11).

Das Knochenmark der vier untersuchten Versuchsgruppen wies keine signifikanten Unterschiede innerhalb der CD11b⁺-Zellpopulation auf (Abb.4.11, b). Der Anteil CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen war in pfp/rag2- und Select-Mäusen mit shITGB4-Tumoren tendenziell geringer als im Vergleich zu den jeweiligen Versuchsgruppen mit shControl-Tumoren (Abb.4.11, c). Dieser Unterschied war beim Vergleich zwischen pfp/rag2/shITGB4 gegen Select/shControl statistisch signifikant (Abb.4.11, c). Der Hauptanteil CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen ließ sich weiter als Gr-1^{Hi} SSC^{Int} Zellen definieren (Abb.4.11, d; Population A in Abb. 4.11, a). Diese Population entspricht am wahrscheinlichsten differenzierten Neutrophilen. Hierbei auffällig war, dass insbesondere pfp/rag2-Mäuse mit shITGB4-Tumoren einen geringeren Anteil dieser Zellpopulation im Knochenmark im Vergleich zu Mäusen mit shControl-Tumoren aufwiesen (Abb.4.11, d). Gleichzeitig fand sich in der pfp/rag2/shITGB4-Versuchsgruppe ein erhöhter Anteil an Gr-1^{Hi} SSC^{Lo} Zellen (Abb.4.11, e; Population B in Abb. 4.11, a), die sich als Vorläuferzellen von Neutrophilen oder Monozyten charakterisieren lassen. Der Anteil CD11b⁺ F4/80⁺ und CD11b⁺ CD11c⁺ Zellen lag in allen Versuchsgruppen unterhalb von 1 % und wurde daher als nicht nachgewiesen angesehen (Abb.4.11, a).

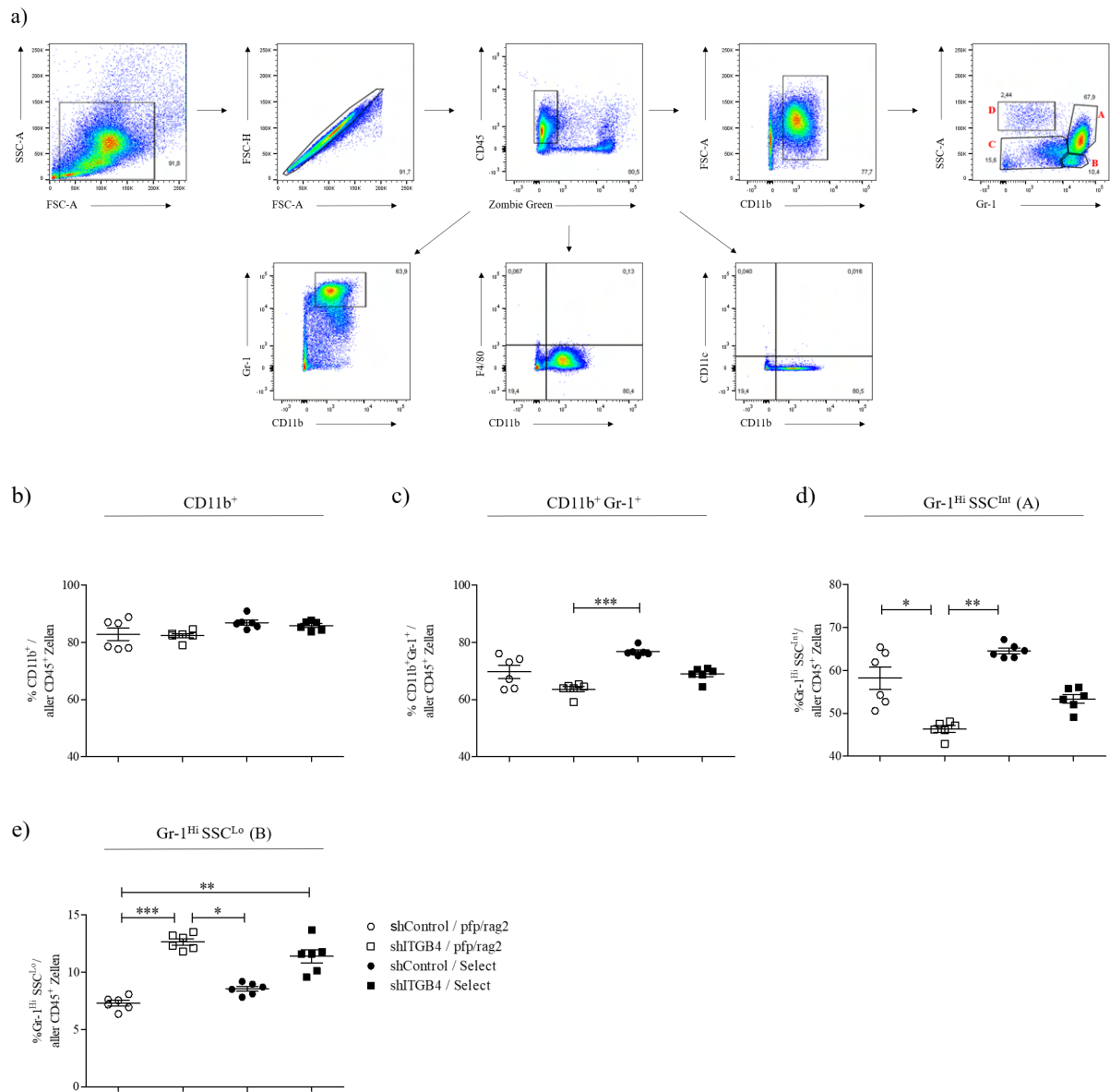


Abbildung 4.11: Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen im Knochenmark Xenograft-Tumor-tragender pfp/rag2- und Select-Mäuse. pfp/rag2- und Select-Mäusen wurden 1×10^6 shControl- oder shITGB4-Tumorzellen der Linie PC-3 s.c. injiziert. 10 Tage nach Inokulation erfolgte die Immunphänotypisierung von isolierten Zellen des Knochenmarks mittels anti-CD45-, anti-CD11b-, anti-CD11c-, anti-Gr-1- und anti-F4/80-Antikörper. a) Darstellung der *Gating*-Strategie anhand von Punktwolkendiagrammen (von links nach rechts). Der Fluoreszenzfarbstoff Zombie Green wurde zur Lebend/Tot-Diskriminierung eingesetzt. CD11b⁺ Zellen wurden basierend auf dem Marker Gr-1 und dem SSC-Kanal in die Subpopulationen A-D unterteilt. b) Prozentuale Anteile CD11b⁺, c) CD11b⁺ Gr-1⁺, d) CD11b⁺ Gr-1^{Hi} SSC^{Int} (Population A in a) und e) CD11b⁺ Gr-1^{Hi} SSC^{Lo} (Population B in a) an der CD45⁺ Zellpopulation. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Statistik mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunns Post-Test; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Hi=hoch, Int=intermediär, Lo=gering.

4.4.2 Immunphänotypisierung myeloider Zellen im Blut

Xenograft-Tumor-tragender Mäuse

Die Tumor-induzierte Expansion von Immunzellen im Knochenmark ist in der Regel mit einer Zunahme zirkulierender Immunzellen im peripheren Blut assoziiert. Aus diesem Grund wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse Blut von s.c. Xenograft-Tumor-tragenden pfp/rag2- und Select-Mäusen 10 Tage nach PC-3-Tumorzell-Inokulation auf verschiedene Immunzellpopulationen analysiert. Die zur Charakterisierung eingesetzten Oberflächenantigene sowie die *Gating*-Strategie waren analog zur Analyse des Knochenmarks.

Aus den Analysen ging hervor, dass Select-Mäuse tendenziell einen höheren Anteil CD11b⁺ und CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen im Blut aufwiesen als pfp/rag2-Mäuse (Abb. 4.12, b, c). Der erhöhte Anteil CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen in Select-Mäusen ließ sich im Wesentlichen auf die Gr-1^{Hi} SSC^{Int} Population zurückführen (Abb. 4.12, d; Population A in Abb. 4.12, a). Wie bereits für Proben aus dem Knochenmark beobachtet, war der Anteil der Gr-1^{Hi} SSC^{Lo} Population auch in Blutproben von pfp/rag2-Mäusen mit shITGB4-Tumoren im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen erhöht, wobei eine statistische Signifikanz nur im Vergleich zur shITGB4/Select-Gruppe vorlag (Abb. 4.12, e; Population B in Abb. 4.12, a). Blutproben von Select-Mäusen mit shControl-Tumoren enthielten signifikant höhere Mengen CD11b⁺ F4/80⁺ Zellen im Vergleich zur shITGB4/pfp/rag2- und shITGB4/Select-Versuchsgruppe (Abb. 4.12, f). Der Anteil von CD11b⁺ CD11c⁺ Zellen lag in allen Versuchsgruppen unterhalb von 1 % und wurde als nicht nachgewiesen bewertet (Abb. 4.12, a).

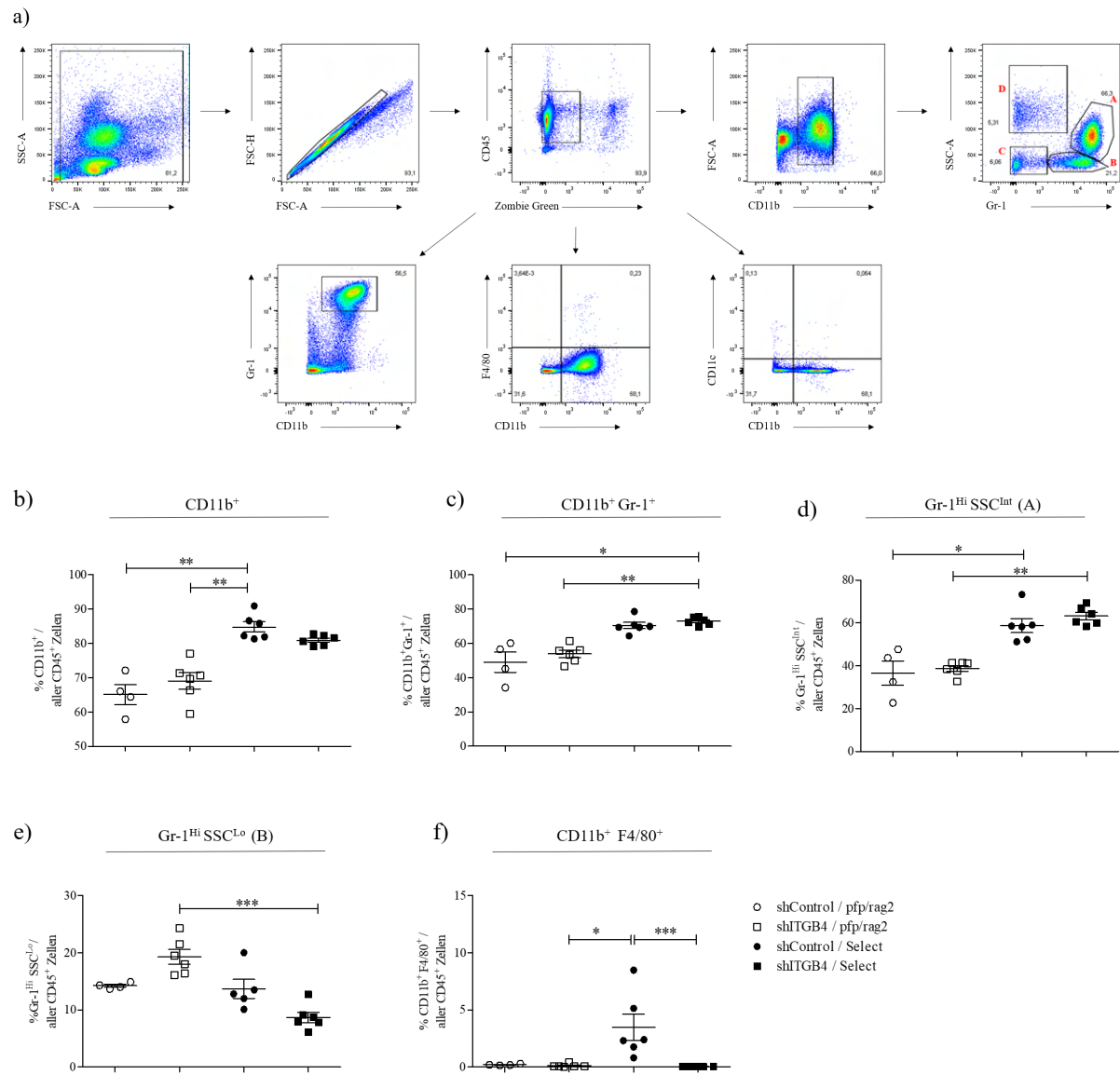


Abbildung 4.12: Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen im Blut Xenograft-Tumor-tragender pfp/rag2- und Select-Mäuse. pfp/rag2- und Select-Mäusen wurden 1×10^6 shControl- oder shITGB4-Tumorzellen der Linie PC-3 s.c. injiziert. 10 Tage nach Inokulation erfolgte die Immunphänotypisierung von isolierten Zellen aus dem Blut mittels anti-CD45-, anti-CD11b-, anti-CD11c-, anti-Gr-1- und anti-F4/80-Antikörper. a) Darstellung der *Gating*-Strategie anhand von Punktwolkendiagrammen (von links nach rechts). Der Fluoreszenzfarbstoff Zombie Green wurde zur Lebend/Tot-Diskriminierung eingesetzt. $CD11b^+$ Zellen wurden basierend auf dem Marker Gr-1 und dem SSC-Kanal in die Subpopulationen A-D unterteilt. b) Prozentuale Anteile $CD11b^+$, c) $CD11b^+ Gr-1^+$, d) $CD11b^+ Gr-1^{Hi} SSC^{Int}$ (Population A in a), e) $CD11b^+ Gr-1^{Hi} SSC^{Lo}$ (Population B in a) und f) $CD11b^+ F4/80^+$ Zellen an der $CD45^+$ Zellfraktion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Statistik mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunns Post-Test; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Hi=hoch, Int=intermediär, Lo= gering.

4.4.3 Immunphänotypisierung myeloider Zellen in der Milz von Xenograft-Tumor-tragenden Mäusen

Neben dem Knochenmark bildet die Milz ein weiteres wichtiges lymphatisches und hämatopoetisches Organ in Mäusen (Bronte and Pittet, 2013) und ist im Kontext von Krebserkrankungen als Ort der extramedullären Hämatopoese beschrieben (Wu et al., 2020b). Für die immunphänotypische Analyse wurden Milzen s.c. Xenograft-Tumor-tragender pfp/rag2- und Select-Mäuse 10 Tage nach PC-3-Tumorzell-Inokulation entnommen. Die durchflusszytometrische Analyse von Immunzellpopulationen erfolgte analog zum bereits für Knochenmark und Blut beschriebenen Vorgehen.

Wie für murine Blutproben beobachtet, konnte in Milzen von Select-Mäusen ein höherer Anteil $CD11b^+$ und $CD11b^+ Gr-1^+$ Zellen im Vergleich zu Milzen von pfp/rag2-Mäusen festgestellt werden (Abb. 4.13, b, c). Auch hier wurde der Hauptanteil von $Gr-1^{Hi} SSC^{Int}$ Zellen bestimmt (Abb. 4.13, d; Population A in Abb. 4.13, a). Interessanterweise ergab sich hinsichtlich der $Gr-1^{Hi} SSC^{Lo}$ Population keine Unterschiede in den Versuchsgruppen (Abb. 4.13, e; Population B in Abb. 4.13, a). In Milzen der shControl/Select-Versuchsgruppe konnten im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen vermehrt $CD11b^+ CD11c^+$ Zellen detektiert werden (Abb. 4.13, f). Der Anteil $CD11b^+ F4/80^+$ Zellen lag in allen Versuchsgruppen unterhalb von 1 % und wurde als nicht nachgewiesen bewertet.

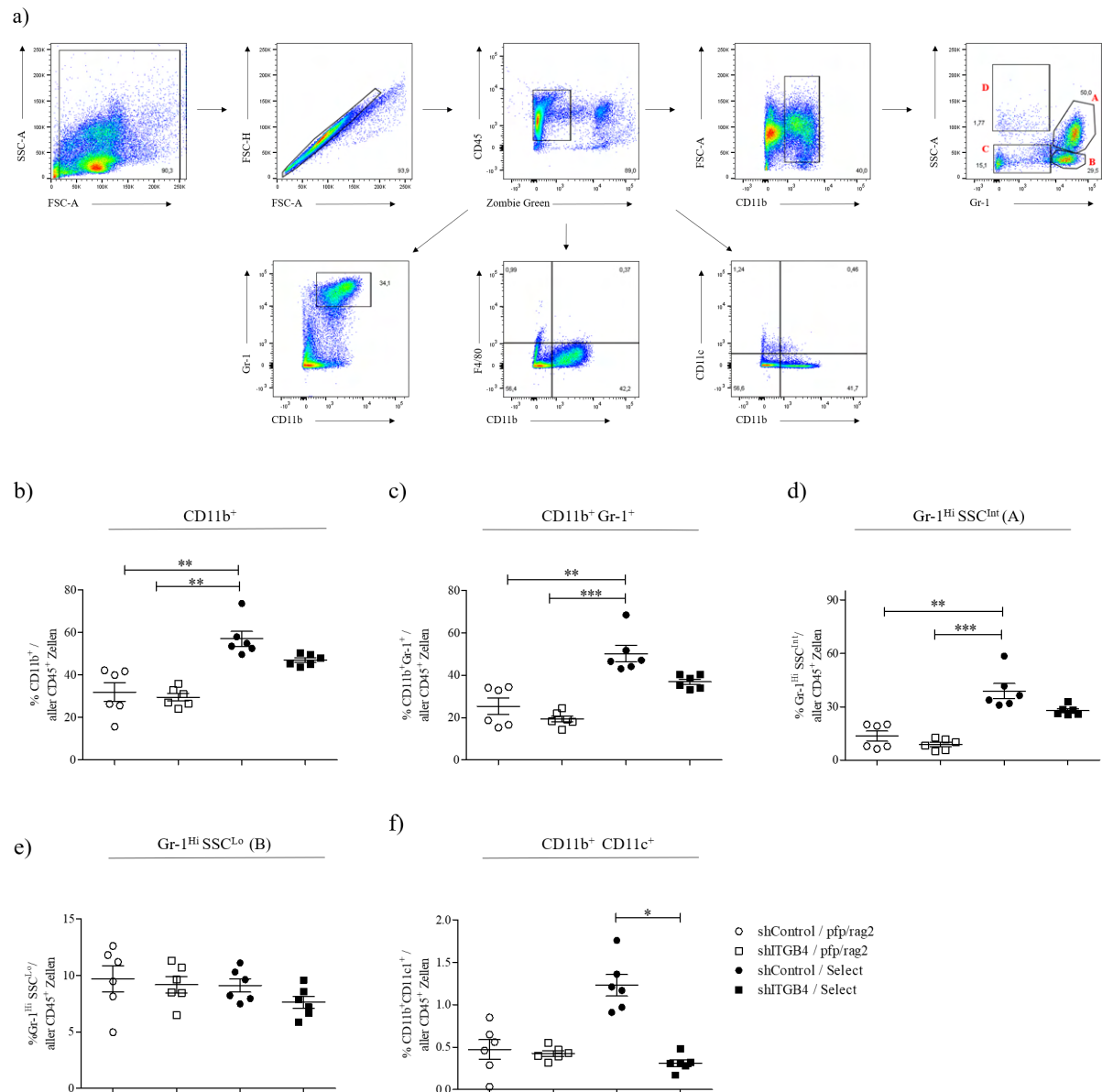


Abbildung 4.13: Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen in Milzen Xenograft-Tumor-tragender pfp/rag2- und Select-Mäusen. Pfp/rag2- und Select-Mäusen wurden 1×10^6 shControl- oder shITGB4-Tumorzellen der Linie PC-3 s.c. injiziert. 10 Tage nach s.c. Inokulation erfolgte die Immunphänotypisierung von isolierten Zellen aus der Milz mittels anti-CD45-, anti-CD11b-, anti-CD11c-, anti-Gr-1- und anti-F4/80-Antikörper. a) Darstellung der *Gating*-Strategie anhand von Punktwolkendiagrammen (von links nach rechts). Der Fluoreszenzfarbstoff Zombie Green wurde zur Lebend/Tot-Diskriminierung eingesetzt. $CD11b^+$ Zellen wurden basierend auf den Marker Gr-1 und dem SSC-Kanal in die Subpopulationen A-D unterteilt. b) Prozentuale Anteile $CD11b^+$, c) $CD11b^+ Gr-1^+$, d) $CD11b^+ Gr-1^{Hi} SSC^{Int}$ (Population A in a), e) $CD11b^+ Gr-1^{Hi} SSC^{Lo}$ (Population B in a) und f) $CD11b^+ CD11c^+$ Zellen an der $CD45^+$ Zellfraktion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Statistik mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunns Post-Test; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. Hi=hoch, Int=intermediär, Lo= gering.

4.4.4 Splenomegalie in E-/P-Selektin-defizienten Versuchstieren

Neben der erhöhten Präsenz leukozytärer Zellpopulationen wurden im Zuge der hier durchgeführten Tierexperimente morphologische Auffälligkeiten an Milzen von Select-Versuchstieren festgestellt. Bereits bei naiven Select-Mäusen konnte eine Splenomegalie diagnostiziert werden, die sich in einer Verdopplung des Organgewichtes gegenüber Milzen aus naiven pfp/rag2-Mäusen manifestierte (Abb.4.14, a, b). Die weitere mikroskopische Analyse HE-gefärbter Milz-Präparate von Select-Tieren ergab eine Expansion der roten Pulpa und einen Rückgang der weißen Pulpa bis auf kleinere inselförmige Bereiche. Im Vergleich zu Milzen aus pfp/rag2-Tieren enthielt die rote Pulpa der Doppel-*knockouts* zahlreiche blastäre Zellen (Abb. 4.14, c) von denen einige eine ring-förmige Zellkernmorphologie aufwiesen (Abb. 4.14, c; schwarze Pfeile). Die durchflusszytometrische Analyse dieser Milzen belegte, dass in naiven (nicht Tumor-tragenden) Select-Tieren ein signifikant größerer Anteil an CD11b⁺ (Abb. 4.14, d) und CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen (Abb. 4.14, e) vorhanden war. Der erhöhte Anteil CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen ließ sich dabei hauptsächlich auf Gr-1^{Hi} SSC^{Int} Zellen zurückführen (Abb. 4.14, f, g).

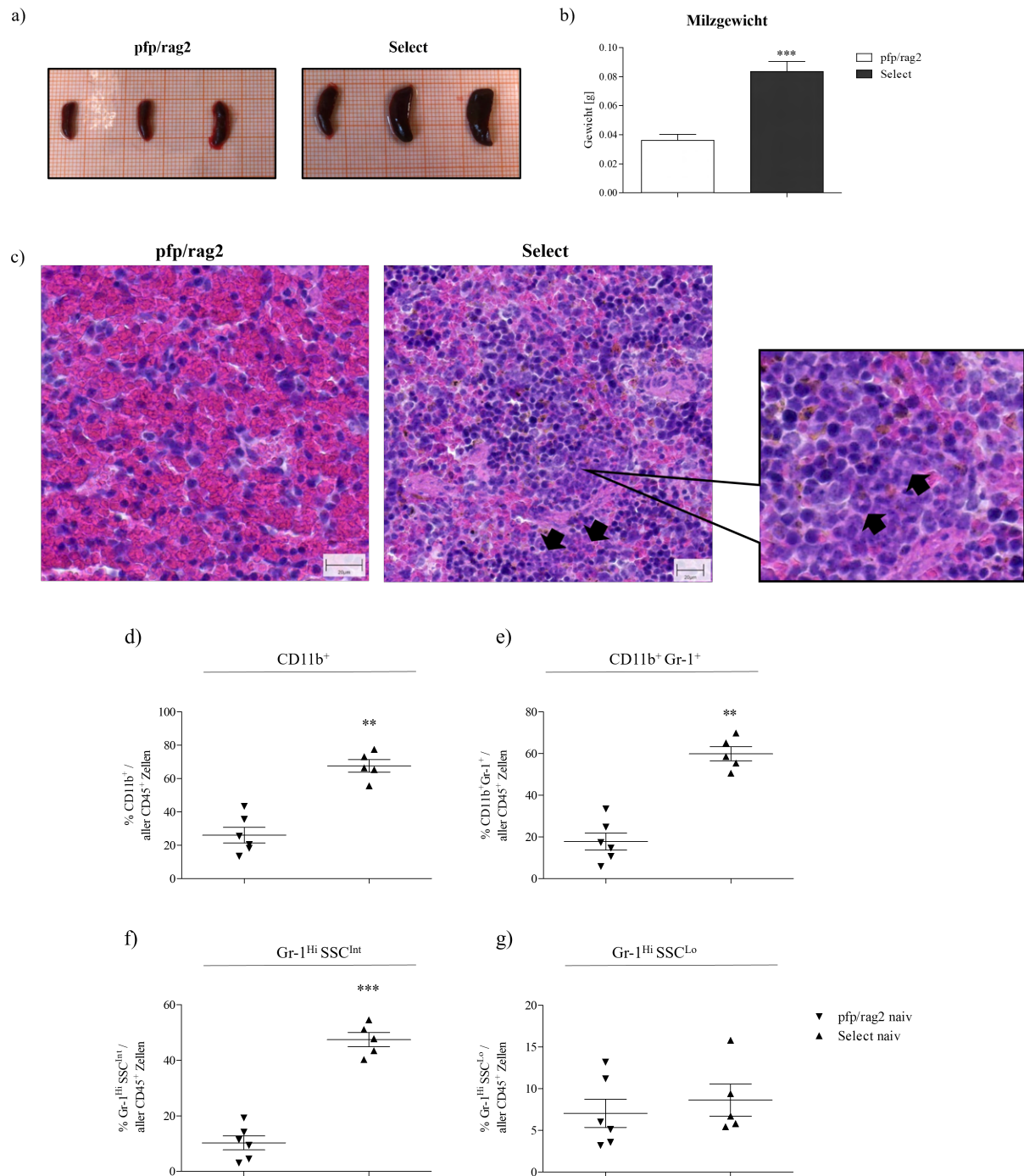


Abbildung 4.14: Splenomegalie in naiven (nicht Tumor-tragenden) Select-Versuchstieren. a) Morphologie von Milzen naiver pfp/rag2- und Select-Mäuse. b) Milzgewicht naiver pfp/rag2- und Select-Mäuse. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=8$ pro Versuchsgruppe. Statistik mittels ungepaartem t-Test; *** $p \leq 0.001$. c) HE-Färbung von Milzen naiver pfp/rag2- und Select-Mäuse. Pfeile markieren Zellen mit ringförmiger Kernmorphologie. Maßstabsbalken entspricht jeweils $20 \mu\text{m}$. d-g) Durchflusszytometrische Analyse von Milzen aus naiven pfp/rag2- und Select-Mäusen. Prozentuale Anteile d) CD11b^+ , e) $\text{CD11b}^+ \text{Gr-1}^+$, f) $\text{CD11b}^+ \text{Gr-1}^{\text{Hi}} \text{SSC}^{\text{Int}}$ und g) $\text{CD11b}^+ \text{Gr-1}^{\text{Hi}} \text{SSC}^{\text{Lo}}$ Zellen an der CD45^+ Zellfraktion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Statistik mittels Mann-Whitney-U-Test; ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.4.5 Morphologie der Milz in Xenograft-Tumor-tragenden Mäusen

An Milz-Präparaten Tumor-tragender pfp/rag2- und Select-Mäuse wurde überprüft, ob neben den in naiven Select-Mäusen bereits beobachteten Auffälligkeiten weitere Tumor-induzierte morphologische Veränderungen auftraten. Hierzu wurden pfp/rag2- und Select-Mäusen shControl- oder shITGB4-Zellen der Tumorzelllinien PC-3 bzw. PaCa5061 s.c. injiziert. Zehn Tage nach Inokulation der Tumorzellen wurden die Milzen entnommen und histologisch aufgearbeitet. Anhand von HE-Färbungen konnte in der shControl/Select-Versuchsgruppe zwischen roter und weißen Pulpa differenziert werden, während in Select-Mäusen mit shITGB4-Tumoren Bereiche der weißen Pulpa undifferenziert und desorganisiert erschienen. So waren insbesondere deutlich weniger Milzknötchen in dieser Versuchsgruppe erkennbar (Abb. 4.15, a). Des Weiteren konnten in Select-Tieren beider Versuchsgruppen (unabhängig vom ITGB4-Status der injizierten Tumorzellen) erneut Zellen mit ringförmiger Zellkernmorphologie identifiziert werden (Abb. 4.15, b; Pfeile). Zudem fanden sich eine Vielzahl blastärer sowie größerer Megakaryozyten-ähnlicher Zellen in Präparaten dieser Versuchsgruppen (Abb. 4.15, b; Pfeilspitzen). Milzen von pfp/rag2-Mäusen zeigten nach Injektion von shControl- oder shITGB4-Tumorzellen (PC-3 und PaCa5061) keine dieser morphologischen Auffälligkeiten.

