

GPR65-abhängige Zusammensetzung des Tumormikromilieus hoch glykolytischer Tumore

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Natalia Margarete Truong-Andrievici
geb. am 14.03.1988 in Bad Königsdorff-Jastrzemb

MAINZ, 2023

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2023

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Eigenständigkeitserklärung

Ich, Natalia Margarete Truong-Andrievici, versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen schriftlichen Quellen, sowie andere Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, habe ich kenntlich gemacht. Ich habe keine entgeltliche Hilfe Dritter, insbesondere Promotionsberatung oder -vermittlung in Anspruch genommen.

Inhaltsverzeichnis

I.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
III.	TABELLENVERZEICHNIS	5
1.	EINLEITUNG	6
1.1	Das Tumormikromilieu	6
1.2	Hoch glykolytische Tumore	8
1.2.1	Metabolismus hoch glykolytischer Tumorzellen: Der Warburg-Effekt	8
1.2.2	Das B16 Melanom-Modell und das MC38 Kolonadenokarzinom-Modell	9
1.3	Makrophagen	10
1.3.1	Pro- und antiinflammatorische Makrophagen	11
1.3.2	Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM)	13
1.4	Neutrophile Granulozyten	14
1.4.1	Pro- und antitumorale neutrophile Granulozyten	15
1.4.2	Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten zum Tumorherd	16
1.5	G-Protein gekoppelte Rezeptoren und der cAMP-Signalweg	17
1.6	Immunevasionsmechanismus hoch glykolytischer Tumore	19
1.7	Zielsetzung	20
2.	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Verbrauchsmaterialien	21
2.2	Laborgeräte und technische Hilfsmittel	22
2.3	Chemikalien	23
2.4	Reagenzien und Medienzusätze	23
2.5	Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien	24
2.6	Kits	28
2.7	Oligonukleotide	29
2.7.1	Primer für die Genotypisierung von Mausstämmen	29
2.7.2	Primer zum Nachweis und zur Quantifizierung von Nukleinsäuren	29
2.8	Tiere	30
2.8.1	Tierstämme	30
2.9	Zelllinien	30
2.10	Antikörper und Antagonisten	31
2.11	Methoden der Zellkultur	32
2.11.1	Bestimmung der Lebendzellzahl	32

2.11.2 Anreinigung, Differenzierung und Kultivierung von Makrophagen aus dem Knochenmark.....	32
2.11.3 Kultivierung von Makrophagen unter sauren Bedingungen	33
2.11.4 Kultivierung von Tumorzelllinien	33
2.11.4.1 B16 Melanomzellen.....	33
2.11.4.2 MC38 Kolonadenokarzinomzellen.....	34
2.12 <i>In vivo</i> Tumormodelle mit B16 Melanom- und MC38 Kolonadenokarzinomzellen	34
2.12.1 Inokulation von Tumorzellen	34
2.12.2 Messung der TumorgroÙe	35
2.12.3 Behandlung der tumortragenden Tiere mit Neutrophilen-depletierendem Antikörper	35
2.12.4 Behandlung der tumortragenden Tiere mit einem CXCR2-Antagonisten.....	36
2.12.5 Behandlung des B16 Melanoms mit einer Immun-Checkpoint-Blockade (ICB) mittels anti-PD1 Antikörper.....	37
2.12.6 Behandlung des B16 Melanoms mit einer Kombinationstherapie aus CXCR2-Antagonisten und der ICB	37
2.13 <i>Ex vivo</i> Tumoraufarbeitung	38
2.13.1 Blutentnahme	39
2.13.2 Isolierung von TAM.....	39
2.13.3 Isolierung der CD45 ⁺ -Immunzellen	40
2.14 Durchflusszytometrie	40
2.14.1 Oberflächenfärbung	41
2.14.2 Fixierung und Permeabilisierung.....	41
2.14.3 Intrazellulärfärbung	41
2.14.4 Kompensation.....	41
2.15 Probenaufarbeitung für Sekretomanalysen.....	42
2.16 qRT-PCR.....	42
2.16.1 RNA-Isolierung	43
2.16.2 cDNA-Synthese	43
2.16.3 Amplifizierung der cDNA.....	44
2.17 <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS).....	45
2.17.1 <i>Bulk Sequencing</i>	46
2.17.2 <i>Single-cell Sequencing</i>	46
2.18 Bioinformatische Auswertungen.....	47
2.19 Statistik	48
3. ERGEBNISSE	49
3.1 Expression von GPR65 auf Zellen der myeloiden Zelllinie.....	49
3.2 B16 Melanome weisen ein hoch glykolytisches Proteinprofil auf.....	51
3.3 Ausbleiben der Säure-induzierten <i>Icer</i>-Expression in <i>Gpr65</i>-defizienten BMDM	53
3.4 <i>Gpr65</i>- und <i>Icer</i>-kompetente Makrophagen weisen unter sauren Bedingungen einen antiinflammatorischen Phänotyp auf.....	54

3.5	Das Wachstum hoch glykolytischer Tumore ist in <i>Gpr65</i> -defizienten Mäusen inhibiert.....	56
3.6	Tumor-infiltrierende Leukozyten von <i>Gpr65</i> -defizienten und <i>Gpr65</i> -kompetenten Mäusen zeigen unterschiedliche Zellpopulationen zwischen B16 und MC38 Tumoren.....	57
3.7	In <i>Gpr65</i> -defizienten Tieren liegt eine verringerte Anzahl an antiinflammatorischen Makrophagen vor.....	59
3.8	Chemokine zur Neutrophilen-Rekrutierung werden im B16 Melanom maßgeblich von antiinflammatorischen Makrophagen produziert	61
3.9	Neutrophilen-rekrutierende Chemokine fehlen auch in <i>Icer</i> -defizienten TAM....	63
3.10	Die CXCL-abhängige Kommunikation zwischen Makrophagen und Neutrophilen ist in <i>Gpr65</i> -defizienten Mäusen unterbrochen	64
3.11	Tumor-infiltrierte Neutrophile fehlen in B16-Melanomen der <i>Gpr65</i> -defizienten Tiere	67
3.12	<i>Gpr65</i> -defiziente Mäusen weisen kein Entwicklungsdefizit hinsichtlich der Neutrophilen auf.....	68
3.13	Die Neutrophilenpopulation von <i>Gpr65</i> -kompetenten Tieren zeigt einen MDSC-ähnlichen Phänotyp.....	69
3.14	Durch Depletion der Neutrophilen in wildtypischen Mäusen kann das Wachstum des B16 Melanoms inhibiert werden	70
3.15	Die Kombinationstherapie aus CXCR2-Blockade und ICB führt zu einem signifikant verringerten B16 Tumorwachstum.....	75
4.	DISKUSSION	78
4.1	<i>Gpr65</i> -abhängige Immunantworten gegen hoch glykolytische Tumore.....	78
4.2	Therapeutische Relevanz und Perspektiven	85
5.	ZUSAMMENFASSUNG	87
6.	ABSTRACT.....	88
7.	LITERATURVERZEICHNIS	89
8.	CURRICULUM VITAE.....	99
9.	DANKSAGUNG	101

I. Abkürzungsverzeichnis

AC no.	Accession number
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
AHA	L-Azidohomoalanin
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
Arg1	Arginase-1
ATP	Adenosintriphosphat
Basp1	<i>Brain acid soluble protein 1</i>
BMDM	<i>Bone Marrow-derived Macrophages</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
Btg2	<i>B-cell translocation gene 1</i>
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
Ccl	<i>CC-chemokine ligand</i>
Ccr1	C-C-Chemokinrezeptor-Ligand
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CBP	CREB binding protein
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Clec4n	<i>C-type lectin domain family 4 member n</i>
Cpe	Carboxypeptidasen
CPM	Counts per Million
CBP	<i>Creb-binding Protein</i>
CRE	cAMP-responsive element
CREB	cAMP-responsive element binding
CREM	cAMP-responsive element modulator
Csf1	<i>Colony Stimulating Factor 1</i>
CXCL	C-X-C-Motif-Chemokin-Rezeptor
CXCR	C-X-C-Motif-Chemokin-Rezeptor
DAMP	<i>Damage-associated Molecular Pattern</i>
dd	doppelt destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsuloxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
Esp8	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 8
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAS	<i>Fas Cell Surface Death Receptor</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
Gadd45b	<i>Growth Arrest and DNA Damage 45b</i>
Gapdhs	Glycerinaldehyd 3 phosphat-Dehydrogenase
GM-Puffer	großer MACS-Puffer
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat

GPCR	<i>G-Protein coupled receptor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
Gyg	Glykogenin
Hcar2	Hydroxycarbonsäurerezeptor 2
HCl	Chlorwasserstoffsäure
Hif-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1
Hist1h1c	Histone H1.2
Hspa	Hitze-Schock-Protein A
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
ICB	Immune-Checkpoint-Blockade
ICER	<i>Inducible cAMP early repressor</i>
Ier	<i>Radiation-inducible immediate-early gene IEX</i>
IFN- γ	Interferon- γ
Ifrd	<i>Interferon Related Developmental Regulator 1</i>
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
JAK	Januskinasen
Jun	Jun Proto-Oncogene
LDH (A,B,C)	Lactat-Dehydrogenase (Untereinheit A, B, C)
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6C	<i>Lymphocyte Antigen 6 Complex Locus C</i>
Ly6G	<i>Lymphocyte Antigen 6 Complex Locus G</i>
KÜS	Kulturüberstand
KO	<i>knock-out</i>
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony-stimulating Factor</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived Suppressor Cells</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
Mtor	Serin-Threonin-Kinase mTOR
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Naga	α -N-Acetylgalactosaminidase
NEAA	<i>Non Essential Aminoacids</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
Ninj1	Ninjurin-1
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PD1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PKA	Proteinkinase A
PKM	Pyruvatkinase
PKM2	Pyruvatkinase M2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Ppbb	<i>Pro-Platelet Basic Protein</i>

Ppt2	Palmitoyl Protein Thioesterase 2
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
Ptgs2	Prostaglandinsynthase-2
Pygm	Glykogenphosphorylase
qRT-PCR	<i>Quantitative Realtime-Polymerase-Chain-Reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPKM	<i>Reads per Kilobase per Million</i>
Saa3	Serum Amyloid A-3
Serpine1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
Srgn	Serglycin
SSC	<i>Side Scatter</i>
t-SNE	<i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i>
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TAN	Tumor-assoziierte Neutrophile
TCDA8	<i>T-cell death-associated gene 8</i>
T _c	Zytotoxische T-Zellen
TGF- β	<i>Tissue Growth Factor β</i>
T _H	T-Helfer-Zellen
T _{H1}	T-Helfer-Zellen vom Typ 1
T _{H2}	T-Helfer-Zellen vom Typ 2
Thbs	Thrombospondin 1
Timp1	Metallopeptidase-Inhibitor 1
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
TIL	Tumor-infiltrierende Leukozyten
TM	Testmedium
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Txnip	<i>Thioredoxin Interacting Protein</i>
VE	Vollentsalzenes Wasser
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WT	Wildtyp
WTA	<i>Whole Transcriptome Analysis</i>
Xbp1	X-Box-Bindungsprotein 1

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierung und phänotypische Merkmale von M1- und M2-Makrophagen..... 12

Abbildung 2: Phänotypische Merkmale von N1- und N2-Neutrophilen und MDSC. 16

Abbildung 3: Immunevasionsmechnismus hoch glykolytischer Tumore..... 19

Abbildung 4: Behandlungsschema zur Depletion von Neutrophilen..... 36

Abbildung 5: Behandlungsschema zur CXCR2-Blockade..... 36

Abbildung 6: Behandlungsschema zur Immun-Checkpoint-Blockade..... 37

Abbildung 7: Behandlungsschema zur Kombinationstherapie von CXCR2-Antagonisten und ICB mittels anti-PD1..... 38

Abbildung 8: Myeloide Zellen weisen eine erhöhte GPR65 Expression auf. 50

Abbildung 9: B16 Melanome zeigen auf Proteomebene eine hohe glykolytische Aktivität..... 51

Abbildung 10: Die Säure-induzierte *Icer*-Expression bleibt in *Gpr65*-defizienten Makrophagen aus..... 54

Abbildung 11: BMDM aus *Gpr65*- und *Icer*-wildtypischen Mäusen weisen unter sauren Bedingungen eine erhöhte Expression antiinflammatorischer Gene auf. 55

Abbildung 12: In *Gpr65*-defizienten Mäusen ist das Tumorwachstum hoch-glykolytischer Tumore inhibiert. 56

Abbildung 13: Tumor-infiltrierende CD45⁺ Immunzellen von *Gpr65*-defizienten und -kompetenten Mäusen unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Zellenpopulationen im B16 und MC38 Tumor..... 58

Abbildung 14: In B16-infiltrierenden Immunzellen aus *Gpr65* KO Mäusen ist die Anzahl an antiinflammatorischen M2-Markophagen reduziert. 60

Abbildung 15: Antiinflammatorische TAM vom M2-Phänotyp exprimieren Chemokine zur Neutrophilen Rekrutierung..... 61

Abbildung 16: Relative Expression von *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* und *Ppbp* ist in *Gpr65*-kompetenten TAM stärker als in *Gpr65*-defizienten TAM des B16 Melanoms. 62

Abbildung 17: Die Chemokine zur Neutrophilen Rekrutierung werden ebenfalls von *Icer*-defizienten TAM schwach exprimiert. 63

Abbildung 18: Der Informationsfluss über CXCL-Signalwege zwischen Makrophagen und Neutrophilen ist im B16 Melanom von *Gpr65*-defizienten Tieren unterbrochen. ... 65

Abbildung 19: Der Informationsfluss über CXCL-Signalwege zwischen Makrophagen und Neutrophilen zeigt im MC38 Adenokarziom des Kolons keine Unterschiede zwischen *Gpr65*-defizienten und *Gpr65*-kompetenten Tieren..... 66

Abbildung 20: Infiltrate der neutrophilen Granulozyten fehlen im B16 Melanom der *Gpr65*-defizienten Tiere. 67

Abbildung 21: *Gpr65*-defiziente und *Gpr65*-kompetente Mäuse weisen keinen Unterschied in der Anzahl der Neutrophilen im Blut auf..... 68

Abbildung 22: Neutrophile Granulozyten aus B16 Melanominfiltraten weisen einen MDSC-Phänotyp auf..... 69

Abbildung 23: Effektive Depletion von Neutrophilen inhibiert das B16 Melanomwachstum in wildtypischen Mäusen..... 72

Abbildung 24: Myeloide Zellen zeigen eine antitumorale Polarisierung nach Depletion von Neutrophilen..... 74

Abbildung 25: Verringertes Tumorwachstum nach einer Kombinationstherapie aus CXCR2-Antagonisten und ICB..... 76

Abbildung 26: Eine Kombinationstherapie aus CXCR2-Antagonisten und ICB verbessert die Immunantwort der lymphoiden Zellen im B16 Tumor..... 77

Abbildung 27: Unterbindung des Immunevasionsmechanismus hochglykolytischer Tumore..... 84

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezugsliste der Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 2: Laborgeräte und technische Hilfsmittel	22
Tabelle 3: Bezugsliste der Reagenzien und Medienzusätze.....	23
Tabelle 4: Bezugsliste der Kits	28
Tabelle 5: Auflistung der Primer zur Genotypisierung.....	29
Tabelle 6: Auflistung der Primer zur Quantifizierung von Nukleinsäuren	29
Tabelle 7: Bezugsliste der Antikörper für FACS-Analysen.....	31
Tabelle 8: Bezugsliste der <i>in vivo</i> neutralisierenden Antikörper	31
Tabelle 9: Bezugsliste der Antagonisten	31
Tabelle 10: 20 µl Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese.....	44
Tabelle 11: Reaktionsansatz für Triplikate einer qRT-PCR.....	45
Tabelle 12: qRT-PCR Programm zur Bestimmung von <i>Icer</i>	45
Tabelle 13: Verteilung der Versuchstiere zur Depletion der Neutrophilen.....	71
Tabelle 14: Verteilung der Versuchstiere zur CXCR2-Blockade und ICB.....	75

1. Einleitung

1.1 Das Tumormikromilieu

Krebs ist eine Erkrankung auf zellulärer Ebene, bei der Störungen im Kontrollmechanismus des Zellzyklus auftreten. Diese Fehlregulationen führen zu Zellwucherungen, welche als Tumor bezeichnet werden. Als Tumormikromilieu wird die unmittelbare Umgebung des Tumors bezeichnet. Sie besteht aus einer zellulären Komponente und der extrazellulären Matrix. Krebszellen interagieren während ihrer gesamten Progression mit diesen Bestandteilen. Sie fördern damit ihre Heterogenität, ihre Entwicklung und Invasionsfähigkeit, sowie ihre klonale Expansion, die zur Metastasierung und Erhaltung des Tumors führt.¹ Zu der zellulären Komponente zählen Tumorstromazellen, wie Fibroblasten und Endothelzellen, und Immunzellen der myeloiden und lymphoiden Zellreihe, und die Tumorzellen selbst. Die nicht-zelluläre Komponente besteht aus Kollagen, Fibronectin, Laminin und weiteren matrixbildenden Bestandteilen. Sie dienen als Träger für die Zellen des Tumors und regulieren die Verbindungen unter ihnen. Weiterhin erleichtert die Umstrukturierung des umgebenden Netzwerks die Invasion weiterer Tumorzellen.^{2,3} Als Zentrum des Tumormikromilieus steuern sie die Funktion dieser Zell-Matrix-Beziehung und nutzen sie zu ihrem Vorteil.⁴

Von wesentlicher Bedeutung für diese Arbeit sind die Immunzellen der Mikroumgebung des Tumors. Sie werden über komplexe Signalwege so umprogrammiert, dass sie dem Tumor von Nutzen sind. Dies resultiert in einem mangelhaften Ansprechen auf Therapien.^{5,6} Immunzellen lassen sich grob in zwei Kategorien unterscheiden. Die adaptiven Immunzellen und Zellen des angeborenen Immunsystems.

Die adaptive Immunität wird durch Zellen koordiniert, welche durch Kontakt mit einem spezifischen Antigen aktiviert werden. Sie nutzen ein immunologisches Gedächtnis, um die Bedrohung zu bewerten und anschließend eine Immunantwort auszulösen. Zu ihnen gehören T-Zellen (T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen), B-Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen).^{7,8} T-Helferzellen des adaptiven Immunsystems können sich innerhalb des Tumormikromilieus in eine Vielzahl von Subtypen differenzieren. Nennenswert im Tumorkontext sind die T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1-Zellen), welche proinflammatorische Eigenschaften aufweisen und zytotoxische T-Zellen (T_c-Zellen) aktivieren und unterstützen.⁹ T_c-Zellen erkennen abnorme Tumorantigene auf Krebszellen und können aktiv gegen sie vorgehen. Sie zerstören nicht nur gezielt die malignen Zellen, sondern unterdrücken auch die Angiogenese des Tumors. Sie sind mit einer positiven Prognose in vielen Krebsarten assoziiert.¹⁰ Regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen) hingegen unterdrücken die

proinflammatorischen Vorgänge im Tumormikromilieu. Sie fördern die Tumorprogression, indem sie unter anderem die Funktion der NK-Zellen modulieren und ihre antitumorale Wirkung unterbinden.¹¹

Die angeborene Immunität ist ein unspezifischer Verteidigungsmechanismus, der nach dem Eindringen eines fremden Antigens in den Körper verzögert abläuft. Zu den wichtigsten Zellen, die eine angeborene Immunreaktion auslösen, zählen myeloide Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen.⁷ Myeloide Zellen sind die am häufigsten vorkommenden Immunkomponenten des Tumormikromilieus. Ihre Funktionen reichen von immunsuppressiven bis hin zu immunstimulierenden Effekten. Myeloide Zellen sind sehr plastisch und können sich je nach den von ihrer Mikroumgebung ausgehenden Reizen in verschiedene Phänotypen differenzieren.¹²

Makrophagen sind entscheidende Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie modulieren Immunantworten durch ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Phagozytose von Krankheitserregern. Sie erkennen Antigene, nehmen diese auf und präsentieren sie den Zellen des adaptiven Immunsystems in sekundären lymphoiden Organen. Im Tumormikromilieu können Makrophagen bis zu 50 % der Masse ausmachen, was für eine hohe Tumordinfiltration dieser Zellen spricht. Sie lassen sich entweder als entzündliche Makrophagen beschreiben (im Folgenden bezeichnet als Makrophagen vom Typ M1), die Zellen phagozytieren, abtöten und antitumorale Eigenschaften aufweisen, oder als immunsuppressive Makrophagen (im Folgenden bezeichnet als Makrophagen vom Typ M2), die an der Wundheilung beteiligt sind und protumorale Eigenschaften aufzeigen. Beide Klassen können in einem Tumor vorkommen. Jedoch fördert in den meisten Fällen die Mikroumgebung des Tumors einen M2-Phänotyp, was mit einer schlechten klinischen Prognose der Patienten einhergeht.¹³⁻¹⁶ Weitere wesentliche myeloide Zellen im Tumormikromilieu sind neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen. Neutrophile machen bis zu 70 % der im Blut zirkulierenden Leukozyten aus und bilden daher die erste Verteidigungslinie gegen viele Krankheitserreger. Im Zusammenhang mit Krebs können Neutrophile, ebenso wie Makrophagen, entweder das Tumorstadium unterdrücken oder fördern.^{17,18} Dendritische Zellen fungieren als Antigenpräsentierende Zellen. Letztlich stellen sie, so wie die Makrophagen auch, eine Brücke zwischen adaptiver und angeborener Immunität dar, um Pathogen-spezifische T-Zellantworten zu initiieren. In der Mikroumgebung des Tumors werden dendritische Zellen von verschiedenen Faktoren geprägt, die entweder eine antitumorale Antwort fördern oder eine Tumortoleranz begünstigen.⁹

Das Tumormikromilieu ist also eine wechselseitige und dynamische Einheit aus Immunzellen und extrazellulärer Matrix. Es ist aktiv an der Krebsentwicklung beteiligt und bietet daher zahlreiche Möglichkeiten zur therapeutischen Intervention gegen Krebs.¹⁹

1.2 Hoch glykolytische Tumore

Tumorzellen müssen ihren Stoffwechsel anpassen, um ihre unkontrollierte Vermehrung, ihr schnelles Wachstum und ihr Überleben unter den durch das Tumormikromilieu vorgegebenen Bedingungen zu sichern. Für die Umstrukturierung ihres Energiestoffwechsels ist eine ständige Zufuhr von Nährstoffen notwendig.^{20,21} Viele Tumorarten, beispielsweise das maligne Melanom der Haut, zeigen nachweislich eine erhöhte Aufnahme von Glukose und eine erhöhte Glykolyserate, um ihren erhöhten Energieverbrauch zu decken.²² Letztlich geht es mit einer verstärkten Lactatbildung und Lactatsekretion ins umliegende Gewebe einher, was in einer Übersäuerung der Mikroumgebung des Tumors resultiert. Der veränderte Metabolismus ist ein Markenzeichen hoch glykolytischer Tumore und führt zur erfolgreichen Immunevasion der Krebszellen.^{23,24}

1.2.1 Metabolismus hoch glykolytischer Tumorzellen: Der Warburg-Effekt

Im Jahr 1924 beschrieb der deutsche Biochemiker Otto Heinrich Warburg den veränderten Energiestoffwechsel hoch glykolytischer Tumorzellen als Warburg-Effekt. Er beobachtete, dass Tumorzellen den weniger effizienten Weg der Glykolyse zur Energiegewinnung bevorzugen, obwohl ausreichend Sauerstoff in ihrer Gegenwart vorhanden ist. Diese Art der aeroben Glykolyse sichert den Zellen ihr Überleben und ihr Wachstum.²⁵⁻²⁷ Um ihren hohen Energiebedarf zu decken, stellen sie ihren Metabolismus von der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung auf den erhöhten Glukoseabbau um, obwohl normoxische Bedingungen herrschen und die Nettoausbeute an gewonnenem Adenosintriphosphat (ATP) wesentlich geringer ist. In der Glykolyse wird ein Molekül Glukose zu zwei Molekülen Pyruvat abgebaut, welches im Anschluss zu Lactat reduziert und aus der Zelle ausgeschleust wird. Netto werden dabei zwei Moleküle ATP generiert. In der oxidativen Phosphorylierung hingegen werden 36 Moleküle ATP pro Glukoseeinheit erzeugt.^{28,29}

Die Gründe für die Abhängigkeit der Glykolyse sind noch nicht vollends geklärt. In der Literatur werden einige Vorteile für diesen Stoffwechselweg diskutiert. Zum einen ist die Produktion von ATP über den Glukoseabbau schneller als über die oxidative Phosphorylierung. Zum anderen liefert eine erhöhte Glykolyserate eine Vielzahl von wertvollen Zwischenprodukten, die für die

Biosynthese von Nucleinsäuren, Proteinen und Lipiden notwendig sind. Schnell proliferierende Tumorzellen können so ihren Bedarf an essentiellen Bausteinen für ihr Wachstum decken. Weitere glykolytische Metabolite können in den Pentosephosphatweg eingeschleust werden und dienen der Bereitstellung von Energie. Darüber hinaus fallen in diesem Stoffwechselweg größere Mengen an Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) an, welche die Krebszellen nutzen, um eine Resistenz gegen Chemotherapeutika zu entwickeln.^{23,24,30,31} Krebszellen regulieren demnach laut der Hypothese von Warburg die Glykolyse hoch. Auf molekularer Ebene spielt dabei der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 α (HIF-1 α) eine bedeutende Rolle.³² Der Transkriptionsfaktor sorgt dafür, dass glykolytische Enzyme, wie Hexokinase und Lactatdehydrogenase A (LDHA), induziert werden. Außerdem unterdrückt es die Einschleusung von Pyruvat in den Citratzyklus, so dass es vermehrt zu Lactat umgewandelt wird und außerhalb der Tumorzelle zur Ansäuerung des Tumormilieus führt.^{33,34}

1.2.2 Das B16 Melanom-Modell und das MC38 Kolonadenokarzinom-Modell

Wie bereits erwähnt können Tumore eine hohe oder niedrige glykolytische Aktivität aufweisen. Bohn et al. konnten zeigen, dass das humane maligne Melanom eine Vielzahl von Markern aufweist, welche mit dem Stoffwechselweg der Glykolyse assoziiert sind. Insbesondere sind die Schlüsselenzyme Pyruvatkinase M2 (PKM2) und die Lactatdehydrogenase- (LDH) Untereinheiten LDHA, LDHB und LDHC positiv reguliert. Verglichen wurden die erhöhten Expressionslevel mit Daten des Kolonadenokarzinoms, welche niedrigere Expressionen dieser Marker zeigen.²² Um dieses Erkenntnis in ein präklinisches Tiermodell zu übertragen, wurden die Tumorzelllinien B16 und MC38 als Tumormodelle etabliert. B16 Melanome sind mit einer hohen Glykolyseaktivität assoziiert, MC38 Kolonadenokarzinome mit einer niedrigen glykolytischen Aktivität. Dies konnten Bohn et al. über spezielle Positronen-Emissionstomographische Untersuchungen beobachten, welche eine erhöhte Glukoseaufnahme in murinen B16 Melanomen zeigten, verglichen mit murinen MC38 Adenokarzinomen des Kolons. Die erhöhte Glukoseaufnahme der B16 Melanome korreliert mit einer erhöhten Glykolyserate dieser Zellen. Demnach dient die murine Zelllinie des B16 Melanoms als subkutanes Tumormodell mit starker glykolytischer Kapazität und starker Fähigkeit zur extrazellulären Ansäuerung. MC38 hingegen ist eine murine Zelllinie des Kolonkarzinoms und dient mit seiner geringen Fähigkeit zur Azidifizierung der Tumorumgebung als subkutanes Tumormodell mit einer niedrigen Glykolyserate der Zellen.²²

Beide Tumormodelle werden in vielen Studien zur Untersuchung und Bewertung von Therapiemöglichkeiten verwendet.³⁵⁻³⁷

1.3 Makrophagen

Makrophagen sind eine heterogene Population von angeborenen, myeloiden Immunzellen, die an Gesundheit und Krankheit beteiligt sind. Sie sind die funktionell vielfältigsten Zellen des hämatopoetischen Systems. Ihre Hauptfunktion besteht darin, auf Krankheitserreger zu reagieren und die adaptive Immunantwort durch Antigenverarbeitung und -präsentation zu modulieren.³⁸⁻⁴⁰ Weiterhin dienen sie der Aufrechterhaltung der Homöostase, durch Phagozytose von Trümmern, der Beseitigung toter Zellen und der ständigen Umstrukturierung der Matrix.⁴¹ Ihre Zytotoxizität gegen Parasiten, Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen und die Sekretion von Enzymen und Zytokinen zählen ebenfalls zu den wesentlichen Funktionen der Makrophagen.^{42,43} Durch die Ausschüttung bestimmter Zytokine und Chemokine sind sie dazu befähigt, weitere Zelltypen in ihre unmittelbare Umgebung zu rekrutieren.⁴⁴

Makrophagen entstammen hauptsächlich dem hämatopoetischen System. Aus pluripotenten Stammzellen entsteht im Knochenmark ein gemeinsamer myeloider Progenitor, welcher zum Granulozyten- und Monozytenprogenitor heranreift.^{45,46} Diese Vorläuferzellen werden aus dem Knochenmark in den Blutstrom ausgeschwemmt und reifen zu Monozyten heran, welche ins Gewebe einwandern können. Dort differenzieren sie sich unter dem Einfluss von Zytokinen zu Makrophagen weiter.⁴⁷ Dieser Prozess läuft kontrolliert unter dem Einfluss vom Makrophagenkolonie-stimulierenden Faktor (*Macrophage Colony-stimulating Factor*, M-CSF) ab, welcher hauptsächlich von Stromazellen produziert wird.^{48,49}

Die professionellen Phagozyten können über verschiedene Rezeptoren auf ihrer Oberfläche aktiviert werden. Mustererkennungsrezeptoren, sogenannte *Pattern Recognition Receptors* (PRR), ermöglichen Makrophagen *Pathogen-associated Molecular Pattern* (PAMP) und *Damage-associated Molecular Pattern* (DAMP) zu erkennen und schnell gegen Pathogene vorzugehen. Diese unspezifische Reaktion ist möglich, da keine Prozessierung und Präsentation des Antigens nötig sind, um aktiv gegen die Erreger zu agieren.^{50,51} Eine weitere Gruppe von Rezeptoren stellen F_c-Rezeptoren dar, welche die Makrophagen zu einem essentiellen Verknüpfungselement zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort machen. Sie binden den F_c-Teil von Immunglobulinen infizierter Zellen oder eingedrungener Pathogene und leiten die Phagozytose ein. Die Pathogene werden verdaut und die Antigene über *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Moleküle den T-Zellen des erworbenen Immunsystems präsentiert.⁵²⁻⁵⁴ Dieser Prozess der Opsonierung findet im Lymphknoten statt. Damit gehören die Makrophagen den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) an.⁵⁵ Aufgrund unterschiedlichster Transkriptionsprofile dieser bedeutenden Zellen, werden Makrophagen in zwei Subtypen unterteilt werden, welche im Folgenden beschrieben werden.⁵⁶

1.3.1 Pro- und antiinflammatorische Makrophagen

Makrophagen sind in der Lage sich je nach den Einflüssen ihrer Umgebung in einen pro- oder antiinflammatorischen Phänotyp zu differenzieren.⁵⁷ Stein et al. beschrieben im Jahr 1991 erstmals, dass das Zytokin Interleukin (IL)-4 eine andere Wirkung auf die Genexpression von Makrophagen hat als Interferon (IFN)- γ und Lipopolysaccharide (LPS). Im Gegensatz zur klassischen Aktivierung von Makrophagen durch IFN- γ und LPS wurde die durch IL-4 induzierte Makrophagen-Genexpression als "alternative Aktivierung" bezeichnet.^{58,59}

M1-Makrophagen (klassisch aktivierte Makrophagen) werden von IFN- γ -produzierenden T_H1-Zellen oder NK-Zellen polarisiert. Auch LPS und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (*Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor*, GM-CSF) induzieren eine Polarisierung der Zellen in Richtung M1-Phänotyp.^{15,60} Dabei zeigen die Makrophagen einen erhöhten Arginin-Stoffwechsel durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), bei welchem Stickstoffmonoxid (NO) aus Arginin gebildet wird. Durch das zytotoxische NO besitzen sie die Fähigkeit das Erbgut eingedrungener Mikroben oxidativ zu schädigen.^{61,62} Sie sind weiterhin gekennzeichnet durch die Produktion hoher Mengen an entzündungsfördernden Zytokinen, wie IL-1 β , IL-6, IL-23, TNF- α oder IL-12, sowie reaktiven Sauerstoffspezies. Diese lösen T_H1-Entzündungsreaktionen aus, welche sich gegen Krankheitserreger richten, und können sogar zur Bekämpfung von intrazellulären Erregern und Tumoren beitragen. Ihnen werden daher auch antitumorale Funktionen zugeschrieben. M1-Makrophagen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche verstärkt MHCII, CD68 und die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86.⁶⁰ Makrophagen vom M2-Typ (alternativ aktivierte Makrophagen) hingegen besitzen entzündungshemmende Funktionen. Sie beteiligen sich am Gewebeumbau, an der Immunregulation, an der Bekämpfung von Parasiten und an der Förderung von Tumoren.¹⁵ Im Gegensatz zu M1-Makrophagen erfolgt die Aktivierung der M2-Subtypen durch Immunkomplexe und Komplementkomponenten oder durch antiinflammatorische Zytokine, wie IL-4, IL-13, IL-10 und dem *Transforming Growth Factor β* (TGF- β).⁶³ Auch eine verstärkte Säure-induzierte Expression vom Transkriptionsfaktor *Inducible cAMP early repressor* (ICER) hat eine Polarisierung in Richtung M2-Phänotyp als Folge.²² Die Aktivierung der M2-Makrophagen führt zur Sekretion großer Mengen von IL-10 und geringer Mengen von IL-12, wodurch ein Wechsel zum M1-Phänotyp inhibiert wird.⁶⁴ Weiterhin zeigen sie eine verstärkte Expression des Enzyms Arginase-1 (ARG1), welches Ornithin aus Arginin metabolisiert und zur Wundheilung von Zellen beiträgt, sowie deren Wachstum fördert.

Außerdem werden Wachstumsfaktoren wie der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), der *Epidermal Growth Factor* (EGF) und der *Fibroblast Growth Factor* (FGF) vermehrt gebildet.^{65,66}

Der Makrophagen-Phänotyp ist nicht statisch, sondern plastisch, so dass je nach Zytokinspektrum des umliegenden Gewebes ein Phänotypwechsel stattfinden kann. Diese Repolarisierung erfordert jedoch eine Neuvernetzung von Signalnetzwerken auf Transkriptions- und Translationsebene.^{67,68}

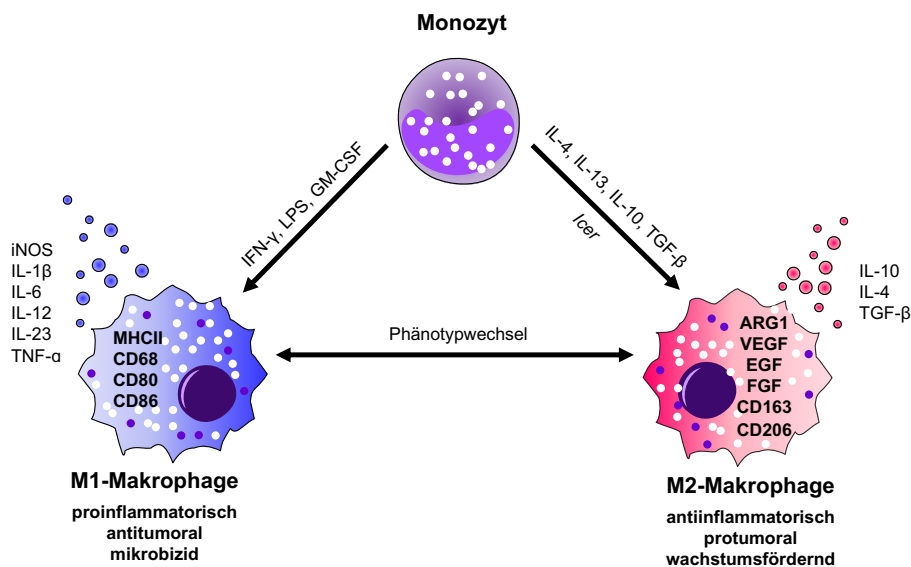


Abbildung 1: Differenzierung und phänotypische Merkmale von M1- und M2-Makrophagen.

Monozyten können sich in Makrophagen mit unterschiedlichen Phänotypen ausdifferenzieren. M1-Makrophagen besitzen einen proinflammatorischen und antitumoralen Phänotyp. Sie sind durch eine hohe Produktion an iNOS, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 und TNF- α gekennzeichnet. M2-Makrophagen hingegen zeigen wachstumsfördernde, antiinflammatorische und protumorale Eigenschaften. Sie produzieren große Mengen an IL-4, IL-10 und TGF- β . Die Polarisation ist nicht endgültig, so dass ein Wechsel der Phänotypen abhängig von der umliegenden Zytokinzusammensetzung stattfinden kann.

1.3.2 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM)

Im Jahr 1863 schlug Rudolf Virchow vor, dass ein Tumor auch aus einer chronischen Entzündung resultieren kann und nicht nur genetische Mutationen ursächlich sind, und dass eine Gewebsschädigung mit einhergehender Entzündung die Zellproliferation und das Fortschreiten von Krebs fördert.⁶⁹ Einige Jahre später beobachtete auch Harold F. Dvorak, dass Tumore starke Wundheilungsprozesse hervorrufen.⁷⁰ Da sich vor allem M2-Makrophagen an Wundheilungsreaktionen beteiligen, infiltrieren zunächst Monozyten in das betroffene Gewebe und differenzieren sich dann zu einer speziellen Subpopulation aus, den Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM). Sie werden über das *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1), IL-8, IL-10, TGF- β und VEGF von Tumorzellen rekrutiert und machen einen erheblichen Anteil des Tumormikromilieus aus.⁷¹ TAM weisen überwiegend Merkmale des antiinflammatorischen M2-Phänotyps auf und gelten als fördernd für die Tumorprogression und Metastasierung.^{72,73} In der Regel sind sie durch die Expression von CD163, CD204 und CD206 auf ihrer Oberfläche gekennzeichnet, den *Scavenger-Rezeptoren*.⁷⁴ Es konnte gezeigt werden, dass in Gewebeproben von verschiedenen Krebsarten die Dichte an CD163⁺ Makrophagen höher war, als in gesundem Gewebe. Dazu korreliert eine erhöhte CD163⁺ Makrophagendichte im Tumorgewebe negativ mit der Überlebenschance der Betroffenen.⁷³ Die Anzahl der im Tumor vorhandenen TAM kann damit als prognostischer Marker für Krebspatienten dienen.⁷⁵ TAM unterstützen die Tumorprogression zum einen, indem sie sich durch die Produktion der Wachstumsfaktoren VEGF, EGF und dem *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) positiv auf die Angiogenese auswirken. Zum anderen unterdrücken sie die antitumorale Immunantwort, beispielsweise durch hohe Konzentrationen an IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- β , sowie durch sehr niedrige Konzentrationen an TNF- α .^{71,76,77} Die hypoxische Mikroumgebung fördert unter anderem auch die Expression von *Arg1* in TAM. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Hypoxie-induzierbare Lipidtröpfchen-assoziierte Protein HILPDA in den meisten Tumoren stark ausgeprägt ist und dass es mit schlechteren Überlebenschancen der Patienten korreliert.⁷⁸

Durch die genannten Eigenschaften entgeht der Tumor einer effizienten Immunabwehr und TAM werden damit zu wichtigen Angriffspunkten für neuartige Immuntherapien gegen Tumore. Durch ihre hohe Plastizität besteht die Möglichkeit einer Repolarisierung in einen M1-Phänotyp, indem mit IFN- γ phänotypische Funktionen von M1-Makrophagen in TAM provoziert werden oder indem mit der Inhibition von *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) antiinflammatorische Signalwege unterbunden werden.⁷⁹⁻⁸¹ Auch wird bereits versucht, das Tumormilieu selbst zu modulieren, wodurch es zu einer verminderten Infiltration von Monozyten in das Tumorgewebe kommt. Dies kann mit einer Inhibierung des Hif-1 α Signalwegs erfolgen, welcher biologische Prozesse reguliert, die

für das Überleben und Fortschreiten von Tumoren erforderlich sind. Ebenfalls kann der Oberflächenmarker CD206 als Therapieziel ausgenutzt werden, dabei werden TAM gezielt fokussiert und beseitigt.^{16,71,82}

Eine weitere bedeutende Rolle in der M2-fokussierten Tumorthherapie spielt ICER. Ein Transkriptionsfaktor, dessen Expression durch den cAMP-Signalweg gesteuert wird (1.5 G-Protein-gekoppelter-Rezeptoren und der cAMP-Signalweg). ICER induziert einen M2-Phänotyp in Makrophagen, indem es iNOS und TNF- α inhibiert.²² Zudem sind Zellen, welche *Icer* exprimieren, resistent gegen cAMP-gesteuerten Zelltod.⁸³ Weiterhin kann ICER durch die Bindung an den IL-2-Promotor von T_H-Zellen diesen inhibieren und eine Proliferation dieser immunaktiven Zellen verhindern.^{84,85} Diese Mechanismen tragen erheblich zur Tumorprogression bei.²²

1.4 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten gehören, so wie Makrophagen, zu den phagozytierenden Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie entstammen ebenfalls der myeloiden Zellreihe des hämatopoetischen Systems. Als reife Neutrophile zirkulieren sie im Blut und bilden mit bis zu 70 % den Hauptanteil der Leukozyten. Dadurch können sie bei Bedarf unmittelbar aus der Blutbahn ins Gewebe mobilisiert werden. Sie sind sehr kurzlebig, so dass sie kontinuierlich nachgebildet werden müssen. Die rasche Mobilisierung aus dem Knochenmark führt dazu, dass neu generierte, zirkulierende Neutrophile eine geringere Membranexpression von *Lymphocyte Antigen 6 Complex Locus G* (Ly6G) aufzeigen und folglich schwerer als solche zu identifizieren sind.⁸⁶ Durch ihre hohe Präsenz und die Möglichkeit der raschen Mobilisierung zum Ort des Geschehens, zählen die Neutrophilen zu der ersten Abwehrfront bei Infektionen.^{87,88} Dementsprechend zählt zu ihren Hauptfunktionen die Beseitigung von Krankheitserregern. Neutrophile können jedoch nicht nur zur Auslösung und Modulation von Immunreaktionen beitragen, sondern auch zu dessen Beendigung. Sie sind an der Wundheilung beteiligt und wichtig für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase. Darüber hinaus können Neutrophile aktiv mit anderen Immunzellen interagieren.⁸⁹ Neutrophile sind daher, wie auch die Makrophagen, eine sehr heterogene und komplexe Zellpopulation. Es wird insbesondere im Tumormikromilieu zwischen pro- und antitumoralen Subtypen unterschieden.^{90,91}

1.4.1 Pro- und antitumorale neutrophile Granulozyten

Neutrophile, welche sich im Tumorgewebe befinden, werden als Tumor-assoziierte Neutrophile (TAN) bezeichnet. Sie zeigen eine hohe Plastizität und sind in der Lage, ihre Funktion an die Bedürfnisse des sie umgebenden Milieus anzupassen. Sie werden anhand ihrer unterschiedlichen Immuneigenschaften in zwei Subtypen unterteilt, die antitumoralen Neutrophilen (im Folgenden als N1-Neutrophile beschrieben) und die protumoralen Neutrophilen (im Folgenden als N2-Neutrophile beschrieben).^{90,92} Verschiedene Faktoren haben Einfluss auf die Polarisierung von Neutrophilen. Meist handelt es sich dabei um die Zytokine, welche sich im Tumormilieu befinden. Proinflammatorische Zytokine begünstigen die Differenzierung in einen N1-Phänotyp, wohingegen antiinflammatorische Zytokine einen N2-Phänotyp provozieren.⁹³ Die Zellen des N1-Phänotyps zeigen eine antineoplastische Aktivität, mit einem immunaktiven Expressionsmuster von Zytokinen und Chemokinen. Weiterhin weisen sie eine geringere Expression von ARG1 auf und besitzen die Fähigkeit zur Zytotoxizität gegenüber tumoraler Zellen, indem sie die Apoptose einleiten. Zusätzlich fördern sie die Rekrutierung und Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch die Produktion immunstimulatorischer Zytokine wie IL-12 und TNF- α .^{92,93} N2-Neutrophile hingegen fördern die Tumorentwicklung. Diese Eigenschaft wird mit der Produktion angiogener und wachstumsfördernder Faktoren, wie beispielsweise VEGF, sowie katabolen Enzymen, in Verbindung gebracht. Weiterhin kommt es durch ihre hohe Kollagenaseaktivität zur Auflockerung der umliegenden Matrix und zur Extravasation, dem Austritt von Blut und dessen Verteilung im Tumorgewebe. Ebenfalls sind erhöhte Level an ARG1 zu beobachten, welche die Aktivität der CD8⁺ T-Zellen herabsetzen und zur Immunsuppression führen.^{91,94} Es wird auch angenommen, dass sie in der Lage sind die Immunantwort gegen Krebszellen zu hemmen, indem sie die antitumorale Aktivität und die Tumordinfiltration weiterer Zellenpopulationen, wie Makrophagen oder NK-Zellen, negativ beeinflussen.^{95,96} Diese Subpopulation von Neutrophilen ist nicht klar abzugrenzen von *Myeloid-derived Suppressor Cells* (MDSC). Sie beschreiben ebenfalls eine heterogene Gruppe der myeloiden Zelllinie mit immunsuppressiver Aktivität, so dass N2-Zellen als funktionelle MDSC-typische Zellen angesehen werden können.⁹⁷⁻¹⁰⁰ MDSC supprimieren ebenfalls T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen. Sie fördern über anti-immune Mechanismen die Tumorprogression und Metastasierung. Ihre negative Regulierung von Immunreaktionen bei Krebs führt daher bei Patienten zu einer schlechten Prognose, die mit schlechten therapeutischen Ergebnissen verbunden ist.¹⁰¹⁻¹⁰³

Zirkulierende Neutrophile werden als Reaktion auf Infektionen schnell rekrutiert und bilden die erste Verteidigungslinie des Wirts. Eine gestörte Rekrutierung oder Aktivierung kann zu einer unkontrollierten Immunreaktion und damit zu Sepsis führen. Es ist also wichtig, dass die Migration von Neutrophilen streng reguliert wird, um eine überschießende Entzündung zu verhindern.^{104,105}

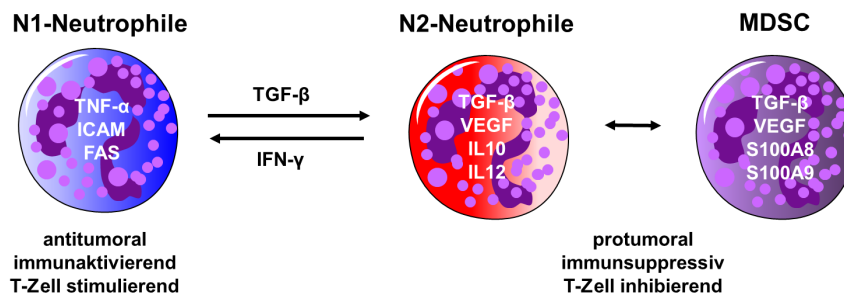


Abbildung 2: Phänotypische Merkmale von N1- und N2-Neutrophilen und MDSC.

Neutrophile Granulozyten können einen N1- oder N2-Phänotyp annehmen. N1-Neutrophile besitzen immunaktivierende und antitumorale Eigenschaften. Sie sind durch eine hohe Produktion an proinflammatorischen Proteinen, wie TNF- α , interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1 (*Intercellular adhesion molecule 1*, ICAM) und *Fas Cell Surface Death Receptor* (FAS), gekennzeichnet. N2-Neutrophile zeigen immunsuppressive und protumorale Eigenschaften. Sie produzieren große Mengen an IL-10, IL-12, VEGF und TGF- β . Neutrophile vom N2-Phänotyp sind funktionell nicht klar von MDSC abzugrenzen, die ebenfalls antiinflammatorische Proteine, wie TGF- β , VEGF, S100A8 und S100A9 synthetisieren.

1.4.2 Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten zum Tumorherd

Die Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen unterliegt einem komplexen Zusammenspiel zwischen Adhäsionsmolekülen, chemoattraktiven Zytokinen und den entsprechenden Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Der prominenteste Rezeptor ist der C-X-C-Motif-Chemokin-Rezeptor 2 (CXCR2). CXCR2 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, dem eine wichtige Rolle bei der Entstehung entzündlicher Erkrankungen und dem aggressiven Wachstum von Tumoren zugeschrieben wird.¹⁰⁶ Er wird hauptsächlich von den C-X-C-Motif-Chemokin-Liganden CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 und CXCL7 gebunden und navigiert die neutrophilen Granulozyten zum Ort der Entzündung oder im Fall von Krebs zum Tumorherd.^{89,107–110} Sezerniert werden die Chemokine hauptsächlich von Monozyten und TAM.^{111–113} Die ausgedehnte Infiltration von Neutrophilen während einer Entzündung ist einer der wichtigsten pathogenen Faktoren verschiedener Krankheiten. Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass eine chronische Entzündung mit intensiver Migration der neutrophilen Granulozyten eng mit der Entstehung von Krebs zusammenhängt.^{106,107}

Für diese Arbeit ist vor allem die Mobilisierung der Neutrophilen aus dem Blutkreislauf in Richtung Tumor von großer Bedeutung. In tumortragenden Mäusen bilden sich Chemokingradienten. Es herrschen niedrige Konzentrationen der Chemokin-Liganden im Knochenmark und hohe Konzentrationen im Tumor. Neutrophile, die auf ihrer Oberfläche CXCR2 exprimieren, bewegen sich in Richtung der höheren Konzentration und kommen in direkten Kontakt mit dem Tumor.¹⁰⁸ Die Aktivierung der CXCR2-CXCL-Achse aktiviert mehrere Signalwege, darunter die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-, p38/*Extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK)- und Januskinase (JAK)-Wege, welche mit dem raschen Fortschreiten von Tumoren in Verbindung gebracht werden. Darüber hinaus inhibiert die immunsuppressive Wirkung von protumoralen Neutrophilen und MDSC die antitumorale Wirkung von T-Zellen und fördert die Tumordinvasion ins umliegende Gewebe und Metastasierung.¹¹⁴

1.5 G-Protein gekoppelte Rezeptoren und der cAMP-Signalweg

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*G-Protein coupled receptors*, GPCR) vermitteln Informationen an Zellen, indem sie auf externe Signale reagieren und zahlreiche zelluläre Reaktionen auslösen. Sie zählen zu der größten Familie von Membranproteinen. Gekennzeichnet sind die Zelloberflächenrezeptoren durch das Vorhandensein von sieben membrangängigen α -helikalen Segmenten, welche sich über die gesamte Breite der Membran erstrecken. Zwischen den Transmembrandomänen befinden sich intra- und extrazelluläre Schleifen. Besonders die extrazellulären Schleifen sind wichtig, da sie Taschen bilden, an welche Signalmoleküle binden können. Eine solche Bindung verursacht eine Konformationsänderung, die wiederum eine Interaktion zwischen dem GPCR und einem G-Protein auslöst. G-Proteine bestehen aus drei verschiedenen Untereinheiten. Die α -Untereinheit und die γ -Untereinheit sind durch Lipidanker an der Plasmamembran befestigt. Die α -Untereinheit hat zudem die Fähigkeit Guanosintriphosphat (GTP) oder Guanosindiphosphat (GDP) zu binden. In ihrer aktiven Form haben G-Proteine GTP gebunden, in der inaktiven Form GDP. Sobald ein Ligand am GPCR bindet, wird das GDP durch GTP ersetzt und das G-Protein aktiviert. Infolgedessen dissoziiert das G-Protein in die α -Untereinheit, welche GTP gebunden hat, und in einen $\beta\gamma$ -Dimer. Beide Teile sind nicht mehr an den GPCR gebunden, so dass sie nun frei diffundieren und mit anderen Effektoren interagieren können. Solange die α -Untereinheit mit GTP verbunden ist, bleibt das G-Protein aktiv und kann die Information des GPCR weiterleiten. Wenn dieses GTP jedoch wieder zu GDP hydrolysiert wird, nehmen die Untereinheiten wieder die Form eines inaktiven Heterotrimers an, und das gesamte G-Protein assoziiert wieder mit dem nun inaktiven GPCR

zusammen. Auf diese Weise funktionieren G-Proteine wie ein Schalter, der durch Signal-Rezeptor-Interaktionen an der Zelloberfläche ein- oder ausgeschaltet wird.^{115–117}

Ein besonders häufiges Ziel aktivierter G-Proteine ist die Adenylatcyclase, ein membranassoziiertes Enzym, welches die Synthese des sekundären Botenstoffs cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat) aus ATP-Molekülen katalysiert. Dieses wiederum aktiviert die Proteinkinase A (PKA). Durch die Aktivierung der PKA lösen sich ihre beiden katalytischen Untereinheiten und translozieren in den Zellkern, wo sie Transkriptionsfaktoren unter dem Verbrauch von ATP phosphorylieren. Dabei handelt es sich hauptsächlich um die Transkriptionsfaktoren der *cAMP-response elements binding-/cAMP-response elements modulating*-Familie (CREB-/CREM-Familie). Diese binden wiederum an *cAMP-response elements* (CRE) der DNA und führen bei Phosphorylierung zu einer Aktivierung der Expression nachgeschalteter Gene, indem ein aktivierender Komplex mit dem *Creb-binding Protein* (CBP) entsteht.^{118,119} Der Transkriptionsfaktor ICER gehört zur Familie der CREB-/CREM-Proteine und ist ein alternatives Transkriptionsprodukt des *Crem*-Gens. Seine Transkription beginnt jedoch an einem alternativen Promotor 2. Nach seiner Synthese bindet es CRE-Sequenzen, allerdings wird die Bildung eines transkriptionsaktivierenden Komplexes verhindert, da aufgrund fehlender Interaktionsdomäne kein CBP gebunden werden kann. Infolgedessen kommt es zu einer Inhibierung der Transkription cAMP-regulierter Gene. Somit wirkt ICER als ein Transkriptionsrepressor des cAMP-Signalwegs.^{22,120,121} Zur besseren Unterscheidung zwischen CREM und ICER wird im Folgenden auch für ICER die entsprechende Gennomenklatur *Icer* angewendet.

ICER moduliert nachweislich das Wachstum glykolytischer Tumore, indem es die protumorale M2-Polarisierung von TAM fördert. Die Expression von iNOS und TNF- α , und damit die Differenzierung der Makrophagen in einen proinflammatorischen M1-Phänotyp, wird unterdrückt und die Progression dieser Tumore wird verstärkt. Tiere, welche nicht mehr in der Lage sind, ICER in Makrophagen zu exprimieren, zeigen ein deutlich reduziertes Tumorstadium.²²

1.6 Immunevasionsmechanismus hoch glykolytischer Tumore

Das Mikromilieu von Tumoren mit einer hohen glykolytischen Stoffwechselrate geht mit einem niedrigen extrazellulären pH-Wert einher und ermöglicht so die Stimulation von pH-sensitiven GPCR, wie dem G-Protein-gekoppelte Rezeptor 65 (GPR65, auch *T-cell death-associated gene 8*, TCDA8).¹²² Es handelt sich dabei um einen Psychosinrezeptor, welcher überwiegend auf Zellen des Immunsystems exprimiert wird.¹²³ GPR65 kann den extrazellulären pH-Wert wahrnehmen, in dem er von Protonen stimuliert wird. Dabei werden pH-Werte unter 7,2 registriert. Die Wasserstoffionen binden dabei an Histidinreste der Rezeptoren und protonieren diese. Zellen, die GPR65 auf ihrer Oberfläche tragen, erkennen somit saure Umgebungen und reagieren darauf.¹²⁴ Bekannt ist, dass GPR65 immunvermittelte Entzündungen reduzieren kann, indem es die Produktion von IL-6, IL1 β und TNF- α durch T-Zellen herabsetzt.^{125,126} Nachdem der Rezeptor aktiviert wurde, läuft der Wirkmechanismus über die Auslösung der cAMP-Signalkaskade mit nachfolgender Expression von *Icer*.^{22,124} Makrophagen im Tumormikromilieu polarisieren durch einen *Icer*-abhängigen Mechanismus zu einem antiinflammatorischen Phänotyp, der das Tumorstromung begünstigt.

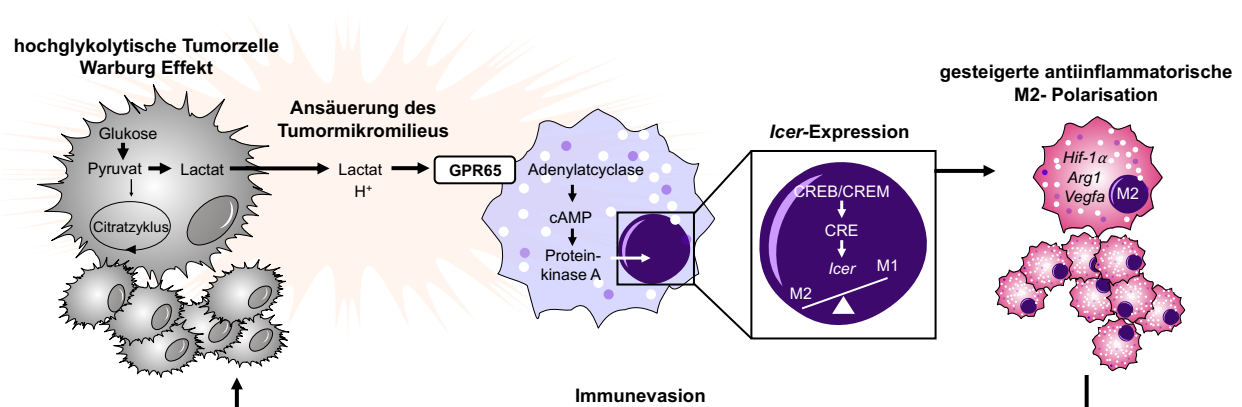


Abbildung 3: Immunevasionsmechnismus hoch glykolytischer Tumore.

Durch den Warburg-Effekt produzieren Tumorzellen vermehrt Lactat, was zu einer Übersäuerung des umliegenden Gewebes führt. Die entstehenden Protonen werden von GPR65 auf TAM gebunden. Das nachgeschaltete G-Protein aktiviert die Adenylatcyclase. Über den cAMP-Signalweg wird cAMP gebildet. Der sekundäre Botenstoff wiederum aktiviert die PKA. Die aktivierte PKA transloziert in den Zellkern und phosphoryliert Proteine der CREB/CREM-Familie. Nach Bindung an CRE wird die Expression von *Icer* induziert, welches erneut an CRE bindet und die Expression weiterer cAMP-regulierter Gene unterbindet. Die TAM differenzieren dadurch in einen M2-Phänotyp, mit verstärkter Expression antiinflammatorischer Gene, wie *Arg1*, *Vegfa* und *Hif-1 α* . Die antiinflammatorischen TAM unterstützen wiederum die Tumorstromung hoch glykolytischer Tumore.

Zusammenfassend sind der pH-sensitive Effekt von GPR65, sowie die nachfolgende Expression von *Icer* und die damit einhergehende Differenzierung von TAM in einen protumoralen M2-Phänotyp, maßgebend für den Immunevasionsmechanismus hoch glykolytischer Tumore.

1.7 Zielsetzung

Das molekularbiologische Verständnis darüber, wie Tumore mit glykolytischem Metabolismusprofil der immunvermittelten Erkennung und Zerstörung entgehen, ist von bedeutender Wichtigkeit für neue Therapieansätze. Krebsarten mit einer starken glykolytischen Stoffwechselaktivität zeigen eine Immunevasion, die auf der Polarisierung von Makrophagen in Richtung M2-Phänotyp beruht.

Tumorfördernde TAM vom M2-Phänotyp machen einen großen Anteil des Tumorgewebes aus. Sie spielen eine große Rolle in der Modifizierung des Tumormikromilieus und tragen entscheidend zur aggressiven Progression von Krebs bei. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern protumorale M2-Makrophagen weitere Tumor-infiltrierende Immunzellen instrumentieren und die zelluläre Zusammensetzung des Mikromilieus hoch glykolytischer Tumore GPR65-abhängig beeinflussen.

Detaillierte Untersuchungen sollen Aufschluss über die tumorbiologischen Prozesse geben, wenn TAM nicht mehr fähig sind die Übersäuerung des Tumormilieus zu registrieren. Zu diesem Zweck wurde das Gen *Gpr65* in Mäusen deletiert, so dass diese Tiere keinen GPR65 mehr auf ihrer Zelloberfläche tragen und die Tumor-bedingte Überproduktion von Säure nicht mehr detektiert werden kann.

Die Klärung nachgeschalteter Mechanismen ist für ein umfassenderes Verständnis der Tumorbiologie von Vorteil und kann zur Entwicklung neuer effektiver Ansätze für Krebsmedikamente mit einer verbesserten antitumoralen Immunantwort beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Verbrauchsmaterialien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden steril bezogen.

Tabelle 1: Bezugsliste der Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
High Sensitivity DNA Chips	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
High Sensitivity RNA Chips	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Kanülen (0,55x25 mm; 0,8x40 mm)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Kryoröhrchen (2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
MS- / LS-Separationssäulen	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Optisch klare Klebefolie	Axon Labortechnik (Kaiserslautern, Deutschland)
Pasteurpipetten	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
PCR Mikroplatte	Axon Labortechnik (Kaiserslautern, Deutschland)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 1000 µl)	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Pre-Separationsfilter (70 µm)	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Protein LoBind Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Reagenzgefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Reagenzgefäße (Durchflusszytometrie)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Reagenzgefäße (gentleMACS M-Tubes)	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Rundbodenplatte	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Serologische Pipetten (5 ml; 10 ml)	Nerbe Puls (Winsen/Luhe, Deutschland)
Spitzbodenplatte (96-Well)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Spritzen (1 ml)	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Spritzen (10 ml)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ² ; 175 cm ²)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturplatten (6-Well)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturplatten (12-Well; 24-Well; 48-Well)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Zellsieb (40 µm)	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Zellsieb (70 µm)	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland)

2.2 Laborgeräte und technische Hilfsmittel

Tabelle 2: Laborgeräte und technische Hilfsmittel

Gerät/Hilfsmittel	Hersteller
2100 Bioanalyzer®	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Analysewaage (Practum® 220g 0,1mg)	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG (Göttingen Deutschland)
BD Rhapsody®	BD Rhapsody (Heidelberg, Deutschland)
Bioruptor® Plus	Diagenode (Seraing, Belgien)
CO ₂ Inkubator	Sanyo (München, Deutschland)
Durchflusszytometer (Ariall®, Arialll®, Symphony®)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
GentleMACS Dissociator®	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Heizblock	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
HiSeq2500®	Illumina (Eindhoven, Niederlande)
Inkubations-Wasserbad	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Massenspektrometer (Synapt G2-S®)	Waters (Milford, USA)
Messschieber	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Mikroskop (ID03)	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikroskop (Axio Vert A1)	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	Superior Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
pH-Meter, CG 840	Schott (Mainz, Deutschland)
Pipetboy comfort	Integra Biosciences (Fernwald, Deutschland)
Pipetten (5 µl; 10 µl, 200 µl)	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
Präparierbesteck	Hammacher (Soligen, Deutschland)
qRT-PCR Cycler (Step One Plus)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Quickdrop SpectraMax® Spektrometer	Molecular Devices (San Jose, USA)
Sterilbank (MSC Advantage)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Vortexer	VWR (Darmstadt, Deutschland)
<u>Zentrifugen:</u>	
Biofuge fresco	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Megafuge 40R	Thermo Fischer Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Multifuge 3L-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Mini Centrifuge MCF-2360	LMS Co. (Tokyo, Japan)

2.3 Chemikalien

Standardchemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) in *pro analysis*-Qualität bezogen.

2.4 Reagenzien und Medienzusätze

Tabelle 3: Bezugsliste der Reagenzien und Medienzusätze

Reagenz / Medienzusatz	Hersteller
5x Reaktionsbuffer RT	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Accutase	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
BSA	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Calcein AM	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Chloroform	Roth (Kaiserslautern, Deutschland)
Dilution Buffer InVivoPure pH 6.5	BioXcell (Eching, Deutschland)
Dilution Buffer InVivoPure pH 7.0	BioXcell (Eching, Deutschland)
DMEM	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
DMEM Trockenpulver	PAN (Biotech (Aidenbach, Deutschland)
DMSO	Roth (Kaiserslautern, Deutschland)
DNA Loading Dye 6x	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
DreamTaq Puffer 10x	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
DreamTaq Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
EDTA	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
FCS	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Fixation und Permeabilisation Puffer Set (<i>FixPerm</i>)	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
Geneticin® G418 Sulfate	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Glykogen	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Hepes	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
L-Glutamin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ketamin Inresa 2 ml (Ketaminhydrochlorid)	Insera Arzneimittel GmbH (Freiburg, Deutschland)
MEM Trockenpulver	PAN Biotech (Aidenbach, Deutschland)
<i>Micro Beads UltraPure® Anti-F4/80 mouse</i>	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland)

<i>Micro Beads UltraPure® Anti-CD45 (TIL)</i>	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
mouse	
Natriumpyruvat	Serva (Tübingen, Deutschland)
NEAA (100x)	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Kompensationsbeads (Negative Control Compensation Particles Set)	BD (Heidelberg, Deutschland)
PEG	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Serva (Tübingen, Deutschland)
Permeabilisationspuffer (10x)	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
Proteinase K	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
RevertAid Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
RPMI 1640	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
Rompum® 2% (Xylazinhydrochlorid)	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
TRI-Reagent RNA	Bio&Sell (Feucht, Deutschland)
Trypanblaulösung 0,4 %	Roth (Kaiserslautern, Deutschland)
Tween80	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
qPCR Mix EVA Green® 5x	Axon Labortechnik (Kaiserslautern, Deutschland)

2.5 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien

Aminosäure-Lösung

32 mM	Alanin
17 mM	Asparagin
26 mM	Asparaginsäure
58 mM	Glutaminsäure
114 mM	Natruimpyruvat
40 mM	Prolin

Alle Zusätze wurden in VE-Wasser gelöst und für 3 Stunden bei 40 °C erhitzt worden. Dieser Lösung wurde eine Mischung aus 1 mM Biotin, 184 µM Vitamin B12 und 1 M HCl (1:2000), ebenfalls gelöst in VE-Wasser, in einer Verdünnung von 1:185 zugegeben.

Ammonium-Chlorid-Kalium (ACK) Lysepuffer

150 mM	NH ₄ Cl
1 mM	KHCO ₃
0,1 mM	EDTA

Der Lysepuffer wurde auf einen pH-Wert von 7,4 in VE-Wasser eingestellt. Vor Verwendung wurde der Puffer auf 37 °C erwärmt.

B16 Kulturmedium

50 µM	β-Mercaptoethanol
10 %	FCS
1 %	Glutamin 200 mM
1 %	NEAA (100x)
1 ‰	Penicillin/Streptomycin

Alle Zusätze wurden in RPMI 1640 gelöst.

BSA-Stammlösung

Es wurde eine 10 %ige Lösung aus BSA in PBS angesetzt, anschließend steril filtriert (0,2 µm) und bei 4 °C gelagert.

CXCR2-Antagonist Injektionslösung

1 %	DMSO
20 %	PEG 400
5 %	tween80
74 %	ddH ₂ O

Alle Zusätze wurden zu 50 mg CXCR2-Antagonisten dazu gegeben und gut resuspendiert. Die Lösung wurde auf 37 °C erwärmt, damit sich der Feststoff löst. Anschließend wurden je 50 µl aliquotiert und bei -20 °C weggefroren.

Depletionsmedium

0,1 mM	AHA
0,1 mM	Arginin
0,1 mM	Lysin

Alle Zusätze wurden in DMEM gelöst. Besondere Vorsicht galt bei der Zugabe von Methionin. Es war streng darauf zu achten, dass zum Medium kein Methionin zugegeben worden war.

EDTA-Stammlösung

Es wurde eine 0,5 M Stammlösung mit einem pH-Wert von 8 in VE-Wasser angesetzt und autoklaviert. Die Lösung wurde bei 4 °C aufbewahrt.

Einfriermedium für Zellen

Für das Einfriermedium wurde FCS mit 10 % DMSO vermischt. Das Medium wurde vor jedem Einfrierprozess frisch angesetzt und auf Eis gestellt.

FCS

FCS wurde zur Inaktivierung der Komplementfaktoren für 45 min auf 56 °C erhitzt. Anschließend aliquotiert, 20 min bei 1100xg zentrifugiert, der Überstand in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert. Es wurde ausschließlich der Überstand für Zellkulturmedien verwendet.

Gey's Lysepuffer

126 µM	EDTA
10 mM	KHCO ₃
16 mM	NH ₄ Cl

Der Lysepuffer wurde auf einen pH-Wert von 7,4 in VE-Wasser eingestellt. Vor Verwendung wurde der Puffer auf 37 °C erwärmt.

Glutamin-Lösung

Es wurde eine 200 mM Glutamin-Lösung in VE-Wasser angesetzt, steril filtriert (0,2 µm) und bei -20 °C gelagert.

GM-Puffer

0,5 %	BSA (10%)
5 mM	EDTA
0,01 %	1 % NaN ₃ -Lösung

Die Zusätze wurden in PBS gelöst.

Iscove's Medium

50 µM	β-Mercaptoethanol
1:100	Aminosäure-Lösung
1:2500	Cystein-Lösung 58 µM (in 0,25 M HCl)
12,5 mM	Hepes
44 mM	NaHCO ₃
128 µM	Natrium-Selenit
1 ‰	Penicillin/Streptomycin

Alle Reagenzien wurden DMEM Trockenpulver zugefügt und in VE-Wasser gelöst. Es wurde ein pH-Wert von 6,9 eingestellt. Als pH-Indikator wurde Phenolrot zugegeben und das Medium wurde steril filtriert (0,2 µm).

Ketamin-Rompun®-Narkoselösung

Die Stocklösung wurde aus einer Ampulle Ketamin (2 ml) und 800 µl Rompun® hergestellt. Diese konnte bis zu 3 Monate nach Ansetzen bei 4 °C aufbewahrt werden. Vor jeder Injektion wurde die Arbeitslösung frisch 1:5 in PBS verdünnt. Die Injektion erfolgte intraperitoneal. Entsprechend dem Gewicht der Maus wurden durchschnittlich zwischen 150 µl und 250 µl verabreicht.

MACS-Puffer

0,5 % BSA (10%)

2 mM EDTA

0,01 % 1 % NaN₃-Lösung

Die Zusätze wurden in PBS gelöst.

Makrophagenmedium

15 % L929-KÜS wurden in TM mit 10 % FCS gelöst. L929-Zellen sind murine adhären wachsende Fibroblasten, welche M-CSF produzieren.¹²⁷

MC38 Kulturmedium

10 % FCS

1 % Glutamin 200 mM

1 % Natriumpyruvat 0,1 M

1 ‰ Penicillin/Streptomycin

Alle Zusätze wurden in DMEM gelöst.

MEM

50 µM β-Mercaptoethanol

1 ‰ Penicillin/Streptomycin

Die Reagenzien wurden MEM Trockenpulver hinzugegeben und in VE-Wasser gelöst. Als pH-Indikator wurde Phenolrot zugeben und das Medium wurde steril filtriert (0,2 µm).

Natriumpyruvat

Es wurde eine 0,1 M Natriumpyruvat-Lösung in VE-Wasser angesetzt, steril filtriert (0,2 µm) und bei 4 °C gelagert.

PBS

1,4 M	NaCl
0,1 M	NaH ₂ PO ₄

Beide Zusätze wurden in VE-Wasser gelöst und ein pH-Wert von 7,2 wurde eingestellt. Anschließend wurde der Puffer autoklaviert.

Penicillin/Streptomycin-Lösung

172 µM	Penicillin
137 µM	Streptomycin

Beide Zusätze wurden in VE-Wasser gelöst und steril filtriert (0,2 µm).