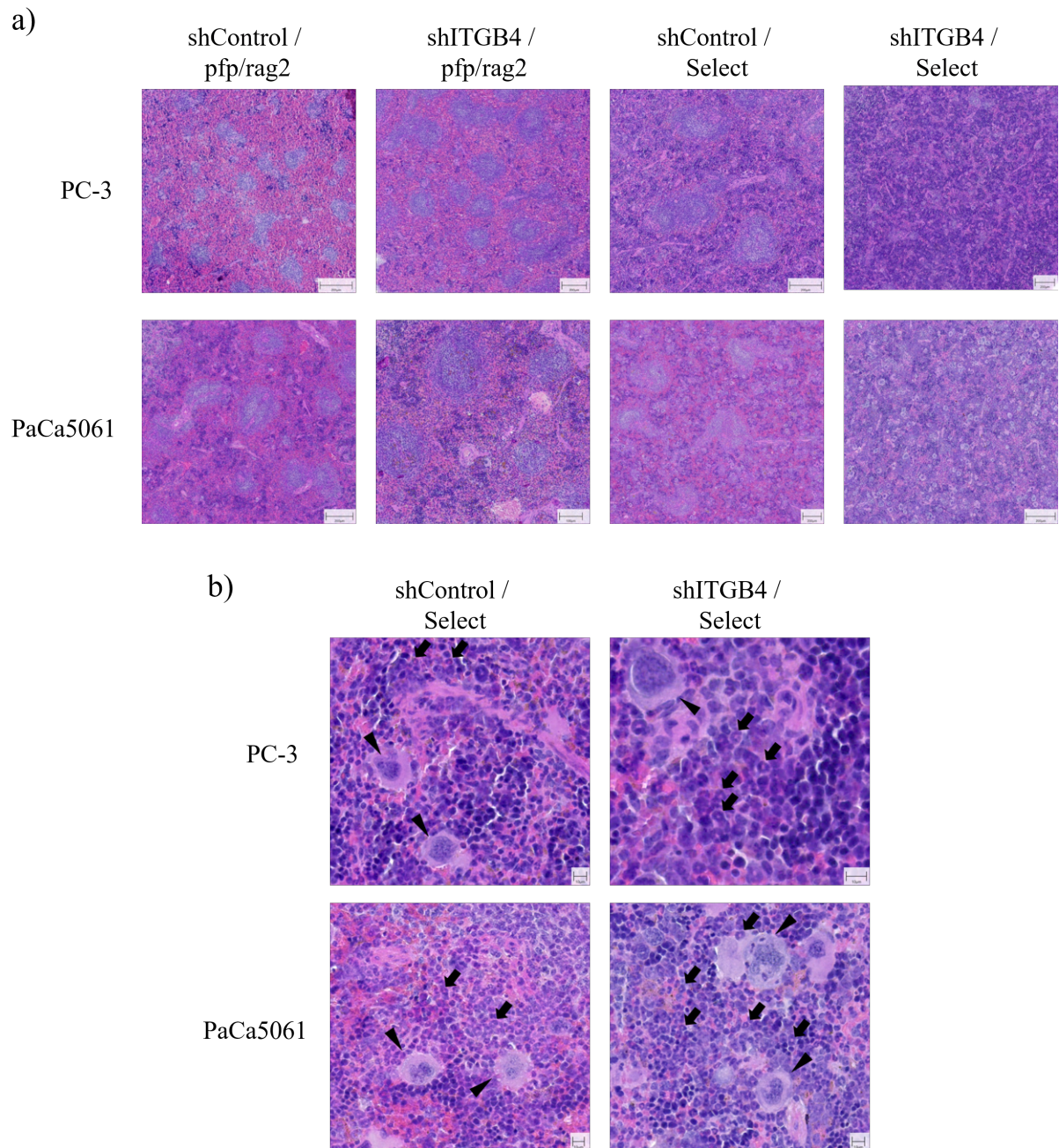


Abbildung 4.15: HE-Färbungen von Milzen Xenograft-Tumor-tragender pfp/rag2- und Select-Mäuse. a, b) Repräsentative HE-Färbungen von Milzen aus Tumor-tragenden pfp/rag2- und Select-Mäusen. Milzen wurden 10 Tage nach s.c. Inokulation von PC-3 oder PaCa5061- shControl bzw. shITGB4- Tumorzellen entnommen. Pfeile markieren Zellen mit ringförmiger Kernmorphologie. Pfeilspitzen markieren Zellen mit Megakaryozyten-ähnlicher Morphologie. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils a) 200 μm bzw. b) 10 μm .

4.4.6 Charakterisierung Gr-1⁺ Immunzell-Subpopulationen in Milzen

Xenograft-Tumor-tragender Mäuse

Nachdem in Milzen von Xenograft-Tumor-tragenden Select-Mäusen ein erhöhter prozentualer Anteil der CD11b⁺ Gr-1⁺-Zellpopulation festgestellt werden konnte und insbesondere in der shITGB4/Select-Versuchsgruppe eine Störung der Milz-Morphologie vorlag, sollte die Identität der CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen des Gr-1-Epitops tiefergehend analysiert werden. Zur weiteren Charakterisierung der CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellfraktion wurden Milzen von pfp/rag2- und Select-Mäusen 10 Tage nach s.c. Injektion von PC-3-shControl- bzw. shITGB4-Tumorzellen durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu wurden vier Antikörper, die sich gegen die Oberflächenantigene CD45, CD11b, Ly6C und Ly6G richteten, verwendet. Nach Exklusion von Zellfragmenten und Dubletten wurden vitale CD45⁺ CD11b⁺ Zellen auf die Expression von Ly6C und Ly6G untersucht. Hierbei ließen sich drei Zellpopulationen differenzieren: L6C⁺ Ly6G⁻ (Population A in Abb. 4.16, a), L6C^{Int} Ly6G⁻ (Population B in Abb.4.16, a) und L6C^{Int} Ly6G⁺ (Population C in Abb. 4.16, a). Aus den Analysen ließ sich schließen, dass der gesteigerte Anteil Gr-1⁺ Zellen in Milzen Tumor-tragender Select-Versuchstiere (Abb. 4.13, c) im Wesentlichen auf einen erhöhten Anteil L6C^{Int} Ly6G⁺ Zellen beruht (Abb. 4.16, d), da sich zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede im Anteil L6C⁺ Ly6G⁻ oder L6C^{Int} Ly6G⁻ Zellen ergaben (Abb. 4.16, b, c).

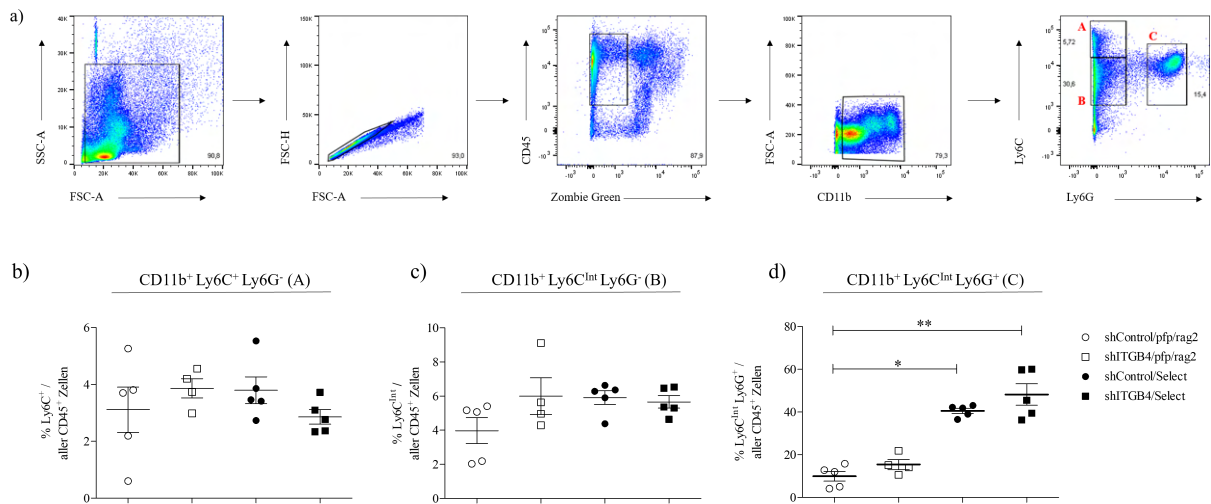


Abbildung 4.16: Durchflusszytometrische Analyse Gr-1⁺ Immunzell-Subtypen in Milzen Xenograft-Tumor-tragender Mäuse. pfp/rag2- und Select-Mäusen wurden 1×10^6 shControl oder shITGB4-Tumorzellen der Linie PC-3 s.c. injiziert. 10 Tage nach Inokulation erfolgte die Immunphänotypisierung von isolierten Zellen aus der Milz mittels anti-CD45-, anti-CD11b-, anti-Ly6C- und anti-Ly6G-Antikörper. a) Repräsentative Darstellung der *Gating*-Strategie anhand von Punktwolkendiagrammen (von links nach rechts). Der Fluoreszenzfarbstoff Zombie Green wurde zur Lebend/Tot-Diskriminierung eingesetzt. Prozentuale Anteile b) CD11b⁺ L6C⁺ Ly6G⁻ (Population A in a), c) CD11b⁺ L6C^{Int} Ly6G⁻ (Population B in a) und d) CD11b⁺ L6C^{Int} Ly6G⁺ (Population C in a) Zellen gegenüber der CD45⁺ Zellfraktion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Statistik mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunns Post-Test; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. Hi=hoch, Int=intermediär.

4.4.7 Immunhistologische Färbung Ly6G⁺ Zellen in Milzen von Xenograft-Tumor-tragenden Mäusen

Neben der durchflusszytometrischen Analyse wurden Milzen von pfp/rag2- und Select-Mäusen nach s.c. Injektion von shControl- bzw. shITGB4-Tumorzellen der Linie PC-3 und PaCa5061 für die Immunhistologie aufgearbeitet und auf den Marker Ly6G gefärbt. Die bereits beschriebene Desorganisation der weißen Pulpa in der shITGB4/Select-Gruppe ist deutlich erkennbar (Abb. 4.17). Milzen aus Select-Mäusen wiesen in beiden Tumorentitäten die stärkste Anfärbung von Ly6G auf, was auf eine erhöhte Anzahl Ly6G⁺ Zellen in diesen Versuchsgruppen hindeutet (Abb. 4.17). Dieser Befund unterstützt das Ergebnis der *ex vivo* Durchflusszytometrie.

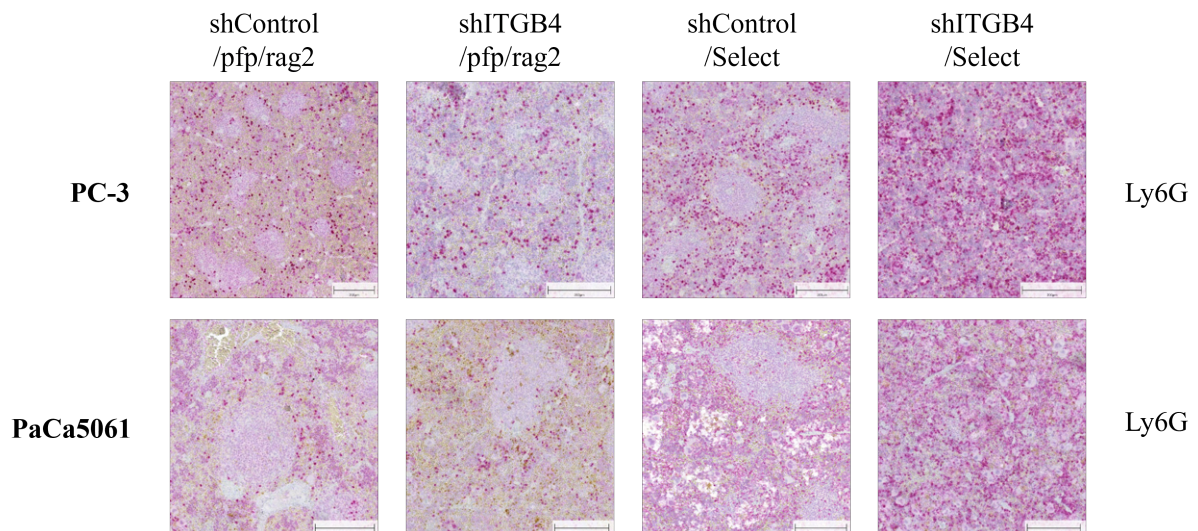


Abbildung 4.17: Immunhistologische Färbung Ly6G⁺ Zellen in Milzen von Tumor-tragenden pfp/rag2- und Select-Mäusen. Repräsentative Ly6G-Färbung an Milzen von pfp/rag2- und Select-Mäusen 10 Tage nach s.c. Inokulation von shControl- bzw. shITGB4-Tumorzellen der Linien PC-3 und PaCa5061. Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

4.4.8 Morphologie isolierter Gr-1⁺ Zellen der Milz

Zur Beurteilung der morphologischen Merkmale Gr-1⁺ Zellen in murinen Milzen wurden Gr-1^{Hi} Ly-6G⁺ Zellen mittels magnetischer Zellseparation (*Myeloid-derived Suppressor Isolation Kit*, Miltenyi Biotec) aus shITGB4-Tumor-tragenden pfp/rag2-Mäusen isoliert und Cytospins angefertigt. Obwohl in Milzen von Select-Mäusen der Anteil an Ly6G⁺ Zellen vermehrt schien, wurde an dieser Stelle bewusst eine Separation dieser Zellfraktion aus shITGB4-Tumor-tragenden pfp/rag2-Mäusen angestrebt, um diese zukünftig für Co-Injektionsversuche mit Tumorzellen nutzbar zu machen. Die initiale mikroskopische Analyse Giemsa-gefärbter Präparate zeigte verschiedene Zell-Subpopulationen. Generell ließen sich zahlreiche Zellen mit ringförmiger Kernmorphologie identifizieren, die sowohl große Ringzentren mit randständigen Kerneinschnürungen (Abb. 4.18, a) als auch kleinere Ringdurchmesser mit runder und regulärer Kernkontur aufwiesen (Abb. 4.18, b). Weiterhin konnten Zellen mit lobulärer (Abb. 4.18, c) und vollständig geschlossener Kernstruktur (Abb. 4.18, d) gefunden werden.

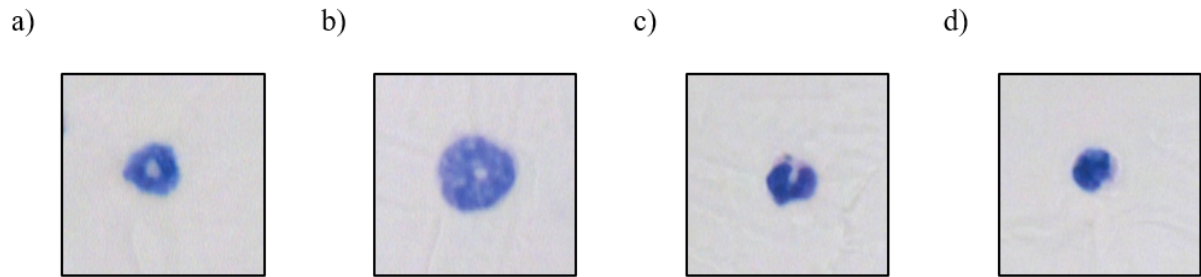


Abbildung 4.18: Giemsa-Färbung isolierter Gr-1^{Hi} Ly-6G⁺ Zellen aus Milzen Xenograft-Tumor-tragender pfp/rag2-Mäuse. Giemsa-Färbung der Gr-1^{Hi} Ly-6G⁺ Zellfraktion muriner Milzen aus pfp/rag2-Mäusen 20 Tage nach Inokulation von shITGB4-PC-3-Tumorzellen. Die Isolierung erfolgte mittels eines *Myeloid-derived Suppressor Isolation Kit* (Miltenyi Biotec). Gezeigt sind repräsentative Einzelzellen mit a) ringförmiger Kernmorphologie mit großem Ringzentrum und Einkerbungen, b) ringförmiger Kernmorphologie mit kleinem Ringzentrum und runder Kernkontur, c) lobulärer Kernstruktur und d) geschlossener Kernmorphologie. Originalvergrößerung x63.

4.4.9 Immunphänotypisierung myeloider Zellen in s.c. Tumoren von Xenograft-Modellen

Tumor-infiltrierende Immunzellen spielen für die Etablierung und weitere Progression von Tumoren eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurden neben den in dieser Arbeit betrachteten Veränderungen der Immunzellkomposition peripherer Organe auch die immunologische Zusammensetzung von Tumorgewebe betrachtet. Die Charakterisierung Tumor-infiltrierender Immunzellen erfolgte zunächst exemplarisch an PC3-Tumoren mittels fünf Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD45, CD11b, CD11c, F4/80 und Gr-1. Zehn Tage nach s.c. Injektion von shControl- bzw. shITGB4-Tumorzellen wurden entstandene Tumorknoten aus pfp/rag2- und Select-Mäusen entnommen und für die durchflusszytometrische Analyse aufgearbeitet. Abbildung 4.19a zeigt exemplarisch die Größe eines Tumorknotens nach Entnahme sowie deren Gewicht in den jeweiligen Versuchsgruppen. Hierbei zeigte sich, dass shITGB4-Tumore im Vergleich zu shControl-Tumoren im gleichen Wachstumszeitraum kleinere Tumorknötchen ausbildeten (Abb. 4.19, a). Zur Analyse der durchflusszytometrischen Daten wurden nach Exklusion von Zellfragmenten und Dubletten vitale CD45⁺ Zellen identifiziert. Hiervon ausgehend wurde der prozentuale Anteil CD11b⁺, CD11b⁺ Gr-1⁺, CD11b⁺ F4/80⁺ und CD11b⁺ CD11c⁺ Zellen ermittelt (Abb. 4.19, a). Weiterhin konnten innerhalb der CD11b⁺ Zellpopulation Gr-1^{Hi} SSC^{Lo} Zellen

(Population B in Abb. 4.19, a) von Gr-1⁻ SSC^{Lo} Zellen (Population A in Abb. 4.19, a) unterschieden werden. Während der Anteil CD11b⁺ Zellen in den Versuchsgruppen nicht variierte (Abb. 4.19, c), konnte in shITGB4-Tumoren von pfp/rag2-Mäusen ein erhöhter Anteil an CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen ermittelt werden (Abb. 4.19, d). Dieser ließ sich durch die weitere Betrachtung der Zellgranularität (SSC) auf einen erhöhten prozentualen Anteil an Gr-1^{Hi} SSC^{Lo} Zellen zurückführen (Abb. 4.19, e). Dieser Anstieg des Anteils CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen war in shITGB4-Tumoren von Select-Mäusen nicht feststellbar. Bezüglich des Anteils CD11b⁺ F4/80⁺ Zellen konnte zwischen den Versuchsgruppen kein Unterschied ermittelt werden (Abb. 4.19, f). CD11b⁺ CD11c⁺ Zellen fanden sich vermehrt in shITGB4-Tumoren von Select-Mäusen, wobei sich ein signifikanter Unterschied nur im Vergleich zur shContol/pfp/rag2-Versuchsgruppe ergab (Abb. 4.19, g).

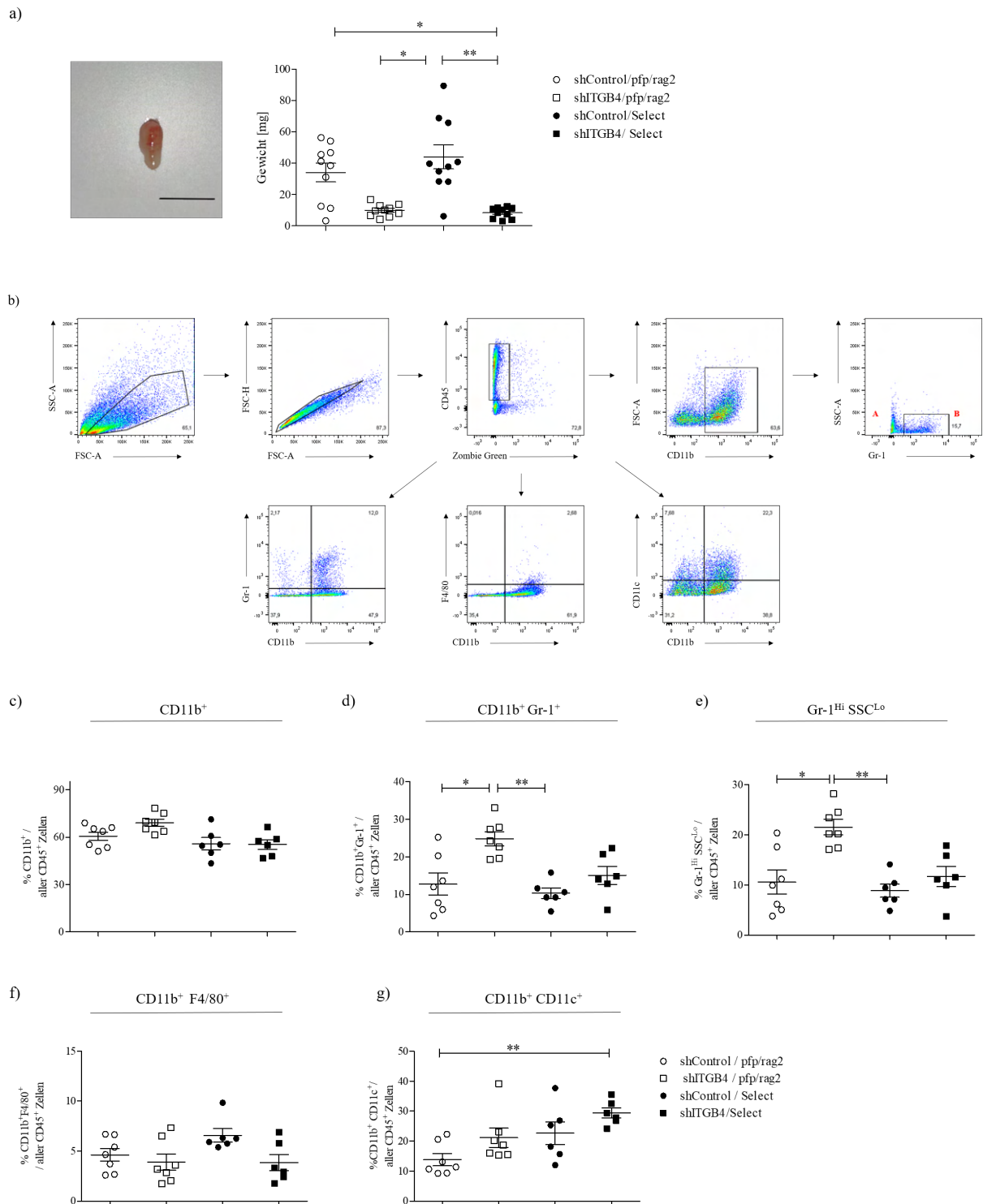


Abbildung 4.19: Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen in s.c. Xenograft-Tumoren von pfp/rag2- und Select-Mäusen. Pfp/rag2- und Select-Mäusen wurden 1×10^6 shControl- und shITGB4-PC3-Tumorzellen s.c. injiziert. Immunzell-Subpopulationen wurden 10 Tage nach s.c. Inokulation analysiert. a) Repräsentative Abbildung entnommener Tumore 10 Tage nach s.c. Inokulation sowie Dokumentation des Tumorgewichts. Der Maßstabsbalken entspricht 0,5 cm. b) Repräsentative Darstellung der für die Analysen zugrunde gelegten *Gating*-Strategie anhand von Punktwolkendiagrammen (von links nach rechts). Prozentuale Anteile c) $CD11b^+$, d) $CD11b^+ Gr-1^+$, e) $CD11b^+ Gr-1^{Hi} SSC^{Lo}$ (Population B in a), f) $CD11b^+ F4/80^+$ und g) $CD11b^+ CD11c^+$ Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler. Statistik mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunns Post-Test; * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$. Hi=hoch, Lo= gering.

4.4.10 Charakterisierung Gr-1⁺ Immunzell-Subpopulationen in s.c.

Xenograft-Tumoren

Zur weiteren Charakterisierung CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen wurden PC-3-shControl- bzw. shITGB4-Tumore 10 Tage nach Inokulation aus pfp/rag2- und Select-Versuchstieren entnommen und durchflusszytometrisch auf die Oberflächenantigene CD45, CD11b, Ly6C und Ly6G analysiert. Es ließen sich drei Zellpopulationen voneinander abgrenzen: L6C⁺ Ly6G⁻ (Population A in Abb. 4.20, a), L6C^{Int} Ly6G⁻ (Population B in Abb. 4.20, a) und L6C^{Int} Ly6G⁺ (Population C in Abb. 4.20, a) (Abb.4.20, a). Innerhalb der Versuchsgruppen konnten für keine der Populationen signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abb. 4.20, b-d). Allerdings dominierte in allen Versuchsgruppen der Anteil an L6C^{Int} Ly6G⁻ Zellen (Abb. 4.20, c; Population B in Abb. 4.20, a).

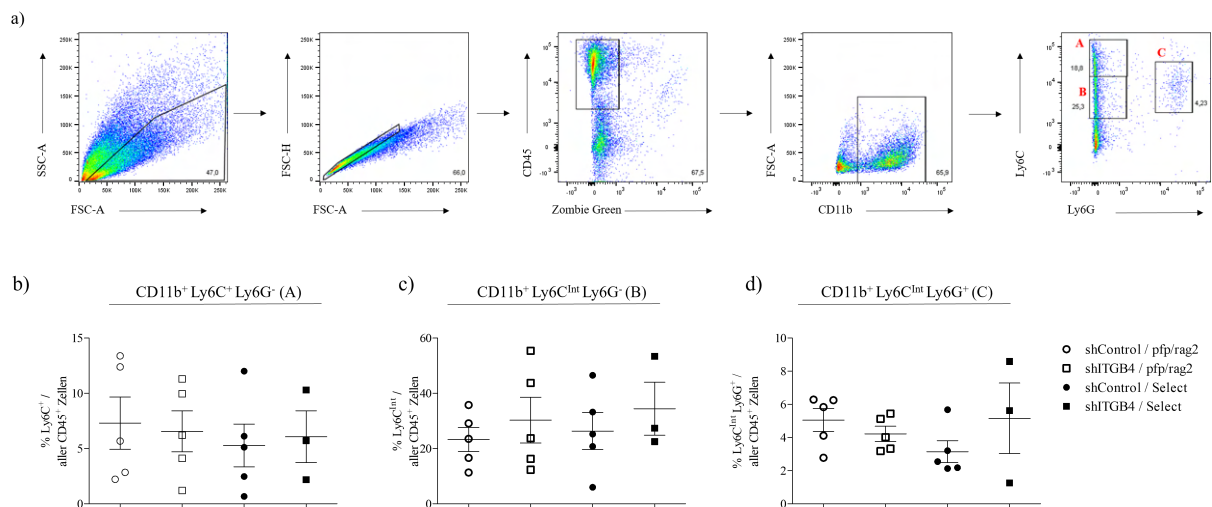


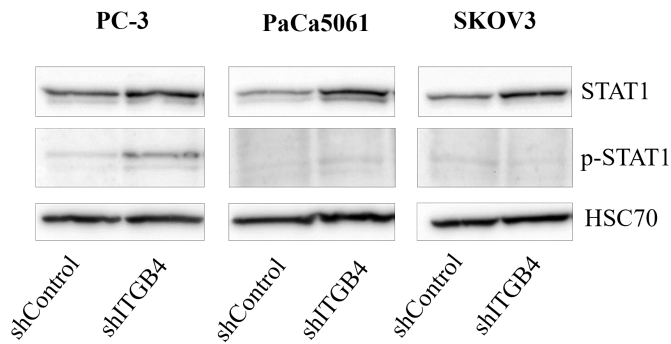
Abbildung 4.20: Durchflusszytometrische Analyse Gr-1⁺ Immunzell-Subtypen in s.c. Xenograft-Tumoren. Pfp/rag2- und Select-Mäusen wurden 10⁶ shControl- und shITGB4-PC-3-Tumorzellen s.c injiziert. Immunzell-Subpopulationen wurden 10 Tage nach s.c. Inokulation durchflusszytometrisch analysiert. a) Repräsentative Darstellung der *Gating*-Strategie anhand von Punktwolkendiagrammen (von links nach rechts). Der Fluoreszenzfarbstoff Zombie Green wurde zur Lebend/Tot-Diskriminierung eingesetzt. Prozentuale Anteile b) CD11b⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁻, c) CD11b⁺ Ly6C^{Int} Ly6G⁻ und d) CD11b⁺ Ly6C^{Int} Ly6G⁺ Zellen gegenüber der CD45⁺ Zellfraktion. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler. Statistik mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunns Post-Test. Hi=hoch, Int=intermediär.

4.5 Untersuchungen zur veränderten Signaltransduktion in ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen

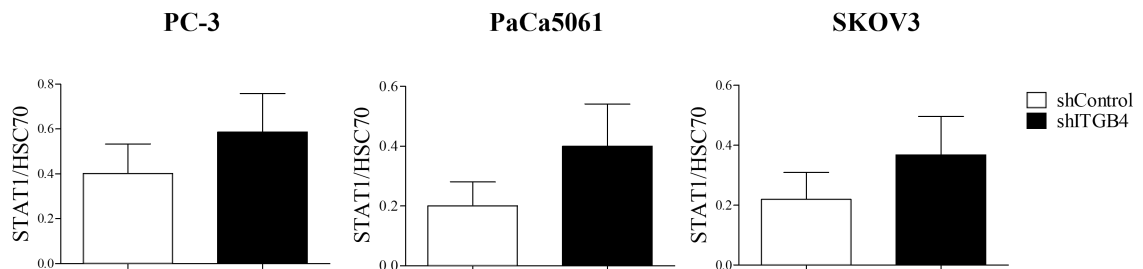
4.5.1 Untersuchungen zur STAT1-Expression

Der Transkriptionsfaktor STAT1 (engl. *signal transducer and activator of transcription* 1) nimmt in der Tumorbiologie eine kontroverse Stellung ein. Zahlreiche Studien korrelieren die STAT1 Expression in Tumorzellen sowohl mit Tumor-supprimierenden als auch Tumor-fördernden Eigenschaften (Meissl et al., 2017). Zu den Tumor-fördernden Funktionen von STAT1 zählt die Begünstigung des Tumorstwachstums durch Induktion einer immunsupprimierenden TME (Meissl et al., 2017). Um den Expressions- und Aktivitätsstatus von STAT1 in Abhängigkeit von der ITGB4-Expression zu untersuchen, wurden Tumorzelllysate mittels Western Blot analysiert. Hierbei zeigte sich, dass shITGB4-Tumorzellen in allen drei untersuchten Tumorentitäten im Vergleich zu den entsprechenden shControl-Zellen tendenziell erhöhte STAT1-Level aufweisen (Abb. 4.21, a, b). Zusätzlich konnte in PC-3-shITGB4-Zellen eine signifikant gesteigerte STAT1-Phosphorylierung an Position Y701 nachgewiesen werden (Abb. 4.21, c).

a)



b)



c)

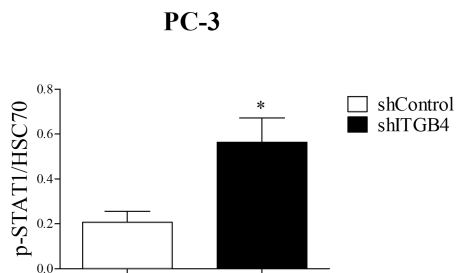


Abbildung 4.21: Analyse der STAT1- und p-STAT1-Level in PC-3, PaCa5061 und SKOV3-Tumorzelllysaten. a) Repräsentative Western Blots der STAT1- und p-STAT1-Proteinexpression (87 kDa) in shControl- und shITGB4-Zelllysaten der Tumorzelllinien PC-3, PaCa5061 und SKOV3. HSC70 (70 kDa) diente als Ladekontrolle. b) Quantifizierung von STAT1 relativ zu HSC70 mittels der Software VisionCap. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=4$ pro Versuchsgruppe. Statistik mittels ungepaartem t-Test. c) Quantifizierung von p-STAT1 relativ zu HSC70 Ladekontrolle für die Zelllinie PC-3 mittels der Software VisionCap. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus $n=3$ pro Versuchsgruppe. Statistik mittels ungepaartem t-Test; * $p \leq 0.05$.