TM5

1 %	Glutamin 200 mM
1 %	Natriumpyruvat-Lösung 0,1 M
5 %	FCS

Alle Zusätze wurden in Iscove's Medium gelöst.

TM10

1 %	Glutamin 200 mM
1 %	Natriumpyruvat-Lösung 0,1 M
10 %	FCS

Alle Zusätze wurden in Iscove's Medium gelöst.

2.6 Kits

Tabelle 4: Bezugsliste der Kits

Kit	Hersteller
<i>Click Chemistry Capture Kit</i>	JenaBioscience (Jena, Deutschland)
<i>High Sensitivity DNA Kit</i>	Agilent (Santa Clara, USA)
<i>NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit</i>	Illumina (Eindhoven, Niederlande)
<i>RNeasy Micro Plus Kit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>RNA 6000 Pico Kit</i>	Agilent (Santa Clara, USA)
<i>Tumor Dissociation Kit</i>	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Qubit® <i>dsDNA BR Assay Kit</i>	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
qScriber® <i>cDNA Synthesis Kit</i>	highQu GmbH (Kaichtal, Deutschland)

BD Rhapsody Single-Cell Analysis System:

<i>WTA Amplification Kit</i>	BD Rhapsody (Heidelberg, Deutschland)
<i>Targeted mRNA and AbSeq Amplification Kit</i>	BD Rhapsody (Heidelberg, Deutschland)

2.7 Oligonukleotide**2.7.1 Primer für die Genotypisierung von Mausstämmen**

Tabelle 5: Auflistung der Primer zur Genotypisierung

Primer	Sequenz	Hersteller
<i>Icer</i> ^{-/-} for	5'- CTTTCATGAGCTACAACCTCTG -3'	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<i>Icer</i> ^{-/-} rev	5'- AGATCACTGCCTTAGTCAAC -3'	
<i>Icer</i> ^{fl/fl} for	5'- CTTTCATGAGCTACAACCTCTG -3'	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<i>Icer</i> ^{fl/fl} rev	5'- AGATCACTGCCTTAGTCAAC -3'	
<i>Gpr65</i> KO for	5'- GCCTGAAGAACGAGATCAGC -3'	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<i>Gpr65</i> KO rev	5'- TGGACCATCCAGAGACTGC -3'	
<i>Gpr65</i> WT for	5'- GACTAAGAGGTGGAGGCAGGT -3'	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<i>Gpr65</i> WT rev	5'- GACTGATGCAGGCAGACTGA -3'	
<i>LysM-Cre</i> for	5'- CATGTTTCAGGGATCGCCAGGCG -3'	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<i>LysM-Cre</i> rev	5'- TAACCAGTGAAACAGCATTGCTG -3'	

2.7.2 Primer zum Nachweis und zur Quantifizierung von Nukleinsäuren

Tabelle 6: Auflistung der Primer zur Quantifizierung von Nukleinsäuren

Primer	Sequenz	Hersteller
<i>Icer</i> for	5'- ATGGCTGTAACCTGGAGATGAA -3'	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<i>Icer</i> rev	5'- GTGGCAAAGCAGTAGTAGGA -3'	
<i>HGPRT</i> for	5'- GTTGGATACAGGCCAGACTTTGT -3'	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<i>HGPRT</i> rev	5'- GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT -3'	
Random N6 Primer	zufällige Basen	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Oligo (dT) ₁₈ Primer	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)

2.8 Tiere

Alle Mäuse wurden unter Haltungs- und Hygieneformen der Tierhaltungseinrichtung des *Translational Animal Research Center* (TARC) gemäß §1 des TierSchVersV gehalten und gezüchtet. Eine ausreichende Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr wurde *ad libitum* erbracht. Die Mäuse unterlagen einem künstlichen Belichtungsrythmus von 12 Stunden / 12 Stunden (Licht / Dunkelheit). Alle Versuche wurden tierschutzgerecht durchgeführt und durch das deutsche Tierschutzgesetz für Labortiere kontrolliert. Für *in vitro* Versuche wurden Tiere in einem Alter zwischen 6-18 Wochen verwendet. *In vivo* Versuche wurden mit Tieren in einem Alter von 8-16 Wochen durchgeführt. Alle Tiere wurden mithilfe von spezifischen Primern (2.7.1 Primer für die Genotypisierung von Mausstämmen) mittels PCR genotypisiert.

2.8.1 Tierstämme

C57BL/6J – Die Tiere wurden kommerziell von der Firma Charles River Laboratories Inc. oder Envigo bezogen.

IcerKO - *Icer*-defiziente Mäuse mit C57BL/6J Hintergrund stammen aus eigener Zucht.

Icer^{fl/fl} x LysM-Cre – Mäuse mit loxP-flankierten Allelen wurden mit *LysM-Cre* tragenden Tieren gekreuzt. Sie stammen aus eigener Zucht.

Gpr65 KO - *Gpr65*-defiziente Tiere wurden von Jackson Lab bezogen.

2.9 Zelllinien

Die Zelllinie des B16 Melanoms ist Ovalbumin (OVA) exprimierend und wurde von der Mainzer Wissenschaftsallianz *Translational Oncology Mainz* (TrOn) zur Verfügung gestellt. Sie dient als murines Modell für das humane Melanom. Die Zelllinie für das MC38 Kolonadenokarzinom wurde vom Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz, bezogen.

2.10 Antikörper und Antagonisten

Tabelle 7: Bezugsliste der Antikörper für FACS-Analysen

Antikörper	Klon	Hersteller
anti-Arg1	A1exF5	Invitrogen Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
anti-CD11b	M1/70	BioLegend (San Diego, USA)
anti-CD11c	N418	BD (Heidelberg, Deutschland)
anti-CD25	PC61	BD (Heidelberg, Deutschland)
anti-CD206	MR6F3	Invitrogen Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
anti-CD3	17A2	BioLegend (San Diego, USA)
anti-CD4	GK1.5	BD (Heidelberg, Deutschland)
anti-CD45 pan	30-F11	BioLegend (San Diego, USA)
anti-CD8	53-6.7	BioLegend (San Diego, USA)
anti-F4/80	BM8	BioLegend (San Diego, USA)
anti-Foxp3	FJK-16s	eBioscience (Frankfurt am Main, Deutschland)
anti-Ly6C	HK1.4	BioLegend (San Diego, USA)
anti-Ly6G	1A8	BD (Heidelberg, Deutschland)
anti-MHCII	M5/114.15.2	BD (Heidelberg, Deutschland)
anti-NK1.1	PK136	BioLegend (San Diego, USA)

Tabelle 8: Bezugsliste der *in vivo* neutralisierenden Antikörper

Antikörper	Klon	Hersteller
anti-Ly6G	1A8	BioXcell (Eching, Deutschland)
Rat IgG2a, κ	2A3	BioXcell (Eching, Deutschland)
anti-rat κ light chain	MAR 18.5	BioXcell (Eching, Deutschland)
Mouse IgG2a, κ	C1.18.4	BioXcell (Eching, Deutschland)
anti-PD1	RPM1-14	BioXcell (Eching, Deutschland)

Tabelle 9: Bezugsliste der Antagonisten

Antagonist	Hersteller
CXCR2-Antagonist SB225002	Hycultec (Beutelsbach, Deutschland)

2.11 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten, welche Zellkulturen betreffen, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für diesen Zweck wurde unter Sterilbänken gearbeitet. Die Kultivierung der Zellen fand in einem Inkubator bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % statt.

2.11.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in einem definierten Volumen in Medium aufgenommen und 10 µl der Zellsuspension in 90 µl Trypanblau verdünnt. Der Verdünnungsfaktor (V) betrug dabei 1:10. Tote Zellen besitzen keine intakte Zellwand mehr, wodurch der Farbstoff in die Zelle eindringen kann und diese blau markiert. Lebende Zellen blieben ungefärbt. Unter dem Lichtmikroskop lassen sich durch diesen Farbunterschied tote von lebenden Zellen unterscheiden. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die lebenden, ungefärbten Zellen (N) gezählt und die Summe aller Zellen mit nachfolgender Formel berechnet. Die verwendete Zählkammer besaß einen Kammerfaktor (K) von 10⁴.

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = N \times K \times V$$

2.11.2 Anreinigung, Differenzierung und Kultivierung von Makrophagen aus dem Knochenmark

Um Makrophagen aus Knochenmarkszellen, sogenannte *bone marrow-derived macrophages* (BMDM), zu gewinnen, wurden zunächst Knochenmarkszellen aus Röhrenknochen der Hinterbeine der Maus isoliert. Dafür wurden Femur und Tibia der Maus präpariert und von Muskelgewebe frei gelegt. Der Knochenschaft war zu öffnen, um an das Knochenmark zu gelangen. Mittels Kanüle und Spritze wurde das Zellgewebe von dem Knochen getrennt. Die Knochenmarkszellen wurden in MEM aufgefangen, resuspendiert und die Erythrozyten lysiert. Dafür wurde die Zellsuspension für 2 min mit 2 ml, 37 °C warmen Gey's Lysepuffer versetzt. Die Lyse der Erythrozyten wurde mit 4-fachem Überschuss an MEM gestoppt. Die Zellen wurden über ein Zellsieb (0,40 µm) in ein sauberes Falcon überführt und die Anzahl lebender Zellen wurde bestimmt und in Makrophagenmedium (2.5 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien) aufgenommen. 3x10⁶ Zellen wurden pro well pro 1 ml in einer 6-well-Platte ausplattiert, mit 4 ml Makrophagenmedium aufgefüllt und im Brutschrank für 6 Tage kultiviert. An Tag 3 wurde das Makrophagenmedium gewechselt, indem etwa die Hälfte des vorhandenen Mediums abgesaugt und mit neuem Medium aufgefüllt worden ist. An Tag 5 wurden weitere 2 ml Makrophagen-Medium zugegeben und am darauffolgenden Tag konnten die ausdifferenzierten Makrophagen für Versuche verwendet werden.

2.11.3 Kultivierung von Makrophagen unter sauren Bedingungen

Je 1×10^6 Zellen wurden pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Alternativ betrug die Zellzahl für einen kleineren Versuchsansatz 6×10^5 Zellen pro Well einer 48-Well-Platte. Diese wurden in einer 25 mM Salzsäurelösung für 8 Stunden bei 37 °C kultiviert. Dies entspricht einem pH-Wert von 6,1. Die Salzsäurelösung wurde in TM10 hergestellt. Das Gesamtvolumen eines Wells einer 24-Well-Platte betrug 1 ml; das der 48-Well-Platte 500 µl.

2.11.4 Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Tumorzellen der verwendeten Zelllinien wurden in Einfriermedium (2.5 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien) in Stickstofftanks lagert. Um die Zellen in Kultur aufzunehmen, wurden sie zunächst 2 min im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in das jeweilige Medium überführt, resuspendiert und bei 300xg 7 min zentrifugiert. Nach Wiederaufnahme der Zellpellets im entsprechenden Medium, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen ausplattiert.

2.11.4.1 B16 Melanomzellen

Die Kultivierung der B16 Melanomzellen fand in Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37 °C unter 5 % CO₂ statt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70-80 % erreicht haben, wurden sie gesplittet. Dafür wurde zunächst der Überstand an B16 Kulturmedium (2.5 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien) mit darin enthaltenden nicht adhären Zellen abgesaugt. Die adhären Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit Accutase (1 ml Accutase / 10 ml Medium) vom Flaschenboden getrennt. Sobald sich die Zellen vom Boden lösten, wurde die Accutase durch 4-fachen Überschuss an Medium inaktiviert. Die Zellen wurden bei 300xg 5 min pelletiert und die Anzahl an lebenden Zellen wurde bestimmt. Anschließend wurden die Zellen nach Bedarf verdünnt und wieder in einer Zellkulturflasche ausplattiert. Die B16 Zellen wurden zusätzlich mit 300 µg / ml G418 unter Selektionsdruck gesetzt, da die B16 Zelllinie ein Ovalbumin (OVA)-tragendes Peptid enthält, welches eine Geneticin-Resistenz trägt. Einen Tag vor Verwendung der Zellen wurde der Zusatz an G418 weggelassen.

2.11.4.2 MC38 Kolonadenokarzinomzellen

Die Kultivierung der MC38 Kolonadenokarzinomzellen unterschied sich kaum von der Kultivierung der B16 Zellen. Lediglich das MC38 Kulturmedium (2.5 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien) ist in der Zusammensetzung abweichend.

2.12 *In vivo* Tumormodelle mit B16 Melanom- und MC38 Kolonadenokarzinomzellen

2.12.1 Inokulation von Tumorzellen

Die Tumorzellen wurden mit einer Konfluenz von 70-80 % mittels Accutase geerntet. Dafür wurde der Überstand an Medium abgesaugt und die Zellen wurden in der Zellkulturflasche mit PBS gewaschen. Anschließend wurde Accutase (1 ml Accutase / 10 ml Medium) auf die Zellen gegeben und so lange inkubiert, bis sie sich vom Flaschenboden lösten. Nachdem alle Zellen gelöst waren, wurde die enzymatische Reaktion mit einem 4-fachem Überschuss an Medium gestoppt. Die gelösten Zellen wurden in ein 50 ml Falcon überführt, bei 300xg 5 min zentrifugiert und die Anzahl an lebenden Zellen wurde bestimmt. Es wurden 2×10^5 B16 Melanomzellen oder 1×10^6 MC38 Kolonadenokarzinomzellen in je 100 μ l PBS in die Flanke der Maus injiziert. Die Injektion erfolgte subkutan.

Um die Tiere vor dem Eingriff zu narkotisieren, wurde ihnen eine Ketamin-Rompun®-Narkoselösung verabreicht (2.5 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien). Bei den in Narkose liegenden Tieren wurde die rechte oder die linke Flanke rasiert und die Augen wurden mit Bepanthen® Augen- und Nasensalbe bestrichen, um sie vor dem Austrocknen zu schützen.

2.12.2 Messung der Tumorgröße

Die Größe des Tumors wurde ab Tag 7 nach Inokulation der Tumorzellen ermittelt. Die Tumorentwicklung wurde alle zwei Tage protokolliert, bis zum Zeitpunkt der Tumorentnahme. Gemessen wurde mit Zuhilfenahme einer Schieblehre, dabei wurden die Länge und die Breite des Tumors bestimmt. Je nach Wachstum des Fells, wurde die Flanke erneut rasiert. War der Tumor zwar sichtbar, jedoch keine Messung der Größe mit der Schieblehre möglich, wurde sowohl die Länge, als auch die Breite des Tumors als 1 definiert. Das Tumolvolumen wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Tumolvolumen} = (\text{Breite})^2 \times \text{Länge} \times 0,5$$

2.12.3 Behandlung der tumortragenden Tiere mit Neutrophilen-depletierendem Antikörper

Um Neutrophile *in vivo* zu depletieren wurde den Tieren ein neutralisierender Antikörper injiziert. Entsprechend eines Protokolls von Boivin et al. (*Nature Communication*, 2020), begann die Behandlung einen Tag nach der Inokulation von Tumorzellen und erfolgte daraufhin täglich (Abbildung 4).⁸⁶ Dabei wurde ein monoklonaler anti-Ly6G Antikörper (BioXcell, 2.10 Antikörper und Antagonisten) verwendet, welcher intraperitoneal injiziert wurde. Es wurden ab Beginn der Injektion 7 Tage lang 25 µg des Antikörpers injiziert, gelöst in entsprechendem Puffer IP0070 (BioXcell, 2.4 Reagenzien und Medienzusätze). Insgesamt wurde pro Injektion ein Gesamtvolumen von 100 µl verabreicht. Nach Ablauf der ersten 7 Tage wurde die Menge des applizierten Antikörpers auf 50 µg erhöht. Tieren der Kontrollgruppe wurde der korrespondierende Isotyp des Antikörpers (BioXcell, 2.10 Antikörper und Antagonisten) in der gleichen Menge verabreicht, gelöst im Puffer IP0065 (BioXcell, 2.4 Reagenzien und Medienzusätze). Aufgrund der raschen Mobilisierung der Neutrophilen aus dem Knochenmark und zusätzlich geringerer Ly6G-Expression auf neu generierten Neutrophilen, wurde ein sekundärer Antikörper anti-rat K light chain (BioXcell, 2.10 Antikörper und Antagonisten) verwendet. Dadurch wird die Behandlung mit dem anti-Ly6G Antikörper verstärkt und eine effiziente und andauernde Depletion der neutrophilen Granulozyten *in vivo* gewährleistet.⁸⁶ Mit der Injektion des Sekundärantikörpers wurde einen Tag nach Inokulation der Tumorzellen begonnen und erfolgte alle 48 Stunden. Dabei wurden 50 µg des Antikörpers gelöst in 100 µl des Puffers IP0070 (BioXcell, 2.4 Reagenzien und Medienzusätze) appliziert. Zwischen zwei Injektionen erfolgte eine Wartezeit von mindestens 2 Stunden.

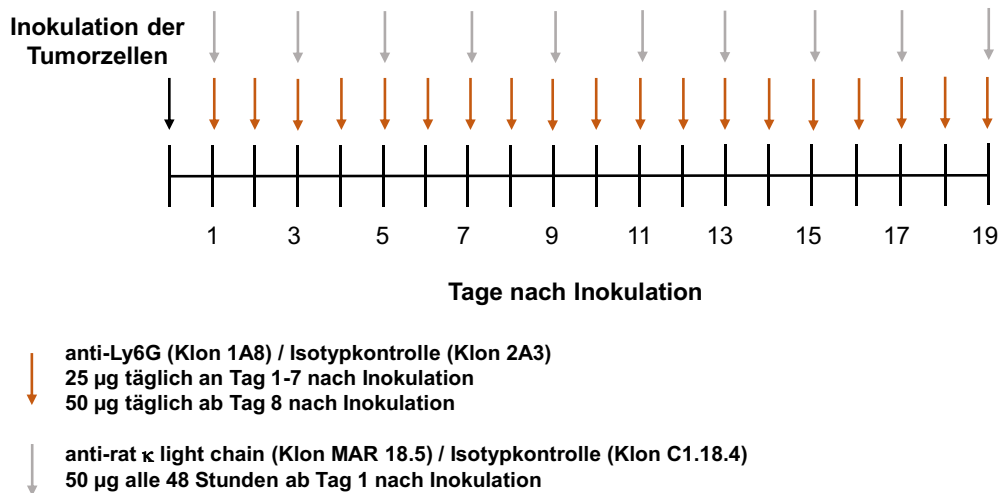


Abbildung 4: Behandlungsschema zur Depletion von Neutrophilen.

Die Depletion von Neutrophilen erfolgte über die tägliche Gabe eines anti-Ly6G Antikörper. Alle 48 Stunden erfolgte die zusätzliche Gabe eines sekundären anti-rat κ light chain Antikörpers zur Verstärkung der Wirkung. Die Kontrolltiere wurden mit den entsprechenden Isotypkontrollen behandelt.

2.12.4 Behandlung der tumortragenden Tiere mit einem CXCR2-Antagonisten

Zur Inhibierung der CXCR2-CXCL-Achse wurde der CXCR2-Antagonist SB225002 (MedChemExpress, 2.10 Antikörper und Antagonisten) verwendet. Einen Tag nach der subkutanen Inokulation von Tumorzellen begann eine tägliche Behandlung mit dem Antagonisten. Die Injektion erfolgte intraperitoneal mit 10 mg des Antagonisten pro 1 kg Körpergewicht der Maus in einem Gesamtvolumen von 100 µl PBS. Der Antagonist wurde in 1 % DMSO, 20 % PEG 400, 5 % Tween 80 und 74 % ddH₂O gelöst. Den entsprechenden Kontrolltieren wurden ausschließlich 100 µl PBS verabreicht (Abbildung 5).

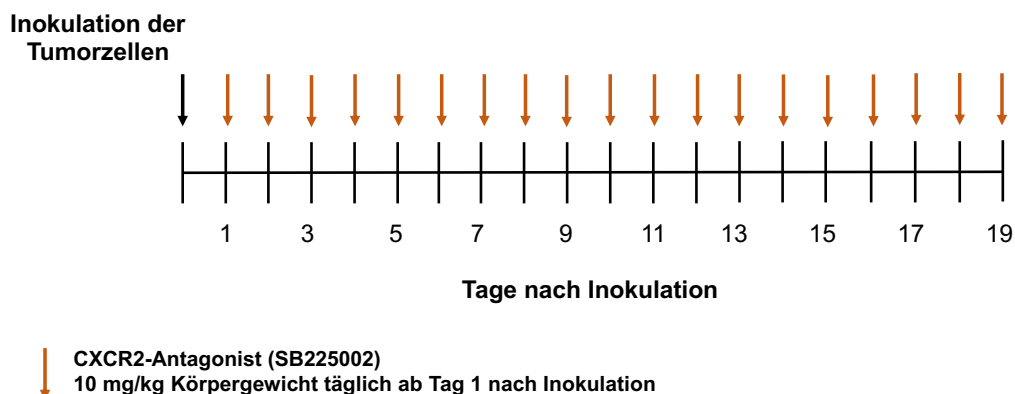


Abbildung 5: Behandlungsschema zur CXCR2-Blockade.

Zum Blockieren des CXCR2-Rezeptors wurde der Antagonist SB225002 täglich intraperitoneal verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten PBS.

2.12.5 Behandlung des B16 Melanoms mit einer Immun-Checkpoint-Blockade (ICB) mittels anti-PD1 Antikörper

Die intravenöse Injektion von anti-PD1 Antikörper (BioXcell, 2.10 Antikörper und Antagonisten) begann einen Tag nach der Inokulation der Tumorzellen. Die Mäuse wurden zweimal pro Woche mit 10 mg des Antikörpers pro 1 kg Körpergewicht der Maus behandelt (Abbildung 6). Die Kontrollgruppe erhielt eine IgG2a Isotypkontrolle (BioXcell, 2.10 Antikörper und Antagonisten). Der anti-PD1 Antikörper wurde im Puffer IP0070 (BioXcell, 2.4 Reagenzien und Medienzusätze) gelöst, die Isotypkontrolle in IP0065 (BioXcell, 2.4 Reagenzien und Medienzusätze).

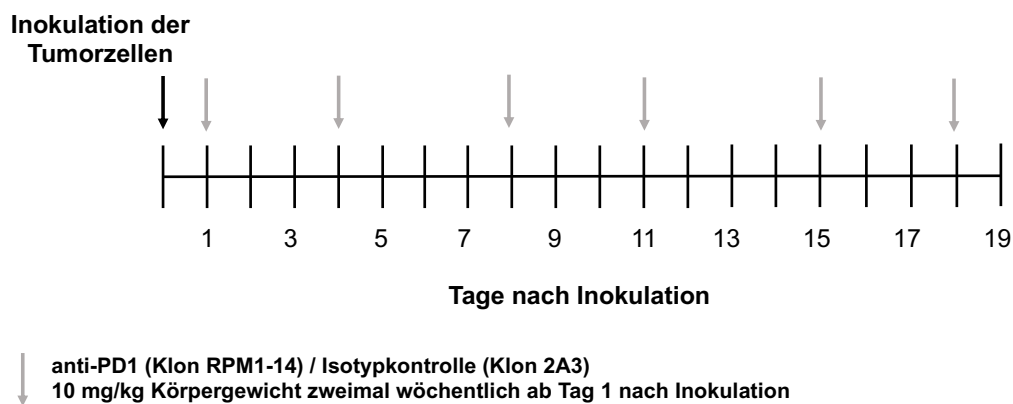


Abbildung 6: Behandlungsschema zur Immun-Checkpoint-Blockade.

Zur ICB wurde zweimal pro Woche ein anti-PD1 Antikörper intravenös verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten eine Isotypkontrolle.

2.12.6 Behandlung des B16 Melanoms mit einer Kombinationstherapie aus CXCR2-Antagonisten und der ICB

Mit der Kombinationstherapie aus CXCR2-Antagonisten und der ICB wurde ebenfalls einen Tag nach Inokulation der Tumorzellen begonnen. Die Behandlung erfolgte parallel gemäß der in Abschnitt 2.12.4 und 2.12.5 beschriebenen Angaben (Abbildung 7).

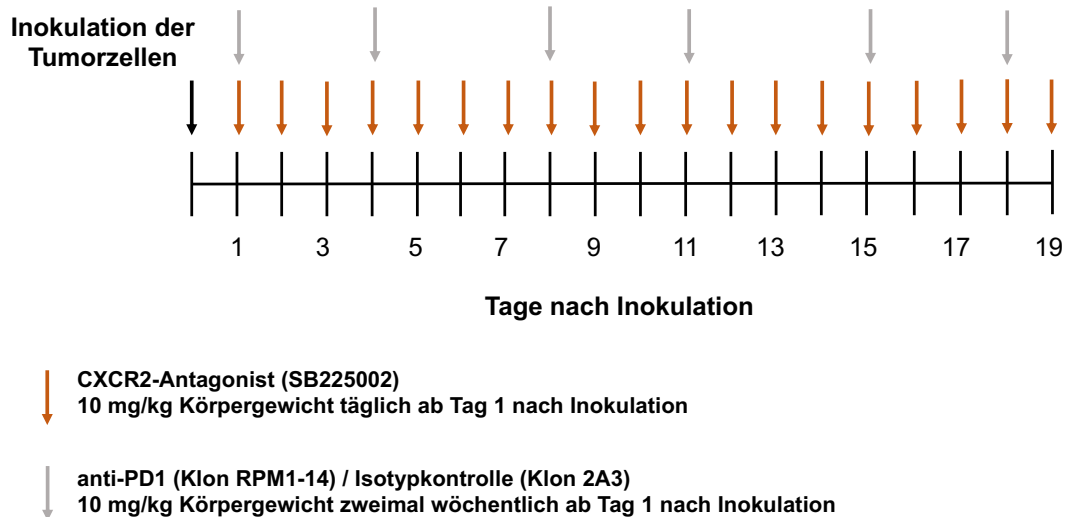


Abbildung 7: Behandlungsschema zur Kombinationstherapie von CXCR2-Antagonisten und ICB mittels anti-PD1.

Zum Blockieren des CXCR2-Rezeptors wurde der Antagonist SB225002 täglich intraperitoneal verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten PBS. Zusätzlich erfolgte die ICB zweimal pro Woche durch einen anti-PD1 Antikörper intravenös. Die Kontrolltiere erhielten eine Isotypkontrolle.

2.13 *Ex vivo* Tumoraufarbeitung

Um eine Einzelzellsuspension des Tumors herzustellen, musste zunächst das Tumorgewebe aus der Maus präpariert werden. Für die Tumorentnahme wurde die Maus unter CO₂-Gaseinleitung abgetötet. Anschließend wurde die Oberhaut bauchwärts aufgeschnitten und die Haut vom Muskelgewebe getrennt, so dass der Tumor von der Innenseite der Haut mit einem Skalpell zu entnehmen war. Es wurde darauf geachtet, den Tumor nicht zu verletzen und diesen im Ganzen zu entfernen. Die Tumore wurden entweder in kleinen Petrischalen aufgefangen oder direkt in Enzymlösung des *Tumor Dissociation Kits* (2.6 Kits) aufgefangen. Anschließend wurde der Tumor in der Petrischale bzw. in der Enzymlösung mit einer Schere zerkleinert. Im weiteren Verlauf der Aufarbeitung wurde sich an das Protokoll des Herstellers gehalten.

2.13.1 Blutentnahme

Die Entnahme von Blut erfolge *post mortem* aus dem Herzen. Dafür wurde direkt nach dem Euthanasieren der Maus die Brusthöhle mit einer kleinen spitzen Schere offengelegt, um Zugang zum Herzen zu bekommen. Dafür wurde das Brustbein aufgeschnitten. Anschließend wurde die linke Herzkammer angeschnitten und das auslaufende Blut wurde mit einer Pipette aufgefangen, noch bevor es gerinnt. Wurde das Blut für eine FACS-Analyse benötigt, so wurde es in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in welchen sich 1 ml EDTA befand. Dies hemmt die Blutgerinnung. Anschließend wurde das Gemisch in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt, in welchem 4 ml ACK-Puffer (2.5 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien) vorgelegt wurden. Dieses Gemisch wurde 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei 200xg 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 50 µl großem MACS (GM)-Puffer aufgenommen und in eine Spitzbodenplatte überführt. Anschließend wurde mit der FACS-Färbung fortgefahren (2.14.1 Oberflächenfärbung).

2.13.2 Isolierung von TAM

Die Isolierung von TAM erfolgt über das Verfahren der magnetischen Separation (*Magnetic Activated Cell Sorting*, MACS). Die Durchführung basiert auf der Sortierung von magnetisch markierten Zellen einer Zellsuspension. Dabei binden magnetische MicroBeads an spezifische Strukturen auf den Zielzellen und werden dadurch in einer Säule, die von einem starken Magnetumfeld umgeben ist, zurückgehalten. Die markierte Zellpopulation bleibt damit in der Säule haften und kann nach Entfernen aus dem magnetischen Umfeld durch Spülen der Säule eluiert werden.

Um TAM zu separieren, wurden anti-F4/80 *Micro Beads* verwendet. Hierfür musste zunächst die Gesamtzellzahl der Einzelzellsuspension aus der Tumormasse (2.13 *Ex vivo* Tumoraufarbeitung) ermittelt werden. Je 1×10^7 Zellen wurden in 90 µl MACS-Puffer (2.5 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien) aufgenommen und mit 10 µl anti-F4/80 *Micro Beads*, ebenfalls pro 1×10^7 Zellen, vermengt. Nach Resuspendieren wurde für 15 min im Kühlschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde auf ein finales Volumen von 1 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und über eine Separationssäule gegeben. Je nach Menge der enthaltenen Zellen wurde zwischen MS- und LS-Säulen gewählt. Nachdem die Probe durch die Säule gelaufen war, wurde diese noch weitere 3-mal mit 500 µl (MS-Säule) bzw. 1 ml (LS-Säule) MACS-Puffer gewaschen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Säulen nicht trocken liefen. Nach den Waschvorgängen wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und auf ein

15 ml-Reaktionsgefäß gesetzt. Die markierten Zellen wurden anschließend mit 1 ml (MS-Säule) bzw. 3 ml (LS-Säule) MACS-Puffer mithilfe eines Stempels aus der Säule gedrückt.

2.13.3 Isolierung der CD45⁺-Immunzellen

Die Isolierung der CD45⁺-Zellpopulation aus der Tumormasse erfolgte ebenfalls nach dem Prinzip des magnetischen Sortierens. Es wurde genauso vorgegangen wie bei der Isolierung der TAM, jedoch wurden hierbei anti-CD45 (TIL) *Micro Beads* verwendet.

2.14 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmarkern auf Zellen, sowie deren intrazellulären Proteine. Grundlage dieser Methode ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei binden fluoreszenzmarkierte Antikörper Proteine auf oder in den Zellen und markieren sie dadurch. Die Zellen können dadurch von einem gebündelten Laserstrahl erfasst werden. Bei exakter Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe werden diese auf ein höheres Energieniveau angehoben. Nach Passieren des Laserstrahls fallen sie auf ihr Ursprungsniveau zurück und emittieren Licht bestimmter Wellenlänge. Dieses wird dann in ein elektrisches Signal umgewandelt, so dass jeder Farbstoff über ein charakteristisches Emissionsspektrum verfügt. Weiterhin wird der Lichtstrahl durch die markierte Zelle gestreut. Vorwärts gestreutes Licht (*forward scatter*, FSC) dient dabei als Maß für die relative Größe der Zelle. Seitwärts gestreutes Licht (*side scatter*, SSC) stellt die Granularität der Zelle dar. Die verwendeten Antikörper zur Analyse von Einzelzellsuspensionen sind in Abschnitt 2.10 aufgelistet.

Die Durchflusszytometrie bietet auch die Möglichkeit Zellen zu sortieren. Dabei ist den Fluoreszenzdetektoren ein elektrostatischer Sortiermechanismus nachgeschaltet. Der Flüssigkeitsstrom wird in kleinste Tröpfchen unterteilt, in welche genau eine Zelle passt. Dieses Tröpfchen durchläuft das elektrische Feld und wird polarisiert und in ein Gefäß gelenkt.

2.14.1 Oberflächenfärbung

Die Zellen wurden zunächst in eine 96-well Spitzbodenplatte überführt und zweimal mit 75 µl GM-Puffer gewaschen. Zentrifugiert wurde bei 300xg für 2 min. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl Oberflächenfärbelösung aufgenommen. Diese bestand aus den fluoreszenzmarkierten Antikörpern gelöst in GM-Puffer. Nach Inkubation von 15 min bei 4 °C im Dunkeln wurde erneut zweimal gewaschen und mit den nächsten Schritten fortgefahren. Sobald Zellen jedoch durchflusszytometrisch sortiert werden sollten, wurde auf die folgenden Schritte verzichtet und die Zellen wurden in 200 µl GM-Puffer zum Sortieren aufgenommen.

2.14.2 Fixierung und Permeabilisierung

Zur Fixierung wurden die Zellen mit 50 µl *FixPerm* für 30 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit Permeabilisationspuffer gewaschen. Zentrifugiert wurde bei 300xg für 2 min. Sofern keine intrazelluläre Färbung vorzunehmen war, wurden die Zellen in 100 µl GM-Puffer zur Analyse aufgenommen. Ansonsten wurde mit dem nächsten Schritt fortgefahren.

2.14.3 Intrazellulärfärbung

Das Zellpellet wurde in 50 µl Intrazellulärfärbung aufgenommen und 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisationspuffer gewaschen und in 100 µl GM-Puffer zur Analyse aufgenommen. Zentrifugiert wurde bei 300xg für 2 min.

2.14.4 Kompensation

Überlagern sich die Emissionsspektren mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe, so führt dies zu falsch positiv interpretierten Signalen. Daher ist es wichtig die Farbstoffe zu kompensieren. Die Kompensation ermöglicht es, Signale eines Kanals von anderen Kanälen zu isolieren. Dafür wurden je 10 µl Kompensationsbeads mit 1 µl des zu kompensierenden Antikörpers vermengt und das Emissionsspektrum gemessen. Über die FACSDiva® Software wurde die Kompensation anschließend berechnet und erstellt.

2.15 Probenaufarbeitung für Sekretomanalysen

Sekretierte Proteine bilden eine große und biologisch wichtige Untergruppe von Proteinen, die an der zellulären Kommunikation beteiligt sind. Durch massenspektrometrische Analysen können diese Proteine detektiert werden. Dabei überführt ein Massenspektrometer Peptide in die Gasphase, ionisiert sie mittels Elektrospray-Ionisation und trennt die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) auf. Ein nachgeschalteter Detektor identifiziert die ionisierten Peptidfragmente.

Für die Aufarbeitung der zu analysierenden Proben wurden zunächst Tumore isoliert und in 2-3 mm³ große Stücke zerkleinert. Die Gewebeproben wurden für 18 Stunden in Depletionsmedium (2.5 Lösungen, Puffer und Zellkulturmedien) und als Kontrolle in DMEM bei 37 °C inkubiert. Das Depletionsmedium enthielt keinen Zusatz an Methionin, jedoch die analoge Aminosäure AHA (L-Azidohomoalanin). Neu synthetisierte Proteine bauten daraufhin AHA in die Peptidsequenz ein und konnten demnach selektiert werden. Anschließend wurde der Überstand der Tumore gesammelt und mit Proteaseinhibitor versetzt. Das Medium wurde durch Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Schwellenwert von 3 kDa auf ca 250 µl aufkonzentriert, indem bei 4 °C und 300xg 90 min zentrifugiert wurde. Die folgenden Schritte erfolgten nach dem *Click Chemistry Capture Kit* (2.6 Kits) von JenaBioscience. Dabei bediente man sich einer Methode der Click-Chemie. Die Proteine wurden kovalent durch eine Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloadditionsreaktion gebunden. Dafür wurden sie vorab durch den Einbau von AHA mit einer Azidogruppe markiert und anschließend an ein Agarosegel gebunden. Die kovalent gebundenen Proteine werden mit hoher Stringenz gewaschen, wodurch alle nicht spezifisch gebundenen Proteine praktisch eliminiert werden. Nach einem Proteaseverdau ergibt sich ein hochreiner Pool an Peptiden, der sich ideal für die massenspektrometrische Analyse einsetzen lässt.