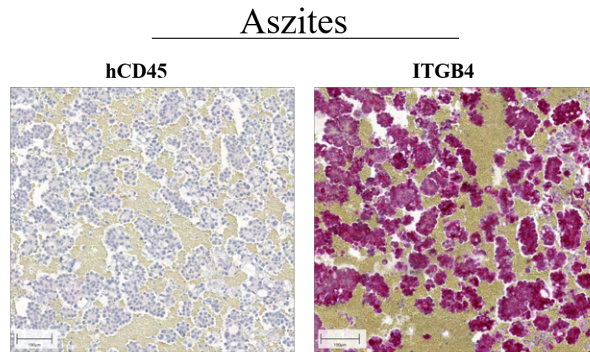
4.6 Untersuchungen zur leukozytären Infiltration in humanen Tumorgeweben

4.6.1 Assoziation zwischen ITGB4-Expression und leukozytärer Infiltration in intraperitonealen Karzinosen von Ovarialkarzinom-Patientinnen

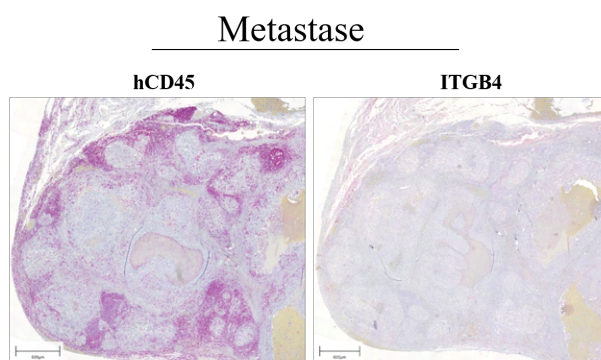
Zur Validierung der klinischen Relevanz der *in vitro* und *in vivo* erhobenen Daten sollte im Weiteren die ITGB4- und hCD45-Expression an humanem Tumorgewebe analysiert werden. Zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit war die immunhistologische Färbung und Befundung von Prostata- und Pankreaskarzinom-Biopsien noch nicht vollständig abgeschlossen. Allerdings stand durch freundliche Unterstützung von Frau PD Dr. Christine Stürken (Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, UKE) ein Kollektiv intraperitonealer Karzinosen von Ovarialkarzinom-Patientinnen institutsintern zur Verfügung. Da die synergistische Wachstumsinhibition von Tumoren auch zuvor für das SKOV3-Xenograft-Modell beobachtet werden konnte, begründete dies die weiterführende Analyse. Die immunhistologische Untersuchung der Expression von ITGB4 sowie die Infiltration durch hCD45-positiver Leukozyten erfolgte an Konsekutivschnitten. Insgesamt wurden 46 Gewebeschnitte nach einem Scoring-Schema bewertet, in dem die Intensität der ITGB4- und korrespondierenden CD45-Färbereaktion von 0-3 bewertet wurde. Ein Score von 3 wurde bei starker, ein Score von 0 bei keiner Anfärbung vergeben. Nach diesem Schema wurden sowohl den Karzinosen mit keiner oder geringer ITGB4-Anfärbung (ITGB4 low (0+1)) als auch den Karzinosen mit mittlerer und starker ITGB4-Anfärbung (ITGB4 high (2-3)) ein entsprechender CD45-Score zugeteilt. Abbildung 4.22 a und b zeigen beispielhafte Anfärbungen von ITGB4 und CD45 an Aszites und einer Metastase aus dem subhepatischen Spaltraum (Recessus hepatorenalis). Im Aszites wiesen freie Tumorsphäroide eine deutliche ITGB4-Anfärbung auf, während gleichzeitig keine Anfärbung von CD45 vorlag. Dem gegenüber wurden in der peritonealen Metastase CD45-positive Leukozyten angefärbt, jedoch wiesen die Tumorzellen keine ITGB4-Expression auf. Die Auswertung des Scores bestätigte, dass die Leukozytendichte negativ mit der ITGB4-

Expression auf Tumorzellen assoziiert war (Abb. 4.22, c).

a)



b)



c)

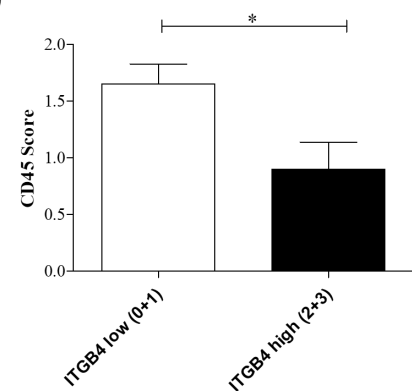


Abbildung 4.22: Immunhistologische Färbung von ITGB4 und CD45 an humanen i.p. Karzinosen von Ovarialkarzinom-Patientinnen. Durch freundliche Unterstützung von Frau PD Dr. Christine Stürken aus dem Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie am UKE wurden Konsekutivschnitte von i.p. Karzinosen aus Ovarialkarzinom-Patientinnen (n=46) auf ITGB4 und CD45 gefärbt. Beispielhafte ITGB4- und CD45-Färbungen an Aszites (a) und einer Metastase aus dem subhepatischen Spaltraum (b). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m (a) bzw. 600 μ m (b). c) Gegenüberstellung der CD45- und ITGB4-Scores. Karzinosen mit keiner oder geringer ITGB4-Anfärbung wurden als ITGB4 low (0+1), Karzinosen mit mittlerer bis starker ITGB4-Anfärbung wurden als ITGB4 high (2+3) gruppiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus n=46. Statistik mittels ungepaartem t-Test; * $p \leq 0.05$.

5 Diskussion

Die Existenz Tumor-antagonisierender und Tumor-fördernder Immunzellen in der Mikroumgebung solider Tumore ist heute eine zentrale Herausforderung therapeutischer Interventionen. Durch die Weiterentwicklung der Immuntherapie bietet sich Klinikern bereits eine effektive Alternative zum klassischen Behandlungsspektrum. Limitiert wird dies jedoch durch die Fähigkeit von Tumorzellen, einer Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen und die immunologische Zusammensetzung der TME variabel im Prozess der Tumorentwicklung zu gestalten. Die gezielte Charakterisierung von Immunzellen der TME sowie die Aufklärung der an der Kommunikation von Tumorzellen und Immunzellen relevanten molekularen Prozesse stellt daher zukünftig eine wichtige Aufgabe der Grundlagenforschung dar.

5.1 Bedeutung von ITGB4 und E-/P-Selektin für die Tumorentwicklung im Xenograft-Modell

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte für verschiedene Xenograft-Modelle aufgezeigt werden, dass ein ITGB4-*knockdown* in Tumorzellen zu einer signifikanten Verzögerung des Primärtumorwachstums führte. Darüber hinaus inhibierte eine kombinierte E- und P-Selektin-Defizienz der Versuchstiere das Auswachsen von ITGB4-*knockdown*-Tumoren nahezu vollständig. Demgegenüber war die Wachstumsgeschwindigkeit von Kontroll-Tumoren in E-/P-Selektin-defizienten Tieren unverändert. Dies war insofern ein außergewöhnlicher Befund, dass er sich Tumorentitäten-übergreifend für die Tumorzelllinien PC-3, PaCa5061 und SKOV3 reproduzieren ließ. Diese Dissertation sollte die Frage adressieren, ob dieser gleichmäßige Phänotyp durch gemeinsame oder ähnliche molekulare Mechanismen erklärt werden kann.

Im ersten Schritt musste zunächst die Bedeutung der ITGB4-Expression auf Tumorzellen und deren mögliche Kommunikation zu E-/P-Selektin des Wirts im Prozess der in-

itialen Tumorentwicklung eingeordnet werden. Im Softagar-*assay* konnte die dreidimensionale Kolonieformation von ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen im Vergleich zu ITGB4-exprimierenden Tumorzellen verglichen werden. Interessanterweise konnte für alle der drei untersuchten Tumorzelllinien festgestellt werden, dass ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen bei gleicher Wachstumsdauer kleinere Tumorkolonien ausbildeten. Dieses Ergebnis lässt einen durch die reduzierte ITGB4-Expression verursachtes Kolonisations-Defizit von Tumorzellen vermuten und könnte das verlangsamte Tumorwachstum innerhalb der pfp/rag2-Versuchsgruppe erklären. Eine Einschränkung der Kolonieformation nach ITGB4-*knockdown* konnte *in vitro* ebenfalls bei Zellen des hepatozellulären Karzinoms (Li et al., 2017b) und Brustkrebszellen (Lipscomb et al., 2005) gezeigt werden. *In vivo* konnte dies am Xenograft-Modell von PC-3 Tumoren ebenfalls rekapituliert werden. ITGB4-*knockdown*-Zellen bildeten hier im Vergleich zu Kontroll-Zellen nach einer 10-tägigen Wachstumszeit bereits kleinere Tumore aus. Die Beobachtung zum verlangsamten Wachstum ITGB4-depletierter Xenograft-Tumore wird von weiteren Studien bestätigt (Li et al., 2017b; Ma et al., 2019b; Sung et al., 2020). Dies scheint unter der Berücksichtigung, dass die ITGB4-Untereinheit in Epithelzellen als Hauptkomponente von Hemidesmosomen funktioniert und über intrazelluläre Interaktionen mit Keratinfilamenten bzw. extrazelluläre Bindung an Laminin eine feste Adhäsion der Zelle mit der Basallamina vermittelt (Dowling et al., 1996; Wilhelmsen et al., 2006), schlüssig. Ein Verlust der ITGB4-vermittelten Zell-Matrix-Kontakte könnte dementsprechend eine gesteigerte Anoikis-Induktion bedingen und das verlangsamte Wachstumsverhalten mitbegründen. Dies bestätigen die *in vitro* Daten der AnnexinV-basierten Analyse zur Zellvitalität dreidimensionaler Tumor-Sphäroide. ITGB4-*knockdown*-Tumorsphäroide der Linien PC-3 und PaCa5061 wiesen hier einen gesteigerten Anteil an AnnexinV-positiven Zellen auf. Dies konnte für ITGB4-*knockdown*-Tumorsphäroide der Linie SKOV3 nicht gezeigt werden. Vorangegangene *in vitro* Studien zur Untersuchung der Apoptose-Induktion in zwei- und dreidimensionaler Kultur mit ITGB4-*knockdown*-SKOV3-Tumorzellen konnten bezüglich des Apoptosemarkers pH2A.X ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zu Kontroll-Zellen feststellen (Labitzky, 2018). Allerdings konnte in ITGB4-*knockdown*-Xenograft-Tumoren aller drei Tumorzelllinien ei-

ne gesteigerte Anzahl apoptotischer Zellen nachgewiesen werden (Kirchner, 2019; Labitzky, 2018; Schetler, 2019). Durch welchen Signalmechanismus die Anoikis nach reduzierter ITGB4-Expression im Detail induziert wird, ist jedoch noch unklar. Die reduzierte Fähigkeit zur dreidimensionalen Kolonieformation in Kombination mit einer erhöhten Anoikis-Induktion könnte die beobachtete Wachstumsverzögerung von ITGB4-*knockdown*- gegenüber Kontroll-Tumoren im pfp/rag2-Modell erklären. Da in pfp/rag2- im Vergleich zu E-/P-Selektin-*knockout*-Mäusen ein Wachstum von ITGB4-*knockdown*-Tumoren möglich ist, kann die beobachtete synergistische Wachstumsinhibition nicht allein durch die eingeschränkte Kolonieformation bzw. eine gesteigerte Anoikis-Induktion erklärt werden, sondern muss durch den E- und P-Selektin-Status des Wirts zusätzlich beeinflusst sein. Zudem lässt sich vermuten, dass insbesondere solche ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen Tumore etablieren, die im Verlauf eine Resistenz gegen die Anoikis-auslösenden Stimuli entwickeln. Im E-/P-Selektin-defizienten Modell scheinen ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen wiederum Anoikis-sensibel bzw. nicht zur Resistenz-Entwicklung befähigt zu sein. Da das Wachstum von Kontroll-Tumoren durch eine E-/P-Selektin-Defizienz nicht beeinträchtigt ist, scheinen insbesondere ITGB4-*knockdown*-Tumore im pfp/rag2-Modell für eine erfolgreiche Etablierung auf die Präsenz von E-/P-Selektin angewiesen zu sein.

Für die Linie PC-3 wurde in dieser Arbeit erstmals analysiert, ob die Wachstumseinschränkung von ITGB4-*knockdown*-Tumoren auf die Deletion von E- oder P-Selektin oder eine kombinierte Deletion zurückführbar ist. Hierbei wurde deutlich, dass ausschließlich bei Vorliegen einer Doppeldefizienz die Wachstumsinhibition von ITGB4-*knockdown*-Tumoren beobachtet werden kann. Auch nach 279 Tagen wurde keine Maus dieser Gruppe Tumor-bedingt aus dem Versuch genommen. Dies lässt eine kooperative Funktion der beiden Selektine vermuten. Daran schließt sich die Frage an, wie E-/P-Selektin innerhalb der Mikroumgebung die Tumorentwicklung beeinflussen können. Eine direkte Kommunikation zwischen Tumorzellen und murinen E-/P-Selektin im s.c Xenograft-Modell erscheint unwahrscheinlich, da Selektine endoluminal in Mikrogefäßen der Umgebung exprimiert werden, so dass die Tumorzellen nach Injektion keinen unmittelbaren Kontakt zu diesen

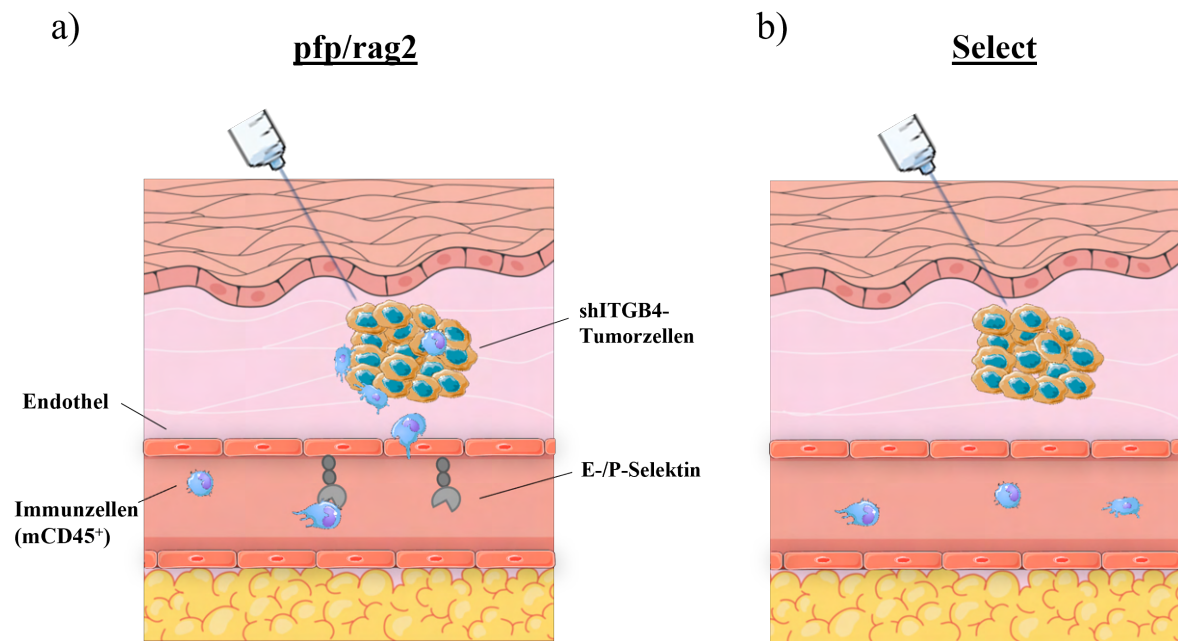


Abbildung 5.1: Pathophysiologisches Modell zur Rolle von E- und P-Selektin bei der Etablierung von Xenograft-Tumoren. a) In E-/P-Selektin-kompetenten pfp/rag2-Mäusen führt die Tumorzellinjektion sowie die anschließende Tumoretablierung durch Induktion inflammatorischer Stimuli zu einer Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blutstrom. Diese sind durch Adhäsion an E- und P-Selektin in der Lage das Tumorbett zu infiltrieren und somit Einfluss auf die Tumorentwicklung auszuüben. b) In Select-Mäusen inhibiert der Verlust von E/P-Selektin die Auswanderung von Leukozyten und somit die Infiltration des Tumors.

haben sollten. Stattdessen stellten wir die Hypothese auf, dass die Präsenz von E-/P-Selektin primär die immunologische Zusammensetzung der TME beeinflusst (Abb.5.1): demnach bedingen die Tumorzell-Injektion als auch die spätere Tumoretablierung inflammatorische Prozesse, die zu einer Attraktion von Leukozyten aus dem Blutstrom führen. Entsprechend der Adhäsionskaskade vermitteln E- und P-Selektin die Anheftung von Leukozyten an die Endothel-Oberfläche und initiieren die Einwanderung in das entzündete Gewebe (Ley et al., 1998; Mayadas et al., 1993; Nolte et al., 1994; Robinson et al., 1999). In E- und P-Selektin-defizienten Tieren konnte daher davon ausgegangen werden, dass die Leukozytenrekrutierung beeinträchtigt ist (Abb. 5.1, b). Dies wurde bereits durch Studien anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Bullard et al. beschrieben, dass das Rollverhalten von Leukozyten in Venolen des murinen M. cremaster in E-/P-Selektin-defizienten Mäusen vollständig unterbunden ist (Bullard et al., 1996). Eine Intravitalmikroskopie mesenterialer Venolen von zuvor inflammatorisch stimulierten E-/P-Selektin-defizienten Mäusen zeigte eine 46-fache Reduktion der Anzahl „rollender“ Leukozyten gegenüber

Wildtyp-Mäusen (Frenette et al., 1996). Ebenso konnten Robinson et al. ein supprimiertes leukozytäres Rollverhalten in E-/P-Selektin-*knockout* Mäusen zeigen (Robinson et al., 1999). Immunhistologische Untersuchungen an frühen Tumoren bestätigten, dass ITGB4-*knockdown*-Tumore in pfp/rag2-Mäusen im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen eine verstärkte Anfärbung des Pan-Leukozytenmarkers CD45 aufwiesen. Bei gleichzeitigem E- und P-Selektin-*knockout* war dies nicht mehr feststellbar.

Da ITGB4-*knockdown*-Tumore von pfp/rag2-Mäusen trotz erhöhter leukozytärer Infiltration einen Wachstumsvorteil gegenüber ITGB4-*knockdown*-Tumoren in E-/P-Selektin-defizienten Mäusen aufwiesen, muss davon ausgegangen werden, dass die entsprechenden Immunzellen eine Tumor-förderliche Funktion wahrnehmen, die sich speziell bei ITGB4-*knockdown* positiv auswirkt (das Wachstum von Kontroll-Tumoren war im E-/P-Selektin-*knockout* nicht beeinträchtigt).

Interessanterweise hatten E-Selektin-defiziente Mäuse mit ITGB4-*knockdown*-Tumoren ein Überlebensnachteil gegenüber P-Selektin-defizienten Tieren. Verschiedene Inhibitions- und *Knockout*-Studien schreiben P-Selektin für die Auswanderung von Leukozyten eine wichtigere Rolle als E-Selektin zu (Labow et al., 1994; Nolte et al., 1994; Robinson et al., 1999). In E-Selektin-defizienten Mäusen scheint eine Leukozytenrekrutierung durch eine P-Selektin-vermittelte Kompensation weiterhin möglich (Labow et al., 1994). Eine P-Selektin-Defizienz hingegen scheint sich insbesondere in der frühen Phase eines inflammatorischen Stimulus negativ auf die Leukozytenrekrutierung auszuwirken und wird erst im späteren Verlauf normalisiert (Ley et al., 1995; Mayadas et al., 1993). Denkbar ist demnach, dass die E-Selektin-Defizienz in pfp/rag2-Tieren die Tumor-Infiltration von Leukozyten nicht beeinträchtigt hat und sich deren Tumor-förderliche Funktionen positiv auf das Tumorstadium ausgewirkt haben. In P-Selektin-defizienten Mäusen kommt es möglicherweise zu einer Verzögerung dieser Infiltration, die durch E-Selektin nicht kompensiert wird und das verlängerte Überleben der Mäuse bedingen. E-/P-Selektin-kompetente Mäuse mit ITGB4-*knockdown*-Tumoren wiesen allerdings einen ähnlichen Überlebensverlauf

wie P-Selektin-defiziente Mäuse auf. Hier bleibt zu klären, wie das Zusammenspiel von E- und P-Selektin die Leukozytenrekrutierung und im Allgemeinen die Leukozytenhomöostase beeinflusst. In diesem Zusammenhang interessant wäre ein zusätzlicher immunhistologischer Vergleich zur Infiltration CD45⁺ Zellen in frühen ITGB4-*knockdown*-Tumoren in E- und P-Selektin-einzeldefizienten vs. doppeldefizienten Mäusen.

5.2 Potentielle Rolle des ITGB4-*knockdowns* von Tumorzellen für die Attraktion von Leukozyten

Da sich nur für ITGB4-*knockdown*-Tumoren aus pfp/rag2-Mäusen Hinweise für eine gesteigerte Leukozyten-Infiltration ergaben, lag die Vermutung nahe, dass diese Tumorzellen selbst aktiven Einfluss auf die Leukozyten-Rekrutierung nehmen. In dieser Arbeit durchgeführte Makrophagen-Invasions-*assays* konnten dies erstmalig bestätigen. Zusätzlich waren die Resultate ein Indiz dafür, dass eine verstärkte Attraktion von Leukozyten nach ITGB4-*knockdown* nicht nur im murinen Modell sondern auch im humanen Organismus von Relevanz sein könnte. Dies unterstützen In-silico-Modellierungen für humane Ovarialkarzinome, die bezüglich der ITGB4-Expression und der Infiltration durch Makrophagen eine signifikante inverse Korrelation berechnen konnten (Wu et al., 2020a). Gleichzeitig beobachteten Bierie et al. in ITGB4-hoch-exprimierenden Xenograft-Tumoren der Brustkrebszelllinie SUM159 eine erhöhte Abundanz polymorphnukleärer Immunzellen als im Vergleich zu ITGB4-gering-exprimierenden Tumoren (Bierie et al., 2017). Diese Kontroverse verdeutlicht, dass die genauen immunmodulatorischen Konsequenzen der ITGB4-Expression in murinen und humanen Tumoren noch weitestgehend unverstanden sind und weiterführender Studien bedürfen. Die in dieser Arbeit identifizierte erhöhte Sekretion verschiedener immunologischer Faktoren unterstützt jedoch die Vermutung, dass eine geringe ITGB4-Expression von Tumorzellen mit einer verstärkten Leukozyten-Attraktion einhergehen könnte. Im Allgemeinen ließ sich kein einheitlicher Faktor identifizieren, der in allen drei untersuchten Tumorzelllinien nach ITGB4-*knockdown* im Vergleich zur Kontrolle verstärkt sekretiert wurde. Eine verstärkte Leukozytenrekrutierung zur Kompensation der nach ITGB4-*knockdown* erschwerten Tumoretablierung ist möglicherweise ein generell

beobachtbares Prinzip, das jedoch Tumorentitäten-abhängig durch individuelle molekulare Mechanismen gesteuert und reguliert wird.

Die für ITGB4-*knockdown*-Zellen der Linie PC-3 verstärkte Sekretion von CXCL1 und CXCL2 steht mit der Attraktion von Immunzellen im Zusammenhang. CXCL1 und CXCL2 wurden ursprünglich als Neutrophile-attrahierende Chemokine charakterisiert (Shi et al., 2018). Ein erhöhtes Expressions-Level dieser Chemokine ist sowohl mit einer gesteigerten Größe als auch einer erhöhten Aggressivität von Tumoren assoziiert und führt zu einer schlechteren Prognose und geringeren Überlebenschancen von Patienten (Hu et al., 2021; Miyake et al., 2014). Neben der Rekrutierung von Neutrophilen sind CXCL1 und CXCL2 bei der Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen im Knochenmark zu Tumor-assoziierten MDSCs beteiligt und veranlassen deren Migration zur Tumorkolonisation (Karin, 2020; Hu et al., 2021; Shi et al., 2018). In murinen Glioblastom-Modellen führte eine Überexpression von CXCL1 und CXCL2 zu einer höheren Dichte an M2-Makrophagen und MDSCs, während gleichzeitig eine Reduktion der CD8⁺ Effektor-T-Zellen vorlag (Hu et al., 2021). Eine Sekretion von CXCL1 und CXCL2 bei Brustkrebszellen führte zu einer gesteigerten Infiltration von Tumor-förderlichen myeloiden Zellen (Acharyya et al., 2012). Neben CXCL1 und CXCL2 konnte in ITGB4-*knockdown*-Überständen von PC-3-Zellen signifikant mehr CXCL10 als in den Kontroll-Zellen gemessen werden. CXCL10 ist durch die Förderung von Proliferation, Invasion und Metastasierung von onkologischer Relevanz (Wightman et al., 2015; Zipin-Roitman et al., 2007). Transkriptomanalysen von Pankreaskarzinomgeweben wiesen eine Assoziation zwischen gesteigerter CXCL10-Expression und einer schlechteren Prognose nach (Huang et al., 2021).

In Überständen von ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen der Linie PaCa5061 konnten neben CXCL2 und CXCL10 noch weitere Chemokine detektiert werden. Unter anderem fanden sich erhöhte Level an VEGF. VEGF ist im Tumorkontext ein kritischer Regulator der Neoangiogenese. Neben dieser Funktion kann von Tumorzellen sezerniertes VEGF zu einer

immunsuppressiven TME beitragen (Yang et al., 2018). Beispielsweise supprimiert VEGF die T-Zell-Funktion und inhibiert die Differenzierung und Aktivierung dendritischer Zellen (Tamura et al., 2019; Yang et al., 2018). Ebenso wird durch VEGF die Generierung und Expansion von MDSC stimuliert (Umansky et al., 2016; Vetsika et al., 2019). Karakhanova et al. konnten am murinen orthotopen Panc02-Pankreaskarzinom-Modell erhöhte Level an VEGF und eine erhöhte intratumorale Infiltration durch MDSC feststellen (Karakhanova et al., 2015). Für eine Attraktion von MDSC spricht ebenfalls, dass Überstände von ITGB4-*knockdown*-PaCa5061-Zellen vermehrt CCL5 enthalten. CCL5 bindet mit hoher Affinität an den Rezeptor CCR5, der von verschiedenen Immunzell-Subtypen exprimiert wird und beim Dirigieren dieser Zellen zum Entzündungsort beteiligt ist (Aldinucci et al., 2020). Hawila et al. konnten insbesondere nachweisen, dass CCR5-Liganden, darunter CCL5, die Migration von CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloiden Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut induziert (Hawila et al., 2017). Tumorzellen, die einer CCL5-Stimulation unterliegen, produzieren VEGF (Aldinucci et al., 2020; Wang et al., 2015), was erklären könnte, weshalb eine signifikante Zunahme von VEGF nur in Überständen von ITGB4-*knockdown*-PaCa5061-Zellen nachweisbar war. Das Chemokin CXCL17 konnte ebenfalls ausschließlich in ITGB4-*knockdown*-PaCa5061-Überständen detektiert werden. Für Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) konnte CXCL17 als ein unabhängiger prognostischer Faktor für das progressionsfreie und Gesamtüberleben identifiziert werden (Li et al., 2014). Zudem korreliert eine CXCL17 Expression positiv mit der Infiltration von HCC-Tumoren durch CD68⁺ Makrophagen (Li et al., 2014). Im murinen Brustkrebsmodell unterstützt CXCL17 die Formation einer pre-metastatischen Nische in der Lunge durch die Rekrutierung von CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSC (Hsu et al., 2019). Ebenso konnte in Kolon-Xenograft-Modellen eine ektope Expression von CXCL17 mit der Rekrutierung von CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloiden Zellen in Verbindung gebracht werden (Matsui et al., 2012).

Das Chemokin CCL2 war nur in Überständen von ITGB4-*knockdown*-Zellen der Linie SKOV3 signifikant erhöht. Die regulatorische Funktion von CCL2 bei der Rekrutierung von Monozyten, Makrophagen und weiteren Zellen myeloiden Ursprungs in entzündliche

Gewebe und Tumoren ist gut beschrieben (Gschwandtner et al., 2019; Serbina and Pamer, 2006). Insbesondere ist CCL2 auch bei der Rekrutierung von MDSC in Tumorgewebe beteiligt (Huang et al., 2007; Sawanobori et al., 2008). *In vitro* reduzierte ein neutralisierender Antikörper gegen CCL2 die Migration von MDSCs, die aus murinem Knochenmark Tumor-tragender-Mäuse (Melanom und HCC) isoliert wurden (Huang et al., 2007). Gleichzeitig führte eine Defizienz des korrespondierenden Rezeptors CCR2 zu einer Verschlechterung der MDSC-Migration in Tumor- und Milzgewebe *in vivo* (Huang et al., 2007). In Patienten mit kolorektalem Karzinom konnte eine Zunahme der CCL2-Expression mit fortschreitender Progression (Chun et al., 2015) beobachtet werden. Eine Deletion von CCL2 in Kolonkarzinom-Mausmodellen reduzierte die Anzahl an MDSC und führte zu einer Reduktion der weiteren Progression (Chun et al., 2015). Eine erhöhte Anzahl an MDSC in Tumoren (Cui et al., 2013b) und Aszites (Obermajer et al., 2011) von Ovarialkarzinom-Patientinnen ist ebenfalls mit einer schlechteren Überlebensprognose assoziiert (Santegoets et al., 2018; Okła et al., 2019; Wu et al., 2017). Für die Zelllinie SKOV3 wurde bereits in früheren, auf RT-PCR- und ELISA-basierten Studien eine geringe CCL2-Expression nachgewiesen (Arnold et al., 2005; Negus et al., 1995). Dies stimmt mit der in dieser Arbeit detektierten geringeren Konzentration an CCL2 in Überständen von shControl-SKOV3-Zellen überein und unterstützt die Vermutung, dass der ITGB4-*knockdown* im direkten Zusammenhang mit der verstärkten CCL2-Sekretion steht.