2.16 qRT-PCR

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) erlaubt es DNA-Sequenzen zu amplifizieren und quantifizieren. Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzmessungen, welche während eines Reaktionszyklus in Echtzeit aufgenommen werden. Je höher die anfängliche Menge vorhandener DNA, desto früher wird ein Anstieg der Fluoreszenz erfasst. Um die DNA von Zellen zu vervielfältigen, wurde zunächst RNA aus diesen Zellen isoliert (2.16.1 RNA-Isolierung) und in cDNA umgeschrieben (2.16.2 cDNA-Synthese). Anschließend folgte die Vervielfältigung der cDNA (2.16.3 Amplifizierung der cDNA).

2.16.1 RNA-Isolierung

Zunächst muss die RNA aus den Zellen isoliert werden. Dafür wurde der Überstand von adhären Zellen eines Wells abgenommen und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Tri-Reagent auf die Zellen, wurden diese vom Plattenboden gelöst und lysiert. Anschließend wurde gut resuspendiert, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren, und das Zelllysate in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzem Vortexen und 5 min Inkubation wurde zu jeder Probe 200 µl Chloroform zugegeben und erneut gut durchmischt und für 5 min inkubiert. Nachfolgende Zentrifugation in einer gekühlten Zentrifuge für 15 min bei 4 °C erlaubte die Phasentrennung des Lysats. Zu erkennen waren 3 Phasen. Die obere, wässrige Phase enthielt die RNA. Diese Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ohne dabei die anderen Phasen zu überführen. Die Interphase enthält die DNA und in der unteren, organischen Phase befinden sich Lipide und Proteine. Zu der überführten, wässrigen Lösung wurden 1,5 µl Glykogen zugegeben, welches als Trägersubstanz für die RNA diente, invertiert und weitere 5 min inkubiert. Im Anschluss wurden 500 µl Isopropanol zugegeben, gevortext und nochmals für 10 min inkubiert. Die ausgefallene RNA wurde durch Zentrifugieren bei 300xg unter 4 °C für 10 min pelletiert und der Überstand abgegossen. Daraufhin wurde das Pellet zweimal mit 1 ml eiskaltem 75%igem Ethanol gewaschen und für etwa 5-10 min luftgetrocknet, bis es einen leichten Glanz gewonnen hat. Das Pellet wurde zum Schluss in 11 µl RNase-freiem Wasser für 5-10 min bei 55 °C im Wasserbad gelöst. Die RNA wurde zur cDNA-Synthese weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert. Die quantitative und qualitative Bestimmung der extrahierten RNA wurde am Quickdrop Spektrometer (San Jose, USA) gemessen. Diese Methode der RNA-Isolierung wurde durchgeführt, sofern die gewonnene RNA für qRT-PCR eingesetzt wurde. Wurden die Proben jedoch für Sequenzierungsanalysen verwendet, so wurde die RNA mithilfe des *RNAeasy Micro Plus Kits* (2.6 Kits) isoliert. Dabei wurde sich an das beigelegte Protokoll gehalten.

2.16.2 cDNA-Synthese

Die cDNA wurde mittels reverser Transkription synthetisiert. Dafür wurde 400 ng der gewonnenen RNA eingesetzt, welche in 11 µl RNase freiem Wasser gelöst war. Je 20 µl des Reaktionsansatzes wurden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die synthetisierte cDNA mit 80 µl autoklaviertem Wasser verdünnt. Die cDNA wurde anschließend in einer qRT-PCR amplifiziert oder bei -20 °C gelagert. Für Proben, die eine geringere Menge als 400 ng RNA aufwiesen, wurde das qScriber® Kit (2.6 Kits) zum Umschreiben in cDNA verwendet. Dabei wurde sich an das beigelegte Protokoll gehalten.

Tabelle 10: 20 µl Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Reagenz	Menge [µl]
5x Reaktionsbuffer RT	4
dNTPs	2
Oligo (dT) ₁₈ Primer	1
Hexamer N6 Primer	1
RevertAid Reverse Transkriptase	1
RNA (400 ng)	11

2.16.3 Amplifizierung der cDNA

Zur Amplifizierung der cDNA diente die Polymerase-Kettenreaktion. In einem ersten Schritt wird dabei die DNA temperaturabhängig in ihre Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt hybridisieren die Oligonukleotide, sogenannte Primer (2.7.2 Primer zum Nachweis und zur Quantifizierung von Nukleinsäuren), mit den Einzelsträngen der DNA (Primerhybridisierung). Der dritte Schritt dient der Synthese des gegenläufigen Strangs mittels Polymerasen (Amplifikation). Die Wiederholung dieser drei Schritte führt zur Amplifizierung der Gensequenz, welche durch die Primer definiert ist. Bei der qRT-PCR bedient man sich zusätzlich eines fluoreszierenden Farbstoffes, welcher sich an die neu synthetisierte DNA anlagert. Dadurch kann anhand der Zykluswiederholungen auf die Menge der zu Beginn eingesetzten DNA rückgeschlossen werden, da die Amplifizierung der Zielsequenz zu einer Erhöhung der Fluoreszenz führt. Diese wiederum ist proportional zur Menge der synthetisierten DNA in jedem neuen Zyklus.

In dieser Arbeit wurde die quantitative Expression von *Icer* in Zellproben nachgewiesen. Die ermittelte DNA-Menge des *Icer*-Gens wurde auf die zusätzlich ermittelte Menge an DNA des Haushaltgens *Hgprt* normalisiert. Somit stellt sich die *Icer*-Expression als relative Expression dar. Jede Probe wurde in Triplikaten untersucht. Der Reaktionsansatz für ein Triplikat ist in Tabelle 11 aufgelistet. Das Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes betrug 20 µl.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für Triplikate einer qRT-PCR

Reagenz	Menge [μ l]
Nukleasese-freies Wasser	40
5x qPCR Mix EVA Green	12,5
Primer-Mix (for und rev Primer; 5 pmol/ μ l)	3,2
DNA	8

Das qRT-PCR Programm für die Amplifizierung der DNA wird im Folgenden beschrieben. Verwendet wurde dafür der Cyclor Step One Plus (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland).

Tabelle 12: qRT-PCR Programm zur Bestimmung von *Icer*

	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Warteposition	95 °C	15 min	1
Zyklus	Denaturierung 95 °C	30 s	40
	Primerhybridisierung 67 °C	30 s	
	Amplifikation 72 °C	1 min	
Erstellung der Schmelzkurven	95 °C	10 s	1
	60 °C	1 min	1
	95 °C	15 s	1

2.17 Next Generation Sequencing (NGS)

Für die Transkriptomanalysen wurde die Methode des *Next Generation Sequencing* angewandt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Sequenzieransätze angewandt. Das *Bulk Sequencing* und das *Single-cell Sequencing*. Während das *Bulk Sequencing* das Genexpressionsmuster auf Populationsebene untersucht, dient das *Single-cell Sequencing* der Analyse von Genexpressionsprofilen einzelner individueller Zellen und gibt detaillierte Auskunft über die Zellheterogenität einer Probe. Für beide Ansätze wurden zunächst die zu untersuchenden Zellen aus Tumorgewebe isoliert (2.13 *Ex vivo* Tumoraufarbeitungen) und anschließend zur höheren Reinheit der Zellpopulation fluoreszenz-sortiert (2.14 Durchflusszytometrie).

2.17.1 Bulk Sequencing

Für das *Bulk Sequencing* wurden die gewonnenen Zellen in Lysepuffer (RLT Buffer, Qiagen) aufgenommen und die RNA mithilfe des *RNEasy Plus Micro Kits* (2.6 Kits) extrahiert. Hierbei wurde sich an das beigefügte Protokoll gehalten. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer bestimmt. Eine Überprüfung auf die Qualität erfolgte mittels einem Bioanalyzer® (Agilent) auf RNA 6000 Pico Chips (Agilent). Um im weiteren Verfahren Transkriptom-Bibliotheken zu erstellen, wurde zunächst die mRNA aus der RNA magnetisch isoliert. Hierfür wurde das *NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Modul* des *NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kits* (Illumina) verwendet (2.6 Kits). Die Synthese der cDNA und die anschließende Präparation der Bibliotheken erfolgte ebenfalls mit dem *NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit*. Dabei wurden 20 ng reine mRNA jeder Probe verwendet. Die Amplifikation der cDNA wurde mit 15 Zyklen durchgeführt. Auch hierbei wurde die Qualität, Quantität und die durchschnittliche Größe der cDNA fluorometrisch überprüft. Die Molarität der Proben wurde auf 10 nM eingestellt und zur Sequenzierung an die Molekulargenetik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz übergeben.

2.17.2 Single-cell Sequencing

Um ein *Single-Cell Sequencing* durchzuführen, wurde ebenfalls mit fluoreszenz-sortierten Zellen gearbeitet. Die Erfassung der Einzelzellen, die Isolierung der RNA und die Synthese der cDNA erfolgte nach dem *BD Rhapsody Single-Cell Analysis System* (2.6 Kits). Bevor die einzelnen Zellen in einer speziellen Kartusche aufgefangen wurden, mussten sie mit einem speziellen *Sample Tag* markiert werden. Dazu bedient man sich der Methode des *Multiplexing*. *Multiplexing* bezeichnet die Markierung der einzelnen Zellen mit einem molekularen *Sample Tag* und das anschließende Mischen dieser Probe mit anderen markierten Proben. Dieser Satz von gemultiplexten Proben kann zusammen verarbeitet werden und nach Erstellung von Transkriptom-Bibliotheken und erfolgter Sequenzierung können die Markierungsinformationen den Zellen zugeordnet werden. Die *Sample Tag*-Zuordnung ermöglicht ebenfalls die Identifizierung von Tröpfchen, die ursprünglich eine oder mehrere Zellen enthielten. Zellen, denen ein bestimmtes Einzel-*Tag* zugewiesen wurde, werden zusammengefasst und rekapitulieren bioinformatisch die einzelnen Proben, die ursprünglich zusammengemischt wurden. Nachdem die Kartusche mit den *Sample-Tag*-markierten Zellen beladen wurde, erfolgte die cDNA-Synthese und die Exonuklease-Behandlung. Das *BD WTA Amplification Kit* (2.6 Kits) diente zur Erzeugung ganzer Transkriptom-Bibliotheken unter Verwendung von Zufallsprimern, gefolgt von der Amplifikation und der Zugabe von

Sequenzieradaptoren. Bei allen Schritten wurde sich an das Protokoll von BD Bioscience gehalten. Nach Amplifikation und Aufreinigung des *Sample Tag*-Produkts und des *Whole Transcriptome Analysis* (WTA)-Produkts wurde nochmals die Qualität und Quantität am Bioanalyzer® überprüft und zur Sequenzierung an das Institut für molekulare Genetik der Johannes Gutenberg-Universität übergeben.

2.18 Bioinformatische Auswertungen

Die bioinformatischen Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit der *Computational Biology and Data Mining Group* des Biozentrums der Universität Mainz. Dafür wurde das Betriebssystem „Linux“ und die Software „Salmon tool“ (Version 0.14.11), sowie „R“ (Version 4.1.2) verwendet. In „R“ wurde mit den Paketen „ComplexHeatmap package“ (Version 2.8.0), „Seurat“ (Version 4.0.0), „SingleR“ (Version 1.4.1) und „CellChat“ (Version 1.1.3) gearbeitet.

Die Visualisierung und Interpretation der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit der *Core Facility NGS* der Universitätsmedizin Mainz. Dabei wurde die Partek Flow Software verwendet.

Für einige Auswertungen der Daten wurden logarithmische Verhältnisse zur Basis 2 verwendet. Es wurden, wenn nicht anders beschrieben, die Log_2 -Verhältnisse der *Fold-Change* dargestellt. Die *Fold-Change* wird in Form von Verhältnissen definiert. Demnach entspricht beispielsweise eine Verdopplung der ursprünglichen Skalierung einem $\text{Log}_2(\text{Fold-Change})$ von 1, eine Vervielfachung einem $\text{Log}_2(\text{Fold-Change})$ von 2. Umgekehrt entspricht die Halbierung eines Wertes einem $\text{Log}_2(\text{Fold-Change})$ von -1 oder eine Viertelung von -2.

2.19 Statistik

Alle Daten sind, wenn nicht anders gekennzeichnet, als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Signifikanzen wurden mit dem studentischen T-Test berechnet, sofern eine Gaußsche Normalverteilung vorlag. Ansonsten wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Sobald die Varianzen eine Signifikanz aufwiesen, wurde eine Welch-Korrektur vorgenommen. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt:

$p > 0,05$ nicht signifikant

* $p \leq 0,05$ signifikant

** $p \leq 0,01$ sehr signifikant

*** $p \leq 0,001$ hoch signifikant

3. Ergebnisse

3.1 Expression von GPR65 auf Zellen der myeloiden Zelllinie

Wissenschaftliche Ergebnisse legten bereits nahe, dass der GPR65 sensitiv auf pH-Wert Änderungen reagiert und damit eine wichtige Rolle in der Erfassung von Protonen in angesäuerten Umgebungen spielt.¹²⁸ Bohn et al. konnten sogar zeigen, dass dieser Rezeptor auf der Oberfläche von B16-infiltrierenden Makrophagen exprimiert wird. Dabei wurden GPR65, GPR132, GPR68, GPR4 und GPR19 auf ihre Expressionshöhe mittels mRNA Sequenzierung (*Bulk Sequencing*) untersucht.²² Um zu klären, in welcher Stärke GPR65 auf Zellen der myeloiden Zelllinie exprimiert ist, wurde zunächst eine öffentlich zugängliche Datenbank genutzt, um nach geeigneten und bereits durchgeführten Studien zu suchen. Das *EMBL's European Bioinformatics Institute* stellt für solche Zwecke den *Single Cell Expression Atlas* zur Verfügung, mit Daten über Genexpressionsmuster aus unterschiedlichsten Projekten und unter verschiedenen biologischen Bedingungen.

Eine Studie des *Tabula Muris* Konsortiums analysierte im Jahr 2018 20 Organe und Gewebeproben von Mäusen mittels *Single-cell Sequencing* („Single-cell RNA-seq analysis of 20 organs and tissues from individual mice creates a Tabula muris“) und erstellte ein Kompendium aus diesen Transkriptomdaten¹²⁹. Dabei wurden 53.759 Zellen dargestellt, welche 82 verschiedenen Zelltypen zugeordnet werden konnten. In Abbildung 8 (A) sind alle Zellen auf Grundlage ihres Genexpressionsmusters in Zelltypen unterteilt und charakterisiert, welche 82 Zellcluster bilden. Abbildung 8 (B) zeigt die Expression des GPR65 über alle Zellcluster hinweg. Dabei wird deutlich, dass hauptsächlich Zellen der myeloiden Zelllinie GPR65 besonders stark exprimieren. Im Einzelnen handelt es sich dabei um die Population der Makrophagen (Cluster 3), der Monozyten (Cluster 2) und der myeloiden Zellen (Cluster 1).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde daher der Fokus auf diesen Zelltyp gelegt, um die Auswirkungen des GPR65 in einem sauren Mikromilieu genauer zu untersuchen. Dafür sollten zwei passende Tumormodelle verwendet werden, welche im Anschluss auf ihre Fähigkeit zur Ansäuerung ihrer Umgebung untersucht wurden.

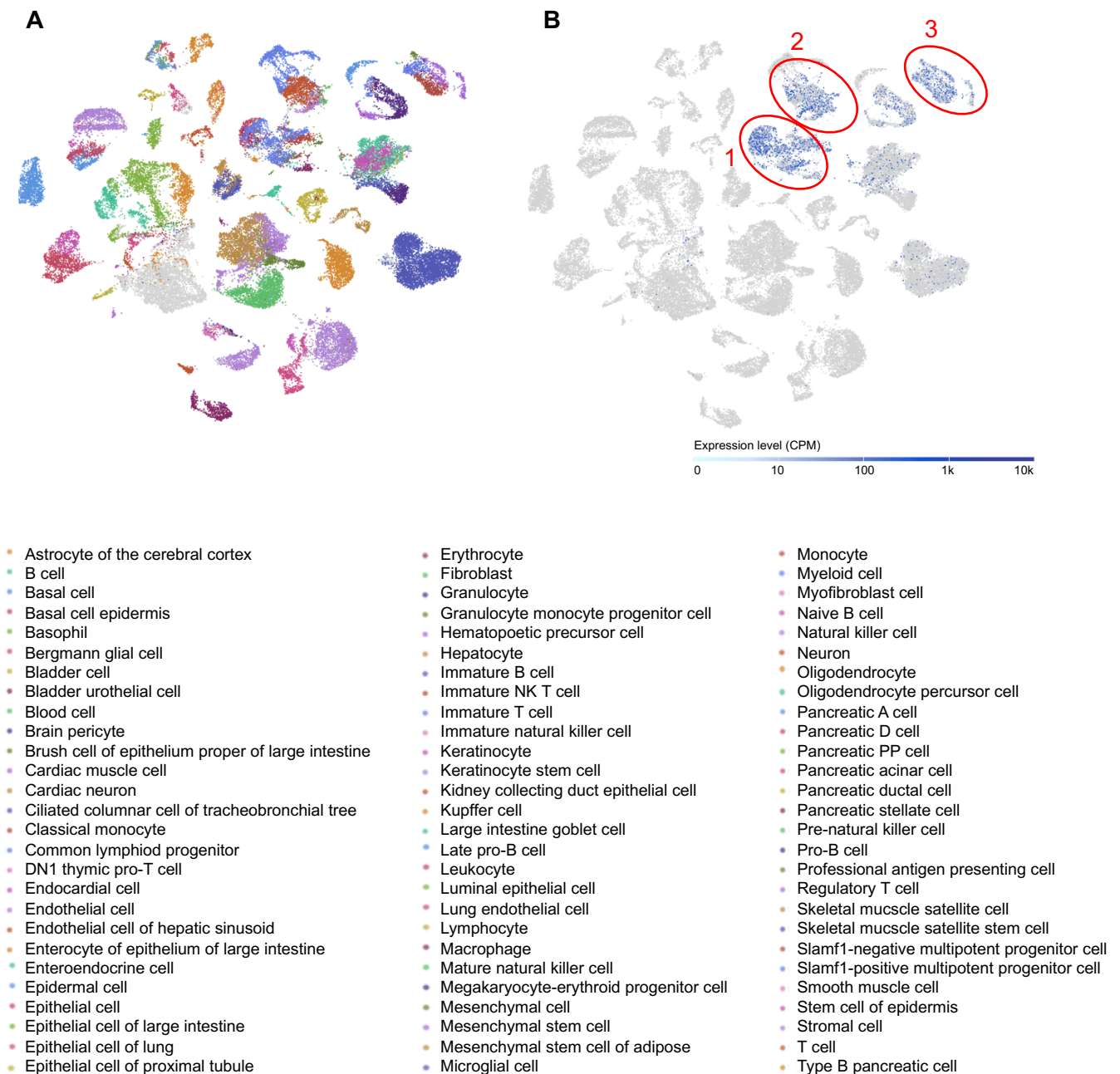


Abbildung 8: Myeloide Zellen weisen eine erhöhte GPR65 Expression auf.

(A) 82 verschiedene Zellpopulationen aus 20 verschiedenen Organen und Geweben der Maus sind in Clustern dargestellt. (B) Die Zellen, welche GPR65 exprimieren sind blau angefärbt. Die Cluster sind rot eingeschlossen. Cluster 1 enthält die myeloide Zellen, Cluster 2 die Monozyten und Cluster 3 die Makrophagen. Dabei entspricht die Intensität der Färbung der Expressionsstärke in CPM (*counts per million*). Die Abbildungen entstammen dem *Single Cell Expression Atlas* des EMBL's *European Bioinformatics Institut*.

3.2 B16 Melanome weisen ein hoch glykolytisches Proteinprofil auf

Melanome weisen eine hohe glykolytische Aktivität auf, die zu einer Übersäuerung des Tumors führt. Dies konnte bereits auf Transkriptomebene durch Analysen des *The Cancer Genome Atlas* von Bohn et al. gezeigt werden.²² Die verstärkte Glykolyse der Melanomzellen korreliert mit einer schlechten Prognose für den Erfolg zur Bekämpfung des Tumors, was darauf hindeutet, dass eine hohe glykolytische Aktivität mit einhergehender Azidose zur Immunevasion beiträgt.^{22,130} Um diese Feststellung in einem Tiermodell auf Proteinebene zu bestätigen, wurde eine Sekretomanalyse durchgeführt. Dabei wurden B16 Melanome und MC38 Kolonadenokarzinome aus Tumor-tragenden Mäusen isoliert und in kleine Gewebestücke zerlegt. Eine Inkubationszeit von 18 Stunden im Inkubator erlaubte es neu synthetisierten Proteinen ins Medium zu diffundieren, welche im Anschluss über die Methodik der Massenspektrometrie detektiert werden konnten. Abbildung 9 zeigt die Auswertung des Sekretoms. Dabei wird deutlich, dass B16 Melanome eine signifikant höhere Biosynthese an einer Vielzahl von Proteinen aufweisen, die als Schlüsselenzyme der aeroben Glykolyse fungieren, als MC38 Kolonadenokarzinome.

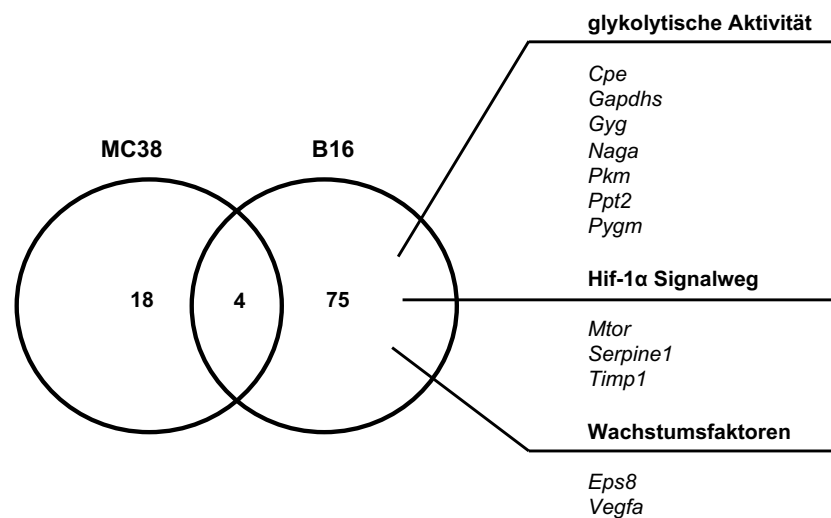


Abbildung 9: B16 Melanome zeigen auf Proteomebene eine hohe glykolytische Aktivität.

B16 Tumore (n=6) und MC38 Tumore (n=6) wurden in einer Sekretomanalyse auf ihr Proteinprofil untersucht. Dargestellt ist die Anzahl signifikant unterschiedlich detektierter Proteine im Depletionsmedium im Vergleich zum Kontrollmedium beider Tumorentitäten ($p < 0,05$; $\log_2(\text{Depletionsmedium}/\text{Kontrollmedium}) > 0,5$). Proteine, die ausschließlich in B16 Melanomen gefunden wurden, sind hervorgehoben: Carboxypeptidasen (*Cpe*, AC no. Q00493), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdhs*, AC no. Q64467), Glykogenin (*Gyg*, AC no. Q9R062), α -N-Acetylgalactosaminidase (*Naga*, AC no. Q9QWR8), Pyruvatkinase (*Pkm*, AC no. P52480), Palmitoyl Protein Thioesterase 2 (*Ppt2*, AC no. O35448), Glykogenphosphorylase (*Pygm*, AC no. Q9WUB3), Serin-Threonin-Kinase mTOR (*Mtor*, AC no. Q0VGB7), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (*Serpine1*, AC no. P22777), Metallopeptidase-Inhibitor 1 (*Timp1*, AC no. P12032), Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 8 (*Eps8*, AC no. Q08509), Vascular endothelial growth factor A (*Vegfa*, AC no. Q00731).

Insbesondere die Pyruvatkinase (*Pkm*) ist ein zentrales Enzym der Glykolyse und stellt die gewonnene Energie der Glykolyse, unter Bildung von Pyruvat, in Form von ATP bereit. So ist auch Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gadphs*) Teil der Glykolyse und zählt ebenfalls zu den wichtigsten Komponenten dieses katabolen Stoffwechselprozesses.^{131,132} α -N-Acetylgalactosaminidase (*Naga*) ist für den Abbau von Glykolipiden verantwortlich und Palmitoyl Protein Thioesterase 2 (*Ppt2*) ist im Fettmetabolismus involviert. Es ist am Umbau von Triacylglyceriden beteiligt, das Glycerin freisetzt. Dieses kann zu Glukose umgebaut werden. Beide Vorgänge können somit Glukose für die Glykolyse bereitstellen.^{133,134} Glykogenin (*Gyg*) ist ebenfalls stärker in B16 Melanomen detektiert worden, als in MC38 Kolonadenokarzinomen. Es fungiert in erster Stelle als Startermolekül für die Neusynthese von Glykogen, jedoch bleibt es auch zurück, wenn Glykogen abgebaut wird. Demnach kann es als Marker für eine vollständig ablaufende Glykogenolyse (Abbau von Glykogen) dienen.¹³⁵ Auch die Glykogenphosphorylase (*Pygm*) ist ein Enzym des Glykogenabbaus. Es katalysiert den ersten Schritt der Glykogenolyse und stellt damit Glukose-1-Phosphaat zur weiteren Glykolyse bereit.¹³⁶ Carboxypeptidasen (*Cpe*) katalysieren hydrolytische Spaltungen von Peptidbindungen. Da die so freigewordenen überschüssigen Aminosäuren zu Glukose abgebaut werden können, welches wiederum in die Glykolyse eingeschleust werden kann, tragen auch Carboxypeptidasen indirekt zur erhöhten glykolytischen Aktivität der B16 Tumorzellen bei.^{137,138} Diese Proteine weisen auf eine hohe glykolytische Aktivität der Zelllinie des B16 Melanoms hin und können infolgedessen mit einer starken Azidose des Tumormilieus assoziiert werden. Dies trifft für die Zelllinie des MC38 Kolonkarzinoms nicht zu.

Weiterhin werden im Sekretom der B16 Tumore Proteine detektiert, die dem Hif-1 α Signalweg zugehörig sind und zeigen damit, die agile Anpassung der Zellen an die im Tumormilieu vorhandene Hypoxie an. Der Hif-1 α Signalweg trägt zur Tumorprogression bei, indem er zur Vaskularisierung mit verstärkter Angiogenese anregt.^{139,140} Auch fördert dieser Signalweg die Anpassung an die sauerstoffarmen Verhältnisse durch eine Erhöhung der Konzentration glykolytischer Enzyme, sowie eine verbesserte Glukoseaufnahme.^{141,142} Außerdem wird die Zellmigration und -adhäsion durch Chemotaxis und Metastasierung unterstützt.¹⁴³ Bei den zugehörigen Proteinen des Hif-1 α Signalwegs handelt es sich zum einen um die Serin-Threonin-Kinase mTOR (*Mtor*), ein immunsuppressiver Regulator von zellulärem Wachstum.¹⁴⁴ Weiterhin wurde der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (*Serpine1*) und der Gewebe-Metallopeptidase-Inhibitor 1 (*Timp1*) detektiert, welche gefäßregulierende Faktoren darstellen. Beide sind am Umbau von extrazellulärer Matrix beteiligt und fördern so die Ausbildung neuer Gefäße.^{145,146} Zudem wurden ausschließlich in B16 Tumoren der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor 8 (*Eps8*) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A

(*Vegfa*) gefunden. Beide sprechen für eine starke Angiogenese mit einhergehender ausgeprägten Tumorgenese.^{147,148}

Die beobachteten Unterschiede konnten zeigen, dass die glykolytische Aktivität und damit die Fähigkeit zur Ansäuerung der Tumorumgebung von B16 Melanomen deutlich höher ist als die von MC38 Kolonadenokarzinomen. Ebenfalls bestätigte sich die Annahme, dass die Energieproduktion und das Wachstum von B16 Melanomen stark von einer hohen glykolytischen Aktivität abhängt. Somit konnten beide Tumormodelle im weiteren Verlauf vergleichend für die folgenden Versuche dieser Arbeit verwendet werden.

Da die verstärkte Glykolyse der Melanomzellen mit einer Übersäuerung der Tumorumgebung einhergeht (1.2 Hoch glykolytische Tumore) und diese Überproduktion von Protonen vom GPR65 auf Makrophagen registriert wird (1.5 G-Protein gekoppelte Rezeptoren und der cAMP-Signalweg), wurde im nächsten Schritt überprüft, wie sich die nachgeschaltete Expression von *Icer* bei einer Defizienz von GPR65 auf Makrophagen verhält.

3.3 Ausbleiben der Säure-induzierten *Icer*-Expression in *Gpr65*-defizienten BMDM

Bohn et al. konnten bereits einen Zusammenhang zwischen der Polarisierung von Makrophagen zu einem antiinflammatorischen M2-Phänotyp zeigen, sobald diese eine hohe *Icer*-Expression aufwiesen.²² Um die Auswirkungen der hohen Glykolyserate von B16 Melanomen und damit einhergehenden Säureproduktion und Ansäuerung des umgebenden Milieus auf Makrophagen und deren *Icer*-Expression zu untersuchen, wurden aus Knochenmarkszellen differenzierte Makrophagen unter sauren Bedingungen kultiviert. Die Makrophagen waren entweder *Gpr65*-kompetent (*Gpr65* WT) oder *Gpr65*-defizient (*Gpr65* KO). Somit konnte ebenfalls die Sensitivität des Rezeptors auf Protonen kontrolliert werden. Für die Säureinduktion wurde sowohl die anorganische Chlorwasserstoffsäure (HCl), als auch die organische Milchsäure Lactat verwendet. Lactat ist die am häufigsten vorkommende Säure im menschlichen Organismus und führt vor allem im Tumor zu einer Übersäuerung des Milieus.^{149,150} Beide Säuren sind in Wasser vollständig dissoziiert und geben Protonen frei, welche den pH-Wert des Mediums, bei einem Einsatz von 25 mM, auf 6,1 senken. Das Ergebnis zeigte in beiden Fällen eine deutliche Säure-induzierte *Icer*-Expression in den wildtypischen Makrophagen. Fehlte der pH-sensitive Rezeptor auf der Zelloberfläche von Makrophagen, so konnte trotz saurem Stimulus kein Anstieg der *Icer*-Expression registriert werden.

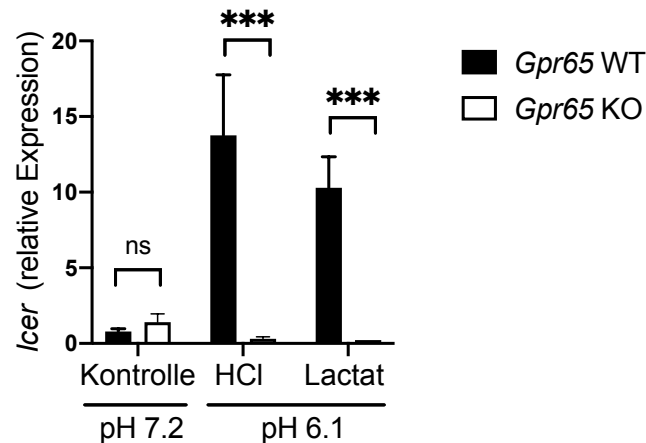


Abbildung 10: Die Säure-induzierte *Icer*-Expression bleibt in *Gpr65*-defizienten Makrophagen aus.

1 x 10⁶ Zellen wurden für 8 Stunden im entsprechenden Medium unter physiologischen und sauren Bedingungen kultiviert (n=3). Mittels einer 25 mM HCl- und Lactat-Lösung wurde ein pH-Wert von 6,1 erreicht. Für die Durchführung der qRT-PCR wurden die Proben in 3 technischen Replikaten gemessen. Die Expressionen wurden relativ zur ersten Probe ermittelt.

Abbildung 10 zeigt, dass die Expression von *Icer* maßgeblich vom GPR65 abhängt. Die nachfolgende cAMP-Signalkaskade ist durch das Fehlen des Rezeptors unterbunden und *Icer* wurde nicht mehr exprimiert. Im Anschluss war es zu überprüfen, welchen Phänotyp die Makrophagen annehmen, wenn die Protonen nicht mehr über den GPR65 erfasst werden können und die *Icer*-Expression folglich nicht ansteigt.

3.4 *Gpr65*- und *Icer*-kompetente Makrophagen weisen unter sauren Bedingungen einen antiinflammatorischen Phänotyp auf

Um den Phänotyp der unter Säure kultivierten Makrophagen zu bestimmen, wurde die Genexpression über die Methode des *Bulk Sequencing* analysiert. Dafür wurden BMDM sowohl aus *Gpr65*-kompetenten (*Gpr65* WT) und -defizienten (*Gpr65* KO) Mäusen, als auch aus *Icer*-kompetenten (*Icer* WT) und -defizienten (*Icer* KO) Mäusen angereinigt. Demzufolge handelte es sich um Zellen mit einer defekten Protonenwahrnehmung (*Gpr65*-Defizienz), bzw. inhibiertem cAMP-Signalweg (*Icer*-Defizienz). 1 x 10⁶ Zellen wurden zunächst unter sauren und physiologischen Bedingungen für 8 Stunden kultiviert. Anschließend wurde die RNA isoliert und auf Transkriptomebene mittels NGS untersucht.

Aus Abbildung 11 wird deutlich, dass die antiinflammatorischen Gene *Arg1*, *Vegfa* und *Hilpda* von den wildtypischen Makrophagen stärker exprimiert werden, sobald sie unter sauren Bedingungen inkubiert wurden. Dies weist auf einen M2-Phänotyp hin. Mit dem Oberflächenmarker H2-Ab verhält es sich umgekehrt. Das Gen wird sowohl von Makrophagen der *Gpr65*-defizienten Mäuse, als auch von denen der *Icer*-defizienten Mäuse stärker exprimiert, wenn eine Säure-Induktion erfolgt. Dies ist ebenfalls charakteristisch für einen M2-Phänotyp der wildtypischen BMDM, sobald diese einem sauren Milieu ausgesetzt sind, und deutet auf einen proinflammatorischen M1-Phänotyp der Makrophagen beider *Knockout*-Linien hin.

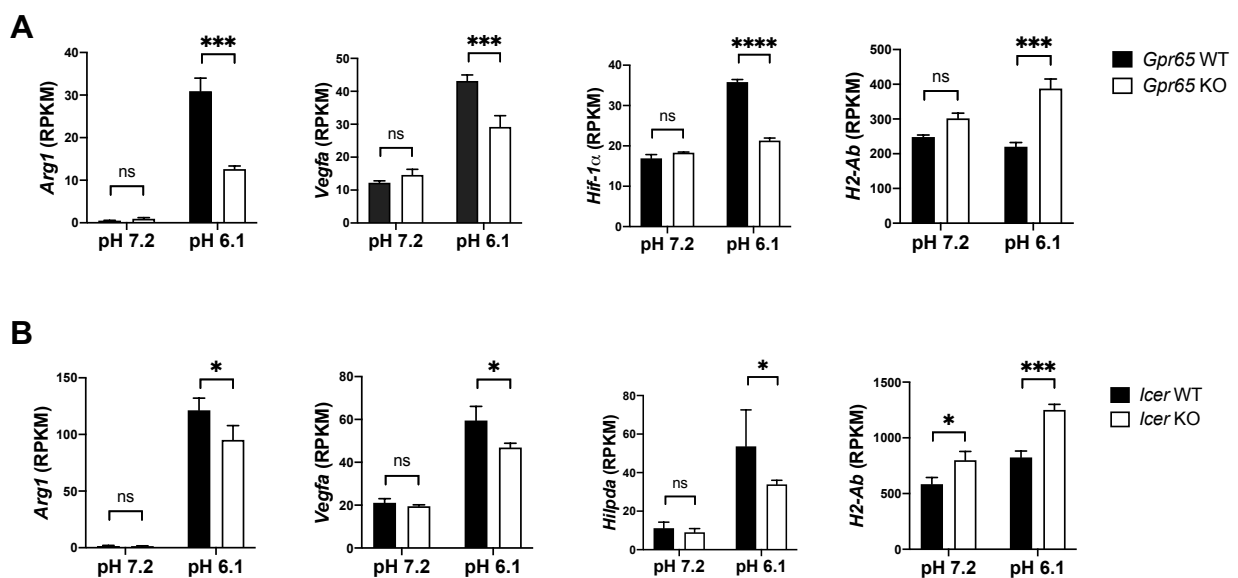


Abbildung 11: BMDM aus *Gpr65*- und *Icer*-wildtypischen Mäusen weisen unter sauren Bedingungen eine erhöhte Expression antiinflammatorischer Gene auf.