Zusammengefasst weisen die Analysen der Zellüberstände aller drei Tumorzelllinien auf eine durch den ITGB4-*knockdown* bedingte Zunahme der Chemokin-Sekretion hin. Alle hier detektierten Chemokine können mit der Attraktion von myeloiden Zellen assoziiert werden, die eingewandert in der TME die Etablierungsbedingungen für ITGB4-*knockdown*-Zellen begünstigen könnten. Eine direkte auto- oder parakrine Stimulation der Tumorzellen untereinander erscheint unter Berücksichtigung der Resultate des Soft-Agar-*assays* unwahrscheinlich, da eine Verbesserung der Kolonisation von ITGB4-*knockdown*-Tumorsphäroiden nach Zugabe von konditionierten Medien hier nicht beobachtet werden konnte. Die aktuellen Daten zur Chemokin-Sekretion basieren jedoch auf zweidimensionalen Kul-

turbedingungen und müssten für eine weitere Festigung der Hypothese an Tumoren nach *in vivo* Wachstum erneut auf Protein- und mRNA-Ebene überprüft werden. Durch spezifische Intervention, z.B. durch einen Chemokin-*knockdown* der Tumorzellen oder deren Rezeptoren im Tiermodell, könnte die genaue Bedeutung und der Einfluss der individuellen Chemokine für das Wachstum von ITGB4-*knockdown*-Tumoren besser verstanden werden. Generell kann eine Sekretion von Chemokinen jedoch nicht nur von Tumorzellen selbst ausgehen, sondern kann ebenfalls unter dem Einfluss der fortschreitenden Tumorprogression von nicht-malignen Zellen der TME wie Fibroblasten und Endothelzellen initiiert werden (Guo and Deng, 2018). Diese sind gleichermaßen zu einer Sekretion Tumor-förderlicher Wachstumsfaktoren oder Modulatoren der TME befähigt, sodass davon auszugehen ist, dass die genaue Zusammensetzung des Chemokin-Cytokin-Netzwerkes in den hier untersuchten Mausmodellen noch unvollständig beleuchtet ist.

Neben der Sekretion von Chemokinen konnte in ITGB4-*knockdown*-Zellen der Linie PC-3 und PaCa5061 eine erhöhte Anzahl extrazellulärer Vesikel nachgewiesen werden. Die Größe der Vesikel blieb dabei zwischen shControl- und shITGB4-Zellen beider Linien vergleichbar. Dies lässt vermuten, dass der ITGB4-*knockdown* direkt oder indirekt den Mechanismus der Exocytose beeinflusst. Dem genauen Zusammenhang zwischen der ITGB4-Expression und vesikulären Transportprozessen von Tumorzellen konnte aus zeitlichen Gründen in dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen werden. Jedoch wäre eine Fortsetzung der Forschungsarbeit bezüglich dieser Thematik insbesondere interessant, wenn die erhöhte Chemokin-Sekretion von ITGB4-*knockdown*-Zellen nicht auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden kann. Beispielsweise stehen Tumor-assoziierte extrazelluläre Vesikel im Verdacht, bei der Formation pre-metastatischer Nischen durch Bildung einer Tumor-förderlichen inflammatorischen Umgebung beteiligt zu sein (Gerwing et al., 2020). Für Melanom-abgeleitete Exosomen konnte gezeigt werden, dass sie Vorläuferzellen des Knochenmarks zur Förderung der Vaskularisierung, Invasion und Metastasierung reprogrammieren (Peinado et al., 2012). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Hinweise, dass Tumor-abgeleitete Exosomen die Tumorprogression durch Beeinflussung verschiedens-

ter Immunzell-Subtypen in Richtung einer Tumor-förderlichen Mikroumgebung regulieren (Greening et al., 2015). Beispielsweise waren Tumor-abgeleitete extrazelluläre Vesikel in der Lage, eine Differenzierung normaler myeloider Zellen zu MDSCs zu induzieren (Fleming et al., 2019; Valenti et al., 2006).

5.3 Einfluss des ITGB4-*knockdowns* von Tumorzellen und der E-/P-Selektin-Defizienz auf Tumor-infiltrierende Immunzell-Subpopulationen

Eine Vielzahl an Studien belegen die prognostische und therapeutische Bedeutung Tumor-infiltrierender Immunzellen für verschiedenste humane Karzinome (Barnes and Amir, 2017). Die sog. Tumor-Immunkontextur unterliegt dabei dynamischen Veränderungen, in denen sich Funktionalität, räumliche Organisation, Dichte und Zusammensetzung des Immunzellinfiltrats nicht nur zwischen Tumorentitäten unterscheidet, sondern sich auch im Verlauf der Tumorentwicklung neu strukturiert (Fridman et al., 2017). Insbesondere Zellen des angeborenen Immunsystems sind kritische Interaktionspartner der TME, die die Tumorprogression und den Verlauf therapeutischer Interventionen entscheidend beeinflussen (Berraondo et al., 2016; Dar et al., 2018).

In der vorliegenden Arbeit wurde das immunzelluläre Infiltrat von s.c Xenograft-Tumoren der Linie PC-3 erstmals durchflusszytometrisch in Abhängigkeit vom ITGB4-Status der Tumorzellen und vom E-/P-Selektin-Status der Versuchstiere charakterisiert. Da es sich bei den verwendeten Mauslinien um immundefiziente Tiere handelte, wurde eine Infiltration durch NK-, T- und B-Zellen in diesen Modellen als nicht relevant für die Tumoretablierung eingestuft und daher experimentell nicht untersucht. Im Folgenden werden die hier phänotypisierten Immunzell-Subtypen der myeloischen Differenzierungslinie gesondert beleuchtet und im Kontext des Tumorwachstums diskutiert.

5.3.1 Das CD11b⁺ F4/80⁺-Infiltrat

Die Antigene CD11b und F4/80 sind gängige Marker, die zur Charakterisierung von murinen Makrophagen eingesetzt werden (dos Anjos Cassado, 2017). Makrophagen entstam-

men von monozytären Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder embryonalen Dottersack, die nach Migration aus dem Blutstrom eine von der Mikroumgebung des Gewebes abhängige morphologische Differenzierung und spezifische Funktionalität erwerben (Panni et al., 2013; Perdiguero et al., 2015). Auf diese Weise entstehen Makrophagen, die im Gewebe residieren oder unter dem Einfluss von Gewebeschäden-signalisierenden Chemokinen inflammatorische Eigenschaften vermitteln (Redente et al., 2010). Innerhalb der TME lokalisierte TAMs gelten als eine der meist vertretenen Immunzellpopulationen in soliden Tumoren, die aktuelleren Studien zufolge weit aus häufiger eine pro-tumorale als eine anti-tumorale Funktion vermitteln (Noy and Pollard, 2014; Xiang et al., 2021). Beispielsweise kann eine Zunahme der Infiltration durch TAMs mit fortlaufender Progression bei Patienten mit Prostatakarzinom festgestellt werden (Comito et al., 2014; Lissbrant et al., 2000), was in der Regel mit einer schlechteren Gesamtüberlebensrate assoziiert ist (Erlandsson et al., 2019; Yuri et al., 2020).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Tumoren machte das Makrophagen-Infiltrat nur einen geringen prozentualen Anteil der $CD45^+$ Leukozytenpopulation aus und es ergaben sich zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. In Bezug auf die ursprüngliche Hypothese (s. Abb. 5.1) könnte daher gefolgert werden, dass zum Zeitpunkt der frühen Tumorkolonisation von *ITGB4-knockdown*-Tumoren der Linie PC-3 eine tumor-förderliche Aktivität durch TAMs eine untergeordnete Rolle spielt. Bei den hier durchflusszytometrisch erfassten $CD11b^+ F4/80^+$ -Makrophagen handelt es sich möglicherweise vielmehr um Gewebe-residente Makrophagen, die nach Tumorresektion in stromalen Anteilen verblieben sind. Aufgrund der geringen Tumorknoten-Größe war eine klare Abgrenzung von Stroma und Tumor nicht möglich. Generell weisen TAMs eine hohe Plastizität und Adaptationsfähigkeit als Antwort auf die sich stetig verändernden Stimuli der TME auf, was bedingt, dass verschiedene TAM-Phänotypen gleichzeitig regulatorisch auf die Tumorentwicklung einwirken können (Pan et al., 2020). Basierend auf der M1/M2-Klassifikation von Makrophagen ähneln TAMs in den meisten Tumoren in ihrer Funktion und ihrem Phänotypen dem M2-Aktivierungsprofil (Xiang et al., 2021). Vor diesem Hintergrund erscheint die alleinige Charakterisierung von TAMs durch die Marker

CD11b und F4/80 als zu einfach und müsste für eine detailliertere Analyse um weitere Immunzell-Marker erweitert werden. Eine zusätzliche Differenzierung des M1- und M2-Phänotypen könnte durch die Antigene CD80 als M1- und CD206 als M2-Marker erfolgen (Zhou et al., 2017). Dieser Ansatz wurde aufgrund der fehlenden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen jedoch nicht weiter verfolgt. Entgegen bisheriger Publikationen bildeten Makrophagen in den hier untersuchten Modellen nicht den Hauptanteil infiltrierender Immunzellen. Dies könnte dadurch begründet sein, dass entsprechende Daten meistens auf Analysen von Tumoren basieren, die zu einem späteren Zeitpunkt der Tumorentwicklung untersucht wurden.

Nur wenige Studien beschreiben die Zusammensetzung des immunologischen Infiltrats nach kurzen Inokulationszeiten, wie sie in dieser Arbeit gewählt wurden. Im et al. messen nach s.c. Injektion der murinen Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie MC38 in C57Bl/6J Wildtyp-Mäuse nach 10-tägiger Inokulation mit ca. 20 % einen deutlich höheren Makrophagen-Anteil (Im et al., 2020). Eine 19-tägige subkutane Inokulation der murinen Melanom-Zelllinie B16/F10 in C57/B16 Mäusen zeigte in Kontrolltumoren einen TAM-Anteil von ca. 15 % (Di Martile et al., 2020). Angesichts der hohen Phänotypen-Diversität und dessen Abhängigkeit von äußeren Signalen der TME ist ein Vergleich der in dieser Arbeit erhobenen Daten mit Studien, die andere Tumorentitäten und Mausstämme analysieren, fragwürdig. Interessant wäre zu untersuchen, ob die Zusammensetzung des Immunzellinfiltrats von Tumoren der Zelllinien PaC5061 und SKOV3, die in den Tiermodellen ähnliche Phänotypen wie die Linie PC-3 zeigten, mit den hier erhobenen Daten vergleichbar sind. Erste Versuche zur Immunphänotypisierung von PaCa5061-Tumoren wurden in dieser Arbeit bereits initiiert. Diese waren aufgrund des Mangels an analysierbarem Tumorgewebe nach 10-tägiger Inokulation der Tumorzellen jedoch nicht erfolgreich. Eine weitere Verlängerung der Tumorstadiumsdauer wurde nicht angestrebt, da Vordaten Hinweise darauf gaben, dass die Infiltration von Immunzellen insbesondere in der frühen Tumoretablierungsphase von Relevanz ist. So konnte an adulten *ITGB4-knockdown*-Tumoren kein erhöhter Anteil intratumoraler CD45⁺ Leukozyten mehr festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

5.3.2 Das CD11b⁺ CD11c⁺-Infiltrat

Das Antigen CD11c ist einer der am weitesten verbreiteten Marker, die zur Charakterisierung von DCs eingesetzt werden (Wu et al., 2018). Obwohl DCs in der TME im Vergleich zu anderen Immunzellpopulationen geringfügiger repräsentiert sind, sind sie als antigen-präsentierende Zellen zentrale Komponenten der Immunabwehr und Toleranz (Gerhard et al., 2021; Wculek et al., 2020). In der TME vermitteln DCs durch die Erkennung, Prozessierung und Präsentation von Tumor-Antigenen zur Prägung naiver T-Lymphozyten oder Aktivierung von NK-Zellen generell eine anti-tumorigene Rolle. Dementsprechend ist eine erhöhte Infiltration durch DCs bei vielen humanen Tumoren mit einem verlängerten Überleben und einer geringeren Inzidenz von Metastasen assoziiert (Ma et al., 2013). Dennoch sind Funktion und Phänotyp von DCs ähnlich wie bei TAMs von multiplen Einflüssen bestimmt, sodass Stimuli der TME die anti-tumorigene Immunität von DCs zu einer immunsuppressiven, pro-tumorigenen Funktionalität konvertieren können (Shurin and Lotze, 2009).

Die hier erhobenen durchflusszytometrischen Daten ließen auf keinen erhöhten Anteil an DCs in *ITGB4-knockdown*-Tumoren von pfp/rag2-Mäusen schließen. Allerdings war bei *ITGB4-knockdown*-Tumoren von Select-Mäusen der Anteil von DCs erhöht. Dies lässt eine anti-tumorigene Funktion dieser Population vermuten, was das verlängerte Überleben von Select-Tieren mit *ITGB4-knockdown*-Tumoren begünstigt haben könnte. Interessanterweise konnten Nakahara et al. in Melanom-Xenograft-Modellen zeigen, dass Tumorinfiltrierende DCs, die in der frühen Tumoretablierungsphase isoliert wurden (4 Tage nach Inokulation) das Tumorstadium fördern, während DCs, die zu einem späteren Zeitpunkt gewonnen wurden (11 Tage nach Inokulation) die Tumorprogression hemmen (Nakahara et al., 2016). Es wäre zu überprüfen, ob neben der Tumoretablierungsphase auch Einflüsse der TME, wie *ITGB4*- und *E-/P*-Selektin-Status den Aktivitätszustand von DCs beeinflussen. Vor dem Hintergrund der defekten T-Zellantwort im hier gewählten Modell ist jedoch fraglich, inwieweit infiltrierende DCs funktionelle Effekte ausüben können. Diese müssten unabhängig von reifen T-Zellen ablaufen. Frühe Studien an *RAG2^{-/-}*-Mäusen

konnten zeigen, dass die Reifung und Funktionalität von DCs durch die Abwesenheit von T-Zellen bereits initial starken Einschränkungen unterliegt (Shreedhar et al., 1999). Interessanterweise wirkte sich eine E-/P-Selektin-Defizienz nicht nachteilig auf den Anteil von DCs im Tumor aus, obwohl bekannt ist, dass DCs zur Migration aus dem Blut auf die Expression von E- und P-Selektin auf aktivierten Endothelzellen angewiesen sind (de Winde et al., 2020). Im Gegenteil war, wie bereits erwähnt, der DC-Anteil bei Select-Mäusen mit *ITGB4-knockdown*-Tumoren erhöht. Ein von E- und P-Selektin unabhängiger Rekrutierungsprozess ist bisher weder für humane noch murine DCs beschrieben (Alvarez et al., 2008; Pendl et al., 2002), jedoch kann eine Beteiligung weiterer, noch unbekannter Adhäsionsmoleküle nicht ausgeschlossen werden. Aus den getätigten Beobachtungen kann die Hypothese abgeleitet werden, dass DCs das Wachstum von *ITGB4-knockdown*-Tumoren in einer E-/P-Selektin-defizienten TME hemmen. Diese Hypothese müsste weiter adressiert werden, z.B. durch eine Depletion der DCs in dieser Kombinationsgruppe und eine anschließende Bestimmung von Veränderungen in der Dynamik des Tumorwachstums.

5.3.3 Das CD11b⁺ Gr-1⁺-Infiltrat

In Mäusen werden CD11b und Gr-1 co-exprimierende Immunzellen als unreife myeloide Zellen mit frühen Differenzierungsstatus definiert und im Allgemeinen als MDSCs charakterisiert (Bronte et al., 2016). Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben bezüglich dieser Immunzellpopulation die deutlichsten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Ein erhöhter prozentualer Anteil von MDSCs lag insbesondere in *ITGB4-knockdown*-Tumoren von pfp/rag2-Mäusen vor, während dieser gleichzeitig in Select-Tieren sowie Kontroll-Tumoren verringert war. Dieses Resultat ließ darauf schließen, dass die Präsenz von MDSCs in *ITGB4*-depletierten Tumoren möglicherweise zur Etablierung einer Tumorförderlichen Umgebung beiträgt und somit die Tumorkolonisation unterstützt. MDSCs sind als negative Modulatoren immunologischer und nicht-immunologischer Prozesse eingehend beschrieben und in vielen humanen und murinen Studien mit der Progression und Metastasierung von Tumoren assoziiert (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Groth et al., 2019; Markowitz et al., 2015; Taki et al., 2018; Wen et al., 2020). Chemokine gelten als

Schlüsselmediatoren für die Rekrutierung von MDSCs. Die in Überständen von ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen vermehrt gefundenen Chemokine können weitestgehend mit einer Attraktion von MDSCs in Verbindung gebracht werden (s. Abschnitt 5.2). Dies unterstützt die Vermutung, dass in ITGB4-*knockdown*-Tumoren die aktive MDSC-Rekrutierung als mögliche Kompensation zur eingeschränkten Tumoretablierung fungiert. Weiterführende Analysen zur Chemokin-Rezeptor-Expression könnten weitere Einblicke in die Regulation und Aktivität dieser Immunzellpopulation geben.

Der reduzierte Anteil an MDSCs in Select-Mäusen lässt vermuten, dass die E-/P-Selektin-Defizienz sich tatsächlich nachteilig auf die frühe Infiltration auswirkt. Bisher gibt es keine Indizien darauf, dass MDSCs alternative Adhäsionsmoleküle als die aus der Leukozytenadhäsionskaskade bekannten nutzen. Allerdings existieren auch keine Studien, die sich explizit mit endothelialen Interaktionspartnern von MDSCs auseinandersetzen. Eine mögliche Begründung hierfür ist, dass die genaue Identität dieser Zellen aufgrund ihrer hohen Heterogenität und Ähnlichkeit zu Neutrophilen und Monozyten bis heute stark diskutiert wird. Insbesondere das Fehlen von MDSC-spezifischen Markern macht eine differenziertere Abgrenzung schwierig. In Anlehnung an die *Gating*-Strategie von Fujisawa et al. und Rose et al. wurden Gr-1⁺ Zellen zusätzlich nach ihrem Lichtbrechungsverhalten im SSC-Kanal beurteilt (Fujisawa et al., 2017; Rose et al., 2012). Hierbei zeigte sich, dass die Gr-1⁺ Population ausschließlich Zellen enthielt, die einen niedrigen SSC aufwiesen. Dies lässt einen monozytären Phänotypen vermuten oder könnte auf Vorläuferzellen von Neutrophilen schließen lassen. Beide Charakteristika würden zum Profil von M- und PMN-MDSCs passen. Eine verbesserte Klassifikation von MDSCs kann ebenfalls auf Basis des Gr-1-Epitops vorgenommen werden. Durch die differentielle Expression der Antigene Ly6C und Ly6G lassen sich PMN-MDSCs als CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{low} oder M-MDSCs als CD11b⁺ Ly6C^{high} Ly6G⁻ beschreiben (Bronte et al., 2016; Movahedi et al., 2008). Insgesamt ließen sich drei Subpopulationen differenzieren. Die als A gekennzeichnete CD11b⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁻ Population könnten als M-MDSCs charakterisiert werden (Bronte et al., 2016; Wang et al., 2018). Zellen mit intermediärer Ly6C-Expression (Population B) sind noch unzureichend untersucht, könnten aber ein Zwischenstadium von

Ly6C hoch exprimierenden Zellen darstellen (Ghasemlou et al., 2015). In einem Mausmodell zur Ischämie-Reperfusionverletzung wiesen $CD11b^+ Ly6C^{Int}$ Zellen eine Gensignatur auf, die mit dem Prozess der Wundheilung in Verbindung steht (Clements et al., 2016). Eine Infiltration durch Immunzellen, die die Wundheilung unterstützen, ist auch für das hier verwendete subkutane Tumormodell denkbar. Allerdings wurde die Expression von Ly6G von Clements et al. nicht separat analysiert, sodass es sich bei diesen Zellen auch um $CD11b^+ Ly6C^{Int} Ly6G^+$ Zellen handeln könnte, die in dieser Arbeit als Population C gekennzeichnet wurden. Im Tumorkontext handelt es sich bei dieser Population sehr wahrscheinlich um PMN-MDSCs. Leider konnte der gesteigerte Anteil an $CD11b^+ Gr-1^+$ Zellen in *ITGB4-knockdown*-Tumoren von *pfp/rag2*-Mäusen keiner dieser Subpopulationen zugeschrieben werden, da zwischen den Versuchsgruppen keine Unterschiede bestanden. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich die $CD11b^+ Gr-1^+$ Population in *ITGB4-knockdown*-Tumoren von *pfp/rag2*-Tieren gleichermaßen aus beiden Subpopulation zusammensetzte. Eine höhere Versuchstierzahl könnte hier möglicherweise zu einem aussagekräftigeren Ergebnis führen.

Insgesamt muss berücksichtigt werden, dass, auch wenn die Resultate dieser Arbeit Indizien dafür liefern, dass es sich bei der $CD11b^+ Gr-1^+$ Population um MDSCs handeln könnte, es für eine eindeutige Abgrenzung zu klassischen Neutrophilen und Monozyten weiterführender Experimente bedarf. Neuere Studien verweisen auf zusätzliche Antigene, die eine effektivere Identifizierung von M- und PMN-MDSCs ermöglichen sollen. Beispielsweise wurde das Antigen CD84 als neuer Marker von M- und PMN-MDSCs in murinen Tumoren beschrieben (Alshetaiwi et al., 2020). Der Rezeptor CD244 war in murinen Melanom-, Thymom- und Kolonkrebs-Modellen in PMN-MDSCs im Vergleich zu Neutrophilen erhöht (Youn et al., 2012). Ein wesentliches Merkmal von MDSCs ist die Inhibition der durch T-, B- und NK-Zellen vermittelten Immunantwort, die auf spezifische biochemische Eigenschaften der Zellen zurückführbar ist. Für PMN-MDSCs ist die Produktion von Arginase 1, reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) oder Prostaglandin E_2 typisch, während M-MDSCs häufiger über Stickstoffmonoxid (engl. *nitric oxide*, NO) und Cytokine wie IL-10 und $TGF\beta$ ihre immunsuppressive Funktion

ausüben (Veglia et al., 2021a). Da in den in dieser Arbeit untersuchten Modellen eine Tumor-förderliche Rolle durch Suppression der adaptiven Immunität keine Rolle gespielt haben dürfte (aufgrund der Immundefizienz der Versuchstiere), wären diese Faktoren für eine bessere Klassifikation zwar sinnvoll, jedoch nicht zur Erklärung der möglichen Tumor-förderlichen Funktion in *ITGB4-knockdown*-Tumoren von *pfp/rag2*-Mäusen anwendbar. Zu den bisher beschriebenen nicht-immunologischen Funktionen von MDSCs zählen unter anderem die Förderung der Angiogenese durch Sekretion von VEGF und Fibroblasten-Wachstumsfaktor sowie die Sekretion von Chemokinen, die wiederum modulatorischen Einfluss auf die Zusammensetzung der TME nehmen können (Fleming et al., 2018; Zhou et al., 2018). In weiterführenden Experimenten und insbesondere durch funktionelle *assays* müsste zukünftig die Identität und der direkte Mechanismus der MDSC-vermittelten Tumorförderung in *ITGB4-knockdown*-Tumoren weiter analysiert werden. Hierzu könnte die Depletion von MDSCs mittels anti-Gr-1-Antikörpers (RB6-8C5) herangezogen werden. Eine Depletion der MDSC-Population sollte sich negativ auf das Wachstum von *ITGB4-knockdown*-Tumoren in *pfp/rag*-Mäusen auswirken und zu einem ähnlich positiven Überlebensverlauf wie bei E/P-Selektin-defizienten Mäusen führen. Darüber hinaus sollte der beobachtete Synergismus aus *ITGB4-knockdown* und E-/P-Selektin-Depletion im nächsten Schritt in einem syngenem Tumormodell im immun-kompetenten Wirt untersucht werden, da Änderungen der Zusammensetzung von Zellen der angeborenen Immunität in der TME bei gleichzeitiger Anwesenheit einer intakten adaptiven Immunität andere Effekte auf das Tumorstadium ausüben.

5.4 Einfluss des *ITGB4-knockdowns* von Tumorzellen und der E-/P-Selektin-Defizienz des Tumorstromas auf die leukozytäre Zusammensetzung systemischer Organe

Neben parakrinen Interaktion innerhalb der TME hat auch die Modulation der systemischen Immunlandschaft Einfluss auf für die Tumorprogression (McAllister and Weinberg, 2014). Tumor-sekretierte Faktoren wie Chemokine begünstigen nicht nur die aktive Rekrutierung von Immunzellen, sondern fördern deren Expansion und Mobilisierung

aus peripheren Organen, wie dem Knochenmark und der Milz (Wu et al., 2020b). Häufig bedingt dies eine Störung des hämatopoetischen Gleichgewichtes und führt zu einer fehlerhaften Differenzierung myeloider Zellen, die entgegen ihrer eigentlichen Funktion Tumor-förderliche Charakteristika erwerben.

Eine Expansion von MDSCs im Knochenmark, Blut und in der Milz ist sowohl in Tumor-tragenden Mäusen als auch in Patienten beschrieben (Alshetaiwi et al., 2020; Jordan et al., 2017; Porembka et al., 2012; Van Valckenborgh et al., 2012). Die in dieser Arbeit beschriebenen Änderungen der immunzellulären Zusammensetzung in Anwesenheit s.c. Xenograft-Tumore wird im Folgenden für die einzelnen peripheren Organe gesondert diskutiert.

5.4.1 Das Knochenmark

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Xenograft-Modelle war insbesondere auffällig, dass der Anteil an $CD11b^+ Gr-1^{Hi} SSC^{Int}$ Zellen (Population A) im Knochenmark von *pfp/rag2*- und *Select*-Mäusen mit *ITGB4-knockdown*-Tumoren verringert war. Gleichzeitig war der Anteil $CD11b^+ Gr-1^{Hi} SSC^{Lo}$ Zellen (Population B) im Knochenmark dieser Versuchsgruppen erhöht. Population A wird am ehesten von differenzierteren Neutrophilen, Population B von neutrophiler Vorläuferzellen bzw. Monozyten repräsentiert. Dieser Befund könnte dafür sprechen, dass die Differenzierung von Neutrophilen im Knochenmark durch die Präsenz von *ITGB4-knockdown*-Tumoren beeinträchtigt ist und dies die weitere Expansion von unreifen Vorläuferzellen begünstigt. Ebenso ist eine vermehrte Rekrutierung von reiferen Neutrophilen ins Tumorbett denkbar. Gegen die Rekrutierung spricht jedoch, dass diese Immunzell-Population nicht in den untersuchten Xenograft-Tumoren detektiert werden konnte. Die in *ITGB4-knockdown*-Tumoren von *pfp/rag2*-Mäusen charakterisieren $CD11b^+ Gr-1^{Hi} SSC^{Lo}$ -Zellen könnten der Population B aus dem Knochenmark zugeordnet werden, was für eine Tumor-induzierte Expansion dieser Zellpopulation hinweisen könnte.

Die Expansion und Mobilisierung von MDSCs aus dem Knochenmark kann durch Myelo-poese-regulierende Faktoren wie GM-CSF, G-CSF und M-CSF, aber auch durch verschiedene Tumor-sekretierte Chemokine induziert sein (Millrud et al., 2016). *In vitro* konnte für ITGB4-*knockdown*-PC-3-Zellen keine gesteigerte GM-CSF-Sekretion festgestellt werden. Ob diese Differenzierungsfaktoren dennoch *in vivo* eine Rolle spielen, muss weiterführend analysiert werden. Für die Chemokine CXCL1 und CXCL2, die in ITGB4-*knockdown*-PC-3-Zellen vermehrt in konditionierten Medien detektiert wurden, konnte in einem anderen murinen Melanom-Modell festgestellt werden, dass sie die Differenzierung von Zellen des Knochenmarks zu M-MDSCs fördern (Shi et al., 2018). Generell wird die Generierung von MDSCs im Knochenmark durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst, die teils komplementär, teils kombinatorisch auf die Differenzierung von Vorläuferzellen einwirken (Shi et al., 2018). Eine spezifische Depletion von Chemokinen wie CXCL1 und CXCL2 könnte mehr Klarheit über deren Funktion bei der Generierung von MDSCs liefern.

5.4.2 Das Blut

Interessanterweise zeigte sich im Blut von pfp/rag2-Mäusen mit ITGB4-*knockdown*-Tumoren ein signifikant höherer Anteil an CD11b⁺ Gr-1^{Hi} SSC^{Lo} Zellen (Population B) im Vergleich zum Blut von Select-Mäusen mit ITGB4-*knockdown*-Tumoren. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Migration dieser Zellen aus dem Knochenmark ins Blut durch die E-/P-Selektin-Defizienz bei gleichzeitiger Anwesenheit von ITGB4-*knockdown*-Tumoren beeinträchtigt ist. Im Allgemeinen induziert eine verstärkte Inflammation, wie sie im Verlauf der Tumorprogression auftritt, im Zuge der Notfall-Myeloopoese die Proliferation und Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks und deren Migration ins Blut. Winkler et al. konnten diesbezüglich feststellen, dass E-Selektin-exprimierende Endothelzellen der perivaskulären Knochenmarksnische direkt die Proliferation von HSCs stimulieren, während eine E-Selektin-Defizienz zu einem Ruhezustand (engl. *quiescence*) von HSCs führt (Winkler et al., 2012). Eine vermehrte Proliferation von HSCs im Knochenmark könnte sich entsprechend auch auf den Anteil von Leukozyten im Blut auswirken. Dagegen spricht jedoch, dass der Anteil differenzierterer Neutrophiler im Blut von

Select-Mäusen im Vergleich zu pfp/rag2-Mäusen erhöht war. Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Beobachtung aber um eine durch die E-/P-Selektin-Defizienz verursachte Veränderung der physiologischen hämatopoetischen Prozesse. Frenette et al. haben schon früh eine ausgeprägte Leukozytose bei E-/P-Selektin-*knockout*-Mäusen feststellen können, die insbesondere durch eine vermehrte Anzahl an Neutrophilen geprägt war (Frenette et al., 1996). Parallel machten Bullard et al. ebenfalls die Beobachtung, dass es in Blutausstrichen von E-/P-Selektin-defizienten Mäusen zu einem Anstieg an unreifen und reifen Neutrophilen kommt (Bullard et al., 1996). Vor diesem Hintergrund ist die genaue Interpretation der tatsächlich durch den Tumor bedingten systemischen Änderungen der leukozytären Zusammensetzung in den hier untersuchten Xenograft-Modellen erschwert und müsste für eine bessere Einschätzung mit dem Status von gesunden Tieren verglichen werden. Dies wurde in einem ersten Ansatz durch die Analyse von Milzen aus gesunden pfp/rag2- und Select-Mäusen gesondert adressiert.