1 x 10⁶ BMDM aus *Gpr65*-defizienten (A) und *Icer*-defizienten (B) Mäusen, sowie aus wildtypischen Kontrolltieren wurden in einem Medium mit einem pH-Wert von 6,1 und in einem Medium mit einem physiologischen pH-Wert von 7,2 inkubiert (n=3). Nach 8 Stunden Inkubationszeit wurden die RNA isoliert und Transkriptom-Bibliotheken erstellt. Die Analyse der Expressionsdaten erfolgte mit der CLCGenomics Work Bench Software (Qiagen). Die normalisierte Expressionsstärke ist in *Reads per Kilobase per Million* (RPKM) angegeben. Pro Probe wurden durchschnittlich 20 Millionen reads generiert.

3.5 Das Wachstum hoch glykolytischer Tumore ist in *Gpr65*-defizienten Mäusen inhibiert

Als nächstes sollte überprüft werden, welche Auswirkungen es auf die Tumorentwicklung hoch glykolytischer Tumore hat, wenn der Protonen-sensitive GPR65 nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dafür wurden vergleichend B16 (hoch glykolytisch) und MC38 (niedrig glykolytisch) Tumorzellen in die Tiere inokuliert (3.2 B16 Melanome neigen zu einem hohen glykolytischen Proteinprofil). 2×10^5 B16 Melanomzellen und 1×10^6 MC38 Kolonadenokarzinomzellen wurden *Gpr65*-kompetenten und *Gpr65*-defizienten Mäusen subkutan injiziert und die Tumorentwicklung wurde über einen Zeitraum von 16-17 Tagen beobachtet. Aus Abbildung 12 wird deutlich, dass es den *Gpr65*-defizienten Tieren möglich ist, das Tumorstadium des B16 Melanoms zu kontrollieren. Nach 17 Tagen weisen die Mäuse dieser Gruppe ein durchschnittliches Tumorstadium von 50 mm^3 auf. Die Kontrolltiere hingegen zeigen eine steile Wachstumskurve des hoch glykolytischen Tumors. Sie haben nach 17 Tagen ein durchschnittliches Tumorstadium von 260 mm^3 (Abbildung 12 (A)). Auf das Tumorstadium der MC38 Zelllinie scheint die Defizienz des GPR65 keinen Einfluss zu haben. Beide Gruppen zeigen hinsichtlich der Tumorentwicklung keinen Unterschied (Abbildung 12 (B)). Das durchschnittliche Tumorstadium der *Gpr65*-defizienten Mäuse betrug 500 mm^3 , das der wildtypischen Kontrolltiere lag bei 460 mm^3 .

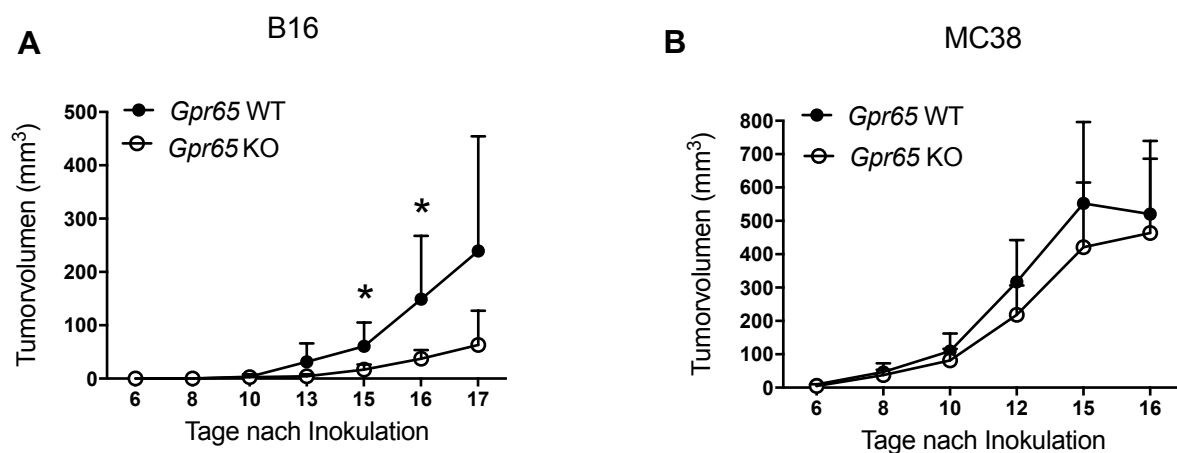


Abbildung 12: In *Gpr65*-defizienten Mäusen ist das Tumorstadium hoch-glykolytischer Tumore inhibiert.

(A) Es wurden 2×10^5 B16 Melanomzellen subkutan in die rechte Flanke von *Gpr65*-wildtypischen (n=8) und *Gpr65*-defizienten (n=9) Tieren injiziert und die Tumorentwicklung über 17 Tage beobachtet. (B) 1×10^6 Kolonadenokarzinomzellen der Linie MC38 wurden subkutan in die rechte Flanke von *Gpr65*-wildtypischen (n=7) und *Gpr65*-defizienten Tieren (n=9) inokuliert. Das Tumorstadium wurde über 16 Tage kontrolliert. Ab Tag 6 erfolgte alle 2-3 Tage eine Messung der Tumorstadium beider Versuche.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es Mäusen, die eine Defizienz im *Gpr65* tragen, möglich ist B16 Melanomzellen abzustößen. Dies trifft jedoch nicht für MC38 Adenokarzinomzellen des Kolons zu. Im Folgenden wurden die infiltrierenden Leukozyten beider Tumore genauer analysiert, um die Tumorantwort der Tiere auf zellulärer Ebene zu untersuchen.

3.6 Tumor-infiltrierende Leukozyten von *Gpr65*-defizienten und *Gpr65*-kompetenten Mäusen zeigen unterschiedliche Zellpopulationen zwischen B16 und MC38 Tumoren

Zur genaueren Untersuchung der Tumor-infiltrierenden Leukozyten wurde die Methode des *Single-cell Sequencing* durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die B16- und MC38-Tumore der Mäuse entnommen und die Tumormasse wurde in eine Einzelzellsuspension dissoziiert. CD45⁺-Zellen wurden magnetisch isoliert und zusätzlich mittels durchflusszytometrischen Sortierens angereinigt. Anschließend wurden Transkriptom-Bibliotheken jeder einzelnen, lebenden Zelle erstellt. Die Auswertung der Sequenzierdaten erfolgte über die Partek Flow Software. Dafür wurde eine statistische Methode zur Visualisierung hochdimensionaler Daten angewendet, die es erlaubt, jede Zelle auf einem bestimmten Punkt in einem dreidimensionalen Raum zu platzieren. Die Zellen mit ähnlichen genetischen Expressionsmustern werden nah zusammengelegt, wohingegen Zellen mit unterschiedlichen genetischen Expressionsmustern weiter auseinander liegen. Dadurch entstehen sogenannte Cluster, welche als Zellpopulationen identifiziert werden können.¹⁵¹ Definiert wurden die Zellcluster mithilfe des ImmGen Databrowsers. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse als *t-distributed stochastic neighbor embedding* (t-SNE).

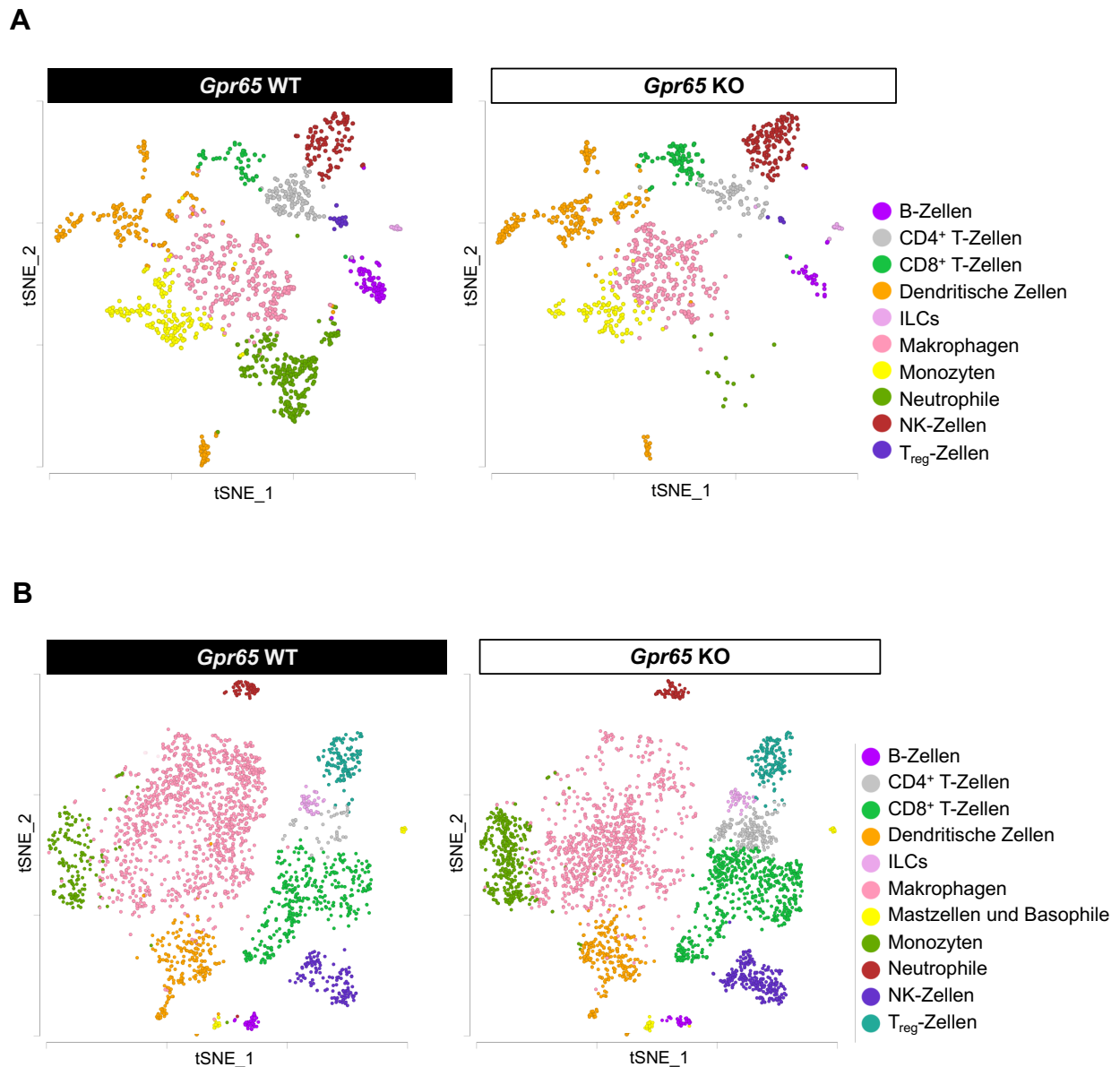


Abbildung 13: Tumor-infiltrierende CD45⁺ Immunzellen von *Gpr65*-defizienten und -kompetenten Mäusen unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Zellpopulationen im B16 und MC38 Tumor.

Aus B16 Melanomen (n=4 pro Gruppe) und MC38 Kolonkarzinomen (n=3 pro Gruppe) wurden CD45⁺ Tumor-infiltrierende Leukozyten magnetisch isoliert und zusätzlich fluoreszenzbasiert angereinigt. Anschließend erfolgte eine Transkriptomanalyse, welche nach Auswertung als t-SNE Diagramm dargestellt wurde. Für das *Single-cell Sequencing* wurden die Zellen mit je mindestens 20 000 Reads pro Zelle sequenziert. **(A)** Aus den B16 Melanomen wurden insgesamt 5071 Tumor-infiltrierende CD45⁺ Leukozyten aufgefangen und für das *Single-cell Sequencing* aufgearbeitet. Dabei konnten 10 Zellpopulationen identifiziert werden. **(B)** Im MC38 Kolonadenokarzinom wurden 11 366 Zellen aufgefangen und konnten 11 Clustern unterschiedlicher Zellpopulationen zugeordnet werden.

Die Zellen der verschiedenen Zellpopulationen sind in den MC38-infiltrierenden Leukozyten weitgehend gleich verteilt (Abbildung 13 (B)). Davon ausgenommen sind die CD4⁺ T-Zellen, welche vermehrt in den *Gpr65*-defizienten Mäusen zu finden sind. In den B16-infiltrierenden Immunzellen fallen mehr Populationen mit einer Ungleichverteilung zwischen beiden Genotypen auf (Abbildung 13 (A)). Zum einen weisen die *Gpr65*-wildtypischen CD45⁺ Immunzellen im Vergleich zu den *Gpr65*-defizienten CD45⁺ Immunzellen eine niedrigere Anzahl an NK-Zellen und zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen auf. Zum anderen ist ein deutlicher Unterschied in der Population der Neutrophilen und einer Subpopulation der Makrophagen zu erkennen. Dabei ist die Anzahl der Zellen dieser Populationen in den *Gpr65*-defizienten Proben im Vergleich zu den wildtypischen Kontrollen reduziert. Auf die infiltrierenden Makrophagen des B16 Melanoms wird im Folgenden genauer eingegangen.

3.7 In *Gpr65*-defizienten Tieren liegt eine verringerte Anzahl an antiinflammatorischen Makrophagen vor

Wie eingangs gezeigt (3.1 Expression von GPR65 auf Zellen der myeloiden Zelllinie) wird GPR65 überwiegend von myeloiden Zellen exprimiert, so dass nachfolgend die Population der Makrophagen genauer betrachtet wird. Zunächst fällt auf, dass eine Subpopulation von Makrophagen in den *Gpr65*-defizienten Mäusen den *Gpr65*-Wildtypen quantitativ unterlegen ist. Die Untersuchung der Expression der antiinflammatorischen Gene *Arg1* und *Vegfa* und des proinflammatorischen Gens *H2-Ab* dieser Zellen, lässt die Annahme zu, dass es sich um Makrophagen des M2-Phänotyps handelt. *Arg1* und *Vegfa* sind vor allem in der Population exprimiert, welche in den *Gpr65*-defizienten Makrophagen fehlt. *H2-Ab* hingegen zeigt höhere Expressionslevel in der Population, welche sowohl in den *Gpr65*-kompetenten, als auch in den *Gpr65*-defizienten Tumorzellinfiltraten vorhanden sind. Jedoch ist ersichtlich, dass *H2-Ab* in den *Gpr65*-defizienten Makrophagen stärker exprimiert zu sein scheint als in den wildtypischen Makrophagen.

Zur weiteren Charakterisierung der antiinflammatorischen TAM vom M2-Phänotyp wurden zusätzlich die Expressionen von *Ptgs2*, *Egfr*, *IL1rn*, *IL10* und *IL12a* herangezogen, welche jedoch nicht weiter aufgeführt werden, da *Arg1* und *Vegfa* am stärksten reguliert waren und als wesentliche Parameter für antiinflammatorische Makrophagen gelten.

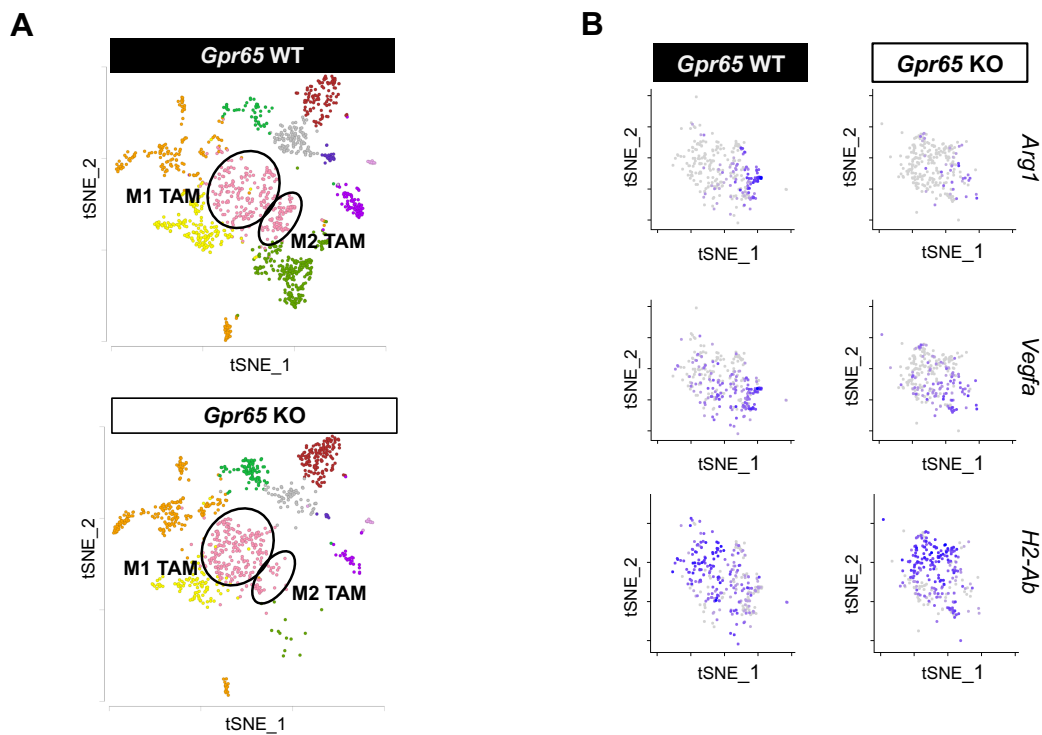


Abbildung 14: In B16-infiltrierenden Immunzellen aus *Gpr65* KO Mäusen ist die Anzahl an antiinflammatorischen M2-Markophagen reduziert.

(A) In den t-SNE Diagrammen aus Abbildung 13 (A) sind die Subpopulationen der proinflammatorischen (M1 TAM) und antiinflammatorischen (M2 TAM) Makrophagen hervorgehoben. **(B)** Die Expression der antiinflammatorischen Gene *Arg1* und *Vegfa*, sowie des proinflammatorischen Gens *H2-Ab*, sind in *Gpr65*-defizienten und *Gpr65*-kompetenten Makrophagen dargestellt. Zur Visualisierung der Expressionsstärke der Gene wurde eine *heatmap* verwendet. Dabei korreliert die Intensität der Farbe mit der Höhe der Expression jeder einzelnen Zelle.

Das saure Mikromilieu scheint somit einen Effekt auf die Polarisierung der Makrophagen zu haben. Es können deutlich zwei Populationen an Makrophagen ausgemacht werden, welche mit dem B16 Melanom assoziiert sind. Beide Subtypen wurden im Anschluss detaillierter untersucht.

3.8 Chemokine zur Neutrophilen-Rekrutierung werden im B16 Melanom maßgeblich von antiinflammatorischen Makrophagen produziert

Bei näherer Betrachtung der zwei Makrophagenpopulationen wurde deutlich, dass die antiinflammatorischen M2-Makrophagen nicht nur die Gene *Arg1* und *Vegfa* stärker exprimieren, sondern auch die Gene der Chemokine *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* und *Ppbp* (*Ppbp* kodiert das Chemokin CXCL7). Abbildung 15 zeigt ein Streudiagramm, welches die Signifikanz der gemessenen Expressionslevel gegen die relative Expressionsstärke darstellt. Dadurch können Gene, welche besonders stark und signifikant exprimiert werden, deutlich dargestellt und schnell identifiziert werden. CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL7 spielen eine große Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen. Sie binden an den CXCR2 Rezeptor auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und fungieren damit als Orientierungshilfe für diese Zellen. Sie werden dadurch in das Tumormikromilieu geleitet.^{107,108}

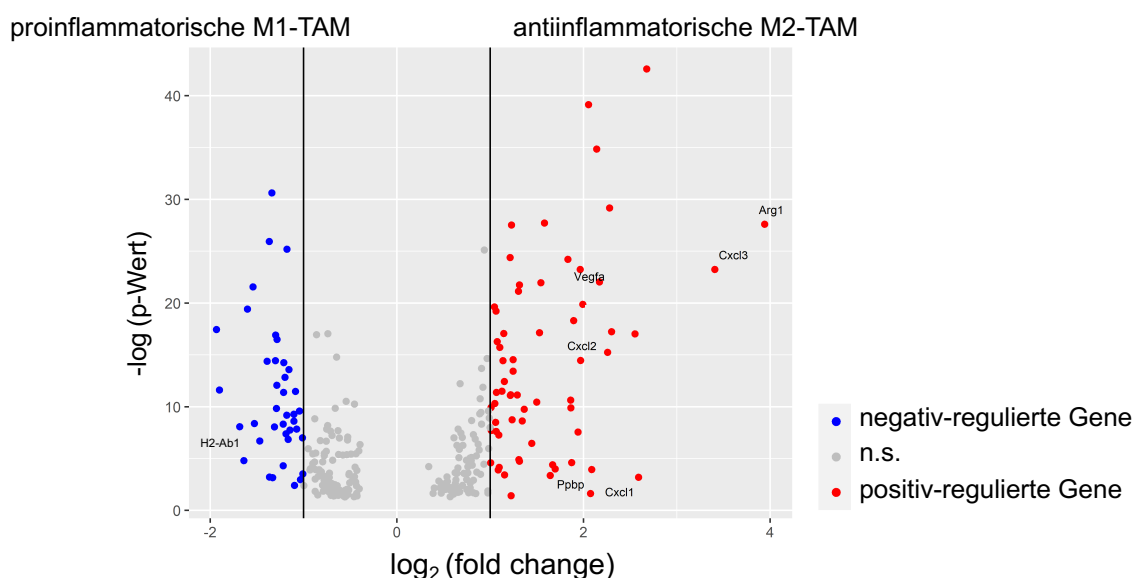


Abbildung 15: Antiinflammatorische TAM vom M2-Phänotyp exprimieren Chemokine zur Neutrophilen Rekrutierung.

Zusätzlich zu den antiinflammatorischen Genen *Arg1* und *Vegfa* werden die Gene der Chemokine *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* und *Ppbp* von TAM des M2-Phänotyps besonders stark exprimiert. Die Darstellung zeigt einen *Volcano Plot*, der die Signifikanz und die Expressionsstärke abbildet.

Die Gene, welche für die Chemokine kodieren, werden von der TAM-Subpopulation besonders stark exprimiert, welche in den Tumordinfiltraten der *Gpr65*-defizienten Mäuse fehlen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Rekrutierung von Neutrophilen zum Tumorherd in *Gpr65*-defizienten Mäusen gestört ist.

Wird die Expression der Chemokine in MC38 Tumoren betrachtet, welche nachweislich zu geringeren Ansäuerung der Tumorumgebung führen, so wird deutlich, dass die Expressionsstärke von *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* und *Pbbp* der TAM in *Gpr65*-kompetenten und in *Gpr65*-defizienten Tumorinfiltraten keine großen Unterschiede aufweist, ebenso wie die Anzahl der Makrophagen. Zur Darstellung dieses Ergebnisses wurde eine AUCell Analyse durchgeführt. Sie ermöglicht die Identifizierung von Zellen mit aktiven Genen. Dabei wird die Methode der Berechnung der *Area Under the Curve* (AUC) verwendet, um zu ermitteln, ob eine kritische Menge eines oder mehrerer exprimierten Gene in den *Single-cell* Sequenzierdatensätzen angereichert ist. Die Verteilung der so ermittelten AUC-Scores über alle Zellen ermöglicht eine Einschätzung der relativen Expressionssignatur dieser Gene.¹⁵² Zunächst einmal wird durch diese Untersuchung aus Abbildung 16 deutlich, dass die Gene zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowohl im B16 Melanom, als auch im MC38 Kolonadenokarzinom überwiegend von Makrophagen und Neutrophilen selbst exprimiert werden. Weiterhin ist zu erkennen, dass die B16-infiltrierenden TAM der *Gpr65*-wildtypischen Mäuse wesentlich höhere Level an *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* und *Pbbp* exprimieren, als die TAM der *Gpr65*-defizienten Geschwistertiere. Außerdem ist ersichtlich, dass die Expressionsstärke der Chemokine in den TAM des MC38 Kolonadenokarzinoms in den *Gpr65*-defizienten Tieren und den wildtypischen Kontrolltieren kaum Unterschiede aufweist.

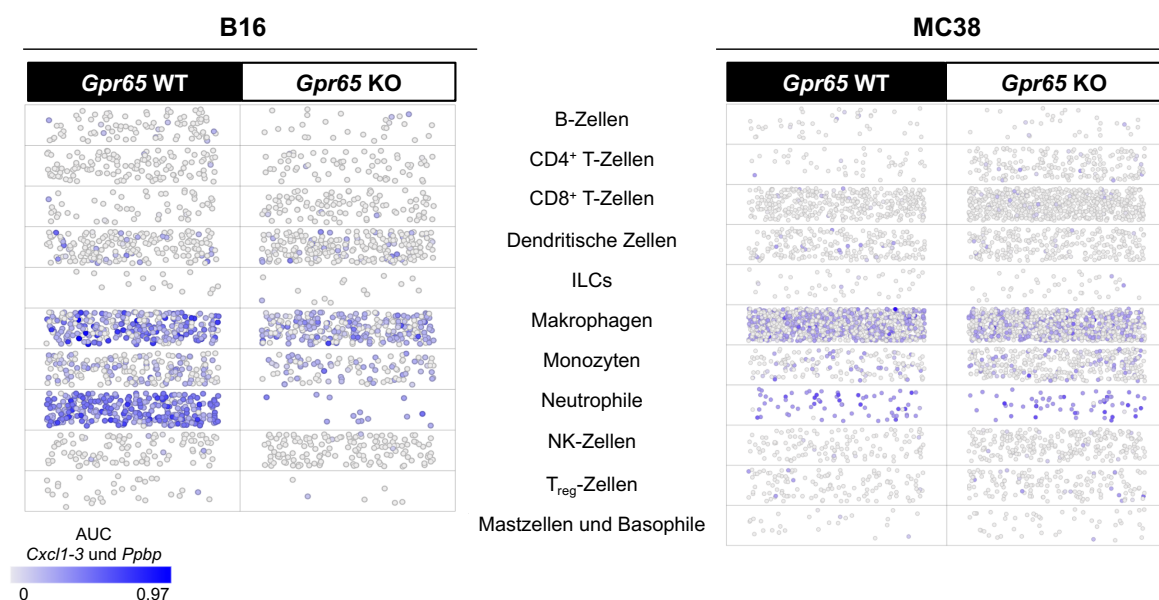


Abbildung 16: Relative Expression von *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* und *Pbbp* ist in *Gpr65*-kompetenten TAM stärker als in *Gpr65*-defizienten TAM des B16 Melanoms.

Die relative Expression von *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* und *Pbbp* in *Gpr65*-kompetenten und -defizienten Tumor-infiltrierenden Immunzellen des B16 Melanoms und MC38 Kolonadenokarzinoms ist dargestellt. Die Intensität der Farbe korreliert mit der Expressionsstärke des Gensets.

Zusammenfassend lässt sich auch hier auf eine fehlgeschlagene Rekrutierung der Neutrophilen zum angesäuerten Tumorherd rückschließen, sobald die TAM keinen protonen-sensitiven Rezeptor GPR65 mehr besitzen.

3.9 Neutrophilen-rekrutierende Chemokine fehlen auch in *Icer*-defizienten TAM

Anschließend wurde untersucht, ob die geringe Expressionsstärke der Neutrophilen-rekrutierenden Chemokine der *Gpr65*-defizienten TAM allein vom Fehlen des GPR65 abhängt, oder ob auch *Icer*-defiziente Tiere diese Einschränkung aufweisen. Dafür wurden zunächst 2×10^5 B16 Melanomzellen in die rechte Flanke von *Gpr65*- und *Icer*-defizienten Mäusen, sowie in die jeweiligen Kontrolltiere, subkutan inokuliert. Nach 17 Tagen wurden die Tumore aus den Mäusen entnommen und die infiltrierenden F4/80⁺ und CD11b⁺ TAM zunächst magnetisch, dann durchflusszytometrisch isoliert. Anschließend wurden die Zellen für die *Single-cell* Sequenzierung aufgearbeitet und der Datensatz bioinformatisch ausgewertet. Abbildung 17 zeigt die relative Expressionsstärke der Chemokine von *Gpr65*- und *Icer*-defizienten TAM vergleichend zu ihren korrespondierenden wildtypischen Kontrollproben. Es wird deutlich, dass in beiden Fällen die Expression der Chemokine in den Proben der defizienten Tiere um mindestens die Hälfte reduziert ist. Die *Icer*-defizienten Proben zeigen sogar eine vierfach geringere Expression. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass der fehlgeschlagene Mechanismus zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch TAM nicht nur vom GPR65 abhängt, sondern auch ICER- und damit cAMP-Signalweg-abhängig ist.

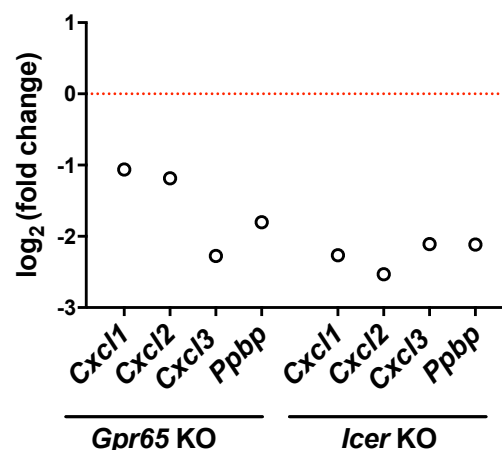


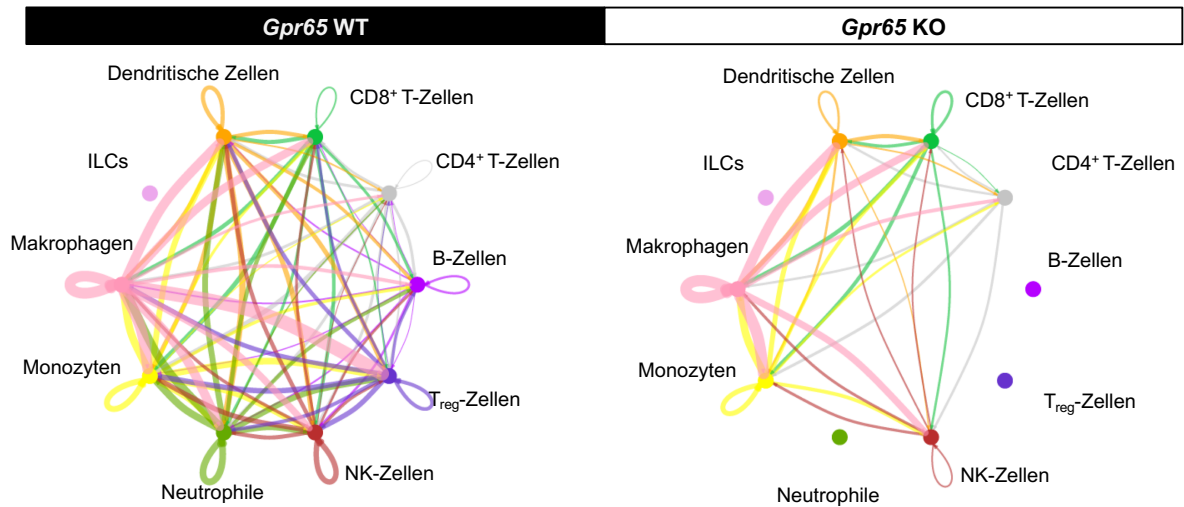
Abbildung 17: Die Chemokine zur Neutrophilen Rekrutierung werden ebenfalls von *Icer*-defizienten TAM schwach exprimiert.

Die Log₂-Verhältnisse von Proben defizienter Tiere zu den entsprechenden wildtypischen Proben sind für *Gpr65*- und *Icer*-defiziente TAM dargestellt. Sowohl für die *Gpr65*- als auch für die *Icer*-defizienten TAM zeigt sich eine niedrigere Expressionsstärke für die Gene *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3* und *Ppbp*.

3.10 Die CXCL-abhängige Kommunikation zwischen Makrophagen und Neutrophilen ist in *Gpr65*-defizienten Mäusen unterbrochen

Um sicher zu stellen, dass die Rekrutierung im Wesentlichen auf die von Makrophagen produzierten Chemokine zurückzuführen ist, wurde eine Kommunikationsanalyse aus den Transkriptomdaten durchgeführt. Dafür wurde zum einen ein Kommunikationsnetzwerk für die ermittelten Zellpopulationen erstellt, welches eine Übersicht über die gesamte Interaktion zwischen den Zelltypen zeigt. Zum anderen wurde ein CXCL-abhängiges Netzwerk ausgearbeitet, welches die Interaktion der Zellen über CXCL-Signalwege zeigt. Der Informationsfluss ist als Kommunikationswahrscheinlichkeit zwischen Ligand- und Rezeptorinteraktion der Zelltypen definiert. Abbildung 18 (A) zeigt den Kommunikationsfluss verschiedener Signalwege zwischen den ermittelten Zellpopulationen im B16 Melanom. Dabei ist zu erkennen, dass der Informationsfluss der Zellen untereinander in den B16 Infiltraten der *Gpr65*-defizienten Tiere allgemein abnimmt. Die Kommunikationswege von Makrophagen zu Neutrophilen, B-Zellen und regulatorischen T-Zellen ist sogar komplett unterbunden. Weiterhin ist die Kommunikation der Neutrophilen untereinander ebenfalls nicht mehr vorhanden, sobald der GPR65 nicht mehr auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Betrachtet man die Abbildung 18 (B), wird ersichtlich, dass vor allem die CXCL-abhängigen Signalwege der Makrophagen zu den Neutrophilen in *Gpr65*-defizienten Tieren unterbrochen sind. Der CXCL-abhängige Informationsfluss in den Neutrophilen untereinander ist ebenfalls nicht mehr vorhanden.

A



B

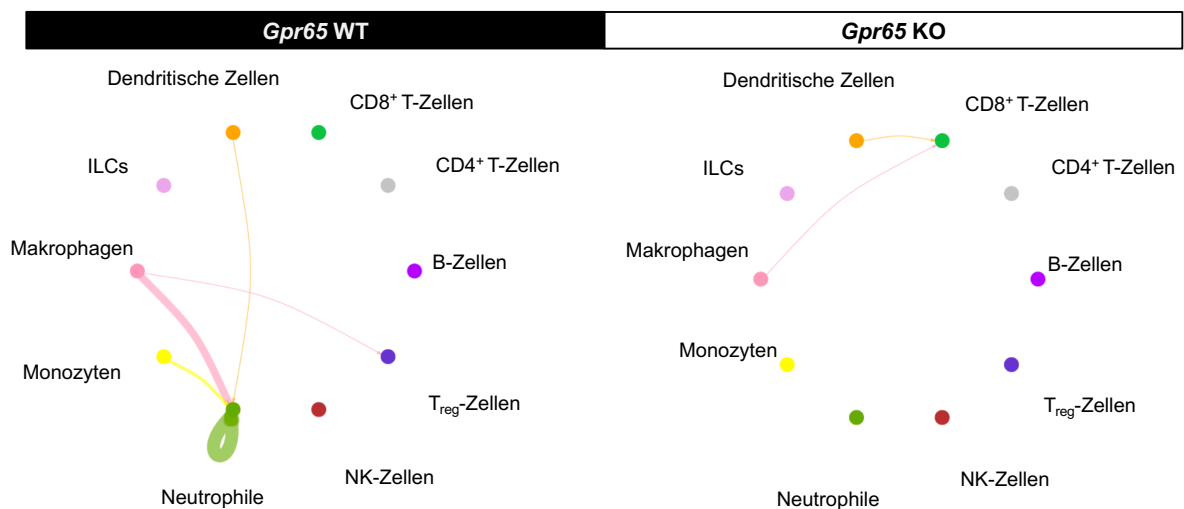
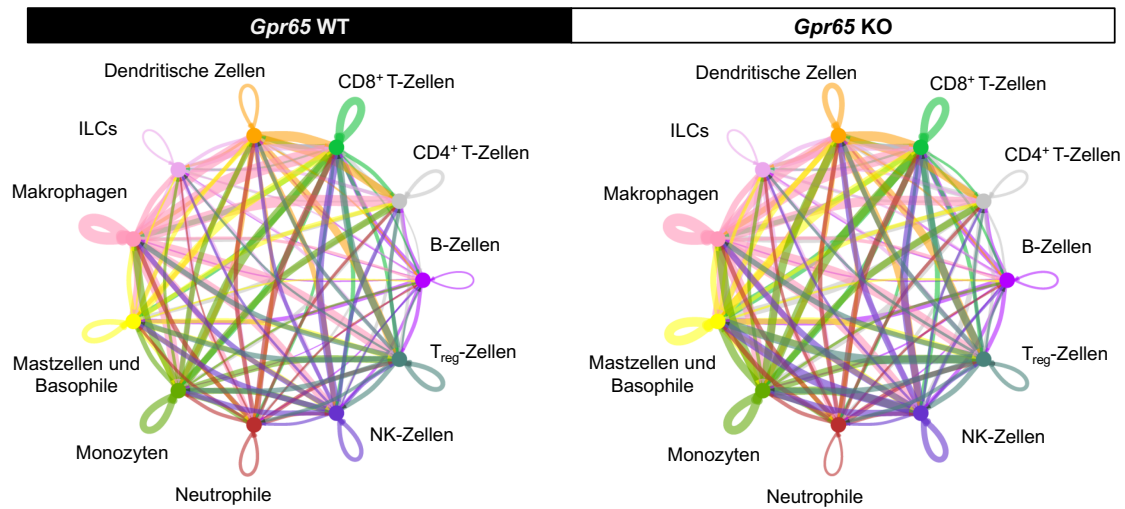


Abbildung 18: Der Informationsfluss über CXCL-Signalwege zwischen Makrophagen und Neutrophilen ist im B16 Melanom von *Gpr65*-defizienten Tieren unterbrochen.