5.4.3 Die Milz

Aus den Analysen von Milzen gesunder Mäuse (pfp/rag2 und Select) ging hervor, dass Select-Mäuse neben einer Splenomegalie morphologische Veränderungen aufwiesen. Hierzu zählte eine erhöhte Präsenz von Zellen mit ringförmiger Kernmorphologie, was auf eine Expansion von neutrophilen Vorläuferzellen hindeutet (Biermann et al., 1999; Kim et al., 2017). Identische Beobachtungen machten Frenette et al., die ebenfalls von einer erhöhten Zellularität sowie einem gesteigertem Gewicht von Milzen aus E-/P-Selektin-defizienten Mäusen berichten (Frenette et al., 1996). Auch die durchflusszytometrische Analyse ergab einen signifikant höheren Anteil an $CD11b^+ Gr-1^{Hi} SSC^{Int}$ Zellen in Milzen von gesunden Select- im Vergleich zu pfp/rag2-Mäusen. Da es scheinbar bereits in gesunden Select-Tiere zu einer vermehrten Akkumulation von reiferen Neutrophilen in der Milz kommt, ist es wahrscheinlich, dass der erhöhte Anteil an $CD11b^+$ -Leukozyten bzw. $CD11b^+ Gr-1^{Hi} SSC^{Int}$ Zellen in Milzen und Blut von Tumor-tragenden-Select-Mäusen auf die E-/P-Selektin-Defizienz zurückzuführen ist und nicht primär durch den Tumor bedingt wird. Dies lässt vermuten, dass $CD11b^+ Gr-1^{Hi} SSC^{Int}$ Zellen in systemischen

Organen eine untergeordnete Rolle für das Wachstum von ITGB4-*knockdown*-Tumoren und den beobachteten Synergismus spielen.

In Anbetracht der morphologischen Auffälligkeiten von Milzen aus gesunden Select-Mäusen wurde im Weiteren überprüft, ob es Tumor-induziert zu Veränderung der Milzarchitektur kommt. Milzen von Tumor-tragenden Select-Mäusen zeigten sowohl in der HE- als auch in der Ly6G-Färbung eine hohe Zellularität verbunden mit einer Expansion der roten Pulpa. Dies erschien nach Injektion von ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen der Linie PC-3 und PaCa5061 noch stärker ausgeprägt. Die veränderte Morphologie und die zusätzliche Anwesenheit von Megakaryozyten könnten auf eine extramedulläre Hämatopoese (EMH) hindeuten (Elmore, 2006; Loukov et al., 2016). EMH führt zu einer Akkumulation von hämatopoetischen Vorläuferzellen als Antwort auf eine Immunreaktion oder eine gestörte Blutbildung im Knochenmark (Johns and Christopher, 2012; Kim, 2010). Dies unterstützt zusätzlich den Befund, dass die beobachtete Expansion von CD11b⁺ Gr-1^{Hi} SSC^{Int} Zellen im Blut und in der Milz von Tumor-tragenden Select-Mäusen möglicherweise auf eine durch die E-/P-Selektin-Defizienz-bedingte Deregulation der Hämatopoese zurückführbar ist. Identische Befunde sind durch Frenette et al. beschrieben (Frenette et al., 1996). Die verstärkte Anfärbung Ly6G⁺ Zellen lässt eine gesteigerte Bildung von Zellen myeloiden Ursprungs vermuten. Ungeklärt bleibt, ob bereits der erhöhte Anteil CD11b⁺ Gr-1^{Hi} SSC^{Int} Zellen im Blut deren verstärkte Absiedlung in der Milz bedingen oder Veränderungen der Mikroumgebung die Entstehung granulozytärer Vorläuferzellen in der Milz induzieren. Die deutlich ausgeprägtere Anfärbung von Ly6G⁺ Zellen sowie die starke Reduktion von Segmenten der weißen Pulpa in Milzen von Select-Mäusen mit ITGB4-*knockdown*-Tumoren im Vergleich zu Kontroll-Tumoren könnte jedoch auf einen Tumor-basierten Effekt hindeuten, der aber in der durchflusszytometrischen Analyse durch die E-/P-Selektin-Defizienz-induzierten hämatopoetischen Effekte dominiert wird.

Relevant für die Tumoretablierung von ITGB4-*knockdown*-Tumoren könnten CD11b⁺ Gr-1^{Hi} SSC^{Lo} Zellen sein. Ein Unterschied im Anteil CD11b⁺ Gr-1^{Hi} SSC^{Lo} Zellen konnte aber

in Tumor-tragenden Milzen nicht detektiert werden. Sollte es sich bei dieser Population um MDSCs handeln, die aus dem Knochenmark über das Blut in *ITGB4-knockdown*-Tumore rekrutiert werden, stünde dies im Kontrast zu bisherigen Studien. Eine Akkumulation von neutrophilen Progenitorzellen bzw. MDSCs wird in Milzen von Tumorpatienten und murinen Tumormodellen häufig beobachtet. Eine Studie zur MDSC-Häufigkeit in Milzen von verschiedenen Krebspatienten konnte feststellen, dass granulozytische MDSCs vermehrt in Milzen von Kolon-, Melanom- und Ovariakarzinompatienten im Vergleich zu Patienten mit benignen Zysten vorkommen und dies eine verschlechterte Überlebensprognose bedingt (Jordan et al., 2017). In murinen Milzen ist eine MDSC-Akkumulation oft noch stärker ausgeprägt. Sowohl in murinen Kolon- (Capuano et al., 2009), Lymphom- (Schlecker et al., 2012), Mammakarzinom- (DuPre' and Hunter, 2007), Lungenkarzinom- (Srivastava et al., 2012) sowie Pankreaskarzinom-Modellen (Zhao et al., 2009) konnte eine MDSC-Expansion in der Milz nach Tumorzell-Injektion nachgewiesen werden. Möglicherweise basiert die Diskrepanz zwischen den in dieser Arbeit erhobenen Daten und bisherigen Studien auf längeren Tumorwachstumsphasen. Eine MDSC-Expansion in der Milz wurde hier vergleichsweise nach ca. 20-tägiger Tumordinokulation (DuPre' and Hunter, 2007; Schlecker et al., 2012; Srivastava et al., 2012) oder nach Erreichen größerer Tumorumfänge beobachtet (Capuano et al., 2009). Garcia et al. wiederum konnten auch nach 16 Tagen keinen Anstieg $CD11b^+ Gr-1^+$ Zellen in Milzen, Knochenmark und Blut von *Pten*-Null-Prostatakarzinom-Mäusen beobachten (Garcia et al., 2014). Dies verdeutlicht, dass sowohl die immunzelluläre Zusammensetzung von Tumoren als auch deren Einfluss auf hämatopoetische Organe in Abhängigkeit von der Tumorentität, von der Dauer der Wachstumsphase und dem verwendeten Mausmodell variieren kann und dies insbesondere bei der Translation auf potentiell klinische Anwendungen zu berücksichtigen ist.

Insgesamt offen bleibt, ob die im Knochenmark und Blut von *ITGB4-knockdown*-Tumor-tragenden *pfp/rag2*-Mäusen detektierten $CD11b^+ Gr-1^{Hi} SSC^{Lo}$ Zellen in ihrer Funktionalität mit denen in den Tumoren gefundenen übereinstimmen oder ob direkte Einflüsse der TME diese erst modulieren. Meanhout et al. beispielsweise konnten eine immunsup-

pressive Funktion von aus Milzen stammenden MDSCs bei Tumor-tragenden Mäusen feststellen, während Haverkamp et al. dies erst nach vorangegangener Immunstimulation beobachten konnten (Haverkamp et al., 2011; Maenhout et al., 2014). Unterschiedliche Aktivierungszustände sowie eine unterschiedliche Zusammensetzung der MDSC-Subtypen in peripheren Organen tumor-tragender Mäuse sind demnach für weiterführende Analysen zu bedenken. Dies konnte in einem ersten Ansatz zur Isolierung von MDSCs aus Milzen *ITGB4-knockdown*-Tumor-tragender pfp/rag2-Mäuse bestätigt werden. Nach Giemsa-Färbung von Zytozentrifugenpräparaten konnten Zellen mit verschiedenen Zellkernmorphologien identifiziert werden. Es konnten hierbei keine Zellen mit eindeutig segmentiertem lobulärem Kern separiert werden, was für einen geringen Anteil reifer Neutrophiler spricht. Demgegenüber fanden sich vermehrt Zellen mit ringförmigen Kernen. Zellen mit ringförmiger Kernmorphologie werden mit Vorläuferzellen von Neutrophilen und Makrophagen in Verbindung gebracht (Biermann et al., 1999). Die hier identifizierten Zellen mit zirkulärer und irregulärer Kernkontur (Abb. 4.18,a) ähneln in ihrer Morphologie Pre-Neutrophilen (Jaillon et al., 2020; Kim et al., 2017). Demgegenüber repräsentieren Zellen mit regulärer Kernkontur (Abb. 4.18,b) am ehesten murine Metamyelozyten (Pillay et al., 2013), die im Vergleich zu Pre-Neutrophilen einen unreiferen Differenzierungszustand aufweisen (Jaillon et al., 2020). Zellen mit lobulärem U-förmigem Kern (Abb. 4.18,c) könnten sowohl als Monozyten als auch Myelozyten charakterisiert werden, während eine geschlossene Kernmorphologie sehr wahrscheinlich auf Monozyten hinweist (Liyanage et al., 2016; Kim et al., 2017). Insbesondere hierbei interessant wäre zu analysieren, inwiefern sich MDSCs aus Milzen von pfp/rag2-Mäusen in ihren morphologischen Merkmalen von MDSCs aus Select-Mäusen unterscheiden.

5.5 Bedeutung des Transkriptionsfaktors STAT1 für die immunzelluläre Infiltration

Der Transkriptionsfaktor STAT1 ist eines von sieben Mitgliedern der STAT-Familie. Vermittelt durch die Stimulation von Cytokinen, Wachstumshormonen und Interferonen transduziert STAT1 intrazelluläre Signalkaskaden, die die Transkription von Genen in-

itieren, die die Zellproliferation, Differenzierung, Immunstimulation und Apoptose regulieren (Meissl et al., 2017; Zhang and Liu, 2017). Im Kontext der Tumorgenese gilt STAT1 primär als Tumorsuppressor und ist in Patienten mit Ovarial- (Li et al., 2021), Brust- (Widschwendter et al., 2002), Pankreas- (Sun et al., 2014) oder Kolonkarzinomen (Gordziel et al., 2013) mit einer guten Prognose assoziiert. Gleichzeitig liegen konträre Daten vor, die STAT1 ein onkogenes Potential zuschreiben (Arzt et al., 2014; Khodarev et al., 2010; Li et al., 2021). Zu den pro-tumorigenen Funktionen von STAT1 zählt unter anderem die Induktion einer immunsuppressiven TME (Meissl et al., 2017).

In dieser Arbeit konnte für alle untersuchten Tumorzelllinien eine tendenziell erhöhte STAT1-Expression nach ITGB4-*knockdown* festgestellt werden. Interessanterweise wiesen nur ITGB4-*knockdown* PC-3 Zellen erhöhte p-STAT1-Level auf. Eine erhöhte STAT1-Expression von ITGB4-*knockdown* Zellen könnte generell mit der Expansion und Rekrutierung von MDSCs in Verbindung stehen. In murinen Mammakarzinomzellen führte die Überexpression von konstitutiv aktiviertem STAT1 zu einer Zunahme CD11b⁺ Gr-1⁺ MDSCs im Knochenmark, der Milz sowie im Tumorgewebe immunkompetenter Mäuse (Hix et al., 2013). Untersuchungen zweier unabhängiger Kohorten von Patientinnen mit Brustkrebs zeigte ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der STAT1 mRNA-Expression und Markern Tumor-infiltrierender Makrophagen (Tymszuk et al., 2014). Die Rekrutierung Tumor-infiltrierender Immunzellen scheint dabei durch eine STAT1-induzierte Freisetzung von Cytokinen wie TGF α , TGF β oder IL-13 vermittelt zu werden (Hix et al., 2013). Zu weiteren STAT1-Zielgenen zählt auch CXCL10, welches in ITGB4-*knockdown*-Überständen von PC-3- und PaCa5061-Tumorzellen verstärkt detektiert werden konnte (Tymszuk et al., 2014). Es wäre umso interessanter diesem Befund weiter nachzugehen, wenn sich eine veränderte Chemokin-Sekretion auch auf mRNA-Ebene feststellen ließe. Ob eine Phosphorylierung an Position Y701 essentiell für eine Aktivierung und die weitere Signaltransduktion von STAT1 ist, bleibt weiterführend zu klären. Neben der Phosphorylierung sind weitere post-translationale Modifizierungen von STAT-Proteinen bekannt, die Einfluss auf den Aktivitätsstatus nehmen (Lim and Cao, 2006). Ebenso wird diskutiert,

ob unphosphorylierte STAT-Proteine als Transkriptionsfaktoren fungieren können (Lim and Cao, 2006). In HCC Tumoren hatten erhöhte Level an unphosphorylierten STAT1-Proteinen gleichzeitig einen positiven Effekt auf das Zellwachstum (Ma et al., 2019a). Ein direkter Zusammenhang zwischen der STAT1- und ITGB4-Expression in Tumoren ist bisher nicht beschrieben. In PC-3 Zellysaten konnte nach siRNA-vermitteltem *knockdown* der Integrin-Untereinheit $\beta 6$ eine gesteigerte STAT1-Expression festgestellt werden (Lu et al., 2018). Kemper et al. konnten nach *knockdown* der Integrin-Untereinheit αV , welches Heterodimere mit dem Integrin $\beta 6$ ausbildet, erhöhte STAT1-Level in Pankreas-Xenograft-Tumoren finden (Kemper et al., 2021). Es bleibt zu überprüfen, ob ein *knockdown* dieser Integrin-Untereinheiten die Expression von ITGB4 oder umgekehrt tangiert und auf diesem Wege die STAT1-Expression moduliert wird. Weiterführend wäre die STAT1 bzw. p-STAT1-Expression auch in Tumor-Sphäroiden sowie s.c Xenograft-Tumoren zu überprüfen. Eine vollständigere Übersicht über mögliche veränderte Signalwege in 10 Tage alten Kontroll- und ITGB4-*knockdown*-Xenograft-Tumoren könnte eine Kinom-Analyse (engl. *kinom profiling*) bieten.

5.6 Bedeutung der ITGB4-Expression für die leukozytäre

Infiltration in humanen Tumorgeweben

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten gaben erste Hinweise darauf, dass eine verringerte ITGB4-Expression mit einer erhöhten Attraktion von Leukozyten in Zusammenhang stehen könnte. Zur Untersuchung der klinischen Relevanz dieses Befundes wurden zunächst Gewebeproben von humanen Ovarialkarzinomen auf die Expression von ITGB4 und CD45 untersucht. Diese standen durch freundliche Unterstützung von Frau PD Dr. Christine Stürken (Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie; UKE) für eine direkte Analyse zur Verfügung. Eine Anfärbung von MDSCs wurde zunächst nicht angestrebt, da diese anders als murine MDSCs einen komplexeren Phänotypen aufweisen (Vanhaver et al., 2021) und zunächst geklärt werden sollte, ob generell ein Zusammenhang zwischen der ITGB4-Expression humaner Tumore und deren leukozytäre Infiltration besteht. Basierend auf immunhistologischen Färbungen konnte bestätigt werden, dass die

ITGB4-Expression in Ovarialkarzinomen negativ mit der Leukozyteninfiltration assoziiert war. Während zahlreiche Studien eine Infiltration von Leukozyten in Ovarialkarzinomen beschreiben (Biggerstaff et al., 2006; Negus et al., 1997; Silasi et al., 2006), ist eine mögliche Assoziation zur ITGB4-Expression bisher unveröffentlicht. Ein direkter Zusammenhang zwischen der ITGB4-Expression und inflammatorischen Prozessen existiert bisher nur in einem Mausmodell mit konditionalem ITGB4-*knockout* in Epithelzellen der Atemwege. Der Verlust der ITGB4-Expression führt hier zu einer exzessiven Zunahme inflammatorischer Zellen im Lungengewebe (Han et al., 2018). Ausblickend müsste geklärt werden, ob es sich bei der hier untersuchten CD45⁺ Leukozytenpopulation tatsächlich um MDSCs handelt und ob für weitere Tumorentitäten wie insbesondere das Prostata- und Pankreaskarzinom, für die in dieser Arbeit umfangreiche präklinische Daten vorliegen, eine entsprechende Assoziation festgestellt werden kann. Als mögliche Marker für eine Phänotypisierung von humanen MDSCs könnten die Antigene CD11b, CD14, CD15, CD66 und HLA-DR verwendet werden (Bronte et al., 2016; Veglia et al., 2021b).

Während ITGB4 als wichtige Komponente von Hemidesmosomen in einer Vielzahl von Normalgeweben als therapeutische Zielstruktur per se ungeeignet erscheint, wäre ein spezifisches *targeting* von MDSCs in Patienten:innen mit geringem ITGB4-Status eine möglicherweise vielversprechende Alternative.

6 Zusammenfassung

Die immunologische Zusammensetzung der Mikroumgebung von Tumoren hat entscheidenden Einfluss auf den biologischen Verlauf von Krebserkrankungen und somit auch tiefgreifende klinische Bedeutsamkeit. Insbesondere Tumor-infiltrierende Immunzellen, die beeinflusst durch Tumor- und Stromazellen Tumor-förderliche Eigenschaften erwerben, stellen die Forschung vor besondere Herausforderungen.

Im Fokus von Vorarbeiten des vorliegenden Projektes stand die Rolle der Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin, P-Selektin und Integrin β 4 (ITGB4) für die hämatogene Metastasierung von Tumorzellen. Verschiedene Tumor-Xenograft-Modelle kamen zu dem Resultat, dass eine kombinierte Depletion der E- und P-Selektin-Expression im Stroma von immundefizienten Mäusen und ein ITGB4-*knockdown* auf Tumorzellen (PC-3, PaCa5061 und SKOV3) zu einer synergistischen Inhibition des Tumorwachstums führte. Da der ITGB4-*knockdown* allein das Tumorwachstum nur moderat verzögerte und die E-/P-Selektin-Depletion allein keinen Einfluss auf das Wachstum von Kontroll-Tumoren nahm, ergab sich die Fragestellung, durch welche molekularen Mechanismen der beobachtete Synergismus bedingt ist.

Anhand von Xenograft-Modellen der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden, dass die synergistische Wachstumsinhibition nicht durch eines der endothelialen Selektine allein bedingt wird, sondern sich erst nach E-/P-Selektin-Doppeldepletion manifestiert. *In vitro* Studien ließen vermuten, dass der ITGB4-*knockdown* zu einer generellen Beeinträchtigung der Kolonieformation und einer erhöhten Apoptose-Induktion in den Tumorzellen führt. Angesichts der maßgeblichen Rolle von E- und P-Selektinen für die Leukodiapedese wurden an PC-3-Xenograft-Modellen Veränderungen des immunzellulären Infiltrats in subkutanen Tumoren und systemischen Organen in der frühen Phase der Tumoretablierung analysiert. Hierbei wurde ein erhöhter Anteil an CD11b⁺ Gr-1⁺ Leukozyten in ITGB4-*knockdown*-Tumoren von E-/P-Selektin-kompetenten Mäusen festgestellt. Lag zusätzlich eine E-/P-Selektin-Defizienz vor, war

dieser Anstieg nicht mehr zu verzeichnen. CD11b⁺ Gr-1⁺ Leukozyten gelten in der Literatur als förderlich für das Tumorwachstum, sodass die Hypothese aufgestellt werden konnte, dass diese Subpopulation E-/P-Selektin-abhängig Tumore infiltriert und insbesondere essentiell für die Etablierung ITGB4-depletierter Tumorzellen ist. Weitere *in vitro* Versuche zur Chemokin-Sekretion und Leukozyten-Attraktion unterstützten die Vermutung, dass ITGB4-*knockdown*-Tumorzellen vermehrt Chemokine sekretieren, die mit der aktiven Rekrutierung von Immunzellen in Verbindung stehen. Folglich zeigte auch das Knochenmark von Mäusen mit ITGB4-*knockdown*-Tumoren vermehrt unreife myeloide Zellen (CD11b⁺ Gr-1^{Hi} SSC^{Lo}). Die gleiche Subpopulation war im Blut und in den Tumoren in der ITGB4-*knockdown*-Gruppe erhöht, sofern es sich um E-/P-Selektin-kompetente Tiere handelte. Bei gleichzeitigem E-/P-Selektin-*knockout* waren die unreifen myeloiden Zellen im Blut und in den Tumoren nicht mehr vermehrt. Hieraus ließ sich die Annahme ableiten, dass ITGB4-*knockdown*-Tumore die Expansion unreifer myeloider Zellen im Knochenmark propagieren, jedoch deren Auswanderung ins Blut und nachfolgende Infiltration des Tumors von der E-/P-Selektin-Expression abhängig sind. Darüber hinaus zeigten E-/P-Selektin-defiziente Tiere mit ITGB4-*knockdown*-Tumoren eine ausgeprägte Störung der Milzmorphologie, die Hinweise auf eine Leukozytose sowie Anzeichen einer extramedullären Hämatopoese (EMH) gaben. Immunhistologische Untersuchungen eines Kollektivs intraperitonealer Karzinosen von Ovarialkarzinom-Patientinnen konnten zeigen, dass auch in klinischen Material die ITGB4-Expression von Tumorzellen negativ mit der Leukozytenanzahl assoziiert ist.

Zusammenfassend sprechen die Resultate dieser Studie dafür, dass die Etablierung von Tumorzellen durch den ITGB4-*knockdown* beeinträchtigt wird, jedoch die aktive Rekrutierung von myeloiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und Blut dazu beiträgt eine tumor-förderliche Mikroumgebung zu schaffen. Diese Infiltration scheint von der Expression endothelialer Selektine abhängig zu sein und entscheidend für das Tumorwachstum. Weiterführende Analysen müssen zukünftig mehr Erkenntnisse über die genaue Identität und das Wirkungsspektrum dieser Immunzellen liefern, um sie für klinische Therapieansätze nutzbar zu machen.

6.1 Abstract

The immunological composition of the tumor microenvironment has a decisive influence on the biological course of cancer and thus also profound clinical relevance. In particular, tumor-infiltrating immune cells, which acquire tumor-promoting properties under the influence of tumor and stromal cells, confront research with special challenges.

The present study initially focused on the role of the cell adhesion molecules E-selectin, P-selectin, and integrin $\beta 4$ (ITGB4) in hematogenous metastasis. Several tumor xenograft models concluded that combined depletion of E- and P-selectin expression in the stroma of immunodeficient mice and ITGB4 knockdown on tumor cells (PC-3, PaCa5061, and SKOV3) resulted in synergistic growth inhibition of the primary tumor. Since ITGB4 knockdown alone only moderately retarded tumor growth and E-/P-selectin depletion alone had no effect on control tumor growth, the question arose by which molecular mechanisms the observed synergism was caused.

Using PC-3 prostate carcinoma cell line xenograft models, this study demonstrated that synergistic growth inhibition is not due to one of the endothelial selectins alone, but manifests only after E-/P-selectin double depletion. In vitro studies suggested that ITGB4 knockdown leads to a general impairment of colony formation and increased apoptosis induction in tumor cells. Given the crucial role of E- and P-selectins in leukodiapedesis, PC-3 xenograft models were used to analyze changes in the immune cellular infiltrate in subcutaneous tumors and systemic organs during the early phase of tumor establishment. This revealed increased levels of CD11b⁺ Gr-1⁺ leukocytes in ITGB4 knockdown tumors derived from E-/P-selectin-competent mice. If the mice were also E-/P-selectin-deficient, this increase was no longer seen. CD11b⁺ Gr-1⁺ leukocytes are considered in the literature to be beneficial for tumor growth, so it could be hypothesized that this subpopulation infiltrates tumors in an E-/P-selectin-dependent manner and is particularly essential for the establishment of ITGB4-depleted tumor cells. Further in vitro experiments on chemokine secretion and leukocyte attraction supported the suggestion that

ITGB4 knockdown tumor cells secrete increased chemokines that are linked to immune cell recruitment. Consequently, bone marrow from mice with ITGB4 knockdown tumors also showed more immature myeloid cells (CD11b⁺ Gr-1^{Hi} SSC^{Lo}). The same subpopulation was increased in blood and tumors in the ITGB4 knockdown group, provided that they were E-/P-selectin-competent animals. In the case of concomitant E-/P-selectin knock-out, immature myeloid cells were no longer increased in blood and tumors. From these findings, it could be suggested that ITGB4 knockdown tumors propagate the expansion of immature myeloid cells in the bone marrow, but their emigration into the blood and subsequent infiltration into the tumor are dependent on the expression of E-/P-selectin. In addition, E-/P-selectin-deficient animals with ITGB4 knockdown tumors showed marked disruption of splenic morphology, providing evidence of leukocytosis as well as signs of extramedullary hematopoiesis (EMH). Immunohistological studies of a collective of intraperitoneal carcinomatosis of ovarian cancer patients demonstrated that ITGB4 expression of tumor cells was also negatively associated with leukocyte count in clinical material.

In summary, the results of this study suggest that tumor cell establishment is impaired by ITGB4 knockdown, but active recruitment of myeloid progenitor cells from bone marrow and blood helps to create a tumor-promoting microenvironment. This infiltration appears to be dependent on the expression of endothelial selectins and critical for tumor growth. Further analysis will need to provide more insight into the exact identity and spectrum of action of these immune cells in the future to make them useful for clinical therapeutic approaches.

Literaturverzeichnis

- Acharyya, S., Oskarsson, T., Vanharanta, S., Malladi, S., Kim, J., Morris, P. G., Manova-Todorova, K., Leversha, M., Hogg, N., Seshan, V. E., Norton, L., Brogi, E., and Massagué, J. (2012). A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell*, 150(1):165–178.
- Aldinucci, D., Borghese, C., and Casagrande, N. (2020). The CCL5/CCR5 Axis in Cancer Progression. *Cancers*, 12(7).
- Allen, M. V., Smith, G. J., Juliano, R., Maygarden, S. J., and Mohler, J. L. (1998). Down-regulation of the $\beta 4$ integrin subunit in prostatic carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia. *Human Pathology*, 29(4):311–318.
- Alon, R. and Shulman, Z. (2011). Chemokine triggered integrin activation and actin remodeling events guiding lymphocyte migration across vascular barriers. *Experimental Cell Research*, 317(5):632–641.
- Alshetaiwi, H., Pervolarakis, N., McIntyre, L. L., Ma, D., Nguyen, Q., Rath, J. A., Nee, K., Hernandez, G., Evans, K., Torosian, L., Silva, A., Walsh, C., and Kessenbrock, K. (2020). Defining the emergence of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer using single-cell transcriptomics. *Science immunology*, 5(44).
- Alvarez, D., Vollmann, E. H., and von Andrian, U. H. (2008). Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration. *Immunity*, 29(3):325–342.
- Anderson, L. R., Owens, T. W., and Naylor, M. J. (2014). Structural and mechanical functions of integrins. *Biophysical Reviews*, 6(2):203–213.
- Anderson, N. M. and Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. *Current biology : CB*, 30(16):R921–R925.

- Arbonés, M. L., Ord, D. C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Cappon, D. J., and Teddert, T. F. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity*, 1(4):247–260.
- Arnaout, M. A. (2016). Biology and structure of leukocyte $\beta 2$ integrins and their role in inflammation. *F1000Research*, 5(0):2433.
- Arnaout, M. A., Mahalingam, B., and Xiong, J.-P. (2005). Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1):381–410.
- Arnold, J. M., Huggard, P. R., Cummings, M., Ramm, G. A., and Chenevix-Trench, G. (2005). Reduced expression of chemokine (C-C motif) ligand-2 (CCL2) in ovarian adenocarcinoma. *British journal of cancer*, 92(11):2024–31.
- Arun, A. S., Tepper, C. G., and Lam, K. S. (2018). Identification of integrin drug targets for 17 solid tumor types. *Oncotarget*, 9(53):30146–30162.
- Arzt, L., Kothmaier, H., Halbwedl, I., Quehenberger, F., and Popper, H. H. (2014). Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) acts like an oncogene in malignant pleural mesothelioma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 465(1):79–88.
- Atretkhany, K. S., Drutskaya, M. S., Nedospasov, S. A., Grivennikov, S. I., and Kuprash, D. V. (2016). Chemokines, cytokines and exosomes help tumors to shape inflammatory microenvironment. *Pharmacology and Therapeutics*, 168:98–112.
- Auchampach, J. A., Oliver, M. G., Anderson, D. C., and Manning, A. M. (1994). Cloning, sequence comparison and in vivo expression of the gene encoding rat P-selectin. *Gene*, 145(2):251–5.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science*, 317(5838):666–670.