Informationsfluss von Signalwegen, basierend auf der Kommunikationswahrscheinlichkeit zwischen Ligand und Rezeptor der Zellgruppen im B16 Melanom. Erstellt wurden die Abbildungen in Zusammenarbeit mit der Bioinformatik des Biozentrums der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. **(A)** zeigt das Kommunikationsnetzwerk der Gesamtheit von Signalwegen. **(B)** zeigt die CXCL-abhängige Kommunikationsstärke zwischen den Zellpopulationen.

A



B

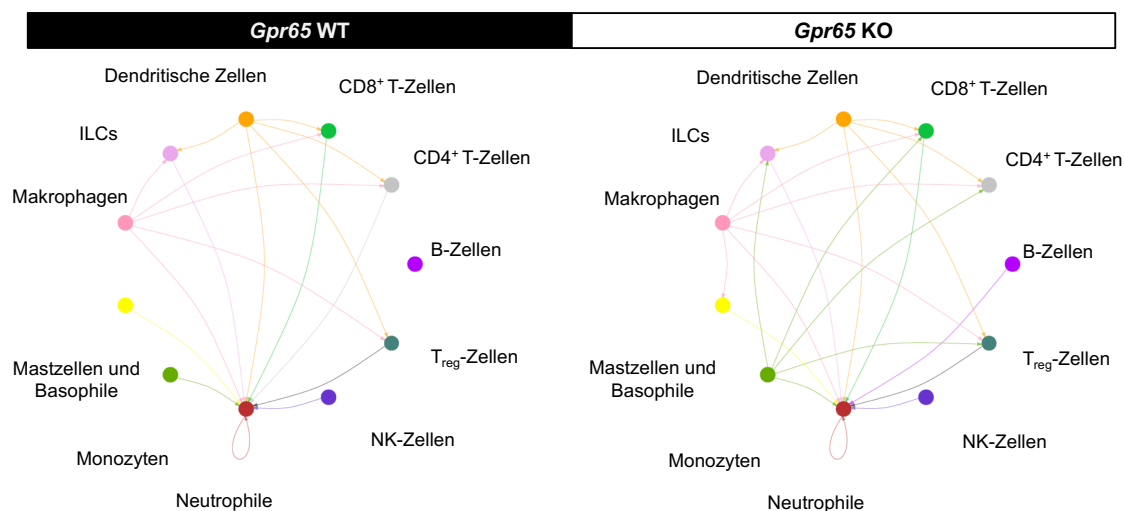


Abbildung 19: Der Informationsfluss über CXCL-Signalwege zwischen Makrophagen und Neutrophilen zeigt im MC38 Adenokarziom des Kolons keine Unterschiede zwischen *Gpr65*-defizienten und *Gpr65*-kompetenten Tieren.

Informationsfluss von Signalwegen, basierend auf der Kommunikationswahrscheinlichkeit zwischen Ligand und Rezeptor der Zellpopulationen im MC38 Kolonadenokarzinom. Erstellt wurden die Abbildungen in Zusammenarbeit mit der Bioinformatik des Biozentrums der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. **(A)** zeigt das Kommunikationsnetzwerk der Gesamtheit von Signalwegen. **(B)** zeigt die CXCL-abhängige Kommunikationsstärke zwischen den Zellpopulationen.

Für die Tumor-infiltrierenden Zellen des MC38 Kolonadenokarzinoms trifft dies nicht zu. Das Kommunikationsnetzwerk für die gesamten Signalwege und auch für die CXCL-abhängigen Signalwege zeigt keine auffälligen Unterschiede zwischen *Gpr65*-kompetenten und *Gpr65*-defizienten Tieren (Abbildung 19 (A) und (B)). Insbesondere ist die Kommunikation zwischen TAM und Neutrophilen weder in *Gpr65*-defizienten Mäusen noch in wildtypischen Geschwistertieren beeinträchtigt.

Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Rekrutierung von Neutrophilen zum Tumorherd von Makrophagen ausgeht, welche über CXCL-abhängige Signalwege gesteuert wird. Weiterhin konnte belegt werden, dass dies nur für TAM aus Tumoren gilt, welche die Fähigkeit zur Ansäuerung des Mikromilieus besitzen.

3.11 Tumor-infiltrierte Neutrophile fehlen in B16-Melanomen der *Gpr65*-defizienten Tiere

Anhand der bisherigen Ergebnisse konnte geklärt werden, dass die Rekrutierung der Neutrophilen über die von Makrophagen produzierten Chemokine CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL7 erfolgt. Dementsprechend sollte anschließend überprüft werden, ob die Population der Neutrophilen in Tumordinfiltraten der *Gpr65*-defizienten Proben fehlt. Hierzu wurden erneut die Transkriptomdaten ausgewertet, indem ein 2D-Scatter-plot erstellt wurde. Dieser zeigt die einzelnen Zellen jeder Zellpopulation der unterschiedlichen Proben (Abbildung 20).

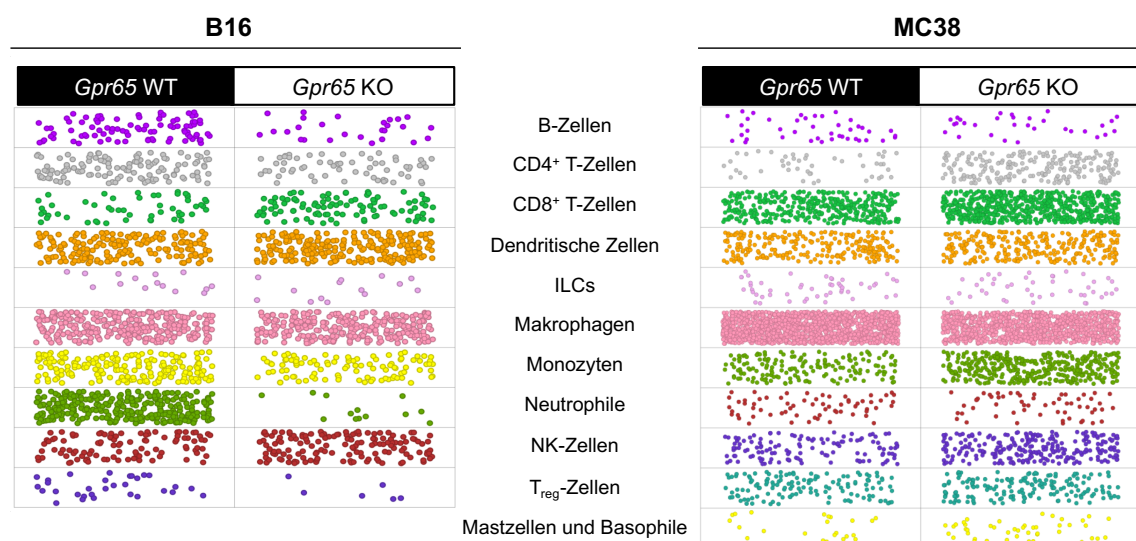


Abbildung 20: Infiltrate der neutrophilen Granulozyten fehlen im B16 Melanom der *Gpr65*-defizienten Tiere.

Einzelne Zellen jeder Zellpopulation sind für Tumordinfiltrate des B16 Melanoms und des MC38 Kolonadenokarzinoms aus *Gpr65*-kompetenten und *Gpr65*-defizienten Tieren dargestellt.

Die Anzahl der Neutrophilen, welche das B16 Melanom infiltrieren, ist in *Gpr65*-defizienten Mäusen deutlich reduziert. In MC38 Infiltraten ist eine homogene Verteilung der neutrophilen Granulozyten unabhängig von der Expression der GPR65 zu erkennen. Damit konnte gezeigt werden, dass die fehlende Rekrutierung von Neutrophilen durch antiinflammatorische TAM in *Gpr65*-defizienten Tieren tatsächlich zu einer verminderten Anzahl an TAN in Tumoren mit hoher glykolytischer Aktivität führt. Um einen Entwicklungsdefekt der Neutrophilen Population in den *Gpr65*-defizienten Mäusen auszuschließen, wurde nachfolgend eine Blutanalyse durchgeführt.

3.12 *Gpr65*-defiziente Mäusen weisen kein Entwicklungsdefizit hinsichtlich der Neutrophilen auf

Um zu überprüfen, ob die fehlende Neutrophilenpopulation ein GPR65-abhängiger Defekt oder ein Defekt ihrer Entwicklung ist, wurden Blutproben von 20 *Gpr65*-Wildtypen und 19 *Gpr65*-defizienten Tieren entnommen und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dafür wurden die zellulären Bestandteile des Blutes untersucht. Diese wurden für die Durchflusszytometrie mit Antikörpern markiert. Die Population der Neutrophilen ist positiv für CD45, CD11b und Ly6G. Die Expression von Ly6C dieses Zelltyps ist gering. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der Blutanalyse hinsichtlich der Anzahl an Neutrophilen im Blut.

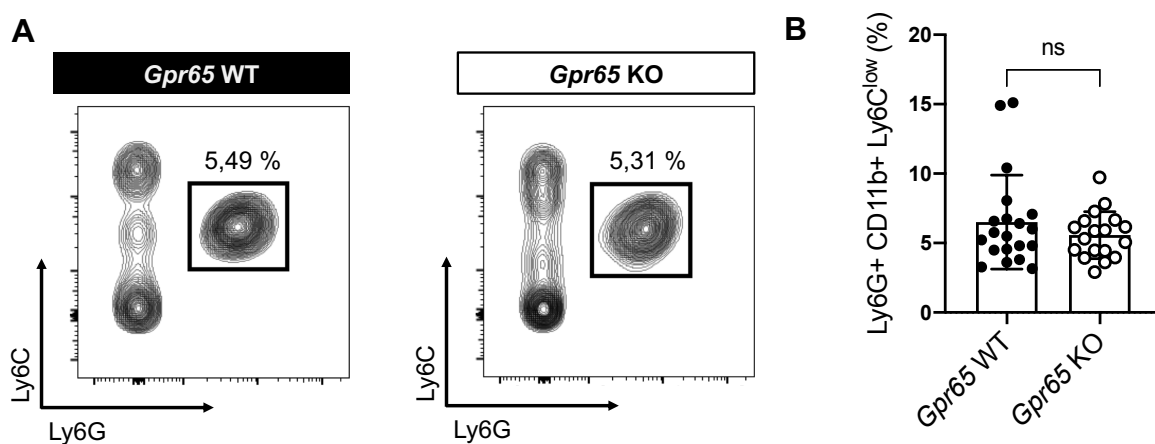


Abbildung 21: *Gpr65*-defiziente und *Gpr65*-kompetente Mäuse weisen keinen Unterschied in der Anzahl der Neutrophilen im Blut auf.

Zelluläre Bestandteile des Blutes wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf CD45, CD11b, Ly6G und Ly6C gefärbt und mittels Durchflusszytometrie auf neutrophile Granulozyten untersucht. (A) zeigt exemplarisch den Anteil von Ly6G⁺ und Ly6C^{low} Zellen aller lebenden CD45⁺ Immunzellen im Blut von *Gpr65*-kompetenten (n=20) und *Gpr65*-defizienten (n=19) Mäusen. In (B) ist der Mittelwert aller getesteten Blutproben dargestellt.

Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen *Gpr65*-Wildtypen und *Gpr65*-defizienten Tieren. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen der Neutrophilen in *Gpr65*-defizienten Melanomen kein Entwicklungsdefizit der Zellpopulation ist. Vielmehr handelt es sich tatsächlich um ein Ausbleiben der Rekrutierung von Neutrophilen durch antiinflammatorische TAM. Es stellte sich anschließend die Frage, welchen funktionellen Phänotyp die Neutrophilen aufweisen, da auch das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten mit einer verstärkten Tumorprogression assoziiert ist.^{102,153}

3.13 Die Neutrophilenpopulation von *Gpr65*-kompetenten Tieren zeigt einen MDSC-ähnlichen Phänotyp

Wie bereits erwähnt, werden auch die Neutrophilen in antitumorale N1-Neutrophile und protumorale N2-Neutrophile unterschieden. N2-Zellen können zudem als funktionelle MDSC angesehen werden.^{97,98} Um zu prüfen, um welchen Phänotyp der Neutrophilen es sich in unserem Datensatz handelt, wurde eine AUCell Analyse mit dieser Zellpopulation durchgeführt. Veglia et al. veröffentlichten kürzlich eine Studie, in welcher Gene identifiziert wurden, welche mit dem Phänotyp von aktivierten MDSC assoziiert sind.¹⁵⁴ Dieser Gendatensatz wurde gewählt, um zu ermitteln, ob diese Gene in den Melanom-infiltrierenden Neutrophilen angereichert und aktiv sind und für einen MDSC-Phänotyp sprechen.

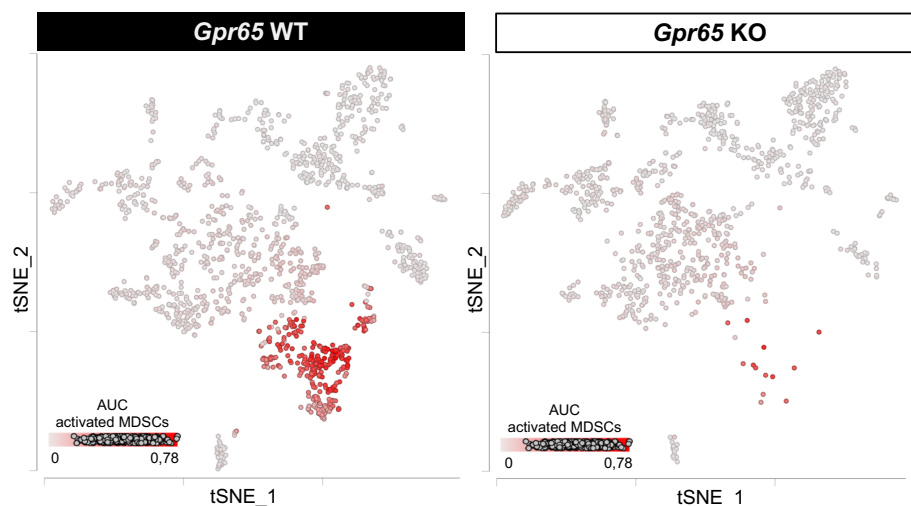


Abbildung 22: Neutrophile Granulozyten aus B16 Melanominfiltraten weisen einen MDSC-Phänotyp auf.

Die Expressionssignatur der Gene, welche mit einem funktionellen Phänotyp der MDSC assoziiert ist, wurde mittels AUCell ermittelt (*Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl9*, *Cxcl3*, *Jun*, *Ccr12*, *Gadd45b*, *Il1b*, *Ninj1*, *Clec4n*, *Hcar2*, *Basp1*, *Nfkb1a*, *Btg1*, *Il1rn*, *Ier3*, *Ier5*, *Cxcl1*, *Hilpda*, *Srgn*, *Csf1*, *Ptgs2*, *Saa3*, *Ifrd1*, *Txnip*, *Thbs1*, *Hist1h1c*, *Hspa5*, *Xbp1*).¹⁵⁴ Die AUCell-Scores wurden über alle Zellen gelegt, um die Expression dieses Gensets bewerten zu können.

Aus Abbildung 22 wird ersichtlich, dass die Gene, welche für einen funktionellen MDSC-Phänotyp kodieren, in der Neutrophilenpopulation angereichert sind. Die Neutrophilen, welche von *Gpr65*-defizienten Makrophagen nicht zum Tumorherd rekrutiert werden, besitzen somit einen MDSC-ähnlichen Phänotyp mit antiinflammatorischen Eigenschaften.

Im Folgenden war zu klären, ob eine Depletion der Neutrophilen in wildtypischen Mäusen zu Beginn der Tumordinokulation ebenfalls mit einem reduzierten Tumolvolumen einhergeht.

3.14 Durch Depletion der Neutrophilen in wildtypischen Mäusen kann das Wachstum des B16 Melanoms inhibiert werden

Die bisher durchgeführten Experimente zeigten zum einen, dass das B16 Melanomwachstum im Vergleich zu wildtypischen Kontrollmäusen in *Gpr65*-defizienten Mäusen inhibiert ist und zum anderen, dass im Tumormikromilieu dieser Mäuse keine Neutrophilen vorhanden sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die TAN der wildtypischen Mäuse einen Phänotyp besitzen, welcher dem von MDSC entspricht. Somit sind sie in einen antiinflammatorischen N2-Phänotyp ausdifferenziert, der letztlich die Tumorprogression fördert.¹⁵⁵ Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob die Depletion der N2-TAN in wildtypischen Mäusen ebenfalls zu einer verbesserten antitumoralen Antwort führt und letztendlich in einer Reduktion des B16 Melanomwachstums resultiert, welche den *Gpr65*-defizienten Tieren gleicht.

Hierzu wurden zunächst 40 Mäusen 2×10^5 B16 Tumorzellen in die rechte Flanke inokuliert. 20 Tiere waren *Gpr65*-defizient, die anderen 20 Tiere waren wildtypische Geschwister. Einen Tag nach Tumordinokulation wurde die Versuchsgruppe (je 10 Tiere jeden Stamms) mit einem *in vivo* Antikörper zur Depletion der Neutrophilen behandelt. Da das Oberflächenprotein Ly6G einen verlässlichen Marker für Neutrophile darstellt, wurde ein anti-Ly6G Antikörper verwendet, welcher die neutrophilen Granulozyten bindet und neutralisiert. Um eine effiziente und anhaltende Depletion der Neutrophilen zu erreichen, wurde zusätzlich ein Sekundäntikörper verabreicht, welcher den Primäntikörper bindet und dessen Wirksamkeit verstärkt (2.12.3 Behandlung der tumortragenden Tiere mit Neutrophilen-depletierendem Antikörper). Die Kontrollgruppe (ebenfalls je 10 Tiere jeden Stamms) erhielt die korrespondierenden Isotypkontrollen. Die Gabe der Antikörper erfolgte über den gesamten Versuchsverlauf und endete einen Tag vor der Tumoraufarbeitung. Tabelle 13 zeigt die Aufteilung der Versuchstiere.

Tabelle 13: Verteilung der Versuchstiere zur Depletion der Neutrophilen.

Mausstamm	Versuchsgruppe Gabe der Antikörper	Kontrollgruppe Gabe der Isotypkontrollen
Gpr65 WT	10	10
Gpr65 KO	10	10

Zur Überprüfung der gewünschten Effektivität der depletierenden Antikörper wurde nach Beendigung des Versuchs Blut der Mäuse entnommen und die zellulären Bestandteile wurden anhand der Marker CD11b, Ly6G und Ly6C auf den Anteil von Neutrophilen untersucht. Abbildung 23 (A) und (B) zeigen, dass der Anteil an Neutrophilen durch Injektion der depletierenden Antikörper auf durchschnittlich 1,45 % der CD45⁺ Immunzellen im Blut der *Gpr65*-defizienten Mäuse gefallen ist und auf 1,04 % im Blut der wildtypischen Geschwistertiere. Zwischen den Isotypkontrollgruppen besteht kein signifikanter Unterschied, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Isotyp des Antikörpers keinen Einfluss auf die Zellzusammensetzung im Blut der Tiere hat.

Die Tumorprogression wird in Abbildung 23 (C) dargestellt. Dabei wird deutlich, dass allein die unbehandelten wildtypischen Mäuse einen starken Tumoranstieg des Melanoms aufweisen. Das Tumolvolumen an Tag 20 beträgt durchschnittlich 325,4 mm³. Die Tiere, welche die Antikörperbehandlung erhalten haben, zeigen am letzten Tag des Tumorverlaufs ein reduziertes Tumolvolumen unabhängig vom Genotyp der Maus. Dabei betragen die Volumina der Tumore an Tag 20 für die *Gpr65*-kompetenten Tiere durchschnittlich 68,4 mm³ und für die *Gpr65*-defizienten Tiere 103,4 mm³. Die unbehandelten *Gpr65*-defizienten Mäuse zeigen mit durchschnittlich 49,0 mm³ an Tag 20 ein erheblich reduziertes Tumorstadium im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistertieren. Diese Tendenz spiegelt sich auch im Gewicht der isolierten Tumore, dargestellt in Abbildung 23 (D), wieder.

Daraus lässt sich schließen, dass das Wachstum von glykolytisch aktiven Tumoren beeinträchtigt ist, sobald es neutrophilen Granulozyten nicht mehr möglich ist, das angesäuerte Mikromilieu zu infiltrieren und einen N2-Phänotyp anzunehmen.

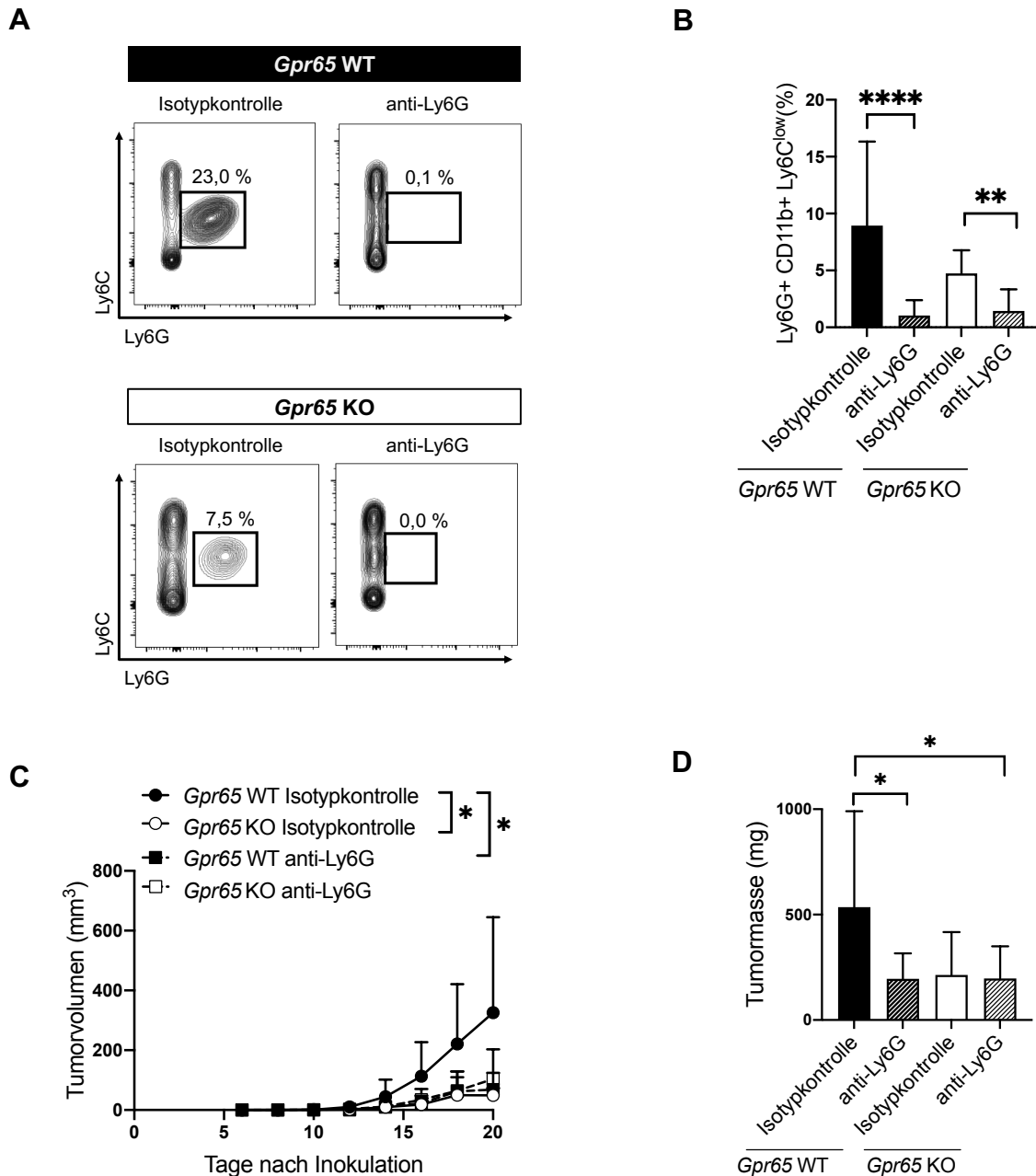
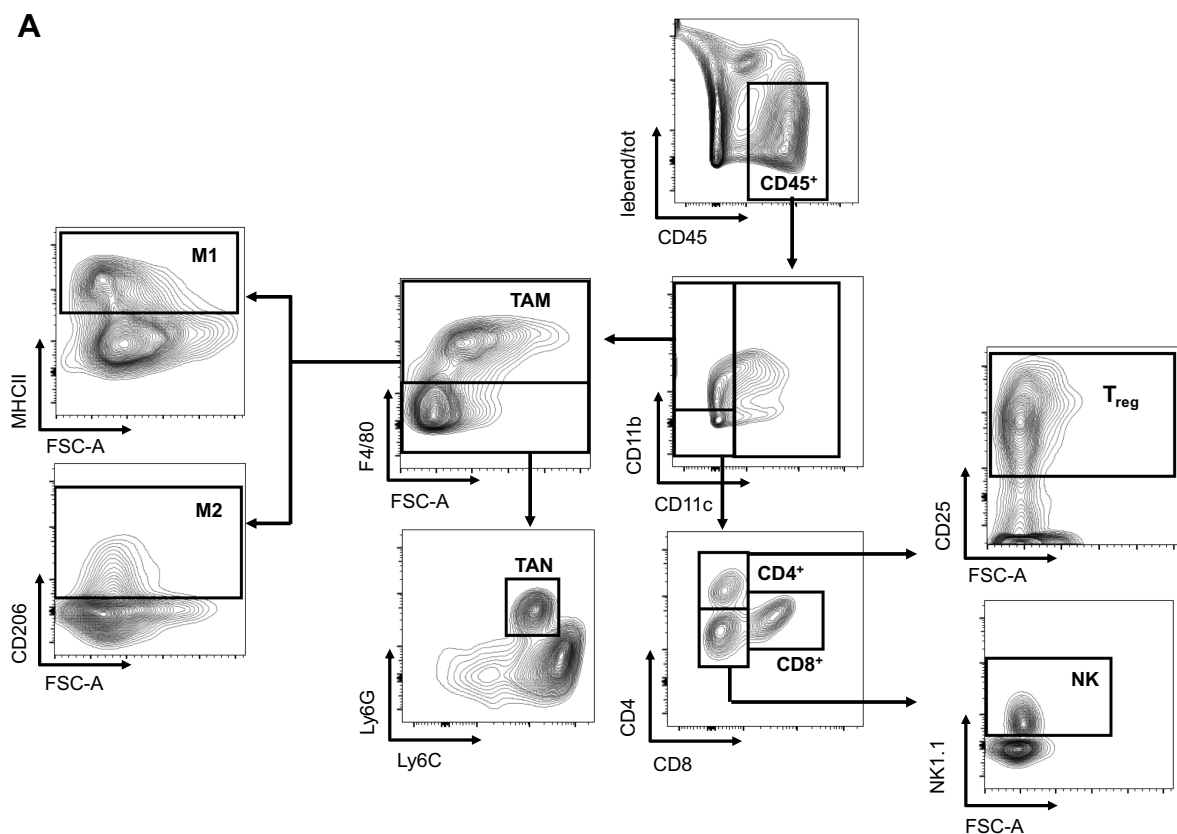


Abbildung 23: Effektive Depletion von Neutrophilen inhibiert das B16 Melanomwachstum in wildtypischen Mäusen.

(A) und (B) zeigen die effektive Depletion von Neutrophilen durch anti-Ly6G Antikörper. Die zellulären Bestandteile des Bluts wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf CD45, CD11b, Ly6G und Ly6C gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Der Anteil von Ly6G⁺ und Ly6C^{low} Zellen aller lebenden CD45⁺ Immunzellen im Blut von *Gpr65*-kompetenten und *Gpr65*-defizienten Mäusen mit Behandlung von neutralisierendem anti-Ly6G Antikörper und Sekundärantikörper und dessen Isotypkontrollen ist exemplarisch für jeweils eine Probe dargestellt. (B) Die Anteile von Ly6G⁺, CD11b⁺ und Ly6C^{low} Zellen aller lebenden CD45⁺ Immunzellen im Blut sind als Mittelwerte aller Proben dargestellt. (C) 2×10^5 B16 Tumorzellen wurden in *Gpr65*-kompetente und -defiziente Tiere subkutan injiziert und das Tumorwachstum wurde gemessen (n=10 pro Gruppe). Die Signifikanz bezieht sich auf den letzten Tag des Tumorversuchs. (D) zeigt die durchschnittliche Tumormasse der Gruppen nach Entnahme.

Um das Tumorgewebe auf weitere Zellpopulationen zu untersuchen, wurde eine FACS Analyse durchgeführt. Dafür wurden die Tumore jeder Versuchsgruppe entnommen und in eine Einzelzellsuspension gebracht. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 24 zeigt zum einen die *Gating Strategy* (A), mit welcher die Zellpopulationen identifiziert wurden und zum anderen die ausgewerteten Ergebnisse als prozentuale Anteile von lebenden CD45⁺ Immunzellen (B). Wie zu erwarten war, ist die Population der TAN in den behandelten Gruppen signifikant reduziert. Auch die unbehandelte Versuchsgruppe der *Gpr65*-defizienten Tiere zeigt im Vergleich zu den Tumorgeweben der wildtypischen Tiere einen verminderten Anteil an tumorinfiltrierenden Neutrophilen. Während sich der Gesamtanteil an TAM der Versuchsgruppen nicht signifikant unterscheidet, sind die antitumoralen TAM vom M1-Phänotyp sowohl in der *Gpr65*-defizienten Gruppe, als auch in den mit dem Antikörper behandelten Versuchsgruppen signifikant erhöht. Weiterhin scheint die Polarisierung in Richtung protumoralen M2-Phänotyp inhibiert zu sein. Die *Gpr65*-defizienten Tiere zeigen generell eine verminderte antiinflammatorische Makrophagenpopulation. Der prozentuale Anteil der Zellen der lymphoiden Linie, so wie die NK-Zellen zeigen hingegen keine Unterschiede. Daher stellte sich die Frage, ob die antitumoralen Effekte der Immunzellen weiter verstärkt werden können, indem nicht nur die Neutrophilen daran gehindert werden den Tumor zu infiltrieren, sondern zusätzlich eine Immun-Checkpoint Blockade durchgeführt wird, um einen synergistischen Effekt zu erzielen.



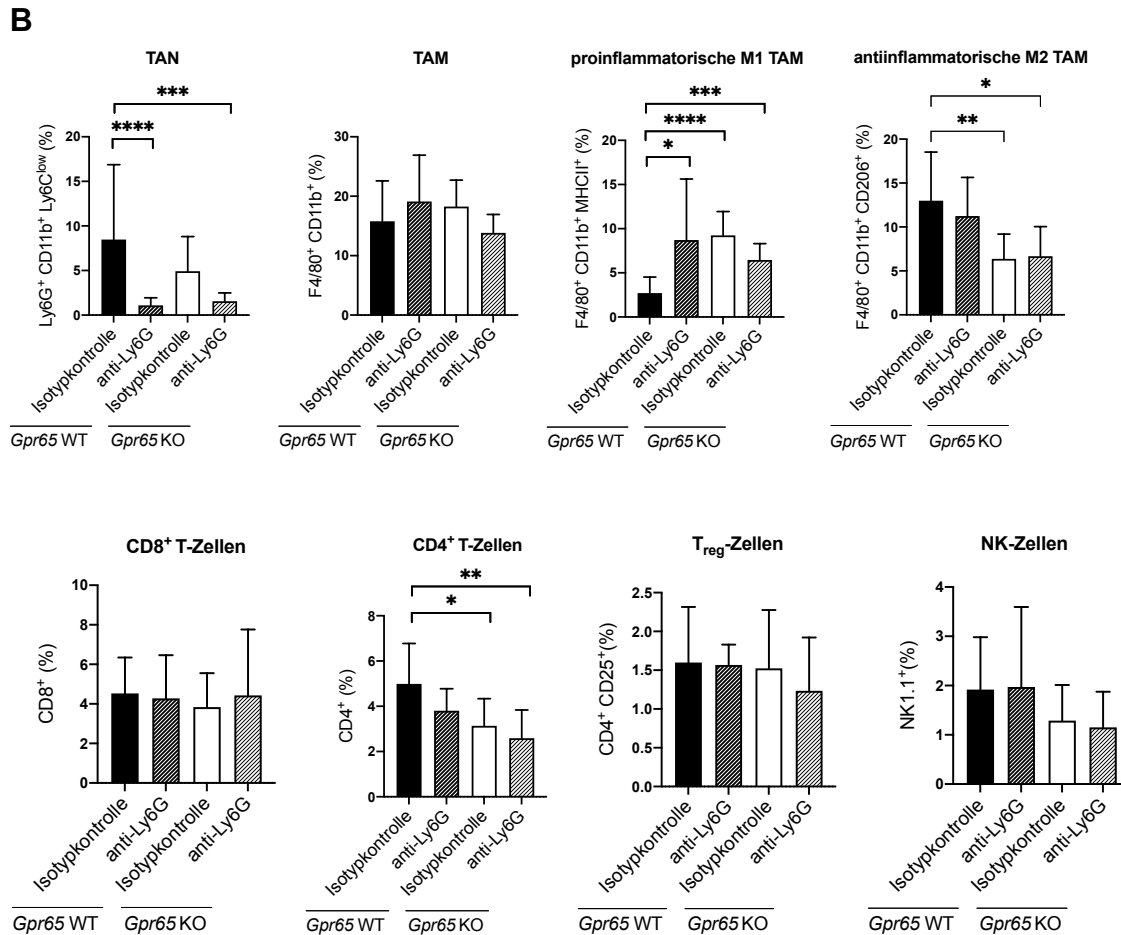


Abbildung 24: Myeloide Zellen zeigen eine antitumorale Polarisierung nach Depletion von Neutrophilen.

B16 Melanome aller Versuchstiere wurden an Tag 20 isoliert und mit dem *Tumor Dissociation* Kit zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet (*Gpr65* WT Isotypkontrolle n=10, *Gpr65* WT anti-Ly6G n=9, *Gpr65* KO Isotypkontrolle n=10, *Gpr65* KO anti-Ly6G n=8). Das Zellpellet wurde anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Die Oberflächenfärbung enthielt Antikörper gegen CD45, CD11b, CD11c, CD4, CD8, CD25, NK1.1, Ly6C, Ly6G, F4/80 und MHCII. Die intrazelluläre Färbung enthielt den Antikörper gegen den Marker CD206. **(A)** zeigt die *Gating Strategy*, die mittels FlowJo Software (BD Bioscience) angewendet wurde, um die einzelnen Zellpopulationen zu definieren. Folgende Zelltypen konnten analysiert werden: CD45⁺ Immunzellen (CD45⁺), CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD8⁺), regulatorische T-Zellen (T_{reg}), natürliche Killerzellen (NK), Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM), proinflammatorische Makrophagen (M1), antiinflammatorische Makrophagen (M2) und Tumor-assoziierte Neutrophile (TAN). **(B)** zeigt die durchschnittlichen prozentualen Anteile der Zellpopulationen der infiltrierenden, lebenden CD45⁺ Immunzellen in den Tumorgeweben der einzelnen Versuchsgruppen. Für die Signifikanzberechnungen wurden die unbehandelten *Gpr65*-wildtypischen Proben als Referenz gewählt.