- Ban, Y., Mai, J., Li, X., Mitchell-Flack, M., Zhang, T., Zhang, L., Chouchane, L., Ferrari, M., Shen, H., and Ma, X. (2017). Targeting Autocrine CCL5-CCR5 Axis Reprograms Immunosuppressive Myeloid Cells and Rein vigorates Antitumor Immunity. *Cancer research*, 77(11):2857–2868.
- Banyard, J., Chung, I., Migliozi, M., Phan, D. T., Wilson, A. M., Zetter, B. R., and Bielenberg, D. R. (2014). Identification of genes regulating migration and invasion using a new model of metastatic prostate cancer. *BMC Cancer*, 14(1):387.
- Barnes, T. A. and Amir, E. (2017). HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *British journal of cancer*, 117(4):451–460.
- Beaulieu, J.-F. (2010). Integrin $\alpha6\beta4$ in colorectal cancer. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 1(1):3–11.
- Beauséjour, M., Thibodeau, S., Demers, M. J., Bouchard, V., Gauthier, R., Beaulieu, J. F., and Vachon, P. H. (2013). Suppression of anoikis in human intestinal epithelial cells: Differentiation state-selective roles of $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha5\beta1$, and $\alpha6\beta4$ integrins. *BMC Cell Biology*, 14(1):1–19.
- Benner, B., Scarberry, L., Suarez-Kelly, L. P., Duggan, M. C., Campbell, A. R., Smith, E., Lapurga, G., Jiang, K., Butchar, J. P., Tridandapani, S., Howard, J. H., Baiocchi, R. A., Mace, T. A., and Carson, W. E. (2019). Generation of monocyte-derived tumor-associated macrophages using tumor-conditioned media provides a novel method to study tumor-associated macrophages in vitro. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7(1):140.
- Berman, C. L., Yeo, E. L., Wencel-Drake, J. D., Furie, B. C., Ginsberg, M. H., and Furie, B. (1986). A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein. *Journal of Clinical Investigation*, 78(1):130–137.

- Berraondo, P., Minute, L., Ajona, D., Corrales, L., Melero, I., and Pio, R. (2016). Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. *Immunological reviews*, 274(1):290–306.
- Bevilacqua, M. P., Stengelin, S., Gimbrone, M. A., and Seed, B. (1989). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, 243(4895):1160–1165.
- Bian, X., Xiao, Y.-T., Wu, T., Yao, M., Du, L., Ren, S., and Wang, J. (2019). Microvesicles and chemokines in tumor microenvironment: mediators of intercellular communications in tumor progression. *Molecular Cancer*, 18(1):50.
- Bierie, B., Pierce, S. E., Kroeger, C., Stover, D. G., Pattabiraman, D. R., Thiru, P., Liu Donaher, J., Reinhardt, F., Chaffer, C. L., Keckesova, Z., and Weinberg, R. A. (2017). Integrin- $\beta 4$ identifies cancer stem cell-enriched populations of partially mesenchymal carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(12):E2337–E2346.
- Biermann, H., Pietz, B., Dreier, R., Schmid, K. W., Sorg, C., and Sunderkötter, C. (1999). Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors. *Journal of Leukocyte Biology*, 65(2):217–231.
- Biggerstaff, J., Weidow, B., Amirkhosravi, A., and Francis, J. L. (2006). Enumeration of leukocyte infiltration in solid tumors by confocal laser scanning microscopy. *BMC Immunology*, 7:1–13.
- Bingle, L., Brown, N. J., and Lewis, C. E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of pathology*, 196(3):254–65.
- Bonfanti, R., Furie, B. C., Furie, B., and Wagner, D. D. (1989). PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*, 73(5):1109–1112.
- Bronte, V., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Frey, A. B., Rodriguez, P. C., Chen, S.-H., Vonderheide, R. H., Brandau, S., Umansky, V., Ochoa, A., Gabrilovich, D. I., Sica, A.,

- Colombo, M. P., Greten, T. F., and Ostrand-Rosenberg, S. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*, 7(1):1–10.
- Bronte, V. and Pittet, M. J. (2013). The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*, 39(5):806–818.
- Bronte, V., Wang, M., Overwijk, W. W., Surman, D. R., Pericle, F., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (1998). Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(10):5313–20.
- Bruehl, R. E., Springer, T. A., and Bainton, D. F. (1996). Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 44(8):835–844.
- Buessow, S. C., Paul, R. D., and Lopez, D. M. (1984). Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 73(1):249–255.
- Bullard, D. C., Kunkel, E. J., Kubo, H., Hicks, M. J., Lorenzo, I., Doyle, N. A., Doerschuk, C. M., Ley, K., and Beaudet, A. L. (1996). Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *Journal of Experimental Medicine*, 183(5):2329–2336.
- Califano, J. A., Khan, Z., Noonan, K. A., Rudraraju, L., Zhang, Z., Wang, H., Goodman, S., Gourin, C. G., Ha, P. K., Fakhry, C., Saunders, J., Levine, M., Tang, M., Neuner, G., Richmon, J. D., Blanco, R., Agrawal, N., Koch, W. M., Marur, S., Weed, D. T., Serafini, P., and Borrello, I. (2015). Tadalafil augments tumor specific immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(1):30–8.
- Capuano, G., Rigamonti, N., Grioni, M., Freschi, M., and Bellone, M. (2009). Modulators

- of arginine metabolism support cancer immunosurveillance. *BMC Immunology*, 10(June 2014).
- Carman, C. V. and Springer, T. A. (2003). Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current opinion in cell biology*, 15(5):547–56.
- Chavakis, E., Choi, E. Y., and Chavakis, T. (2009). Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. *Thrombosis and haemostasis*, 102(2):191–7.
- Chen, Z., Feng, X., Herting, C. J., Garcia, V. A., Nie, K., Pong, W. W., Rasmussen, R., Dwivedi, B., Seby, S., Wolf, S. A., Gutmann, D. H., and Hambardzumyan, D. (2017). Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer research*, 77(9):2266–2278.
- Chun, E., Lavoie, S., Michaud, M., Gallini, C. A., Kim, J., Soucy, G., Odze, R., Glickman, J. N., and Garrett, W. S. (2015). CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. *Cell Reports*, 12(2):244–257.
- Clements, M., Gershenovich, M., Chaber, C., Campos-Rivera, J., Du, P., Zhang, M., Ledbetter, S., and Zuk, A. (2016). Differential Ly6C Expression after Renal Ischemia-Reperfusion Identifies Unique Macrophage Populations. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 27(1):159–70.
- Colburn, Z. T. and Jones, J. C. R. (2017). $\alpha 6 \beta 4$ Integrin Regulates the Collective Migration of Epithelial Cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 56(4):443–452.
- Comito, G., Giannoni, E., Segura, C. P., Barcellos-de Souza, P., Raspollini, M. R., Baroni, G., Lanciotti, M., Serni, S., and Chiarugi, P. (2014). Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene*, 33(19):2423–31.

- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J. Y., Butcher, E. C., and Laudanna, C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*, 13(6):759–69.
- Cress, A. E., Rabinovitz, I., Zhu, W., and Nagle, R. B. (1995). The alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins in human prostate cancer progression. *Cancer metastasis reviews*, 14(3):219–28.
- Cruz-Monserrate, Z. and O'Connor, K. L. (2008). Integrin $\alpha 6\beta 4$ Promotes Migration, Invasion through Tiam1 Upregulation, and Subsequent Rac Activation. *Neoplasia*, 10(5):408–IN1.
- Cui, T. X., Kryczek, I., Zhao, L., Zhao, E., Kuick, R., Roh, M. H., Vatan, L., Szeliga, W., Mao, Y., Thomas, D. G., Kotarski, J., Tarkowski, R., Wicha, M., Cho, K., Giordano, T., Liu, R., and Zou, W. (2013a). Myeloid-Derived Suppressor Cells Enhance Stemness of Cancer Cells by Inducing MicroRNA101 and Suppressing the Corepressor CtBP2. *Immunity*, 39(3):611–621.
- Cui, T. X., Kryczek, I., Zhao, L., Zhao, E., Kuick, R., Roh, M. H., Vatan, L., Szeliga, W., Mao, Y., Thomas, D. G., Kotarski, J., Tarkowski, R., Wicha, M., Cho, K., Giordano, T., Liu, R., and Zou, W. (2013b). Myeloid-derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA101 and suppressing the corepressor CtBP2. *Immunity*, 39(3):611–21.
- Dans, M., Gagnoux-Palacios, L., Blaikie, P., Klein, S., Mariotti, A., and Giancotti, F. G. (2001). Tyrosine Phosphorylation of the $\beta 4$ Integrin Cytoplasmic Domain Mediates Shc Signaling to Extracellular Signal-regulated Kinase and Antagonizes Formation of Hemidesmosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(2):1494–1502.
- Dar, T. B., Henson, R. M., and Shiao, S. L. (2018). Targeting Innate Immunity to Enhance the Efficacy of Radiation Therapy. *Frontiers in immunology*, 9(JAN):3077.

- Davis, T. L., Cress, A. E., Dalkin, B. L., and Nagle, R. B. (2001). Unique expression pattern of the alpha6beta4 integrin and laminin-5 in human prostate carcinoma. *The Prostate*, 46(3):240–8.
- De Filippo, K., Dudeck, A., Hasenberg, M., Nye, E., Van Rooijen, N., Hartmann, K., Gunzer, M., Roers, A., and Hogg, N. (2013). Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*, 121(24):4930–4937.
- De la Fuente López, M., Landskron, G., Parada, D., Dubois-Camacho, K., Simian, D., Martinez, M., Romero, D., Roa, J. C., Chahuán, I., Gutiérrez, R., Lopez-K, F., Alvarez, K., Kronberg, U., López, S., Sanguinetti, A., Moreno, N., Abedrapo, M., González, M.-J., Quera, R., and Hermoso-R, M. A. (2018). The relationship between chemokines CCL2, CCL3, and CCL4 with the tumor microenvironment and tumor-associated macrophage markers in colorectal cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 40(11):1010428318810059.
- de Veirman, K., van Ginderachter, J. A., Lub, S., de Beule, N., Thielemans, K., Bautmans, I., Oyajobi, B. O., de Bruyne, E., Menu, E., Lemaire, M., van Riet, I., Vanderkerken, K., and van Valckenborgh, E. (2015). Multiple myeloma induces Mcl-1 expression and survival of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget*, 6(12):10532–10547.
- de Winde, C. M., Munday, C., and Acton, S. E. (2020). Molecular mechanisms of dendritic cell migration in immunity and cancer. *Medical Microbiology and Immunology*, 209(4):515–529.
- Di Martile, M., Farini, V., Consonni, F. M., Trisciuglio, D., Desideri, M., Valentini, E., D’Aguanno, S., Tupone, M. G., Buglioni, S., Ercolani, C., Gallo, E., Amadio, B., Terrenato, I., Foddai, M. L., Sica, A., and Del Bufalo, D. (2020). Melanoma-specific bcl-2 promotes a protumoral M2-like phenotype by tumor-associated macrophages. *Journal for immunotherapy of cancer*, 8(1):1–14.
- Dilek, N., Vuillefroy de Silly, R., Blanco, G., and Vanhove, B. (2012). Myeloid-derived

- suppressor cells: mechanisms of action and recent advances in their role in transplant tolerance. *Frontiers in Immunology*, 3(JUL).
- Dimitroff, C. J., Descheny, L., Trujillo, N., Kim, R., Nguyen, V., Huang, W., Pienta, K. J., Kutok, J. L., and Rubin, M. A. (2005). Identification of leukocyte E-selectin ligands, P-selectin glycoprotein ligand-1 and E-selectin ligand-1, on human metastatic prostate tumor cells. *Cancer research*, 65(13):5750–60.
- Doré, M. and Sirois, J. (1996). Regulation of P-selectin expression by inflammatory mediators in canine jugular endothelial cells. *Veterinary pathology*, 33(6):662–71.
- dos Anjos Cassado, A. (2017). F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. In Kloc, M., editor, *Macrophages*, volume 62, chapter 7, pages 161–179. Springer.
- Dowling, J., Yu, Q. C., and Fuchs, E. (1996). Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *Journal of Cell Biology*, 134(2):559–572.
- Draghiciu, O., Nijman, H. W., Hoogbeem, B. N., Meijerhof, T., and Daemen, T. (2015). Sunitinib depletes myeloid-derived suppressor cells and synergizes with a cancer vaccine to enhance antigen-specific immune responses and tumor eradication. *OncoImmunology*, 4(3):e989764.
- DuPre', S. A. and Hunter, K. W. (2007). Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Experimental and molecular pathology*, 82(1):12–24.
- El Rayes, T., Catena, R., Lee, S., Stawowczyk, M., Joshi, N., Fischbach, C., Powell, C. A., Dannenberg, A. J., Altorki, N. K., Gao, D., and Mittal, V. (2015). Lung inflammation promotes metastasis through neutrophil protease-mediated degradation of Tsp-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(52):16000–5.
- Elmore, S. A. (2006). Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicologic pathology*, 34(5):648–55.

- Engvall, E. and Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9):871–874.
- Eriksson, E., Wenthe, J., Irenaeus, S., Loskog, A., and Ullenhag, G. (2016). Gemcitabine reduces MDSCs, tregs and TGF β -1 while restoring the teff/treg ratio in patients with pancreatic cancer. *Journal of Translational Medicine*, 14(1):282.
- Eriksson, E. E., Xie, X., Werr, J., Thoren, P., and Lindbom, L. (2001). Importance of Primary Capture and L-Selectin–Dependent Secondary Capture in Leukocyte Accumulation in Inflammation and Atherosclerosis in Vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 194(2):205–218.
- Erlandsson, A., Carlsson, J., Lundholm, M., Fält, A., Andersson, S.-O., Andrén, O., and Davidsson, S. (2019). M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer. *The Prostate*, 79(4):363–369.
- Fleming, V., Groth, C., Altevogt, P., Umansky, V., Nagibin, V., Weber, R., Utikal, J., and Hu, X. (2018). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. *Frontiers in Immunology*, 9(March).
- Fleming, V., Hu, X., Weller, C., Weber, R., Groth, C., Riester, Z., Hüser, L., Sun, Q., Nagibin, V., Kirschning, C., Bronte, V., Utikal, J., Altevogt, P., and Umansky, V. (2019). Melanoma Extracellular Vesicles Generate Immunosuppressive Myeloid Cells by Upregulating PD-L1 via TLR4 Signaling. *Cancer research*, 79(18):4715–4728.
- Flores-Toro, J. A., Luo, D., Gopinath, A., Sarkisian, M. R., Campbell, J. J., Charo, I. F., Singh, R., Schall, T. J., Datta, M., Jain, R. K., Mitchell, D. A., and Harrison, J. K. (2020). CCR2 inhibition reduces tumor myeloid cells and unmasks a checkpoint inhibitor effect to slow progression of resistant murine gliomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(2):1129–1138.
- Fogh, J., Fogh, J. M., and Orfeo, T. (1977). One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 59(1):221–226.

- Frenette, P. S., Mayadas, T. N., Rayburn, H., Hynes, R. O., and Wagner, D. D. (1996). Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell*, 84(4):563–74.
- Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C., and Kroemer, G. (2017). The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature reviews. Clinical oncology*, 14(12):717–734.
- Fujisawa, T., Wang, K., Niu, X. L., Egginton, S., Ahmad, S., Hewett, P., Kontos, C. D., and Ahmed, A. (2017). Angiopoietin-1 promotes atherosclerosis by increasing the proportion of circulating Gr1+ monocytes. *Cardiovascular Research*, 113(1):81–89.
- Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature reviews. Immunology*, 4(12):941–52.
- Gabrilovich, D. I. (2017). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunology Research*, 5(1):3–8.
- Gabrilovich, D. I., Bronte, V., Chen, S.-H., Colombo, M. P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., and Schreiber, H. (2007). The Terminology Issue for Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research*, 67(1):425; author reply 426.
- Gabrilovich, D. I. and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 9(3):162–174.
- Gajewski, T. F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology*, 14(10):1014–22.
- Galli, F., Aguilera, J. V., Palermo, B., Markovic, S. N., Nisticò, P., and Signore, A. (2020). Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era of immunotherapy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 39(1):1–21.
- Garcia, A. J., Ruscetti, M., Arenzana, T. L., Tran, L. M., Bianci-Frias, D., Sybert, E., Priceman, S. J., Wu, L., Nelson, P. S., Smale, S. T., and Wu, H. (2014). Pten null prostate epithelium promotes localized myeloid-derived suppressor cell expansion and

- immune suppression during tumor initiation and progression. *Molecular and cellular biology*, 34(11):2017–28.
- Gazzaniga, S., Bravo, A. I., Guglielmotti, A., van Rooijen, N., Maschi, F., Vecchi, A., Mantovani, A., Mordoh, J., and Wainstok, R. (2007). Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. *The Journal of investigative dermatology*, 127(8):2031–41.
- Gebauer, F., Wicklein, D., Stübke, K., Nehmann, N., Schmidt, A., Salamon, J., Peldschus, K., Nentwich, M. F., Adam, G., Tolstonog, G., Bockhorn, M., Izbicki, J. R., Wagener, C., and Schumacher, U. (2013). Selectin binding is essential for peritoneal carcinomatosis in a xenograft model of human pancreatic adenocarcinoma in pfp-/rag2-mice. *Gut*, 62(5):741–750.
- Gerhard, G. M., Bill, R., Messemaker, M., Klein, A. M., and Pittet, M. J. (2021). Tumor-infiltrating dendritic cell states are conserved across solid human cancers. *The Journal of experimental medicine*, 218(1).
- Gerwing, M., Kocman, V., Stölting, M., Helfen, A., Masthoff, M., Roth, J., Barczyk-Kahlert, K., Greune, L., Schmidt, M. A., Heindel, W., Faber, C., König, S., Wildgruber, M., and Eisenblätter, M. (2020). Tracking of Tumor Cell-Derived Extracellular Vesicles In Vivo Reveals a Specific Distribution Pattern with Consecutive Biological Effects on Target Sites of Metastasis. *Molecular Imaging and Biology*, 22(6):1501–1510.
- Ghasemlou, N., Chiu, I. M., Julien, J.-P., and Woolf, C. J. (2015). CD11b+Ly6G- myeloid cells mediate mechanical inflammatory pain hypersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(49):E6808–17.
- Gimeno, R. and Barquinerio, J. (2011). Myeloid-derived suppressor cells (MDSC): Another player in the orchestra. *Immunologia*, 30(2):45–53.
- Ginsberg, M. H., Partridge, A., and Shattil, S. J. (2005). Integrin regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(5):509–516.

- Gordziel, C., Bratsch, J., Moriggl, R., Knösel, T., and Friedrich, K. (2013). Both STAT1 and STAT3 are favourable prognostic determinants in colorectal carcinoma. *British journal of cancer*, 109(1):138–46.
- Gotsch, U., Jäger, U., Dominis, M., and Vestweber, D. (1994). Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell adhesion and communication*, 2(1):7–14.
- Grailer, J. J., Kodera, M., and Steeber, D. A. (2009). L-selectin: Role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *Journal of Dermatological Science*, 56(3):141–147.
- Green, S., Setiadi, H., McEver, R., and Kelly, R. (1994). The cytoplasmic domain of P-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. *Journal of Cell Biology*, 124(4):435–448.
- Greening, D. W., Gopal, S. K., Xu, R., Simpson, R. J., and Chen, W. (2015). Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 40:72–81.
- Grossman, H. B., Lee, C., Bromberg, J., and Liebert, M. (2000). Expression of the alpha6beta4 integrin provides prognostic information in bladder cancer. *Oncology Reports*, 7(1):13–16.
- Groth, C., Hu, X., Weber, R., Fleming, V., Altevogt, P., Utikal, J., and Umansky, V. (2019). Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *British Journal of Cancer*, 120(1):16–25.
- Gschwandtner, M., Derler, R., and Midwood, K. S. (2019). More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Frontiers in immunology*, 10(December):2759.
- Guo, S. and Deng, C.-X. (2018). Effect of Stromal Cells in Tumor Microenvironment on Metastasis Initiation. *International journal of biological sciences*, 14(14):2083–2093.

- Haas, L. and Obenauf, A. C. (2019). Allies or Enemies—The Multifaceted Role of Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 10(November):1–11.
- Hahne, M., Jäger, U., Isenmann, S., Hallmann, R., and Vestweber, D. (1993). Five tumor necrosis factor-inducible cell adhesion mechanisms on the surface of mouse endothelioma cells mediate the binding of leukocytes. *The Journal of cell biology*, 121(3):655–64.
- Hajizadeh, F., Aghebati Maleki, L., Alexander, M., Mikhailova, M. V., Masjedi, A., Ahmadpour, M., Hashemi, V., and Jadidi-Niaragh, F. (2021). Tumor-associated neutrophils as new players in immunosuppressive process of the tumor microenvironment in breast cancer. *Life sciences*, 264:118699.
- Han, L., Wang, L., Tang, S., Yuan, L., Wu, S., Du, X., Xiang, Y., Qu, X., Liu, H., Luo, H., Qin, X., and Liu, C. (2018). ITGB4 deficiency in bronchial epithelial cells directs airway inflammation and bipolar disorder-related behavior. *Journal of neuroinflammation*, 15(1):246.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5):646–674.
- Harburger, D. S. and Calderwood, D. A. (2009). Integrin signalling at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(9):1472–1472.
- Harjunpää, H., Lloret Asens, M., Guenther, C., and Fagerholm, S. C. (2019). Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY).
- Hassel, J. C., Jiang, H., Bender, C., Winkler, J., Sevko, A., Shevchenko, I., Halama, N., Dimitrakopoulou-Strauss, A., Haefeli, W. E., Jäger, D., Enk, A., Utikal, J., and Umansky, V. (2017). Tadalafil has biologic activity in human melanoma. Results of a pilot trial with Tadalafil in patients with metastatic Melanoma (TaMe). *OncoImmunology*, 6(9):e1326440.
- Hattori, R., Hamilton, K. K., Fugate, R. D., McEver, R. P., and Sims, P. J. (1989).

- Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid re-distribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *The Journal of biological chemistry*, 264(14):7768–7771.
- Haverkamp, J. M., Crist, S. A., Elzey, B. D., Cimen, C., and Ratliff, T. L. (2011). In vivo suppressive function of myeloid-derived suppressor cells is limited to the inflammatory site. *European journal of immunology*, 41(3):749–59.
- Hawila, E., Razon, H., Wildbaum, G., Blattner, C., Sapir, Y., Shaked, Y., Umansky, V., and Karin, N. (2017). CCR5 Directs the Mobilization of CD11b+Gr1+Ly6Clow Polymorphonuclear Myeloid Cells from the Bone Marrow to the Blood to Support Tumor Development. *Cell Reports*, 21(8):2212–2222.
- Heine, A., Flores, C., Gevensleben, H., Diehl, L., Heikenwalder, M., Ringelhan, M., Jansen, K.-P., Nitsche, U., Garbi, N., Brossart, P., Knolle, P. A., Kurts, C., and Höchst, B. (2017). Targeting myeloid derived suppressor cells with all-trans retinoic acid is highly time-dependent in therapeutic tumor vaccination. *OncoImmunology*, 6(8):e1338995.
- Hellsten, R., Lilljebjörn, L., Johansson, M., Leandersson, K., and Bjartell, A. (2019). The STAT3 inhibitor galiellalactone inhibits the generation of MDSC-like monocytes by prostate cancer cells and decreases immunosuppressive and tumorigenic factors. *The Prostate*, 79(14):1611–1621.
- Hix, L. M., Karavitis, J., Khan, M. W., Shi, Y. H., Khazaie, K., and Zhang, M. (2013). Tumor STAT1 transcription factor activity enhances breast tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(17):11676–11688.
- Holmgaard, R. B., Zamarin, D., Lesokhin, A., Merghoub, T., and Wolchok, J. D. (2016). Targeting myeloid-derived suppressor cells with colony stimulating factor-1 receptor blockade can reverse immune resistance to immunotherapy in indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing tumors. *EBioMedicine*, 6:50–58.

- Horikawa, N., Abiko, K., Matsumura, N., Baba, T., Hamanishi, J., Yamaguchi, K., Murakami, R., Taki, M., Ukita, M., Hosoe, Y., Koshiyama, M., Konishi, I., and Mandai, M. (2020). Anti-VEGF therapy resistance in ovarian cancer is caused by GM-CSF-induced myeloid-derived suppressor cell recruitment. *British Journal of Cancer*, 122(6):778–788.
- Hsu, Y.-L., Yen, M.-C., Chang, W.-A., Tsai, P.-H., Pan, Y.-C., Liao, S.-H., and Kuo, P.-L. (2019). CXCL17-derived CD11b+Gr-1+ myeloid-derived suppressor cells contribute to lung metastasis of breast cancer through platelet-derived growth factor-BB. *Breast cancer research : BCR*, 21(1):23.
- Hu, J., Zhao, Q., Kong, L.-y., Wang, J., Yan, J., Xia, X., Jia, Z., Heimberger, A. B., and Li, S. (2021). Regulation of tumor immune suppression and cancer cell survival by CXCL1/2 elevation in glioblastoma multiforme. *Science Advances*, 7(5):eabc2511.
- Huang, B., Lei, Z., Zhao, J., Gong, W., Liu, J., Chen, Z., Liu, Y., Li, D., Yuan, Y., Zhang, G.-M., and Feng, Z.-H. (2007). CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers. *Cancer Letters*, 252(1):86–92.
- Huang, H., Zhou, W., Chen, R., Xiang, B., Zhou, S., and Lan, L. (2021). CXCL10 is a Tumor Microenvironment and Immune Infiltration Related Prognostic Biomarker in Pancreatic Adenocarcinoma. *Frontiers in molecular biosciences*, 8(February):611508.
- Hunter, K. W., Crawford, N. P., and Alsarraj, J. (2008). Mechanisms of metastasis. *Breast cancer research : BCR*, 10((Suppl 1) :S2):10.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins. *Cell*, 110(6):673–687.
- Iclozan, C., Antonia, S., Chiappori, A., Chen, D.-T., and Gabrilovich, D. (2013). Therapeutic regulation of myeloid-derived suppressor cells and immune response to cancer vaccine in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 62(5):909–918.
- Im, J. H., Buzzelli, J. N., Jones, K., Franchini, F., Gordon-Weeks, A., Markelc, B., Chen, J., Kim, J., Cao, Y., and Muschel, R. J. (2020). FGF2 alters macrophage polariza-

- tion, tumour immunity and growth and can be targeted during radiotherapy. *Nature communications*, 11(1):4064.
- Jaillon, S., Ponzetta, A., Di Mitri, D., Santoni, A., Bonecchi, R., and Mantovani, A. (2020). Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nature reviews. Cancer*, 20(9):485–503.
- Janssen, L. M., Ramsay, E. E., Logsdon, C. D., and Overwijk, W. W. (2017). The immune system in cancer metastasis: Friend or foe? *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 5(1):1–14.
- Jayasingam, S. D., Citartan, M., Thang, T. H., Mat Zin, A. A., Ang, K. C., and Ch'ng, E. S. (2019). Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Frontiers in oncology*, 9(January):1512.
- Johns, J. L. and Christopher, M. M. (2012). Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals. *Veterinary pathology*, 49(3):508–23.
- Jordan, K. R., Kapoor, P., Spongberg, E., Tobin, R. P., Gao, D., Borges, V. F., and McCarter, M. D. (2017). Immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells are increased in splenocytes from cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(4):503–513.
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., and Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology*, 17(1):16–23.
- Kalinina, T., Güngör, C., Thieltges, S., Möller-Krull, M., Penas, E. M. M., Wicklein, D., Streichert, T., Schumacher, U., Kalinin, V., Simon, R., Otto, B., Dierlamm, J., Schwarzenbach, H., Effenberger, K. E., Bockhorn, M., Izbicki, J. R., and Yekebas, E. F. (2010). Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung. *BMC cancer*, 10:295.

- Karakhanova, S., Link, J., Heinrich, M., Shevchenko, I., Yang, Y., Hassenpflug, M., Bunge, H., von Ahn, K., Brecht, R., Mathes, A., Maier, C., Umansky, V., Werner, J., and Bazhin, A. V. (2015). Characterization of myeloid leukocytes and soluble mediators in pancreatic cancer: importance of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*, 4(4):e998519.
- Karin, N. (2020). The Development and Homing of Myeloid-Derived Suppressor Cells: From a Two-Stage Model to a Multistep Narrative. *Frontiers in immunology*, 11(October):557586.
- Kariya, Y., Oyama, M., Hashimoto, Y., Gu, J., and Kariya, Y. (2018). β 4-integrin/PI3K Signaling Promotes Tumor Progression through Galectin-3-N-glycan Complex. *Molecular Cancer Research*, page molcanres.0365.2017.
- Kather, J. N. and Halama, N. (2019). Harnessing the innate immune system and local immunological microenvironment to treat colorectal cancer. *British journal of cancer*, 120(9):871–882.
- Kawamoto, H. and Minato, N. (2004). Myeloid cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(8):1374–1379.
- Keelan, E. T. M., Licence, S. T., Peters, A. M., Binns, R. M., and Haskard, D. O. (1994). Characterization of E-selectin expression in vivo with use of a radiolabeled monoclonal antibody. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 266(1):H279–H290.
- Kemper, M., Schiecke, A., Maar, H., Nikulin, S., Poloznikov, A., Galatenko, V., Tachezy, M., Gebauer, F., Lange, T., Riecken, K., Tonevitsky, A., Aigner, A., Izbicki, J., Schumacher, U., and Wicklein, D. (2021). Integrin alpha-V is an important driver in pancreatic adenocarcinoma progression. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 40(1):1–19.
- Khanna, C. and Hunter, K. (2005). Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis*, 26(3):513–23.

- Khodarev, N., Ahmad, R., Rajabi, H., Pitroda, S., Kufe, T., McClary, C., Joshi, M. D., MacDermed, D., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (2010). Cooperativity of the MUC1 oncoprotein and STAT1 pathway in poor prognosis human breast cancer. *Oncogene*, 29(6):920–9.
- Kim, C. (2010). Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *Journal of Blood Medicine*, page 13.
- Kim, M.-H., Yang, D., Kim, M., Kim, S.-Y., Kim, D., and Kang, S.-J. (2017). A late-lineage murine neutrophil precursor population exhibits dynamic changes during demand-adapted granulopoiesis. *Scientific Reports*, 7(1):39804.
- Kirchner, L. K. (2019). *Einfluss des Integrin β_4 auf das Wachstum des Adenokarzinoms des Pankreas Dissertation*. PhD thesis, Universität Hamburg.
- Kitajiri, S. I., Hosaka, N., Hiraumi, H., Hirose, T., and Ikehara, S. (2002). Increased expression of integrin β -4 in papillary thyroid carcinoma with gross lymph node metastasis. *Pathology International*, 52(7):438–441.
- Köhler, S., Ullrich, S., Richter, U., and Schumacher, U. (2010). E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: First in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *British Journal of Cancer*, 102(3):602–609.
- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., and Gabrilovich, D. I. (2016). The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in Immunology*, 37(3):208–220.
- Kunkel, E. J., Chomas, J. E., and Ley, K. (1998). Role of Primary and Secondary Capture for Leukocyte Accumulation In Vivo. *Circulation Research*, 82(1):30–38.
- Kunkel, E. J. and Ley, K. (1996). Distinct Phenotype of E-Selectin-Deficient Mice. *Circulation Research*, 79(6):1196–1204.

- Kusmartsev, S. and Gabrilovich, D. I. (2002). Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 51(6):293–298.
- Labitzky, V. (2018). *Bedeutung von Integrin $\beta 4$ für die intraperitoneale Metastasierung des Ovarialkarzinoms im Xenograftmodell*. PhD thesis, Universität Hamburg.
- Labow, M. A., Norton, C. R., Rumberger, J. M., Lombard-Gillooly, K. M., Shuster, D. J., Hubbard, J., Bertko, R., Knaack, P. A., Terry, R. W., Harbison, M. L., Kontgen, F., Stewart, C. L., McIntyre, K. W., Will, P. C., Burns, D. K., and Wolitzky, B. A. (1994). Characterization of E-selectin-deficient mice: Demonstration of overlapping function of the endothelial selectins. *Immunity*, 1(8):709–720.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(3):178–96.
- Lange, T., Kupfernagel, M., Wicklein, D., Gebauer, F., Maar, H., Brügge, K., Müller, I., Simon, R., Schlomm, T., Sauter, G., and Schumacher, U. (2014). Aberrant presentation of HPA-reactive carbohydrates implies selectin-independent metastasis formation in human prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 20(7):1791–1802.
- Laviron, M. and Boissonnas, A. (2019). Ontogeny of Tumor-Associated Macrophages. *Frontiers in immunology*, 10(July):1799.
- Lee, M. Y. and Rosse, C. (1982). Depletion of lymphocyte subpopulations in primary and secondary lymphoid organs of mice by a transplanted granulocytosis-inducing mammary carcinoma. *Cancer research*, 42(4):1255–1260.
- Lee, S.-E., Lim, J.-Y., Kim, T. W., Jeon, Y.-W., Yoon, J.-H., Cho, B.-S., Eom, K.-S., Kim, Y.-J., Kim, H.-J., Lee, S., Cho, S.-G., Kim, D.-W., Lee, J. W., Min, W.-S., Shin, D.-M., Choi, E. Y., and Min, C.-K. (2018). Matrix Metalloproteinase-9 in Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Correlate with Early Infections and Clinical Outcomes in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of blood and*

- marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 24(1):32–42.
- Lei, X., Lei, Y., Li, J.-K., Du, W.-X., Li, R.-G., Yang, J., Li, J., Li, F., and Tan, H.-B. (2020). Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer letters*, 470(July 2019):126–133.
- Ley, K., Allietta, M., Bullard, D. C., and Morgan, S. (1998). Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. *Circulation Research*, 83(3):287–294.
- Ley, K., Bullard, D. C., Arbonés, M. L., Bosse, R., Vestweber, D., Tedder, T. F., and Beaudet, A. L. (1995). Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 181(2):669–75.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7(9):678–689.
- Ley, K. and Tedder, T. F. (1995). Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(2):525–8.
- Li, G.-S., Hou, W., Chen, G., Yao, Y.-X., Chen, X.-Y., Zhang, X.-G., Liang, Y., Li, M.-X., Huang, Z.-G., Dang, Y.-W., Liang, Q.-H., Wu, H.-Y., Li, R.-Q., and Wei, H.-Y. (2020). Clinical Significance of Integrin Subunit Beta 4 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 00(00):1–20.
- Li, L., Yan, J., Xu, J., Liu, C.-Q., Zhen, Z.-J., Chen, H.-W., Ji, Y., Wu, Z.-P., Hu, J.-Y., Zheng, L., and Lau, W. Y. (2014). CXCL17 expression predicts poor prognosis and correlates with adverse immune infiltration in hepatocellular carcinoma. *PloS one*, 9(10):e110064.
- Li, X., Wang, F., Xu, X., Zhang, J., and Xu, G. (2021). The Dual Role of STAT1 in Ovarian Cancer: Insight Into Molecular Mechanisms and Application Potentials. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(March):1–13.

- Li, X., Yao, W., Yuan, Y., Chen, P., Li, B., Li, J., Chu, R., Song, H., Xie, D., Jiang, X., and Wang, H. (2017a). Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut*, 66(1):157–167.
- Li, X.-L., Liu, L.-n., Li, D.-d., He, Y.-p., Guo, L.-h., Sun, L.-p., Liu, L.-n., Xu, H.-X., and Zhang, X.-P. (2017b). Integrin $\beta 4$ promotes cell invasion and epithelial-mesenchymal transition through the modulation of Slug expression in hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports*, 7(1):40464.
- Lim, C. P. and Cao, X. (2006). Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Molecular BioSystems*, 2(11):536–550.
- Lin, Y., Xu, J., and Lan, H. (2019). Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *Journal of hematology & oncology*, 12(1):76.
- Lipscomb, E. A., Simpson, K. J., Lyle, S. R., Ring, J. E., Dugan, A. S., and Mercurio, A. M. (2005). The alpha6beta4 integrin maintains the survival of human breast carcinoma cells in vivo. *Cancer research*, 65(23):10970–6.
- Lissbrant, I. F., Stattin, P., Wikstrom, P., Damber, J. E., Egevad, L., and Bergh, A. (2000). Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *International journal of oncology*, 17(3):445–51.
- Litjens, S. H., de Pereda, J. M., and Sonnenberg, A. (2006). Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends in Cell Biology*, 16(7):376–383.
- Liu, J., Wu, S., Zheng, X., Zheng, P., Fu, Y., Wu, C., Lu, B., Ju, J., and Jiang, J. (2020). Immune suppressed tumor microenvironment by exosomes derived from gastric cancer cells via modulating immune functions. *Scientific Reports*, 10(1):1–12.
- Liu, Z., Miner, J. J., Yago, T., Yao, L., Lupu, F., Xia, L., and McEver, R. P. (2010). Differential regulation of human and murine P-selectin expression and function in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 207(13):2975–87.

- Liyanage, S. E., Gardner, P. J., Ribeiro, J., Cristante, E., Sampson, R. D., Luhmann, U. F., Ali, R. R., and Bainbridge, J. W. (2016). Flow cytometric analysis of inflammatory and resident myeloid populations in mouse ocular inflammatory models. *Experimental Eye Research*, 151:160–170.
- Loberg, R. D., Ying, C., Craig, M., Yan, L., Snyder, L. A., and Pienta, K. J. (2007). CCL2 as an important mediator of prostate cancer growth in vivo through the regulation of macrophage infiltration. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 9(7):556–62.
- Loeser, R. F. (2014). Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 39:11–6.
- Loukov, D., Naidoo, A., Puchta, A., Marin, J. L. A., and Bowdish, D. M. E. (2016). Tumor necrosis factor drives increased splenic monopoiesis in old mice. *Journal of leukocyte biology*, 100(1):121–9.
- Lu, H., Bowler, N., Harshyne, L. A., Craig Hooper, D., Krishn, S. R., Kurtoglu, S., Fedele, C., Liu, Q., Tang, H. Y., Kossenkov, A. V., Kelly, W. K., Wang, K., Kean, R. B., Weinreb, P. H., Yu, L., Dutta, A., Fortina, P., Ertel, A., Stanczak, M., Forsberg, F., Gabrilovich, D. I., Speicher, D. W., Altieri, D. C., and Languino, L. R. (2018). Exosomal $\alpha v\beta 6$ integrin is required for monocyte M2 polarization in prostate cancer. *Matrix Biology*, 70(2017):20–35.
- Ma, B., Chen, K., Liu, P., Li, M., Liu, J., Sideras, K., Sprengers, D., Biermann, K., Wang, W., IJzermans, J. N., Cao, W., Kwekkeboom, J., Peppelenbosch, M. P., and Pan, Q. (2019a). Dichotomous functions of phosphorylated and unphosphorylated STAT1 in hepatocellular carcinoma. *Journal of Molecular Medicine*, 97(1):77–88.
- Ma, B., Zhang, L., Zou, Y., He, R., Wu, Q., Han, C., and Zhang, B. (2019b). Reciprocal regulation of integrin $\beta 4$ and KLF4 promotes gliomagenesis through maintaining cancer stem cell traits. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 38(1):23.
- Ma, R.-Y., Zhang, H., Li, X.-F., Zhang, C.-B., Selli, C., Tagliavini, G., Lam, A. D., Prost, S., Sims, A. H., Hu, H.-Y., Ying, T., Wang, Z., Ye, Z., Pollard, J. W., and Qian,

- B.-Z. (2020). Monocyte-derived macrophages promote breast cancer bone metastasis outgrowth. *The Journal of experimental medicine*, 217(11).
- Ma, Y., Shurin, G. V., Peiyuan, Z., and Shurin, M. R. (2013). Dendritic cells in the cancer microenvironment. *Journal of Cancer*, 4(1):36–44.
- Mabuchi, S., Sasano, T., and Komura, N. (2021). Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells in Ovarian Cancer. *Cells*, 10(2):1–12.
- Maenhout, S. K., Van Lint, S., Emeagi, P. U., Thielemans, K., and Aerts, J. L. (2014). Enhanced suppressive capacity of tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells compared with their peripheral counterparts. *International journal of cancer*, 134(5):1077–90.
- Mahmoud, S. M. A., Lee, A. H. S., Paish, E. C., Macmillan, R. D., Ellis, I. O., and Green, A. R. (2012). Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *Journal of clinical pathology*, 65(2):159–63.
- Mainiero, F., Murgia, C., Wary, K. K., Curatola, A. M., Pepe, A., Blumberg, M., Westwick, J. K., Der, C. J., and Giancotti, F. G. (1997). The coupling of alpha6beta4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *The EMBO journal*, 16(9):2365–75.
- Mainiero, F., Pepe, A., Wary, K. K., Spinardi, L., Mohammadi, M., Schlessinger, J., and Giancotti, F. G. (1995). Signal transduction by the alpha 6 beta 4 integrin: distinct beta 4 subunit sites mediate recruitment of Shc/Grb2 and association with the cytoskeleton of hemidesmosomes. *The EMBO Journal*, 14(18):4470–4481.
- Mainiero, F., Pepe, A., Yeon, M., Ren, Y., and Giancotti, F. G. (1996). The intracellular functions of alpha6beta4 integrin are regulated by EGF. *The Journal of cell biology*, 134(1):241–53.
- Mannori, G., Cecconi, O., Hanasaki, K., Nelson, R. M., Bevilacqua, M. P., Crottet, P., Varki, A., and Aruffo, A. (1995). Differential Colon Cancer Cell Adhesion to E-, P-, and L-selectin: Role of Mucin-type Glycoproteins. *Cancer Research*, 55(19):4425–4431.

- Mariotti, A., Kedeshian, P. A., Dans, M., Curatola, A. M., Gagnoux-Palacios, L., and Giancotti, F. G. (2001). EGF-R signaling through Fyn kinase disrupts the function of integrin $\alpha 6 \beta 4$ at hemidesmosomes: role in epithelial cell migration and carcinoma invasion. *The Journal of cell biology*, 155(3):447–58.
- Markowitz, J., Brooks, T. R., Duggan, M. C., Paul, B. K., Pan, X., Wei, L., Abrams, Z., Luedke, E., Lesinski, G. B., Mundy-Bosse, B., Bekaii-Saab, T., and Carson, W. E. (2015). Patients with pancreatic adenocarcinoma exhibit elevated levels of myeloid-derived suppressor cells upon progression of disease. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 64(2):149–59.
- Marshall, B. T., Long, M., Piper, J. W., Yago, T., McEver, R. P., and Zhu, C. (2003). Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature*, 423(6936):190–3.
- Martinez, F. O. and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*, 6(March):13.
- Masucci, M. T., Minopoli, M., and Carriero, M. V. (2019). Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Frontiers in Oncology*, 9(November):1–16.
- Masugi, Y., Yamazaki, K., Emoto, K., Effendi, K., Tsujikawa, H., Kitago, M., Itano, O., Kitagawa, Y., and Sakamoto, M. (2015). Upregulation of integrin $\beta 4$ promotes epithelial–mesenchymal transition and is a novel prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Laboratory Investigation*, 95(3):308–319.
- Matsui, A., Yokoo, H., Negishi, Y., Endo-Takahashi, Y., Chun, N. A. L., Kadouchi, I., Suzuki, R., Maruyama, K., Aramaki, Y., Semba, K., Kobayashi, E., Takahashi, M., and Murakami, T. (2012). CXCL17 expression by tumor cells recruits CD11b+Gr1 high F4/80- cells and promotes tumor progression. *PloS one*, 7(8):e44080.
- Mayadas, T. N. (1995). Gene knockout on P-selectin: Its biology and function. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 5(4):149–157.

- Mayadas, T. N., Johnson, R. C., Rayburn, H., Hynes, R. O., and Wagner, D. D. (1993). Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell*, 74(3):541–554.
- McAllister, S. S. and Weinberg, R. A. (2014). The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nature cell biology*, 16(8):717–27.
- McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L., and Bainton, D. F. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *Journal of Clinical Investigation*, 84(1):92–99.
- Meissl, K., Macho-Maschler, S., Müller, M., and Strobl, B. (2017). The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours. *Cytokine*, 89:12–20.
- Meng, X., Liu, P., Wu, Y., Liu, X., Huang, Y., Yu, B., Han, J., Jin, H., and Tan, X. (2020). Integrin beta 4 (ITGB4) and its tyrosine-1510 phosphorylation promote pancreatic tumorigenesis and regulate the MEK1-ERK1/2 signaling pathway. *Bosnian journal of basic medical sciences*, 20(1):106–116.
- Meyera, C., Sevko, A., Ramacher, M., Bazhin, A. V., Falk, C. S., Osen, W., Borrello, I., Kato, M., Schadendorf, D., Baniyash, M., and Umansky, V. (2011). Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(41):17111–17116.
- Michielsen, A. J., Hogan, A. E., Marry, J., Tosetto, M., Cox, F., Hyland, J. M., Sheahan, K. D., O’Donoghue, D. P., Mulcahy, H. E., Ryan, E. J., and O’Sullivan, J. N. (2011). Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PloS one*, 6(11):e27944.
- Mierke, C. T. (2008). Role of the Endothelium during Tumor Cell Metastasis: Is the

- Endothelium a Barrier or a Promoter for Cell Invasion and Metastasis? *Journal of Biophysics*, 2008:1–13.
- Millrud, C. R., Bergenfelz, C., and Leandersson, K. (2016). On the origin of myeloid-derived suppressor cells. *Oncotarget*, 8(2):3649–3665.
- Milstone, D. S., Fukumura, D., Padgett, R. C., O'Donnell, P. E., Davis, V. M., Benavidez, O. J., Monsky, W. L., Melder, R. J., Jain, R. K., and Gimbrone, M. A. (1998). Mice lacking E-selectin show normal numbers of rolling leukocytes but reduced leukocyte stable arrest on cytokine-activated microvascular endothelium. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)*, 5(2-3):153–71.
- Mirza, N., Fishman, M., Fricke, I., Dunn, M., Neuger, A. M., Frost, T. J., Lush, R. M., Antonia, S., and Gabrilovich, D. I. (2006). All-trans -Retinoic Acid Improves Differentiation of Myeloid Cells and Immune Response in Cancer Patients. *Cancer Research*, 66(18):9299–9307.
- Mishalian, I., Bayuh, R., Eruslanov, E., Michaeli, J., Levy, L., Zolotarov, L., Singhal, S., Albelda, S. M., Granot, Z., and 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.
- Mitroulis, I., Alexaki, V. I., Kourtzelis, I., Ziogas, A., Hajishengallis, G., and Chavakis, T. (2015). Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacology & therapeutics*, 147(1):123–135.
- Miyake, M., Lawton, A., Goodison, S., Urquidi, V., and Rosser, C. J. (2014). Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) protein expression is increased in high-grade prostate cancer. *Pathology - Research and Practice*, 210(2):74–78.
- Miyasaka, M. (1998). Selectins (CD62-E/L/P). In Delves, P. J., editor, *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*, pages 2158–2161. Elsevier, Oxford, second edi edition.
- Mortaz, E., Alipoor, S. D., Adcock, I. M., Mumby, S., and Koenderman, L. (2018).

- Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Frontiers in immunology*, 9(OCT):2171.
- Movahedi, K., Guilliams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J. A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*, 111(8):4233–44.
- Mukaida, N., Sasaki, S.-i., and Baba, T. (2020). Two-Faced Roles of Tumor-Associated Neutrophils in Cancer Development and Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10):3457.
- Muller, W. A. (2002). Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response. *Laboratory Investigation*, 82(5):521–534.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B., and Lewis, C. E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 8(8):618–631.
- Nagaraaj, S. and Gabrilovich, D. I. (2007). Myeloid-derived suppressor cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 601(1):213–223.
- Nagle, R. B., Hao, J., Knox, J. D., Dalkin, B. L., Clark, V., and Cress, A. E. (1995). Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue. *American Journal of Pathology*, 146(6):1498–1507.
- Nahidiazar, L., Kreft, M., van den Broek, B., Secades, P., Manders, E. M. M., Sonnenberg, A., and Jalink, K. (2015). The molecular architecture of hemidesmosomes, as revealed with super-resolution microscopy. *Journal of cell science*, 128(20):3714–9.
- Nakahara, T., Oba, J., Shimomura, C., Kido-Nakahara, M., and Furue, M. (2016). Early tumor-infiltrating dendritic cells change their characteristics drastically in association with murine melanoma progression. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(1):146–153.

- Nefedova, Y., Fishman, M., Sherman, S., Wang, X., Beg, A. A., and Gabrilovich, D. I. (2007). Mechanism of All- Trans Retinoic Acid Effect on Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research*, 67(22):11021–11028.
- Negus, R. P., Stamp, G. W., Hadley, J., and Balkwill, F. R. (1997). Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines. *American Journal of Pathology*, 150(5):1723–1734.
- Negus, R. P., Stamp, G. W., Relf, M. G., Burke, F., Malik, S. T., Bernasconi, S., Allavena, P., Sozzani, S., Mantovani, A., and Balkwill, F. R. (1995). The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *The Journal of clinical investigation*, 95(5):2391–6.
- Neophytou, C. M., Pierides, C., Christodoulou, M.-I., Costeas, P., Kyriakou, T.-C., and Papageorgis, P. (2020). The Role of Tumor-Associated Myeloid Cells in Modulating Cancer Therapy. *Frontiers in oncology*, 10(June):899.
- Niwa, Y., Akamatsu, H., Niwa, H., Sumi, H., Ozaki, Y., and Abe, A. (2001). Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(2):285–9.
- Nolte, D., Schmid, P., Jäger, U., Botzlar, A., Roesken, F., Hecht, R., Uhl, E., Messmer, K., and Vestweber, D. (1994). Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *The American journal of physiology*, 267(4 Pt 2):H1637–42.
- Noy, R. and Pollard, J. W. (2014). Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity*, 41(1):49–61.
- Obermajer, N., Muthuswamy, R., Odunsi, K., Edwards, R. P., and Kalinski, P. (2011). PGE 2 -Induced CXCL12 Production and CXCR4 Expression Controls the Accumulation of Human MDSCs in Ovarian Cancer Environment. *Cancer Research*, 71(24):7463–7470.

- Ohm, J. E. and Carbone, D. P. (2001). VEGF as a Mediator of Tumor-Associated Immunodeficiency. *Immunologic Research*, 23(2-3):263–272.
- Okła, K., Czerwonka, A., Wawruszak, A., Bobiński, M., Bilska, M., Tarkowski, R., Bednarek, W., Wertel, I., and Kotarski, J. (2019). Clinical Relevance and Immunosuppressive Pattern of Circulating and Infiltrating Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) in Epithelial Ovarian Cancer. *Frontiers in immunology*, 10(APR):691.
- Pan, J. and McEver, R. (1993). Characterization of the promoter for the human P-selectin gene. *Journal of Biological Chemistry*, 268(30):22600–22608.
- Pan, J., Xia, L., and McEver, R. P. (1998). Comparison of promoters for the murine and human P-selectin genes suggests species-specific and conserved mechanisms for transcriptional regulation in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16):10058–10067.
- Pan, Y., Yu, Y., Wang, X., and Zhang, T. (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in immunology*, 11(December):583084.
- Panni, R. Z., Linehan, D. C., and Denardo, D. G. (2013). Targeting tumor-infiltrating macrophages to combat cancer. *Immunotherapy*, 5(10):1075–1087.
- Patel, K. D., Cuvelier, S. L., and Wiehler, S. (2002). Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment. *Seminars in immunology*, 14(2):73–81.
- Patten, D. A. and Shetty, S. (2018). More Than Just a Removal Service: Scavenger Receptors in Leukocyte Trafficking. *Frontiers in immunology*, 9(November):2904.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B. A., Callahan, M. K., Yuan, J., Martins, V. R., Skog, J., Kaplan, R. N., Brady, M. S., Wolchok, J. D., Chapman, P. B., Kang, Y., Bromberg, J., and Lyden, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature medicine*, 18(6):883–91.

- Pendl, G. G., Robert, C., Steinert, M., Thanos, R., Eytner, R., Borges, E., Wild, M. K., Lowe, J. B., Fuhlbrigge, R. C., Kupper, T. S., Vestweber, D., and Grabbe, S. (2002). Immature mouse dendritic cells enter inflamed tissue, a process that requires E- and P-selectin, but not P-selectin glycoprotein ligand 1. *Blood*, 99(3):946–956.
- Peng, D., Tanikawa, T., Li, W., Zhao, L., Vatan, L., Szeliga, W., Wan, S., Wei, S., Wang, Y., Liu, Y., Staroslawska, E., Szubstarski, F., Rolinski, J., Grywalska, E., Stanisławek, A., Polkowski, W., Kurylcio, A., Kleer, C., Chang, A. E., Wicha, M., Sabel, M., Zou, W., and Kryczek, I. (2016). Myeloid-derived suppressor cells endow stem-like qualities to breast cancer cells through IL6/STAT3 and NO/NOTCH cross-talk signaling. *Cancer Research*, 76(11):3156–3165.
- Perdiguero, E. G., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., De Bruijn, M., Geissmann, F., and Rodewald, H.-R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Experimental Hematology*, 43(9):S64.
- Pillay, J., Tak, T., Kamp, V. M., and Koenderman, L. (2013). Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(20):3813–27.
- Pollard, J. W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews. Cancer*, 4(1):71–8.
- Porembka, M. R., Mitchem, J. B., Belt, B. A., Hsieh, C. S., Lee, H. M., Herndon, J., Gillanders, W. E., Linehan, D. C., and Goedegebuure, P. (2012). Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(9):1373–1385.
- Powell, D. R. and Huttenlocher, A. (2016). Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends in immunology*, 37(1):41–52.
- Pulkkinen, L., Rouan, F., Bruckner-Tuderman, L., Wallerstein, R., Garzon, M., Brown, T., Smith, L., Carter, W., and Uitto, J. (1998). Novel ITGB4 Mutations in Lethal

- and Nonlethal Variants of Epidermolysis Bullosa with Pyloric Atresia: Missense versus Nonsense. *The American Journal of Human Genetics*, 63(5):1376–1387.
- Qian, B.-Z. and Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1):39–51.
- Redente, E. F., Dwyer-Nield, L. D., Merrick, D. T., Raina, K., Agarwal, R., Pao, W., Rice, P. L., Shroyer, K. R., and Malkinson, A. M. (2010). Tumor progression stage and anatomical site regulate tumor-associated macrophage and bone marrow-derived monocyte polarization. *The American journal of pathology*, 176(6):2972–85.
- Ribechini, E., Greifengberg, V., Sandwick, S., and Lutz, M. B. (2010). Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Medical Microbiology and Immunology*, 199(3):273–281.
- Robinson, S. D., Frenette, P. S., Rayburn, H., Cumiskey, M., Ullman-Culleré, M., Wagner, D. D., and Hynes, R. O. (1999). Multiple, targeted deficiencies in selectins reveal a predominant role for P-selectin in leukocyte recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20):11452–7.
- Rodríguez, P. C. and Ochoa, A. C. (2008). Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological reviews*, 222:180–91.
- Rose, S., Misharin, A., and Perlman, H. (2012). A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 81(4):343–50.
- Rosen, S. D. and Bertozzi, C. R. (1994). The selectins and their ligands. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(5):663–673.
- Rossi, B. and Constantin, G. (2008). Anti-Selectin Therapy for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, 7(2):85–93.

- Rousselle, P. and Scoazec, J. Y. (2020). Laminin 332 in cancer: When the extracellular matrix turns signals from cell anchorage to cell movement. *Seminars in cancer biology*, 62(October 2019):149–165.
- Santegoets, S. J. A. M., de Groot, A. F., Dijkgraaf, E. M., Simões, A. M. C., van der Noord, V. E., van Ham, J. J., Welters, M. J. P., Kroep, J. R., and van der Burg, S. H. (2018). The blood mMDSC to DC ratio is a sensitive and easy to assess independent predictive factor for epithelial ovarian cancer survival. *OncoImmunology*, 7(8):e1465166.
- Sawanobori, Y., Ueha, S., Kurachi, M., Shimaoka, T., Talmadge, J. E., Abe, J., Shono, Y., Kitabatake, M., Kakimi, K., Mukaida, N., and Matsushima, K. (2008). Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood*, 111(12):5457–66.
- Schetler, D. (2019). *Bedeutung von Integrin $\beta 4$ und E- / P-Selektin für das Tumorstadium im Prostatakarzinom-Xenograftmodell*. PhD thesis, Universität Hamburg.
- Schlecker, E., Stojanovic, A., Eisen, C., Quack, C., Falk, C. S., Umansky, V., and Cerwenka, A. (2012). Tumor-Infiltrating Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth. *The Journal of Immunology*, 189(12):5602–5611.
- Schmid, M. C. and Varner, J. A. (2010). Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *Journal of oncology*, 2010:201026.
- Schmidt, E. P., Kuebler, W. M., Lee, W. L., and Downey, G. P. (2016). Adhesion molecules: Master controllers of the circulatory system. *Comprehensive Physiology*, 6(2):945–973.
- Schultze, J. L., Mass, E., and Schlitzer, A. (2019). Emerging Principles in Myelopoiesis at Homeostasis and during Infection and Inflammation. *Immunity*, 50(2):288–301.

- Schwankhaus, N., Gathmann, C., Wicklein, D., Riecken, K., Schumacher, U., and Valentin, U. (2014). Cell adhesion molecules in metastatic neuroblastoma models. *Clinical & experimental metastasis*, 31(4):483–96.
- Schweitzer, K. M., Dräger, A. M., Van Der Valk, P., Thijsen, S. F., Zevenbergen, A., Theijssmeijer, A. P., Van Der Schoot, C. E., and Langenhuijsen, M. M. (1996). Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *American Journal of Pathology*, 148(1):165–175.
- Seager, R. J., Hajal, C., Spill, F., Kamm, R. D., and Zaman, M. H. (2017). Dynamic interplay between tumour, stroma and immune system can drive or prevent tumour progression. *Convergent Science Physical Oncology*, 3(3):034002.
- Serafini, P., Meckel, K., Kelso, M., Noonan, K., Califano, J., Koch, W., Dolcetti, L., Bronte, V., and Borrello, I. (2006). Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *The Journal of experimental medicine*, 203(12):2691–702.
- Serbina, N. V. and Pamer, E. G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology*, 7(3):311–7.
- Sharma, S., Srivastava, Zhu, Harris-White, Huang, St John, Salgia, R., Lee, Cameron, Strieter, and Dubinett, S. (2012). Targeting myeloid-derived suppressor cells augments antitumor activity against lung cancer. *ImmunoTargets and Therapy*, page 7.
- Shaul, M. E. and Fridlender, Z. G. (2019). Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(10):601–620.
- Shen, M., Hu, P., Donskov, F., Wang, G., Liu, Q., and Du, J. (2014). Tumor-Associated Neutrophils as a New Prognostic Factor in Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 9(6):e98259.
- Shi, H., Han, X., Sun, Y., Shang, C., Wei, M., Ba, X., and Zeng, X. (2018). Chemokine

- (C-X-C motif) ligand 1 and CXCL2 produced by tumor promote the generation of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Cancer science*, 109(12):3826–3839.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A. M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 68(5):855–867.
- Shreedhar, V., Moodycliffe, A. M., Ullrich, S. E., Bucana, C., Kripke, M. L., and Flores-Romo, L. (1999). Dendritic cells require T cells for functional maturation in vivo. *Immunity*, 11(5):625–36.
- Shurin, M. R. and Lotze, M. T. (2009). Dendritic Cells in Cancer: Emergence of the Discipline. In Salter, R. D. and Shurin, M. R., editors, *Dendritic Cells in Cancer*, chapter 2. Springer US, New York, NY, 1 edition.
- Sica, A., Guarneri, V., and Gennari, A. (2019). Myelopoiesis, metabolism and therapy: A crucial crossroads in cancer progression. *Cell Stress*, 3(9):284–294.
- Silasi, D. A., Alvero, A. B., Illuzzi, J., Kelly, M., Chen, R., Fu, H. H., Schwartz, P., Rutherford, T., Azodi, M., and Mor, G. (2006). MyD88 predicts chemoresistance to paclitaxel in epithelial ovarian cancer. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 79(3-4):153–163.
- Simons, B. and Brayton, C. (2017). Challenges and Limitations of Mouse Xenograft Models of Cancer. In *Patient Derived Tumor Xenograft Models*, pages 25–36. Elsevier.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1):76–85.
- Somers, W. S., Shaw, G. D., and Camphausen, R. T. (2001). Insights into the Molecular Basis of Leukocyte Tethering and Rolling Revealed by Structures of P- and E-Selectin Bound to SLeX and PSGL-1. *Cell*, 105(7):971.