3.15 Die Kombinationstherapie aus CXCR2-Blockade und ICB führt zu einem signifikant verringerten B16 Tumorwachstum

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass durch Depletion der Neutrophilen die Tumorprogression reduziert werden konnte. Diese ist mit der Tumorentwicklung tumortragender *Gpr65*-defizienter Tiere vergleichbar. Um einen klinischen Bezug herzustellen, wurde die Population der neutrophilen Granulozyten nicht depletiert, sondern ihre Rekrutierung zum Tumorherd unterbunden. Dafür wurde wildtypischen Versuchstieren ein CXCR2-Antagonist intraperitoneal verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten lediglich PBS. Zusätzlich wurde eine Versuchsgruppe mit einem anti-PD1 Antikörper behandelt, um eine Verbesserung der Immunantwort der lymphoiden Zellen zu erzielen. Hierfür wurde ein anti-PD1 Antikörper intravenös appliziert. Die Kontrolltiere bekamen die entsprechende Isotypkontrolle. Eine weitere Versuchsgruppe erhielt eine Kombinationsbehandlung aus CXCR2-Antagonisten und anti-PD1 Gabe, um einen synergistischen Effekt zu untersuchen. Daraus ergaben sich vier Versuchsgruppen die in Tabelle 14 aufgelistet sind. Das Verfahren der Behandlungen ist in Abschnitt 2.12.4, 2.12.5 und 2.12.6 beschrieben.

Tabelle 14: Verteilung der Versuchstiere zur CXCR2-Blockade und ICB.

Mausstamm C57BL/6J			
Kontrollgruppe	Versuchsgruppe anti-PD1	Versuchsgruppe CXCR2-Antagonist	Versuchsgruppe Kombinationstherapie
19	10	10	10

Allen Tieren wurden 2×10^5 B16 Melanomzellen subkutan in die rechte Flanke inokuliert. 18 Tage lang wurde das Tumorwachstum gemessen. Der Verlauf ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Tiere, die den CXCR2-Antagonisten bekommen haben, sowie die Tiere, die eine ICB erhalten haben, zeigen ein deutlich verringertes Tumorwachstum im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Besonders auffällig ist die Tumordinhibition der Tiere, die eine Kombinationstherapie aus CXCR2-Antagonisten und ICB erhalten haben. Das Volumen der B16 Melanome konnte auf ein Minimum reduziert werden. Während die wildtypischen Tiere an Tag 18 ein durchschnittliches Tumolvolumen von $466,9 \text{ mm}^3$ zeigen, ist das Tumorwachstum der behandelten Tiere mit $63,6 \text{ mm}^3$ stark inhibiert.

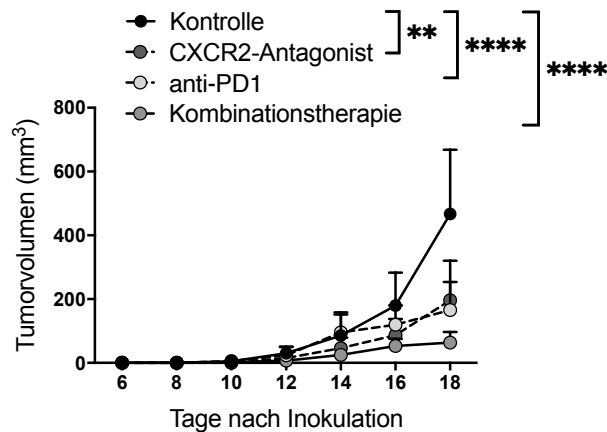


Abbildung 25: Verringeres Tumorwachstum nach einer Kombinationstherapie aus CXCR2-Antagonisten und ICB.

2 x 10⁵ B16 Tumorzellen wurden wildtypischen Tieren in die rechte Flanke subkutan injiziert und das Tumorwachstum gemessen (Kontrolle n=19, CXCR2-Antagonist n=10, anti-PD1 n=10, Kombinationstherapie n=10). Die Behandlungen der Tiere erfolgten wie beschrieben (Abschnitt 2.12.4, 2.12.5 und 2.12.6). Die Signifikanz bezieht sich auf den letzten Tag des Tumorversuchs.

Das Tumorgewebe wurde weiterhin auf infiltrierende Zellpopulationen untersucht. Dafür wurden die Tumore isoliert und zu einer Einzelzellsuspension aufgearbeitet. Nach anschließender magnetischer Selektion tumorinfiltrierender Immunzellen und Färbung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper wurde das Zellpellet durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 26 (A) zeigt das Schema, nach welchem die einzelnen Zelltypen identifiziert wurden. Abbildung 26 (B) zeigt die Ergebnisse. Wie angenommen finden sich weniger TAN in den Tumoren, wenn die Tiere die Kombinationstherapie aus CXCR2-Antagonisten und ICB erhalten haben. Zudem konnte die Immunantwort der lymphoiden Zellpopulationen signifikant verbessert werden. Es fanden sich höhere Anteile an zytotoxischen CD8⁺-Zellen sowie an natürlichen Killerzellen in den behandelten Tieren. Beides spricht für eine gesteigerte antitumorale Wirkung der Kombinationsbehandlung. Weiterhin zeigen sich deutliche Unterschiede in der Population der T_{reg}-Zellen. Der Anteil dieser immunsuppressiven Zellen ist in den behandelten Tieren signifikant reduziert. Auch das spricht für eine erhebliche Verbesserung der antitumoralen Immunantwort.

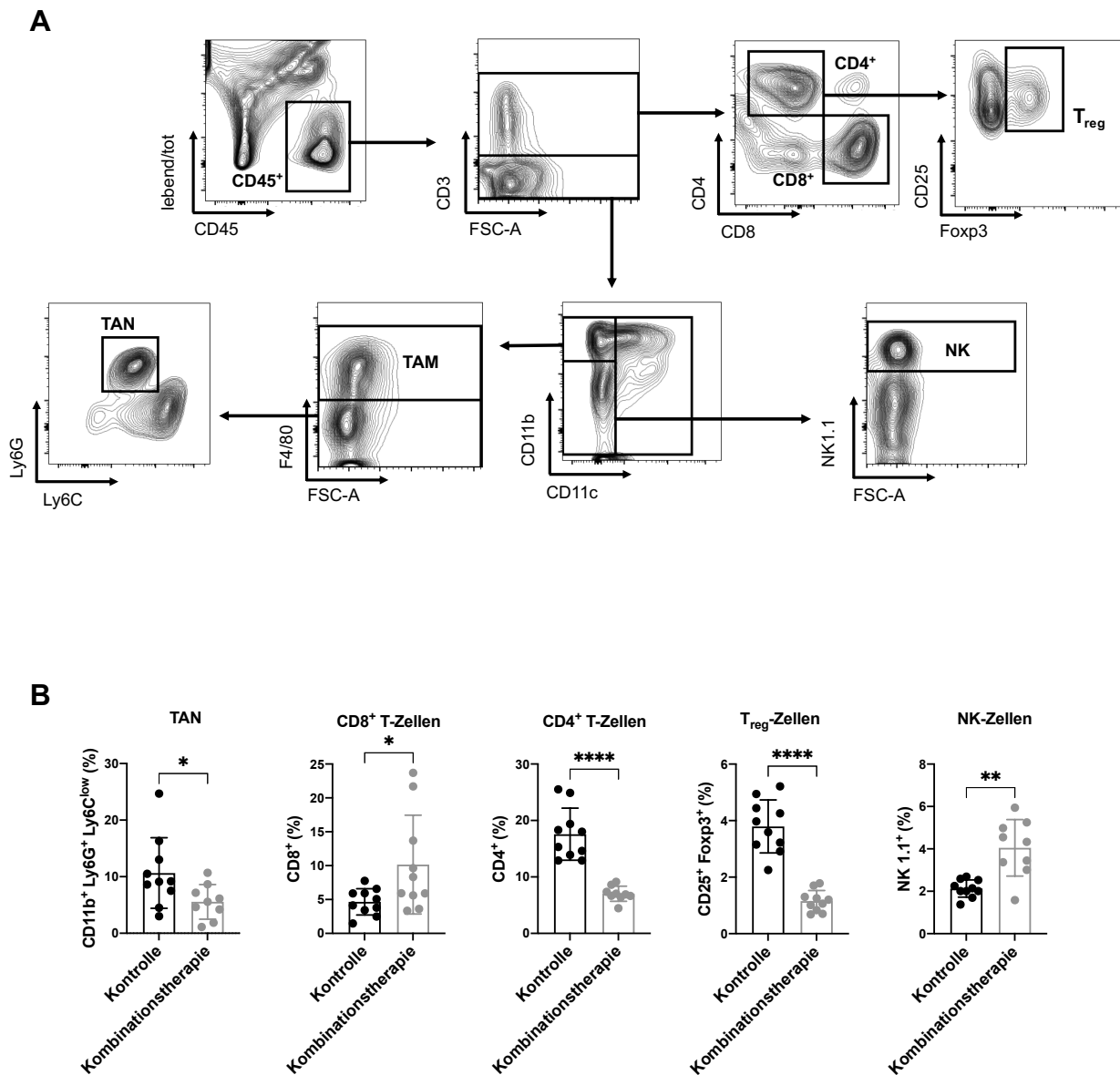


Abbildung 26: Eine Kombinationstherapie aus CXCR2-Antagonisten und ICB verbessert die Immunantwort der lymphoiden Zellen im B16 Tumor.

B16 Tumore der Kontrolltiere (n=10) und der Versuchstiere, welche die Kombinationstherapie erhalten haben (n=10), wurden an Tag 18 entnommen und mithilfe des *Tumor Dissociation Kit* zu einer Einzelzellsuspension aufgearbeitet. Das Zellpellet wurde anschließend mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Die Oberflächenfärbung enthielt Antikörper gegen CD45, CD11b, CD11c, CD3, CD4, CD8, CD25, NK1.1, Ly6C, Ly6G und F4/80. Die intrazelluläre Färbung enthielt den Antikörper gegen Marker Foxp3. **(A)** zeigt die *Gating Strategy*, die mittels FlowJo Software (BD Bioscience) angewendet wurde, um die einzelnen Zellpopulationen zu definieren. Folgende Zelltypen konnten analysiert werden: CD45⁺ Immunzellen (CD45⁺), CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD8⁺), regulatorische T-Zellen (T_{reg}), natürliche Killerzellen (NK), Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) und Tumor-assoziierte Neutrophile (TAN). **(B)** zeigt die durchschnittlichen prozentualen Anteile der Zellpopulationen der infiltrierenden, lebenden CD45⁺ Immunzellen in den Tumorgeweben der einzelnen Versuchsgruppen.

4. Diskussion

4.1 *Gpr65*-abhängige Immunantworten gegen hoch glykolytische Tumore

Die Immunevasion und ein bevorzugter Stoffwechsel, bei dem die Glukoseverwertung in eine erhöhte Milchsäureproduktion umgelenkt wird, sind zwei grundlegende Merkmale von Krebs. Der veränderte Metabolismus, den Tumorzellen annehmen, um ihren Energiebedarf zu decken und der einhergehende Überschuss an Milchsäure wird als Warburg-Effekt beschrieben. Das entstehende Lactat galt lange Zeit als Abfallprodukt dieser Veränderung. Doch viele aktuelle Studien zeigen, dass eine konstant erhöhte Milchsäureproduktion und die daraus resultierende Übersäuerung der Mikroumgebung des Tumors mehrere kritische onkogene Prozesse aktiviert und die Arzneimittelresistenz fördert.^{156–158}

Das Lactat und die zusätzlich entstehenden Protonen werden über spezielle Transporter in den Extrazellularraum gepumpt, um einen intrazellulären Überschuss an Säure zu verhindern. Dazu zählen Säure-Base-Regulatoren, wie Na^+/H^+ -Austauscher und Monocarboxylat-Transporter.^{159,160} Altenberg und Greulich konnten im Jahr 2004 in etwa 70 % aller Krebsfälle eine Überexpression von Glykolyse-relevanten Enzymen und entsprechender Membrantransporter nachweisen.¹⁶¹ Die veränderte Stoffwechsellage stark glykolytischer Tumore führt letztlich zu einer Ansäuerung des Tumormilieus. Der pH-Wert der Tumorumgebung kann auf bis zu 5,5 sinken. Dies liegt, vergleichend mit physiologischen Werten in gesunden Geweben von 7,2 bis 7,4, deutlich im sauren pH-Bereich.^{162,163} Die Konzentration von Lactat im Tumormikromilieu kann dabei bis zu 10-30 mM betragen, während unter normalen physiologischen Bedingungen Konzentrationen von etwa 1,5-3,0 mM vorliegen.¹⁶⁴ Erhöhte LDH-Konzentrationen im Blut dienen daher als prognostischer Marker von Tumoren.^{165–168} Die Dysregulation des pH-Wertes ist ein Kennzeichen aggressiver maligner Tumore, wie dem Brustkrebs, dem Pankreaskarzinom oder dem malignem Melanom.^{169–171} Sie hat Auswirkungen auf die Proliferation, die Migration und die Invasion von Tumorzellen und korreliert mit der Bildung von Metastasen, indem der Säure-induzierte Abbau der extrazellulären Matrix voranschreitet¹⁷². Auch die Daten der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass Tumorzellen des B16-Melanoms ein glykolytisches Proteinprofil ausweisen. Ebenfalls konnten Proteine des Hif-1 α Signalwegs identifiziert werden, welche zusätzlich zur Azidose beitragen. Für Zellen des MC38 Kolonadenokarzinoms hingegen konnte dieses Proteinprofil nicht dargestellt werden, was dafürspricht, dass schwach und stark glykolytische Tumorentitäten existieren (Abbildung 9).

Zudem konnte in vielen Arbeiten gezeigt werden, dass die Funktion von infiltrierenden Immunzellen, Gefäßzellen, Stromazellen und anderen Matrixkomponenten durch das angesäuerte Mikromilieu des Tumors beeinträchtigt wird. Zusammengenommen resultieren diese Effekte in schlechteren klinischen Prognosen.¹⁷³ Vor allem die Aktivität der Immunzellen spielt im veränderten Tumormikromilieu eine bedeutende Rolle in der Tumorbilogie. Es ist bekannt, dass die Immunantworten in der Tumormikroumgebung sowohl tumorunterstützende, als auch tumorhemmende Wirkungen zeigen können.^{26,174} In CD8⁺ T-Zellen induziert eine Azidose eine Anergie und beeinträchtigt damit ihre zytotoxischen Effektorfunktionen.¹⁷⁵ Es konnte ebenfalls eine Verringerung der Sekretion zytolytischer Zytokine von CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden, sowie eine Hemmung der Chemotaxis dieser Zellen in die Umgebung des Tumors.^{176,177} Ähnlich wie CD8⁺ T-Zellen zeigen auch NK-Zellen unter neutralen pH-Bedingungen eine schnelle und starke zytotoxische antitumorale Wirkung, indem sie Perforin, Granzyme und Zytokine produzieren und freisetzen. Eine extrazelluläre Azidose im Mikromilieu des Tumors hemmt jedoch die Degranulation und schwächt ihre antitumorale Aktivität enorm.^{178,179} Die Antitumor-Immunität wird weiterhin supprimiert, indem durch die sauren Tumorbedingungen die Ausschüttung von TNF- α , IL-1 β , IL-12 und TGF- β 1 vermindert wird.^{180,181} Außerdem ist die Infiltration von NK-Zellen ins Tumorgewebe durch die Anwesenheit von TAN vom N2-Phänotyp beeinträchtigt.¹⁸² T_{reg}-Zellen unterstützen bei der Krebsimmunität die Entwicklung und Progression von Tumoren, indem sie die Antitumorantworten unterdrücken. Ihre Aktivität und Rekrutierung zum Tumorherd ist im sauren TME erhöht.^{183,184} Auch für dendritische Zellen wurden immunsuppressive Effekte unter sauren Bedingungen beschrieben. Dendritische Zellen spielen als Antigen-präsentierende Zellen bei der Aktivierung naiver T-Zellen und der Induktion einer antigenspezifischen T-Zell-vermittelten Immunität eine entscheidende Rolle. Da T-Zellen für eine Antitumor-Immunreaktion unverzichtbar sind, sind angemessene Reaktionen der dendritischen Zellen für eine ausreichende T-Zell-Aktivierung erforderlich.^{185,186} Jedoch werden diese Funktionen der krebsassoziierten dendritischen Zellen durch saure Einflüsse der Tumorumgebung unterdrückt.¹⁸⁷ Das Mikromilieu ist reich an immunsuppressiven Faktoren, die immunstimulierende Zellen einschränken.¹⁸⁸ Von Monti et al. konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Lactatkonzentration die Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen hemmt. Unreife myeloide Vorläuferzellen sind dann nicht mehr in der Lage CD1a zu exprimieren und die Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen ist inhibiert.¹⁸⁹ Die Auswirkungen der sauren Umgebung auf Neutrophile und Makrophagen, die mit Krebs assoziiert sind, werden hingegen kontrovers diskutiert. Fridlender et al. beschrieben im Jahr 2009 das binäre Modell von pro- und antiinflammatorischen neutrophilen Granulozyten analog zu Makrophagen.⁹³ Beide Klassen können im Tumormikromilieu vorkommen. So zeigen viele Arbeiten eine Aktivierung der traditionellen, tumorzytotoxischen N1-Neutrophilen durch die

PI3-Kinase und über den ERK-Signalweg, der die Neutrophilen zu starken Entzündungsmediatoren macht.¹⁹⁰ Sie sezernieren immunaktive Faktoren, wie TNF- α , ICAM-1 oder FAS.^{155,191} Andererseits konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten das saure Milieu des Tumors und die Hypoxie verstärken.^{192,193} Dazu fördert das saure Milieu ein alternatives Funktionsprofil der Neutrophilen, welches zu einer Verschlechterung der Phagozytosefähigkeit führt.¹⁹⁴ Die molekularen Mechanismen dahinter sind jedoch nur unzureichend geklärt. Weiterhin ist die Differenzierung von MDSC, welche aus dem Knochenmark stammen, in neutrophile Granulozyten und Makrophagen unter sauren Umständen beeinträchtigt, was zu einer Ansammlung von Zellen mit immunsuppressivem Phänotyp führt.¹⁹⁵ Auch Makrophagen können als Reaktion auf ihre Mikroumgebung entweder einen antitumoralen M1-Phänotyp oder einen protumoralen M2-Phänotyp annehmen. Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass sowohl ein saures TME als auch eine erhöhte Konzentration an Lactat die Makrophagen erheblich beeinflussen können.

So kann ein niedriger pH-Wert den Phänotyp und die Funktionalität von Makrophagen verändern.¹⁹⁶ Insbesondere die von Tumorzellen abgesonderte Milchsäure hat eine entscheidende Signalfunktion im Tumormikromilieu, um die M2-Polarisierung zu induzieren.¹⁹⁷ So entdeckten beispielsweise El-Kenawi et al., dass die saure Umgebung von Prostatakrebs eine verstärkte Expression von CD206 und einer Reihe von M2-verwandten Genen, wie *Arg1*, *CD14* und *IL1b*, hervorrufen kann.¹⁹⁶ Die von Makrophagen registrierte Säure konnte ebenfalls eine Hochregulierung von *Vegfa* fördern.¹⁹⁸ Somit initiiert eine Azidose die Expression von Genen, die traditionell mit M2-Makrophagen in Verbindung gebracht werden. Auch Bohn et al. konnten bereits eindrücklich eine Säure-induzierte Polarisierung der Makrophagen zu einem M2-Phänotyp darstellen. Es gelang ihnen auch den Signalweg der Polarisierung zu entschlüsseln. Die Protonen im Tumormikromilieu induzieren in TAM die cAMP-abhängige Expression von *Icer*. Die erhöhte *Icer*-Expression korreliert nachweislich mit einem M2-Phänotyp. Die polarisierten M2-Makrophagen sind essenziell für die Tumorprogression von B16-Melanomen. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Defizienz von *Icer* in Makrophagen zur Abstoßung der inokulierten Melanome führt.²² Auch die vorliegenden Daten dieser Arbeit zeigen, dass eine *in vitro* Kultivierung von wildtypischen BMDM bei einem pH-Wert von 6,1 die Expression M2-typischer Gene, wie *Arg1*, *Vegfa* und *Hif-1 α* , hervorrufen kann. In *Gpr65*-defizienten Tieren hingegen ist die Expression dieser Gene reduziert. Umgekehrt verhält es sich mit dem M1-typischen Gen *Hb-2A* (Abbildung 11 (A)). Diese Deregulation der Gene konnte ebenfalls für *Icer*-kompetente und -defiziente Makrophagen beobachtet werden (Abbildung 11 (B)). Auch die darauffolgenden *in vivo* Versuche zeigten, dass es über die *Gpr65*-Defizienz und der damit einhergehende Ausfall der cAMP-abhängigen Expression von *Icer* zu einer Abstoßung von B16-Melanomen in der Maus führt

(Abbildung 12 (A)). Für schwach glykolytische Tumore wie das MC38 Adenokarzinom des Kolons trifft dies nicht zu (Abbildung 12 (B)).

Zusammengenommen zeigen diese Arbeiten, dass der erhöhte Säuregehalt des umliegenden Gewebes einen direkten Einfluss auf die Polarisierung des Makrophagen-Phänotyps hat und die Differenzierung zu einem protumoralen M2-Phänotyp bevorzugt ist. Allerdings wurden die daraus resultierenden Auswirkungen auf die zelluläre Zusammensetzung des Tumormikromilieus in der Literatur nicht weiter untersucht.

In dieser Arbeit gelang es die Veränderungen der zellulären Komponenten des Tumormikromilieus zu analysieren, sobald die Azidose des B16-Melanoms durch eine Defizienz des Protonen-sensitiven Rezeptors GPR65 nicht mehr wahrgenommen werden konnte und eine verbesserte Antitumor-Immunantwort zu verzeichnen war.

Zunächst einmal konnte gezeigt werden, dass in *Gpr65*-kompetenten Tieren, die Populationen der NK-Zellen und der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen reduziert sind (Abbildung 13). Dies entspricht der Annahme, dass Lactatkonzentrationen über 20 mM die Anzahl dieser Zellen reduzieren kann, indem sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Apoptose verursachen.¹⁹⁹ Interessanterweise findet sich in der Literatur kein Hinweis darauf, dass Lactat allein unter neutralen pH-Bedingungen derartige hemmende Wirkungen auf diese Zelltypen ausübt. Es scheinen also hohe Lactatkonzentrationen mit einhergehendem niedrigem pH-Wert in der Tumorumgebung notwendig zu sein, um CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen zu blockieren.

Weiterhin ist in Abbildung 14 zu erkennen, dass eine Defizienz an GPR65 eine Polarisierung der TAM in Richtung M1-Phänotyp im Tumorkontext fördert und eine M2-Polarisierung hemmt. Zudem sind in wildtypischen Tumoringfiltraten quantitativ mehr antiinflammatorische TAM vom M2-Phänotyp zu finden. Laut Duque et al. können sich M1-Makrophagen direkt gegen Krebszellen richten, indem sie andere Immuneffektorzellen über CXCL10 rekrutieren und mit IFN- γ oder IL-12 aktivieren.²⁰⁰ Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass M2-Makrophagen ebenfalls einen Rekrutierungsmechanismus nutzen, um das Tumormikromilieu zu prägen. Die M2-Makrophagen zeichnen sich durch die Expression der Chemokine CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL7 aus (Abbildung 15), welche bekannt sind für die Fähigkeit Neutrophile zu mobilisieren und sie chemotaktisch über einen CXCL-CXCR2-Gradienten zu rekrutieren.^{108,201} Folglich ist die Anzahl an infiltrierenden TAN in *Gpr65*-defizienten Tieren geringer als in den wildtypischen Infiltraten (Abbildung 20). Zudem konnte gezeigt werden, dass die TAN der Wildtypen im sauren Milieu des B16-Tumors einen MDSC-typischen Phänotyp annehmen, welche immunsuppressiv wirken (Abbildung 22). Der Säuregehalt des Tumormikromilieus

verstärkt also die Rekrutierung der tumorfördernden TAN deutlich. Dieser Rekrutierungsmechanismus bestätigte sich nicht für *Gpr65*-defiziente Tiere und konnte auch nicht für Tumor-infiltrierende Immunzellen des MC38 Kolonadenokarzinoms nachgewiesen werden. Eine Vielzahl von Belegen deutet darauf hin, dass Zellen mit einem MDSC-ähnlichen Phänotyp bei der negativen Regulierung von Immunreaktionen gegen Krebs eine bedeutende Rolle spielen und ihr Vorhandensein mit einer schlechten klinischen Prognose und schlechten therapeutischen Ergebnissen verbunden ist.^{154,202} Diese immunsuppressive Aktivität dieser Zellen geht auf die Unterdrückung von Funktionen der T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen zurück.^{102,153,203} Die Abbildung 18 (B) zeigt eindrücklich die Kommunikation der TAM und TAN über CXCL-Signalwege und stützt die Annahme, dass eine Unterbrechung dieser Beziehung zu einer verbesserten Antitumor-Antwort führen könnte, da TAN vom N2-Phänotyp nicht mehr zum Tumorherd chemotaktisch rekrutiert werden können. Die anschließende Depletion der protumoralen TAN führte überzeugend zu einer verringerten Tumorprogression der B16 Tumore (Abbildung 23 (C) und (D)) und verstärkte die antitumoralen Effekte der myeloiden Zellen (Abbildung 24 (B)). Um einen klinischen Bezug herzustellen, wurde die TAM-TAN-Interaktion über einen CXCR2-Antagonisten blockiert. Auch hierbei trat die gewünschte Reduktion des Tumorwachstums durch Unterbrechung der CXCL-CXCR2-abhängige Rekrutierung von Neutrophilen ein. Viele Studien haben die positiven Resultate der CXCR2-Blockade ebenfalls für verschiedene Tumoren beschrieben und machen die Inhibierung der MDSC-Rekrutierung dafür verantwortlich.^{204–206}

Eine weitere bekannte und erfolgreiche Behandlung von Tumoren ist die Immuntherapie mittels ICB. Immun-Checkpoint-Proteine sind Regulationsproteine auf der Oberfläche von T-Zellen, die deren Immunantwort modulieren können. Werden die Immun-Checkpoint-Proteine von Partnerproteinen der Tumorzellen erkannt und gebunden, so werden diese aktiviert. Nach Aktivierung werden die Funktionen der T-Zellen inhibiert und folglich werden die T-Zellen daran gehindert die Tumorzellen zu zerstören. Eine ICB blockiert die Bindung von Checkpoint- und Partnerproteinen und verhindert die T-Zell-Blockade. Die immunaktiven Zellen sind somit weiterhin in der Lage die Tumorzellen anzugreifen. Eine solche ICB beruht beispielsweise auf der Inhibierung von PD-1 auf T-Zellen.^{207,208} Da aus unseren Daten hervorging, dass die CXCR2-Blockade keine Verbesserung der T-Zellantwort gegen das B16-Melanom hervorrief, wurde versucht einen zusätzlichen Effekt mittels der T-Zell-basierten Immuntherapie der ICB zu erzielen. Interessanterweise hat die Kombination aus CXCR2-Behandlung und ICB synergistische Auswirkungen sowohl auf das Tumorwachstum (Abbildung 25), als auch auf die lymphoiden Komponenten der Tumormikromilieus (Abbildung 26 (B)). Die erhobenen FACS Analysen zeigen, dass die Zellpopulationen mit einer hohen antitumoralen Wirkung größere Anteile der Tumorumgebung einnehmen, wenn die

Tiere die Kombinationstherapie erhalten haben. NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen infiltrieren das Tumormilieu deutlich stärker, als in den unbehandelten Tieren. Zudem konnte beobachtet werden, dass es den protumoralen T_{reg}-Zellen durch die Kombinationsbehandlung nicht möglich ist, den Tumor zu infiltrieren. In den Tumoren der unbehandelten Mäuse sind sie jedoch weiterhin vermehrt vorhanden (Abbildung 27). Es konnte demnach gezeigt werden, dass eine CXCR2-abhängige Blockade der Rekrutierung von TAN die Empfindlichkeit gegenüber einer ICB mit anti-PD-1 erheblich erhöht. Die Rezension von Goswami et al. stellte die Kombination aus CXCR2-Blockade und ICB ebenfalls als vielversprechenden Ansatz dar und beschrieb die klinische Relevanz dieser kombinatorischen Strategie aus Hemmung der TAN-Rekrutierung und der Immun-Checkpoints.²⁰⁹

Zusammengenommen zeigen die vorliegenden Ergebnisse wie der durch glykolytische Tumorzellen metabolisch induzierte saure pH-Wert die zellulären Komponenten im Tumormikromilieu moduliert und die antitumorale Antwort beeinflusst, indem die entstehende Azidose über GPR65 von TAM registriert wird. Es gelang den stark glykolytischen B16-Tumor für die Checkpoint-Inhibierung über CXCR2-Antagonisierung zu sensibilisieren und die zellulären Mechanismen, die in diesen Prozess involviert sind, zu entschlüsseln.

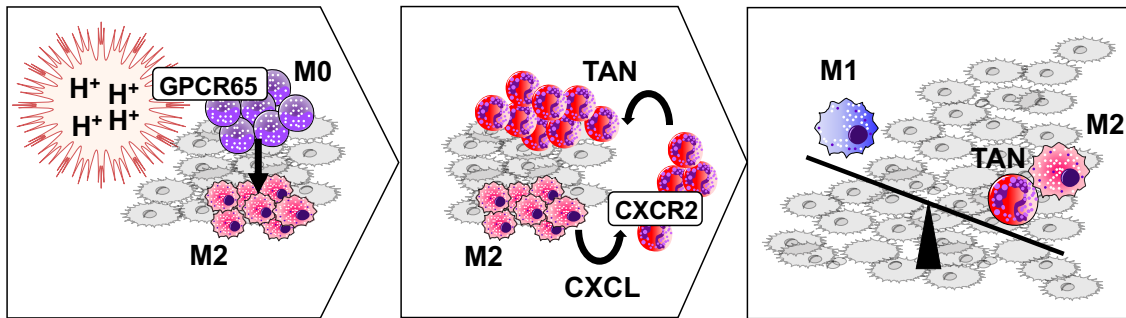
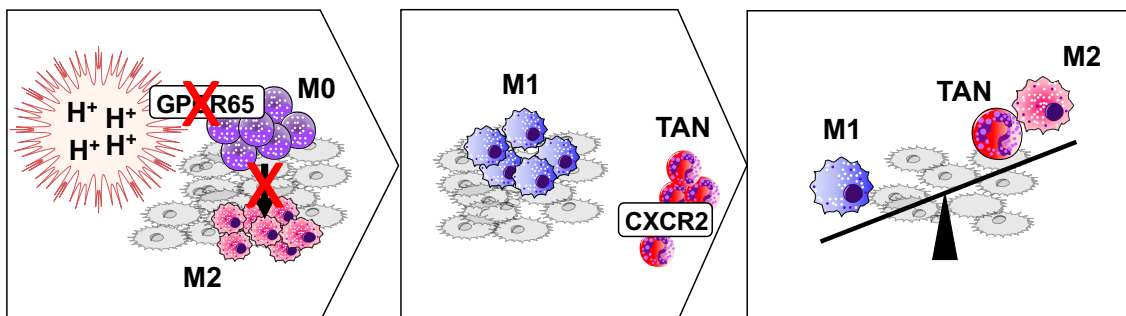
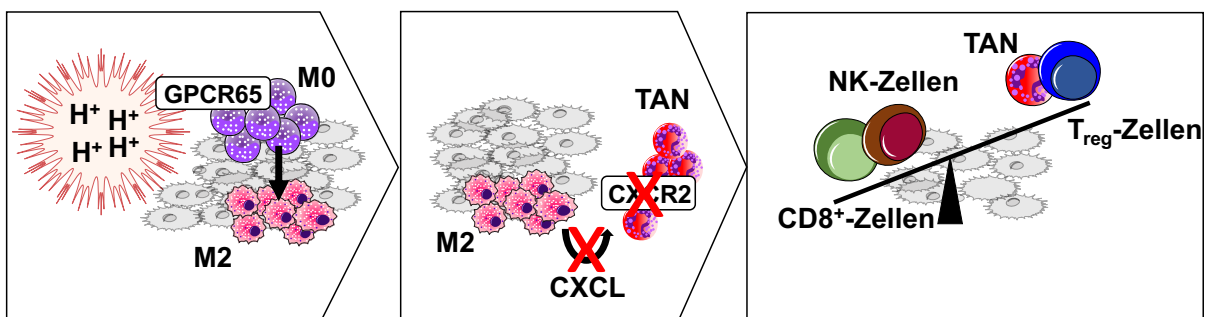
Gpr65 WT**Gpr65 KO****WT + CXCR2-Blockade + ICB**

Abbildung 27: Unterbindung des Immunevasionsmechanismus hochglykolytischer Tumore.

TAM aus B16 Tumoren in *Gpr65*-wildtypischen Mäusen registrieren über den GPR65 die extrazelluläre Ansäuerung des Tumormikromilieus. Die Zellen werden in einen M2-Phänotyp polarisiert und rekrutieren über CXCL-Proteine TAN zur Tumorumgebung. TAN wiederum fördern das aggressive Tumorstadium. Die *Gpr65*-defizienten Mäuse hingegen sind nicht in der Lage die Azidose des B16 Tumormikromilieus zu erkennen. Demnach polarisieren die TAM nicht in einen M2-Phänotyp. Folglich entstehen mehr TAM vom M1-Phänotyp, welche die Tumorstadium unterbinden. Der therapeutische Ansatz aus CXCR2-Blockade und ICB greift in den Rekrutierungsmechanismus von TAN, ausgehend von TAM, ein. Der CXCR2 auf der Oberfläche von TAN wird blockiert und sie werden folglich nicht mehr zum Tumorkern rekrutiert. Die zusätzliche ICB resultiert in einer verbesserten T-Zell-Immunität gegen den Tumor, so dass die myeloiden und lymphoiden Zellen gegen das B16 Melanom agieren.

4.2 Therapeutische Relevanz und Perspektiven

Der Erfolg einer Krebstherapie hängt vor allem von der Zusammensetzung der Mikroumgebung des Tumors ab. Ein hierbei entscheidender Bestandteil stellt die saure Mikroumgebung dar und sollte daher im Fokus einer wirksamen Behandlung von Krebs stehen. Die Azidose eines Tumors gilt als zentraler Metabolit der Tumorbiologie. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet konzentrieren sich die derzeit verfügbaren Immuntherapien jedoch nur auf die Wiederherstellung oder Verstärkung einzelner Komponenten des Immunsystems und richten sich häufig gegen einen einzigen Immunzelltyp. Dies ist bei einer alleinigen ICB-gerichteten Behandlung der Fall und dennoch spricht nur ein Teil der erkrankten Patienten auf diese Therapie an.^{210,211}

Wie in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, hat die entstehende Säure des Tumormikromilieus komplexe Auswirkungen auf Immunzellen des angeborenen und adaptiven Systems, die zur effektiven Immunevasion beiträgt. Dies äußert sich insbesondere in der Polarisierung der Tumor-infiltrierenden Makrophagen. Die protumoralen TAM nutzen einen Rekrutierungsmechanismus, um weitere protumorale neutrophile Granulozyten zu sich zu locken und die Tumorprogression in vollem Ausmaß zu unterstützen. Als wirksame Indikation die Kommunikation zwischen TAM und Neutrophilen zu unterbinden, stellte sich die Gabe eines CXCR2-Antagonisten heraus. Durch eine Kombination aus zusätzlicher Blockade des Immuncheckpoints PD-1 konnten die Verhältnisse der krebsbekämpfenden Zellpopulationen wiederhergestellt werden. Dabei zeigten sich sowohl die myeloiden als auch die lymphoiden Zelllinien aktiv gegen die Tumorzellen. Dieses kombinatorische Zusammenspiel beider Behandlungen zeigte eine äußerst effektive Form der Immuntherapie gegen das Wachstum der hoch glykolytischen B16 Melanomzelllinie.

Eine weitere hoffnungsvolle Möglichkeit in die Hauptwege des glykolytischen Metabolismus von Tumoren einzugreifen, bestünde darin, auf den pH-sensitiven GPR65 direkt einzuwirken oder indirekt die vermittelnden Signalwege zu unterbinden. Angesichts der Auswirkungen auf alle Zelltypen bestehen Bedenken, dass eine Vielzahl von Effektor-Funktionen der Immunzellen gehemmt werden könnten. Dieser einflussreiche Rezeptor sollte daher in den Mittelpunkt weiterer Grundlagenforschung rücken, um seine Auswirkungen besser zu verstehen. Ein weiterer Ansatz wäre die Säureproduktion der Krebszellen direkt oder den Abtransport der anfallenden Protonen in das Tumormikromilieu zu stoppen. Dadurch könnte der Säuregehalt im Extrazellularraum in einem physiologischen pH-Bereich gehalten werden und der Immunevasionsmechanismus wäre unterbrochen.

Zusammengefasst ist das Verständnis über die Komplexität der Mikroumgebung des Tumors und die therapeutischen Manipulationen, die auf die entstehende Azidose abzielen, von großer Bedeutung für Wiederherstellung einer soliden Immunität gegen Krebs.

5. Zusammenfassung

Laut Robert-Koch Institut erkranken in Deutschland jedes Jahr fast 500.000 Menschen an Krebs.²¹² Aufgrund des demographischen Wandels ist nicht nur die Tendenz der Neuerkrankungen steigend, sondern auch die der Sterberate. Daher besteht großer Handlungsbedarf der Krebsforschung innovative therapeutische Strategien zu entwickeln und die Signalwege, die zu einer effizienten antitumoralen Immunantwort führen, zu verstehen.

Aggressiv wachsende Tumore, wie z.B. das maligne Melanom der Haut, zeigen einen sehr hohen Energiebedarf, der durch einen bevorzugten glykolytischen Stoffwechsel gedeckt wird. Infolgedessen kommt es zu einer Überproduktion von Protonen mit einhergehender Ansäuerung des Tumormikromilieus. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass Makrophagen über den Protonen-sensitiven Rezeptor GPR65 in der Lage sind, die Protonen des Tumormikromilieus zu registrieren und im Zuge dessen zu einem antiinflammatorischen und tumorprogressiven Subtyp polarisieren. Ist dieser pH-sensitive Rezeptor auf der Oberfläche von Makrophagen jedoch depletiert, so polarisieren die Makrophagen zu einem funktionellen proinflammatorischen und antitumoralen Phänotyp. *In vivo* Experimente konnten weiterhin zeigen, dass aufgrund der Umpolarisierung von TAM die Progression hoch glykolytischer Tumore signifikant zurück geht. Zudem konnte der nachfolgende Mechanismus auf zellulärer Ebene geklärt werden. *Gpr65*-kompetente antiinflammatorische TAM produzieren Chemokine, die neutrophile Granulozyten zum Tumorherd rekrutieren. Diese Zelltypen weisen ein MDSC-ähnliches Genprofil auf, welche die immunsuppressive Umgebung des Tumors begünstigt. Das Fehlen dieser TAN führt zu einer verbesserten Immunantwort, was in einer Inhibition des B16 Melanomwachstums resultiert. Eine Blockade der Rekrutierung von Neutrophilen über ihren CXCR2-Rezeptor inhibiert das Tumorwachstum ebenfalls signifikant und verbessert die Antitumorantwort der myeloiden Zellen des Tumormikromilieus. Eine zusätzliche ICB verstärkt dazu die Immunantwort der lymphoiden Zellpopulationen und erzielt einen synergistischen Effekt, welcher das Tumorwachstum auf ein Minimum reduziert. Zusammenfassend zeigen die erhobenen Daten, inwiefern GPR65 das zelluläre Tumormikromilieu prägt, und veranschaulichen die Bedeutsamkeit dieses pH-sensitiven Rezeptors.

6. Abstract

According to the Robert Koch Institute, almost 500,000 people in Germany are diagnosed with cancer every year.²¹² Due to demographic change, the trend of new cases and the mortality rate are increasing. Therefore, there is a great need in cancer research to develop innovative therapeutic strategies and to understand the signaling pathways that lead to an efficient antitumor immune response.

Aggressively growing tumors show a very high energy demand, which is met by a glycolytic metabolism. Consequently, there is an overproduction of protons which leads to strong acidification of the tumor microenvironment.

Here we could show that tumor-associated macrophages are able to register protons produced by high glycolytic tumors via the GPR65. Subsequently macrophages react with an induction of the transcription repressor ICER resulting in a change of their phenotype toward a non-inflammatory M2-like phenotype. However, when this pH-sensitive receptor is no longer present on the surface of macrophages, Gpr65-dependent expression of *Icer* is absent and macrophages adopt a functional antitumor M1-like phenotype. *In vivo* experiments further demonstrated that due to the repolarization of TAM, progression of highly glycolytic tumors significantly decreases. Moreover, the subsequent mechanism at the cellular level could be elucidated. Anti-inflammatory TAM produce chemokines in wild-type animals to recruit neutrophils to tumor site. These cell types exhibit an MDSC-like gene profile that favors the immunosuppressive environment of the tumor. The absence of anti-inflammatory TAN leads to an enhanced immune response, resulting in inhibition of B16 melanoma growth. Blockade of neutrophil recruitment via CXCR2 antagonization also significantly inhibits tumor growth and improves the antitumor response of myeloid cells in the tumor microenvironment. Additional ICB enhances the immune response of the lymphoid cell populations and achieves a synergistic effect that minimizes tumor growth. Collectively, these findings show the extent of GPR65 shaping the cellular tumor microenvironment and illustrate the importance of this pH-sensitive receptor.

7. Literaturverzeichnis

1. Anderson, N. M. & Simon, M. C. The tumor microenvironment. *Current Biology* **30**, 905–931 (2020).
2. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322 (2012).
3. Maquoi, E. *et al.* Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression. *Frontiers in Oncology* **1**, 397 (2020).
4. Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C. & Marini, F. C. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Research* **18**, 1–11 (2016).
5. Hinshaw, D. C. & Shevde, L. A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res* **79**, 4557–4567 (2019).
6. Henke, E., Nandigama, R. & Ergün, S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front Mol Biosci* **6**, (2020).
7. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology* 2015 16:4 **16**, 343–353 (2015).
8. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, S3–S23 (2010).
9. Ferris, S. T. *et al.* cDC1 prime and are licensed by CD4+ T cells to induce anti-tumour immunity. *Nature* 2020 584:7822 **584**, 624–629 (2020).
10. Maimela, N. R., Liu, S. & Zhang, Y. Fates of CD8+ T cells in Tumor Microenvironment. *Comput Struct Biotechnol J* **17**, 1–13 (2019).
11. Plitas, G. & Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells in Cancer. *Annu Rev Cancer Biol* **4**, 459–477 (2020).
12. Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine* 2013 19:11 **19**, 1423–1437 (2013).
13. Hao, N. B. *et al.* Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol* **2012**, (2012).
14. Vitale, I., Manic, G., Coussens, L. M., Kroemer, G. & Galluzzi, L. Cell Metabolism Review Macrophages and Metabolism in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab* **30**, 36–50 (2019).
15. Italiani, P., Boraschi, D. & Ley, K. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol* (2014).
16. Yang, L. & Zhang, Y. Tumor-associated macrophages, potential targets for cancer treatment. *Biomark Res* **5**, 1–6 (2017).
17. Wu, L., Saxena, S. & Singh, R. K. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* **1224**, 1–20 (2020).
18. McFarlane, A. J., Fercoq, F., Coffelt, S. B. & Carlin, L. M. Neutrophil dynamics in the tumor microenvironment. *J Clin Invest* **131**, (2021).
19. Lyssiotis, C. A., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Org, A. K. & Kimmelman, A. C. Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment. *Trends Cell Biol* **27**, 863–875 (2017).
20. Yu, L., Chen, X., Sun, X., Wang, L. & Chen, S. The glycolytic switch in tumors: How many players are involved? *J Cancer* **8**, 3430–3440 (2017).
21. Fadaka, A. *et al.* Biology of glucose metabolism in cancer cells. *Journal of Oncological Sciences* **3**, 45–51 (2017).
22. Bohn, T. *et al.* Tumor immunoevasion via acidosis-dependent induction of regulatory tumor-associated macrophages. *Nature Immunology* 2018 19:12 **19**, 1319–1329 (2018).
23. Ganapathy-Kanniappan, S. & Geschwind, J. F. H. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Molecular Cancer* 2013 12:1 **12**, 1–11 (2013).

24. Shiratori, R. *et al.* Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner. *Scientific Reports* 2019 9:1 **9**, 1–15 (2019).
25. Warburg, O. Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften* 1924 12:50 **12**, 1131–1137 (1924).
26. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
27. Koppenol, W. H., Bounds, P. L. & Dang, C. v. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* **11**, 325–337 (2011).
28. Pfeiffer, T., Schuster, S. & Bonhoeffer, S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* (1979) **292**, 504–507 (2001).
29. Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* (1979) **324**, 1029–1033 (2009).
30. Liberti, M. v. & Locasale, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* **41**, 211–218 (2016).
31. Luengo, A. *et al.* Increased demand for NAD⁺ relative to ATP drives aerobic glycolysis. *Mol Cell* **81**, 691–707.e6 (2021).
32. Courtney, R. *et al.* Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Molecular Biology Reports* 2015 42:4 **42**, 841–851 (2015).
33. McFate, T. *et al.* Pyruvate Dehydrogenase Complex Activity Controls Metabolic and Malignant Phenotype in Cancer Cells *. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 22700–22708 (2008).
34. Kaplon, J. *et al.* A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature* 2013 498:7452 **498**, 109–112 (2013).
35. Zhu, G. *et al.* Albumin/vaccine nanocomplexes that assemble in vivo for combination cancer immunotherapy. *Nature Communications* 2017 8:1 **8**, 1–15 (2017).
36. Hos, B. J. *et al.* Identification of a neo-epitope dominating endogenous CD8 T cell responses to MC-38 colorectal cancer. *Oncoimmunology* **9**, (2020).
37. Overwijk, W. W. & Restifo, N. P. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* **CHAPTER**, Unit (2001).
38. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**, 723–737 (2011).
39. Geissmann, F. *et al.* Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* (1979) **327**, 656–661 (2010).
40. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Publishing Group* **8**, (2008).
41. Furth, R. van & Colin, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* **128**, 415–435 (1968).
42. Gordon, S. & Martinez-Pomares, L. Physiological roles of macrophages. *Eur. J. Physiol.* **469**, 365–374 (2017).
43. Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A. & Merad, M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nature Reviews Immunology* **15**, 731–744 (2015).
44. Arango Duque, G., Descoteaux, A., Lacy, P., Gavrillin, M. A. & Zoe Murray, R. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* **5**, 1–12 (2014).
45. Volkman, A. & Gowans, J. L. THE ORIGIN OF MACROPHAGES FROM BONE MARROW IN THE RAT. *Br. J. Exp. Pathol.* **46**, 62–70 (1964).
46. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
47. Imhof, B. A. & Aurrand-Lions, M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature Reviews Immunology* **4**, 432–444 (2004).
48. Ushach, I. & Zlotnik, A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J. Leukoc. Biol.* **100**, 481–489 (2016).

49. Whetton, A. D. & Dexter, T. M. Myeloid haemopoietic growth factors. *Biochim Biophys Acta* **989**, 111–132 (1989).
50. Zhou, L., Cao, X., Fang, J., Li, Y. & Fan, M. Macrophages polarization is mediated by the combination of PRR ligands and distinct inflammatory cytokines. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 10964–10974 (2015).
51. Haskó, G., Pacher, P., Deitch, E. A. & Vizi, E. S. Shaping of monocyte and macrophage function by adenosine receptors. *Pharmacol Ther* **113**, 264–275 (2007).
52. Nimmerjahn, F., Velge-Roussel, F., Junker, F., Gordon, J. & Qureshi, O. Fc Gamma Receptors and Their Role in Antigen Uptake, Presentation, and T Cell Activation. *Frontiers in Immunology* **1**, 1393 (2020).
53. Evans, H. G. *et al.* In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6232–6237 (2009).
54. Gordon, S. & Taylor, P. R. MONOCYTE AND MACROPHAGE HETEROGENEITY. *Nat Rev Immunol* **5**, 953–964 (2005).
55. Martin, M. U. & Resch, K. *Immunologie*. (utb GmbH, 2009).
56. Ohradanova-Repic, A. *et al.* The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol* **1**, 1462 (2019).
57. Murray, P. J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
58. Martinez, F. O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* **6**, 1–13 (2014).
59. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 Potently Enhances Murine Macrophage Mannose Receptor Activity: A Marker of Alternative Immunologic Macrophage Activation. *J. Exp. Med.* **176**, 287–292 (1992).
60. Beatrice, C. F. N. & Seaver, S. A. Perspectives Secretory Products of Macrophages. *J. Clin. Invest.* **79**, 319–326 (1987).
61. Macmicking, J., Xie, Q.-W., Beatrice, C. N. & Seaver, S. A. NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION. *Annu. Rev. Immunol* vol. 15 (1997).
62. Nathan, C. F. & Hibbs, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* **3**, 65–70 (1991).
63. Hill Charles D Mills, A. M., Kincaid, K. & Alt, J. M. Paradigm M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2. *J Immunol References* **164**, 6166–6173 (2000).
64. Herndon, D. N., Suzuki, F., Katakura, T., Miyazaki, M. & Kobayashi, M. Activated Macrophages Inhibit the Generation of Classically Alternatively Activated Macrophages to CCL17 and IL-10 as Effectors That Enable. *J Immunol References* **172**, 1407–1413 (2004).
65. Mills, C. D., Lenz, L. L., Ley, K. & Kemper, C. Macrophages at the fork in the road to health or disease Summary of M1/M2 macrophages topic. *Front Immunol* **6**, (2015).
66. Pearce, E. J. *et al.* Metabolism Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Differential Regulation of Nitric Oxide. *J Immunol References* **167**, 6533–6544 (2001).
67. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* **8**, 958–969 (2008).
68. Davis, M. J. *et al.* Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *mBio* **4**, (2013).
69. Virchow, R. Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutr Rev* **47**, 23–25 (1989).
70. Flier, J. S., Underhill, L. H. & Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* **315**, 1650–1659 (1986).
71. Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* **42**, 717–727 (2006).

72. Sinha, P., Clements, V. K. & Ostrand-Rosenberg, S. Interleukin-13-regulated M2 Macrophages in Combination with Myeloid Suppressor Cells Block Immune Surveillance against Metastasis. *Cancer Res* **65**, 11743–51 (2005).
73. Jung, K. Y. *et al.* Cancers with Higher Density of Tumor-Associated Macrophages Were Associated with Poor Survival Rates. 2383–7837 (2015) doi:10.4132/jptm.2015.06.01.
74. Yang, L. & Zhang, Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol* **10**, 58 (2017).
75. Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Vavrin, Z. & Rachlin, E. M. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 87–94 (1988).
76. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**, 549–555 (2002).
77. Guruvayoorappan, C. Activation of Macrophages-M1 and M2 Polarization. *Integr Cancer Ther* **7**, 90–95 (2008).
78. Xu, X. *et al.* HILPDA Is a Prognostic Biomarker and Correlates With Macrophage Infiltration in Pan-Cancer. *Front. Oncol* **11**, 597860 (2021).
79. Fong, C. H. Y. *et al.* An antiinflammatory role for IKK β through the inhibition of “classical” macrophage activation. *J Exp Med* **205**, 1269 (2008).
80. Duluc, D. *et al.* Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *Int J Cancer* **125**, 367–373 (2009).
81. Urban, J. L., Shepard, H. M., Rothstein, J. L., Sugarman, B. J. & Schreiber, H. Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5233 (1986).
82. Kioi, M. *et al.* Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J Clin Invest* **120**, (2010).
83. Ruchaud, S., Seit , P., Foulkes, N. S., Sassone-Corsi, P. & Lanotte, M. The transcriptional repressor ICER and cAMP-induced programmed cell death. *Oncogene* **1997 15:7 15**, 827–836 (1997).
84. Bodor, J., Fehervari, Z., Diamond, B. & Sakaguchi, S. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur J Immunol* **37**, 884–895 (2007).
85. Bodor, J., Fehervari, Z., Diamond, B. & Sakaguchi, S. Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J Leukoc Biol* **81**, 161–167 (2007).
86. Boivin, G. *et al.* Durable and controlled depletion of neutrophils in mice. *Nat Commun* **11**, 1–9 (2020).
87. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 459–489 (2012).
88. Valerio Marzano, A. *et al.* Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Frontiers in Immunology* **9**, 2171 (2018).
89. Metzemaekers, M., Gouwy, M. & Proost, P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol* **17**, 433–450 (2020).
90. Herrmann, M. *et al.* An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro. *Front Immunol* **11**, 1–12 (2020).
91. Garley, M., Jabłonska, E. & Jabłonska, J. Heterogeneity Among Neutrophils. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (2017).
92. Galdiero, M. R. *et al.* Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology* **218**, 1402–1410 (2013).
93. Fridlender, Z. G. *et al.* Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : ‘N1’ versus ‘N2’ TAN. *Cancer Cell* **16**, 183–194 (2009).
94. Suttman, H. *et al.* Neutrophil Granulocytes Are Required for Effective Bacillus Calmette-Guérin Immunotherapy of Bladder Cancer and Orchestrate Local Immune Responses. *Cancer Res* **66**, 8250–8257 (2006).

95. Tazawa, H. *et al.* Infiltration of Neutrophils Is Required for Acquisition of Metastatic Phenotype of Benign Murine Fibrosarcoma Cells Implication of Inflammation-Associated Carcinogenesis and Tumor Progression. *Am J Pathol* vol. 163 (2003).
96. Palano, M. T. *et al.* Neutrophil and Natural Killer Cell Interactions in Cancers: Dangerous Liaisons Instructing Immunosuppression and Angiogenesis. *Vaccines (Basel)* **12**, 1488–1501 (2021).
97. Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E. & Gabrilovich, D. I. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol* **37**, 208–220 (2016).
98. Aarts, C. E. M., Kuijpers, T. W. & Aarts, C. Neutrophils as myeloid-derived suppressor cells. *Eur. J. Clin. Invest.* **48**, 1–8 (2018).
99. Bronte, V. *et al.* Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* **7**, (2016).
100. Aarts, C. E. M. *et al.* Activated neutrophils exert myeloid-derived suppressor cell activity damaging T cells beyond repair. *Blood Adv* **3**, 3562–3574 (2019).
101. Zhou, J., Nefedova, Y., Lei, A. & Gabrilovich, D. Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells. *Semin Immunol* **35**, 19–28 (2018).
102. Veglia, F., Perego, M. & Gabrilovich, D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology* 2018 19:2 **19**, 108–119 (2018).
103. Condamine, T., Mastio, J. & Gabrilovich, D. I. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol* **98**, 913–922 (2015).
104. Metzemaekers, M., Gouwy, M. & Proost, P. Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords. *Cell Mol Immunol* **17**, 433–450 (2020).
105. de Filippo, K. *et al.* Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* **121**, 4930–4937 (2013).
106. Sawant, K. v. *et al.* Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci Rep* **6**, (2016).
107. Jablonska, J., Wu, C. F., Andzinski, L., Leschner, S. & Weiss, S. CXCR2-mediated tumor-associated neutrophil recruitment is regulated by IFN- β . *Int J Cancer* **134**, 1346–1358 (2014).
108. Sun, X. *et al.* Inflammatory cell-derived CXCL3 promotes pancreatic cancer metastasis through a novel myofibroblast-hijacked cancer escape mechanism. *Gut* **71**, 129–147 (2022).
109. Marcuzzi, E., Angioni, R., Molon, B. & Cali, B. Chemokines and Chemokine Receptors: Orchestrating Tumor Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 96 **20**, 96 (2018).
110. Keeley, E. C., Mehrad, B. & Strieter, R. M. CXC Chemokines in Cancer Angiogenesis and Metastases. *Adv Cancer Res* **106**, 91–111 (2010).
111. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677–686 (2001).
112. Wang, N. *et al.* CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF- κ B/SOX4 signaling. *Cell Death & Disease* 2018 9:9 **9**, 1–18 (2018).
113. Duque, G. A. & Descoteaux, A. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Front Immunol* **5**, (2014).
114. Cheng, Y., Ma, X. lei, Wei, Y. quan & Wei, X. W. Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1871**, 289–312 (2019).
115. O'hayre, M., Degese, M. S. & Gutkind, J. S. Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer. doi:10.1016/j.ceb.2014.01.005.
116. Kobilka, B. K. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1768**, 794–807 (2007).
117. Vizurraga, A., Adhikari, R., Yeung, J., Yu, M. & Tall, G. G. Mechanisms of adhesion G protein-coupled receptor activation. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 14065–14083 (2020).

118. Sassone-Corsi, P. The Cyclic AMP Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **4**, (2012).
119. Cooper, D. M. F. *Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP.* *Biochem. J* vol. 375 (2003).
120. Mayr, B. & Montminy, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001 2:8 **2**, 599–609 (2001).
121. Barabitskaja, O., Foulke, J. S., Pati, S., Bodor, J. & Reitz, M. S. Suppression of MIP-1 β transcription in human T cells is regulated by inducible cAMP early repressor (ICER). *J Leukoc Biol* **79**, 378–387 (2006).
122. Ihara, Y. *et al.* The G protein-coupled receptor T-cell death-associated gene 8 (TDAG8) facilitates tumor development by serving as an extracellular pH sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 17309–17314 (2010).
123. Wang, J. Q. *et al.* TDAG8 Is a Proton-sensing and Psychosine-sensitive G-protein-coupled Receptor *. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 45626–45633 (2004).
124. Ishii, S., Kihara, Y. & Shimizu, T. Identification of T Cell Death-associated Gene 8 (TDAG8) as a Novel Acid Sensing G-protein-coupled Receptor *. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 9083–9087 (2005).
125. Sanderlin, E. J., Justus, C. R., Krewson, E. A. & Yang, L. v. Emerging roles for the pH-sensing G protein-coupled receptors in response to acidotic stress. *Cell Health Cytoskeleton* **7**, 99–109 (2015).
126. Marie, M. A. *et al.* GPR65 (TDAG8) inhibits intestinal inflammation and colitis-associated colorectal cancer development in experimental mouse models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1868**, 166288 (2022).
127. Heap, R. E. *et al.* Proteomics characterisation of the L929 cell supernatant and its role in BMDM differentiation. *Life Sci Alliance* **4**, (2021).
128. Klatt, W., Wallner, S., Brochhausen, C., Stolwijk, J. A. & Schreml, S. Expression profiles of proton-sensing G-protein coupled receptors in common skin tumors. *Sci Rep* **10**, 1–12 (2020).
129. Schaum, N. *et al.* Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature* **562**, 367–372 (2018).
130. Weide, B. *et al.* Baseline Biomarkers for Outcome of Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab. *Clin Cancer Res* **22**, 5487–5496 (2016).
131. Wang, S. *et al.* The Role of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases in NADPH Supply in the Oleaginous Filamentous Fungus *Mortierella alpina*. *Front Microbiol* **11**, 818 (2020).
132. Israelsen, W. J. & vander Heiden, M. G. Pyruvate kinase: function, regulation and role in cancer. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **43**, 43–51 (2016).
133. Calero, G. *et al.* The Crystal Structure of Palmitoyl Protein Thioesterase-2 (PPT2) Reveals the Basis for Divergent Substrate Specificities of the Two Lysosomal Thioesterases, PPT1 and PPT2 *. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 37957–37964 (2003).
134. Klima, B., Pohlentz, G., Schindler, D. & Egge, H. An Investigation into the Glycolipid Metabolism of α -N-Acetylgalactosaminidase-Deficient Fibroblasts Using Native and Artificial Glycolipids. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**, 989–1000 (1992).
135. Roach, P. J. & Skurat, A. v. Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **57**, 289–316 (1997).
136. Browner, M. F. & Fletterick, R. J. Phosphorylase: a biological transducer. *Trends Biochem Sci* **17**, 66–71 (1992).
137. Garcia-Guerrero, M. C. *et al.* Crystal structure and mechanism of human carboxypeptidase O: Insights into its specific activity for acidic residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E3932–E3939 (2018).
138. Zampieri, M., Hörl, M., Hotz, F., Müller, N. F. & Sauer, U. Regulatory mechanisms underlying coordination of amino acid and glucose catabolism in *Escherichia coli*. *Nat Commun* **3354**, 1–13 (2019).
139. Sherwood, L. M., Parris, E. E. & Folkman, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *Engl. J. Med.* **285**, 1182–1186 (2010).

140. Jubb, A. M. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor, hypoxia inducible factor 1 α , and carbonic anhydrase IX in human tumours. *J Clin Pathol* **57**, 504–512 (2004).
141. Firth, J. D., Ebert, B. L. & Ratcliffe, P. J. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem* **270**, 21021–21027 (1995).
142. Semenza, G. L. *et al.* Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase a gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 32529–32537 (1996).
143. Staller, P. *et al.* Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel–Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* **425**, 307–311 (2003).
144. Marhold, M. *et al.* HIF1 α Regulates mTOR Signaling and Viability of Prostate Cancer Stem Cells. *Mol Cancer Res* **13**, 556–564 (2015).
145. Azimi, I., Petersen, R. M., Thompson, E. W., Roberts-Thomson, S. J. & Monteith, G. R. Hypoxia-induced reactive oxygen species mediate N-cadherin and SERPINE1 expression, EGFR signalling and motility in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Sci Rep* **7**, 1–11 (2017).
146. Song, G. *et al.* TIMP1 is a prognostic marker for the progression and metastasis of colon cancer through FAK-PI3K/AKT and MAPK pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **35**, 1–12 (2016).
147. Maa, M. C. *et al.* EPS8 Facilitates Cellular Growth and Motility of Colon Cancer Cells by Increasing the Expression and Activity of Focal Adhesion Kinase. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 19399–19409 (2007).
148. Claesson-Welsh, L. & Welsh, M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med* **273**, 114–127 (2013).
149. Ippolito, L., Morandi, A., Giannoni, E. & Chiarugi, P. Lactate: A Metabolic Driver in the Tumour Landscape. *Trends Biochem Sci* **44**, 153–166 (2019).
150. de la Cruz-López, K. G., Castro-Muñoz, L. J., Reyes-Hernández, D. O., García-Carrancá, A. & Manzo-Merino, J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol* **9**, 1143 (2019).
151. Kobak, D. & Berens, P. The art of using t-SNE for single-cell transcriptomics. *Nature Communications* **2019 10:1** **10**, 1–14 (2019).
152. Aibar, S. *et al.* SCENIC: Single-cell regulatory network inference and clustering. *Nat Methods* **14**, 1083–1086 (2017).
153. Zhou, J., Nefedova, Y., Lei, A. & Gabrilovich, D. Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells. *Semin Immunol* **35**, 19–28 (2018).
154. Veglia, F. *et al.* Analysis of classical neutrophils and polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients and tumor-bearing mice. *Journal of Experimental Medicine* **218**, (2021).
155. Schiavoni, G., Galdiero, M. R., Masucci, M. T., Minopoli, M. & Carriero, M. V. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Frontiers in Oncology* **9**, 1146 (2019).
156. Bellone, M. *et al.* The acidity of the tumor microenvironment is a mechanism of immune escape that can be overcome by proton pump inhibitors. *Oncoimmunology* **2**, (2013).
157. Wang, J. X. *et al.* Molecular Sciences Lactic Acid and an Acidic Tumor Microenvironment suppress Anticancer Immunity. doi:10.3390/ijms21218363.
158. Worsley, C. M., Veale, R. B. & Mayne, E. S. The acidic tumour microenvironment: Manipulating the immune response to elicit escape. *Hum Immunol* **83**, 399–408 (2022).
159. Boedtker, E. *et al.* Contribution of Na⁺,HCO₃⁻-cotransport to cellular pH control in human breast cancer: A role for the breast cancer susceptibility locus NBCn1 (SLC4A7). *Int J Cancer* **132**, 1288–1299 (2013).
160. Izumi, H. *et al.* Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* **29**, 541–549 (2003).

161. Altenberg, B. & Greulich, K. O. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* **84**, 1014–1020 (2004).
162. Kallinowski, F. *et al.* Glucose Uptake, Lactate Release, Ketone Body Turnover, Metabolic Micromilieu, and pH Distributions in Human Breast Cancer Xenografts in Nude Rats¹. *Cancer Res* **48**, 7264–7272 (1988).
163. Tannock, I. F. & Rotin, D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res* **49**, 4373–4384 (1989).
164. Kompanje, E. J. O., Jansen, T. C., van der Hoven, B. & Bakker, J. The first demonstration of lactic acid in human blood in shock by Johann Joseph Scherer (1814-1869) in January 1843. *Intensive Care Med* **33**, 1967–1971 (2007).
165. Petrelli, F. *et al.* Prognostic and predictive role of elevated lactate dehydrogenase in patients with melanoma treated with immunotherapy and BRAF inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Melanoma Res* **29**, 1–12 (2019).
166. Girgis, H. *et al.* Lactate Dehydrogenase A is a potential prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Mol Cancer* **13**, 1–10 (2014).
167. Feng, Y. *et al.* Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Med* **7**, 6124–6136 (2018).
168. Jurisic, V., Radenkovic, S. & Konjevic, G. The Actual Role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects. *Adv Exp Med Biol* **867**, 115–224 (2015).
169. Sun, S., Sun, Y., Rong, X. & Bai, L. High glucose promotes breast cancer proliferation and metastasis by impairing angiotensinogen expression. *Biosci Rep* (2019) doi:10.1042/BSR20190436.
170. Duan, Q. *et al.* High glucose promotes pancreatic cancer cells to escape from immune surveillance via AMPK-Bmi1-GATA2-MICA/B pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **38**, 1–13 (2019).
171. Lim, J. H., Luo, C., Vazquez, F. & Puigserver, P. Targeting mitochondrial oxidative metabolism in melanoma causes metabolic compensation through glucose and glutamine utilization. *Cancer Res* **74**, 3535–3545 (2014).
172. Schulz, M. C., Wagenbrett, L., Schwerdt, G. & Gekle, M. Influence of extracellular acidosis on matrix protein homeostasis in tumour cells and fibroblasts. *Adv Exp Med Biol* **1072**, 213–217 (2018).
173. Fischbeck, A. J. *et al.* Tumor Lactic Acidosis: Protecting Tumor by Inhibiting Cytotoxic Activity Through Motility Arrest and Bioenergetic Silencing. *Front Oncol* **10**, 2528 (2020).
174. Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**, 1–14 (2007).
175. Calcinotto, A. *et al.* Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res* **72**, 2746–2756 (2012).
176. Calcinotto, A. *et al.* Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res* **72**, 2746–2756 (2012).
177. Fischer, K. *et al.* Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* **109**, 3812–3819 (2007).
178. Chiossone, L., Dumas, P. Y., Vienne, M. & Vivier, E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol* **18**, 671–688 (2018).
179. Gonzalez, H., Hagerling, C. & Werb, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev* **32**, 1267–1284 (2018).
180. Fischer, B., Müller, B., Fischer, K. G., Baur, N. & Kreutz, W. Acidic pH Inhibits Non-MHC-Restricted Killer Cell Functions. *Clinical Immunology* **96**, 252–263 (2000).
181. Müller, B., Fischer, B. & Kreutz, W. An acidic microenvironment impairs the generation of non-major histocompatibility complex-restricted killer cells. *Immunology* **99**, 375–384 (2000).
182. Melero, I., Rouzaut, A., Motz, G. T. & Coukos, G. T-Cell and NK-Cell Infiltration into Solid Tumors: A Key Limiting Factor for Efficacious Cancer Immunotherapy. *Cancer Discov* **4**, 522–526 (2014).
183. Ohue, Y. & Nishikawa, H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci* **110**, 2080–2089 (2019).

184. Tanaka, A. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Research* 2017 27:1 **27**, 109–118 (2016).
185. León, B., López-Bravo, M. & Ardavin, C. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* **17**, 313–318 (2005).
186. Wculek, S. K. *et al.* Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2019 20:1 **20**, 7–24 (2019).
187. Monti, M. *et al.* Plasmacytoid Dendritic Cell Impairment in Metastatic Melanoma by Lactic Acidosis. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 2085 **12**, 2085 (2020).
188. Hinshaw, D. C. & Shevde, L. A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Res* **79**, 4557–4567 (2019).
189. Gottfried, E. *et al.* Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* **107**, 2013–2021 (2006).
190. Martínez, D. *et al.* Extracellular Acidosis Induces Neutrophil Activation by a Mechanism Dependent on Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and ERK Pathways. *The Journal of Immunology* **176**, 1163–1171 (2006).
191. Shaul, M. E. & Fridlender, Z. G. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019 16:10 **16**, 601–620 (2019).
192. Borregaard, N., Schwartz, J. H. & Tauber, A. I. Proton secretion by stimulated neutrophils. Significance of hexose monophosphate shunt activity as source of electrons and protons for the respiratory burst. *J Clin Invest* **74**, 455–459 (1984).
193. van Zwieten, R., Wever, R., Hamers, M. N., Weening, R. S. & Roos, D. Extracellular proton release by stimulated neutrophils. *J Clin Invest* **68**, 310–313 (1981).
194. Cao, S. *et al.* Extracellular Acidification Acts as a Key Modulator of Neutrophil Apoptosis and Functions. *PLoS One* **10**, e0137221 (2015).
195. Groth, C. *et al.* Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *British Journal of Cancer* 2018 120:1 **120**, 16–25 (2018).
196. El-Kenawi, A. *et al.* Acidity promotes tumour progression by altering macrophage phenotype in prostate cancer. *British Journal of Cancer* 2019 121:7 **121**, 556–566 (2019).
197. Colegio, O. R. *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 2014 513:7519 **513**, 559–563 (2014).
198. Lewis, C. E. & Pollard, J. W. Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res* **66**, 605–612 (2006).
199. Brand, A. *et al.* LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab* **24**, 657–671 (2016).
200. Duque, G. A. & Descoteaux, A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* **5**, 491 (2014).
201. Ozga, A. J., Chow, M. T. & Luster, A. D. Chemokines and the immune response to cancer. *Immunity* **54**, 859–874 (2021).
202. Zhou, J., Nefedova, Y., Lei, A. & Gabrilovich, D. Neutrophils and PMN-MDSC: Their biological role and interaction with stromal cells. *Semin Immunol* **35**, 19–28 (2018).
203. Condamine, T. *et al.* Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol* **1**, (2016).
204. Steele, C. W. *et al.* CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **29**, 832–845 (2016).
205. Sueoka, H. *et al.* Blockage of CXCR2 suppresses tumor growth of intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Surgery* **155**, 640–649 (2014).
206. Cheng, Y. *et al.* Targeting CXCR2 inhibits the progression of lung cancer and promotes therapeutic effect of cisplatin. *Mol Cancer* **20**, 1–21 (2021).
207. Waldman, A. D., Fritz, J. M. & Lenardo, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology* 2020 20:11 **20**, 651–668 (2020).

208. Watson, R. A. *et al.* Immune checkpoint blockade sensitivity and progression-free survival associates with baseline CD8 + T cell clone size and cytotoxicity. *Sci Immunol* **6**, (2021).
209. Goswami, S., Anandhan, S., Raychaudhuri, D. & Sharma, P. Myeloid cell-targeted therapies for solid tumours. *Nature Reviews Immunology* 2022 1–15 (2022) doi:10.1038/s41577-022-00737-w.
210. Murciano-Goroff, Y. R., Warner, A. B. & Wolchok, J. D. The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations. *Cell Research* 2020 30:6 **30**, 507–519 (2020).
211. Pulte, D., Weberpals, J., Jansen, L. & Brenner, H. Changes in population-level survival for advanced solid malignancies with new treatment options in the second decade of the 21st century. *Cancer* **125**, 2656–2665 (2019).
212. Robert-Koch-Institut, Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Krebs in Deutschland in 2017/2018, **13** (2017).

8. Curriclulum Vitae

9. Danksagung