- Sonnenberg, A., Calafat, J., Janssen, H., Daams, H., van der Raaij-Helmer, L. M., Falcioni, R., Kennel, S. J., Aplin, J. D., Baker, J., and Loizidou, M. (1991). Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *Journal of Cell Biology*, 113(4):907–917.
- Srivastava, M. K., Zhu, L., Harris-White, M., Kar, U., Huang, M., Johnson, M. F., Lee, J. M., Elashoff, D., Strieter, R., Dubinett, S., and Sharma, S. (2012). Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PLoS ONE*, 7(7).
- Starzonek, S., Maar, H., Labitzky, V., Wicklein, D., Rossdam, C., Buettner, F. F. R., Wolters-Eisfeld, G., Guengoer, C., Wagener, C., Schumacher, U., and Lange, T. (2020). Systematic analysis of the human tumor cell binding to human vs. murine E- and P-selectin under static vs. dynamic conditions. *Glycobiology*, 30(9):695–709.
- Stein, J. V., Cheng, G., Stockton, B. M., Fors, B. P., Butcher, E. C., and von Andrian, U. H. (1999). L-selectin-mediated Leukocyte Adhesion In Vivo: Microvillous Distribution Determines Tethering Efficiency, But Not Rolling Velocity. *Journal of Experimental Medicine*, 189(1):37–50.
- Stenberg, P. E., McEver, R. P., Shuman, M. A., Jacques, Y. V., and Bainton, D. F. (1985). A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *Journal of Cell Biology*, 101(3):880–886.
- Stewart, R. L. and O’Connor, K. L. (2015). Clinical significance of the integrin $\alpha 6\beta 4$ in human malignancies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 95(9):976–986.
- Stone, J. P. and Wagner, D. D. (1993). P-selectin mediates adhesion of platelets to neuroblastoma and small cell lung cancer. *The Journal of clinical investigation*, 92(2):804–13.
- Strell, C. and Entschladen, F. (2008). Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Communication and Signaling*, 6(1):10.
- Stromnes, I. M., Brockenbrough, J. S., Izeradjene, K., Carlson, M. A., Cuevas, C., Simmons, R. M., Greenberg, P. D., and Hingorani, S. R. (2014). Targeted depletion of an

- MDSC subset unmasks pancreatic ductal adenocarcinoma to adaptive immunity. *Gut*, 63(11):1769–81.
- Stübke, K., Wicklein, D., Herich, L., Schumacher, U., and Nehmann, N. (2012). Selectin-deficiency reduces the number of spontaneous metastases in a xenograft model of human breast cancer. *Cancer Letters*, 321(1):89–99.
- Sun, Y., Yang, S., Sun, N., and Chen, J. (2014). Differential expression of STAT1 and p21 proteins predicts pancreatic cancer progression and prognosis. *Pancreas*, 43(4):619–23.
- Sundd, P., Pospieszalska, M. K., Cheung, L. S.-L., Konstantopoulos, K., and Ley, K. (2011). Biomechanics of leukocyte rolling. *Biorheology*, 48(1):1–35.
- Sung, J. S., Kang, C. W., Kang, S., Jang, Y., Chae, Y. C., Kim, B. G., and Cho, N. H. (2020). ITGB4-mediated metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts. *Oncogene*, 39(3):664–676.
- Swann, J. B. and Smyth, M. J. (2007). Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation*, 117(5):1137–46.
- Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007). The integrins. *Genome Biology*, 8(5).
- Taki, M., Abiko, K., Baba, T., Hamanishi, J., Yamaguchi, K., Murakami, R., Yamanoi, K., Horikawa, N., Hosoe, Y., Nakamura, E., Sugiyama, A., Mandai, M., Konishi, I., and Matsumura, N. (2018). Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation. *Nature communications*, 9(1):1685.
- Takizawa, Y., Shimizu, H., Nishikawa, T., Hatta, N., Pulkkinen, L., and Uitto, J. (1997). Novel ITGB4 Mutations in a Patient with Junctional Epidermolysis Bullosa-Pyloric Atresia Syndrome and Altered Basement Membrane Zone Immunofluorescence for the $\alpha 6\beta 4$ Integrin. *Journal of Investigative Dermatology*, 108(6):943–946.
- Tamura, R., Tanaka, T., Akasaki, Y., Murayama, Y., Yoshida, K., and Sasaki, H. (2019). The role of vascular endothelial growth factor in the hypoxic and immunosuppressive

- tumor microenvironment: perspectives for therapeutic implications. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 37(1):2.
- Tazawa, H., Okada, F., Kobayashi, T., Tada, M., Mori, Y., Une, Y., Sendo, F., Kobayashi, M., and Hosokawa, M. (2003). Infiltration of neutrophils is required for acquisition of metastatic phenotype of benign murine fibrosarcoma cells: implication of inflammation-associated carcinogenesis and tumor progression. *The American journal of pathology*, 163(6):2221–32.
- Tazzyman, S., Niaz, H., and Murdoch, C. (2013). Neutrophil-mediated tumour angiogenesis: subversion of immune responses to promote tumour growth. *Seminars in cancer biology*, 23(3):149–58.
- Tcyganov, E., Mastio, J., Chen, E., and Gabrilovich, D. I. (2018). Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Current Opinion in Immunology*, 51:76–82.
- Tesi, R. J. (2019). MDSC; the Most Important Cell You Have Never Heard Of. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(1):4–7.
- Thorsson, V., Gibbs, D. L., Brown, S. D., Wolf, D., Bortone, D. S., Ou Yang, T.-H., Porta-Pardo, E., Gao, G. F., Plaisier, C. L., Eddy, J. A., Ziv, E., Culhane, A. C., Paull, E. O., Sivakumar, I. K. A., Gentles, A. J., Malhotra, R., Farshidfar, F., Colaprico, A., Parker, J. S., Mose, L. E., Vo, N. S., Liu, J., Liu, Y., Rader, J., Dhankani, V., Reynolds, S. M., Bowlby, R., Califano, A., Cherniack, A. D., Anastassiou, D., Bedognetti, D., Mokrab, Y., Newman, A. M., Rao, A., Chen, K., Krasnitz, A., Hu, H., Malta, T. M., Noushmehr, H., Pedamallu, C. S., Bullman, S., Ojesina, A. I., Lamb, A., Zhou, W., Shen, H., Choueiri, T. K., Weinstein, J. N., Guinney, J., Saltz, J., Holt, R. A., Rabkin, C. S., Cancer Genome Atlas Research Network, Lazar, A. J., Serody, J. S., Demicco, E. G., Disis, M. L., Vincent, B. G., and Shmulevich, I. (2018). The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*, 48(4):812–830.e14.
- Toh, B., Toh, B., Abastado, J.-P., and Abastado, J.-P. (2012). Myeloid cells. *OncoImmunology*, 1(8):1360–1367.

- Trovato, R., Fiore, A., Sartori, S., Canè, S., Giugno, R., Cascione, L., Paiella, S., Salvia, R., De Sanctis, F., Poffe, O., Anselmi, C., Hofer, F., Sartoris, S., Piro, G., Carbone, C., Corbo, V., Lawlor, R., Solito, S., Pinton, L., Mandruzzato, S., Bassi, C., Scarpa, A., Bronte, V., and Ugel, S. (2019). Immunosuppression by monocytic myeloid-derived suppressor cells in patients with pancreatic ductal carcinoma is orchestrated by STAT3. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7(1):255.
- Tyagi, A., Yeganeh, O., Levin, Y., Hooker, J. C., Hamilton, G. C., Wolfson, T., Gamst, A., Zand, A. K., Heba, E., Loomba, R., Schwimmer, J., Middleton, M. S., and Sirlin, C. B. (2015). Intra- and inter-examination repeatability of magnetic resonance spectroscopy, magnitude-based MRI, and complex-based MRI for estimation of hepatic proton density fat fraction in overweight and obese children and adults. *Abdominal imaging*, 40(8):3070–7.
- Tymoszuk, P., Charoentong, P., Hackl, H., Spilka, R., Müller-Holzner, E., Trajanoski, Z., Obrist, P., Revillion, F., Peyrat, J.-P., Fiegl, H., and Doppler, W. (2014). High STAT1 mRNA levels but not its tyrosine phosphorylation are associated with macrophage infiltration and bad prognosis in breast cancer. *BMC cancer*, 14(1):257.
- Ueda, Y., Kondo, M., and Kelsoe, G. (2005). Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *The Journal of experimental medicine*, 201(11):1771–1780.
- Umansky, V., Blattner, C., Gebhardt, C., and Utikal, J. (2016). The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. *Vaccines*, 4(4):36.
- Valenti, R., Huber, V., Filipazzi, P., Pilla, L., Sovena, G., Villa, A., Corbelli, A., Fais, S., Parmiani, G., and Rivoltini, L. (2006). Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor- β -mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Research*, 66(18):9290–9298.
- Van der Flier, A. and Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell and Tissue Research*, 305(3):285–298.

- Van Dyken, S. J. and Locksley, R. M. (2013). Interleukin-4- and Interleukin-13-Mediated Alternatively Activated Macrophages: Roles in Homeostasis and Disease. *Annual Review of Immunology*, 31(1):317–343.
- Van Valckenborgh, E., Schoupe, E., Movahedi, K., De Bruyne, E., Menu, E., De Baetselier, P., Vanderkerken, K., and Van Ginderachter, J. A. (2012). Multiple myeloma induces the immunosuppressive capacity of distinct myeloid-derived suppressor cell subpopulations in the bone marrow. *Leukemia*, 26(11):2424–8.
- Vanhaver, C., van der Bruggen, P., and Bruger, A. M. (2021). MDSC in Mice and Men: Mechanisms of Immunosuppression in Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 10(13):2872.
- Varki, A. (1994). Selectin ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16):7390–7397.
- Vasquez-Dunddel, D., Pan, F., Zeng, Q., Gorbounov, M., Albesiano, E., Fu, J., Blosser, R. L., Tam, A. J., Bruno, T., Zhang, H., Pardoll, D., and Kim, Y. (2013). STAT3 regulates arginase-i in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *Journal of Clinical Investigation*, 123(4):1580–1589.
- Veglia, F., Perego, M., and Gabrilovich, D. (2019). Myeloid derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology*, 19(2):108–119.
- Veglia, F., Sanseviero, E., and Gabrilovich, D. I. (2021a). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nature Reviews Immunology*.
- Veglia, F., Sanseviero, E., and Gabrilovich, D. I. (2021b). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nature Reviews Immunology*.
- Velten, L., Haas, S. F., Raffel, S., Blaszkiewicz, S., Islam, S., Hennig, B. P., Hirche, C., Lutz, C., Buss, E. C., Nowak, D., Boch, T., Hofmann, W.-K., Ho, A. D., Huber, W., Trumpp, A., Essers, M. A. G., and Steinmetz, L. M. (2017). Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nature Cell Biology*, 19(4):271–281.

- Vetsika, E.-k., Koukos, A., and Kotsakis, A. (2019). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Major Figures that Shape the Immunosuppressive and Angiogenic Network in Cancer. *Cells*, 8(12).
- Vicente-Manzanares, M. and Sánchez-Madrid, F. (2018). Targeting the integrin interactome in human disease. *Current opinion in cell biology*, 55:17–23.
- Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rébé, C., and Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer research*, 70(8):3052–61.
- Walko, G., Castañón, M. J., and Wiche, G. (2015). Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell and tissue research*, 360(3):529–44.
- Walsh, C. M., Matloubian, M., Liu, C. C., Ueda, R., Kurahara, C. G., Christensen, J. L., Huang, M. T., Young, J. D., Ahmed, R., and Clark, W. R. (1994). Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23):10854–10858.
- Wang, S.-W., Liu, S.-C., Sun, H.-L., Huang, T.-Y., Chan, C.-H., Yang, C.-Y., Yeh, H.-I., Huang, Y.-L., Chou, W.-Y., Lin, Y.-M., and Tang, C.-H. (2015). CCL5/CCR5 axis induces vascular endothelial growth factor-mediated tumor angiogenesis in human osteosarcoma microenvironment. *Carcinogenesis*, 36(1):104–14.
- Wang, Y., Ding, Y., Guo, N., and Wang, S. (2019a). MDSCs: Key criminals of tumor pre-metastatic niche formation. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB):1–16.
- Wang, Y., Yin, K., Tian, J., Xia, X., Ma, J., Tang, X., Xu, H., and Wang, S. (2019b). Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote the Stemness of Colorectal Cancer Cells through Exosomal S100A9. *Advanced Science*, 6(18).
- Wang, Y., Zhang, X., Yang, L., Xue, J., and Hu, G. (2018). Blockade of CCL2 enhances immunotherapeutic effect of anti-PD1 in lung cancer. *Journal of Bone Oncology*, 11(126):27–32.

- Wculek, S. K., Cueto, F. J., Mujal, A. M., Melero, I., Krummel, M. F., and Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 20(1):7–24.
- Weiskopf, K., Schnorr, P. J., Pang, W. W., Chao, M. P., Chhabra, A., Seita, J., Feng, M., and Weissman, I. L. (2016). Myeloid Cell Origins, Differentiation, and Clinical Implications. *Microbiology spectrum*, 4(5).
- Weller, A., Isenmann, S., and Vestweber, D. (1992). Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21):15176–15183.
- Wen, J., Huang, G., Liu, S., Wan, J., Wang, X., Zhu, Y., Kaliney, W., Zhang, C., Cheng, L., Wen, X., and Lu, X. (2020). Polymorphonuclear MDSCs are enriched in the stroma and expanded in metastases of prostate cancer. *The journal of pathology. Clinical research*, 6(3):171–177.
- Werner, M. E., Chen, F., Moyano, J. V., Yehiely, F., Jones, J. C. R., and Cryns, V. L. (2007). Caspase proteolysis of the integrin beta4 subunit disrupts hemidesmosome assembly, promotes apoptosis, and inhibits cell migration. *The Journal of biological chemistry*, 282(8):5560–9.
- Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27(45):5904–12.
- Wicklein, D., Schmidt, A., Labitzky, V., Ullrich, S., Valent, P., and Schumacher, U. (2013). E- and p-selectins are essential for repopulation of chronic myelogenous and chronic eosinophilic leukemias in a scid mouse xenograft model. *PloS one*, 8(7):e70139.
- Widschwendter, A., Tonko-Geymayer, S., Welte, T., Daxenbichler, G., Marth, C., and Doppler, W. (2002). Prognostic significance of signal transducer and activator of transcription 1 activation in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8(10):3065–74.

- Wightman, S. C., Uppal, A., Pitroda, S. P., Ganai, S., Burnette, B., Stack, M., Oshima, G., Khan, S., Huang, X., Posner, M. C., Weichselbaum, R. R., and Khodarev, N. N. (2015). Oncogenic CXCL10 signalling drives metastasis development and poor clinical outcome. *British journal of cancer*, 113(2):327–35.
- Wilhelmsen, K., Litjens, S. H. M., Kuikman, I., Margadant, C., van Rheenen, J., and Sonnenberg, A. (2007). Serine phosphorylation of the integrin beta4 subunit is necessary for epidermal growth factor receptor induced hemidesmosome disruption. *Molecular biology of the cell*, 18(9):3512–22.
- Wilhelmsen, K., Litjens, S. H. M., and Sonnenberg, A. (2006). Multiple functions of the integrin alpha6beta4 in epidermal homeostasis and tumorigenesis. *Molecular and cellular biology*, 26(8):2877–86.
- Winkler, I. G., Barbier, V., Nowlan, B., Jacobsen, R. N., Forristal, C. E., Patton, J. T., Magnani, J. L., and Lévesque, J.-P. (2012). Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nature medicine*, 18(11):1651–7.
- Wu, A., Zhang, S., Liu, J., Huang, Y., Deng, W., Shu, G., and Yin, G. (2020a). Integrated Analysis of Prognostic and Immune Associated Integrin Family in Ovarian Cancer. *Frontiers in Genetics*, 11(July):1–25.
- Wu, C., Hua, Q., and Zheng, L. (2020b). Generation of Myeloid Cells in Cancer: The Spleen Matters. *Frontiers in Immunology*, 11(June):1–13.
- Wu, J., Wu, H., An, J., Ballantyne, C. M., and Cyster, J. G. (2018). Critical role of integrin CD11c in splenic dendritic cell capture of missing-self CD47 cells to induce adaptive immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(26):6786–6791.
- Wu, L., Deng, Z., Peng, Y., Han, L., Liu, J., Wang, L., Li, B., Zhao, J., Jiao, S., and Wei, H. (2017). Ascites-derived IL-6 and IL-10 synergistically expand CD14+HLA-DR-/low

- myeloid-derived suppressor cells in ovarian cancer patients. *Oncotarget*, 8(44):76843–76856.
- Wylie, B., Macri, C., Mintern, J. D., and Waithman, J. (2019). Dendritic Cells and Cancer: From Biology to Therapeutic Intervention. *Cancers*, 11(4):521.
- Xiang, X., Wang, J., Lu, D., and Xu, X. (2021). Targeting tumor-associated macrophages to synergize tumor immunotherapy. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1):75.
- Xu, C., Sui, S., Shang, Y., Yu, Z., Han, J., Zhang, G., Ntim, M., Hu, M., Gong, P., Chen, H., and Zhang, X. (2020). The landscape of immune cell infiltration and its clinical implications of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Advanced Research*, 24:139–148.
- Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., De Nardo, D., Gohel, T. D., Emde, M., Schmidleithner, L., Ganesan, H., Nino-Castro, A., Mallmann, M. R., Labzin, L., Theis, H., Kraut, M., Beyer, M., Latz, E., Freeman, T. C., Ulas, T., and Schultze, J. L. (2014). Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*, 40(2):274–88.
- Yago, T., Shao, B., Miner, J. J., Yao, L., Klopocki, A. G., Maeda, K., Coggeshall, K. M., and McEver, R. P. (2010). E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin alphaLbeta2-mediated slow leukocyte rolling. *Blood*, 116(3):485–94.
- Yang, H., Zhang, Q., Xu, M., Wang, L., Chen, X., Feng, Y., Li, Y., Zhang, X., Cui, W., and Jia, X. (2020). CCL2-CCR2 axis recruits tumor associated macrophages to induce immune evasion through PD-1 signaling in esophageal carcinogenesis. *Molecular cancer*, 19(1):41.
- Yang, J., Yan, J., and Liu, B. (2018). Targeting VEGF/VEGFR to Modulate Antitumor Immunity. *Frontiers in immunology*, 9(MAY):978.
- Yoshioka, T., Otero, J., Chen, Y., Kim, Y. M., Koutcher, J. A., Satagopan, J., Reuter, V., Carver, B., De Stanchina, E., Enomoto, K., Greenberg, N. M., Scardino, P. T.,

- Scher, H. I., Sawyers, C. L., and Giancotti, F. G. (2013). $\beta 4$ Integrin signaling induces expansion of prostate tumor progenitors. *Journal of Clinical Investigation*, 123(2):682–699.
- Youn, J.-I., Collazo, M., Shalova, I. N., Biswas, S. K., and Gabrilovich, D. I. (2012). Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of leukocyte biology*, 91(1):167–81.
- Young, M. R., Newby, M., and Wepsic, H. T. (1987). Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research*, 47(1):100–105.
- Yu, J., Du, W., Yan, F., Wang, Y., Li, H., Cao, S., Yu, W., Shen, C., Liu, J., and Ren, X. (2013). Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(7):3783–97.
- Yu, S., Wang, Y., Hou, J., Li, W., Wang, X., Xiang, L., Tan, D., Wang, W., Jiang, L., Claret, F. X., Jiao, M., and Guo, H. (2020). Tumor-infiltrating immune cells in hepatocellular carcinoma: Tregs is correlated with poor overall survival. *PloS one*, 15(4):e0231003.
- Yuri, P., Shigemura, K., Kitagawa, K., Hadibrata, E., Risan, M., Zulfiqqar, A., Soeroharjo, I., Hendri, A. Z., Danarto, R., Ishii, A., Yamasaki, S., Yan, Y., Heriyanto, D. S., and Fujisawa, M. (2020). Increased tumor-associated macrophages in the prostate cancer microenvironment predicted patients' survival and responses to androgen deprivation therapies in Indonesian patients cohort. *Prostate International*, 8(2):62–69.
- Zhang, Q.-w., Liu, L., Gong, C.-y., Shi, H.-s., Zeng, Y.-h., Wang, X.-z., Zhao, Y.-w., and Wei, Y.-q. (2012). Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PloS one*, 7(12):e50946.
- Zhang, Y. and Liu, Z. (2017). STAT1 in cancer: friend or foe? *Discovery medicine*, 24(130):19–29.

- Zhao, F., Obermann, S., Von Wasielewski, R., Haile, L., Manns, M. P., Korangy, F., and Greten, T. F. (2009). Increase in frequency of myeloid-derived suppressor cells in mice with spontaneous pancreatic carcinoma. *Immunology*, 128(1):141–149.
- Zhao, Q., Kim, T., Pang, J., Sun, W., Yang, X., Wang, J., Song, Y., Zhang, H., Sun, H., Rangan, V., Deshpande, S., Tang, H., Cvijic, M. E., Westhouse, R., Olah, T., Xie, J., Struthers, M., and Salter-Cid, L. (2017). A novel function of CXCL10 in mediating monocyte production of proinflammatory cytokines. *Journal of leukocyte biology*, 102(5):1271–1280.
- Zhao, Y., Wu, T., Shao, S., Shi, B., and Zhao, Y. (2016). Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells. *OncoImmunology*, 5(2):1–12.
- Zhou, J., Nefedova, Y., Lei, A., and Gabrilovich, D. (2018). Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells. *Seminars in Immunology*, 35:19–28.
- Zhou, Y., Yoshida, S., Kubo, Y., Yoshimura, T., Kobayashi, Y., Nakama, T., Yamaguchi, M., Ishikawa, K., Oshima, Y., and Ishibashi, T. (2017). Different distributions of M1 and M2 macrophages in a mouse model of laser-induced choroidal neovascularization. *Molecular medicine reports*, 15(6):3949–3956.
- Zhu, Y., Herndon, J. M., Sojka, D. K., Kim, K.-W., Knolhoff, B. L., Zuo, C., Cullinan, D. R., Luo, J., Bearden, A. R., Lavine, K. J., Yokoyama, W. M., Hawkins, W. G., Fields, R. C., Randolph, G. J., and DeNardo, D. G. (2017). Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity*, 47(2):323–338.e6.
- Zipin-Roitman, A., Meshel, T., Sagi-Assif, O., Shalmon, B., Avivi, C., Pfeffer, R. M., Witz, I. P., and Ben-Baruch, A. (2007). CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells. *Cancer research*, 67(7):3396–405.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Illustration der Integrin-Heterodimere und deren Subfamilien	5
1.2	Die Leukozytenadhäsionskaskade	10
1.3	Ontogenese myeloider Suppressorzellen (MDSCs)	16
3.1	Schematischer Ablauf des Kolonienformations- <i>assay</i>	46
3.2	Schematischer Ablauf des 3D Invasion- <i>assay</i>	48
3.3	Schematischer Aufbau <i>semi-dry</i> Western Blot Transfer	50
4.1	Kaplan-Meier-Überlebenskurven	60
4.2	Analyse der dreidimensionalen Kolonieformation von Tumorzellen in Softagar	62
4.3	Durchflusszytometrische Detektion apoptotischer Tumorzellen <i>in vitro</i> . . .	64
4.4	Immunhistologische Analyse CD45 ⁺ Leukozyten in frühen Xenograft-Tumoren	66
4.5	Konditioniertes Medium von ITGB4-depletierten Tumorzellen attrahiert verstärkt humane Makrophagen im 3D Invasions-Modell	67
4.6	Quantifizierung von VEGF und GM-CSF in konditionierten Zellkulturme- dien von Tumorzellen	69
4.7	Quantifizierung von CXCL1 und CXCL2 in konditionierten Zellkulturme- dien von Tumorzellen	70
4.8	Quantifizierung von CCL2 und CCL5 in konditionierten Zellkulturmedien von Tumorzellen	71
4.9	Quantifizierung von CXCL10 und CXCL17 in konditionierten Zellkultur- medien von Tumorzellen	72
4.10	Analyse der Größe und Anzahl extrazellulärer Vesikel aus konditionierten Zellkulturmedien von Tumorzellen mittels Nanopartikel-Tracking	73
4.11	Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen im Knochen- mark Xenograft-Tumor-tragender pfp/rag2- und Select-Mäuse	75
4.12	Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen im Blut Xenograft- Tumor-tragender pfp/rag2- und Select-Mäuse	77

4.13	Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen in Milzen Xenograft-Tumor-tragender pfp/rag2- und Select-Mäuse	79
4.14	Splenomegalie in naiven (nicht Tumor-tragenden) Select-Versuchstieren	81
4.15	HE-Färbungen von Milzen Xenograft-Tumor-tragender pfp/rag2- und Select-Mäuse	83
4.16	Durchflusszytometrische Analyse Gr-1 ⁺ Immunzell-Subtypen in Milzen Xenograft-Tumor-tragender Mäuse	85
4.17	Immunhistologische Färbung Ly6G ⁺ Zellen in Milzen von tumor-tragenden pfp/rag2- und Select-Mäusen	86
4.18	Giemsa-Färbung isolierter Gr-1 ^{Hi} Ly-6G ⁺ - Zellen aus Milzen Xenograft-Tumor-tragender pfp/rag2-Mäuse	87
4.19	Durchflusszytometrische Analyse von Immunzell-Subtypen in s.c. Xenograft-Tumoren von pfp/rag2- und Select-Mäusen	89
4.20	Durchflusszytometrische Analyse Gr-1 ⁺ Immunzell-Subtypen in s.c. Xenograft-Tumoren.	90
4.21	Analyse der STAT1- und p-STAT1-Level in PC-3, PaCa5061 und SKOV3-Tumorzelllysaten	92
4.22	Immunhistologische Färbung von ITGB4 und CD45 an humanen i.p. Karzinosen von Ovarialkarzinom-Patientinnen	94
5.1	Pathophysiologisches Model zur Rolle von E- und P-Selektin bei der Etablierung von Xenograft-Tumoren.	98

Tabellenverzeichnis

2.1	Versuchstiere	26
2.2	Zellkulturmedien	27
2.3	Verbrauchsmaterialien	28
2.4	Chemikalien	29
2.5	Puffer und Lösungen	33
2.6	Antikörper für die Durchflusszytometrie.	37
2.7	Antikörper für Western Blot.	38
2.8	Antikörper für die Immunhistologie.	38
2.9	Assays und Kits	39
2.10	Laborgeräte	40
2.11	Software	42
3.1	Immunhistologische Färbeverfahren	53

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
A.dem	demineralisiertes Wasser
AG	Arbeitsgruppe
APC	Allophycocyanin
bzw.	beziehungsweise
BV	Brilliant Violet
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
ca.	circa
CCL	CC-Chemokinligand
CXCL	CXC-Chemokinligand
Cy	Cyanin
d	Tag
DCs	Dendritische Zellen
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme linked immuno adsorbant assay</i>
engl.	englisch
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)
FCS	fötale Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i>)
GBR	Vereinigtes Königreich

Abkürzung	Bedeutung
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (engl. <i>granulocyte-macrophage-stimulating factor</i>)
h	Stunden
Hi	hoch exprimiert
HLA-DR	MHC-Klasse-II-Zelloberflächenrezeptor
HSC70	<i>heat shock cognate 71 kDa protein</i>
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
Il	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
ITGB4	Integrin $\beta 4$
KD	<i>knockdown</i>
Konz.	Konzentration
Lo	gering exprimiert
MDSCs	myeloide Suppressorzellen (engl. <i>myeloid-derived suppressor cells</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
mind.	mindestens
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
ND	nicht detektierbar
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PB	Pacific Blue
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PolyHema	Poly-(2-Hydroxyethylmethacrylat)

Abkürzung	Bedeutung
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rpm	Umdrehung pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
sek	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sele	pfp ^{-/-} /rag2 ^{-/-} -Sele ^{-/-} (E-Selektin defizient)
Select	pfp ^{-/-} /rag2 ^{-/-} -Sele ^{-/-} /Selp ^{-/-} (E-/P-Selektin defizient)
Selp	pfp ^{-/-} /rag2 ^{-/-} -Selp ^{-/-} (P-Selektin defizient)
sog.	sogenannte
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. <i>side scatter</i>)
Tab.	Tabelle
TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
Verd.	Verdünnung
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Durchführung meines Promotionsvorhabens unterstützt und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Tobias Lange, PhD** für die Bereitstellung dieses spannenden und herausfordernden Themas und für die wertvolle fachliche Betreuung. Vielen Dank für die Unterstützung, guten Tipps, kritischen Denkanstöße und die Freiheit meine eigenen Ideen in meinem Promotionsprojekt zu verwirklichen und an meinen Aufgaben zu wachsen.

Prof. Dr. Udo Schumacher danke ich für die herzliche Aufnahme im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie und die Möglichkeit meine Promotion in seinem Institut unter optimalen Arbeitsbedingungen durchführen zu können. Ich bedanke mich für ein stets offenes Ohr und konstruktiven Austausch bei der Beurteilung immunhistologischer Präparate.

Mein ausdrücklicher Dank gilt ebenfalls **PD Dr. Hartwig Lüthen** für die hilfsbereite Übernahme der Aufgabe als Zweitbetreuer und Gutachter.

Ferner danke ich **Prof. Dr. Stefan Linder** und **Andrea Mordhorst** für die Kooperation und Hilfe bei der Durchführung der Makrophagen-Invasions-Versuche.

Weiter bedanke ich mich bei **Dr. Franz Lennard Ricklefs** und **Mareike Holz** für die gute Zusammenarbeit bezüglich der Exosomen-Versuche.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Prof. Dr. Linda Diehl** und **Dr. Ludmilla Unrau** für anregende Gespräche über die Charakterisierung von Immunzellen und die wertvolle Unterstützung bei den durchflusszytometrischen Analysen. Ludmilla danke ich insbesondere für ihre Geduld bei Fragen rund um die Kompensation und ihre aufbauenden Worte bei FlowJo-Krisen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei **PD Dr.Christine Stürken** für die Bereitstellung des Ovarialkarzinom-Kollektivs.

Ein besonderer Dank geht an **Dr. Katharina Bröker, Dr. Vera Labitzky** und **Dr. Ann-Kristin Ahlers, Alina Schiecke** und **Hanna Maar** nicht nur für den tollen wissenschaftlichen Austausch sowie zahlreiche fachliche Diskussionen, sondern auch für humorvolle Gespräche, Aufheiterungen und Ermutigungen abseits des Laboralltags.

Mein außerordentlicher Dank gilt allen **Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Anatomie und Experimentelle Morphologie** für die motivierende Arbeitsatmosphäre, den guten Zusammenhalt im Team und die Hilfsbereitschaft bei Problemen und Fragen jeglicher Art.

Der liebevollste Dank geht an **meine ganze Familie** für den unermüdlichen Glauben in meine Fähigkeiten und den Rückhalt in all den Jahren.

Der größte Dank gebührt meinem **Gendu**. Danke, dass du bei allen Hoch und Tiefs dieser Promotion an meiner Seite standest und nie daran gezweifelt hast, dass ich den richtigen Weg eingeschlagen habe. Senza di te e il tuo amore non sarei qui oggi.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig verfasst und ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form in keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Hamburg,

(Sandra Genduso)