

Aus dem Institut für Immunologie und Serologie
der Medizinischen Fakultät Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Axel Roers)

Einfluss von mesenchymalen Stromazellen beim Tumorstadium

Inauguraldissertation
zur Erlangung des
Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Alexander Lubosch

aus
Fürth
2023

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referentin: Prof. Dr. med. Inaam Nakchbandi

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Einleitung.....	4
1.1. Krebs.....	4
1.1.1. Das Melanom.....	4
1.1.2. Brustkrebs.....	5
1.1.3. Charakteristika von Krebserkrankungen	6
1.2. Mesenchymale Stromazellen (MSCs).....	7
1.2.1. Die Rolle von MSCs bei Krebserkrankungen	8
1.2.2. Die Polarisierung von MSCs durch TLRs	9
1.3. Die Rolle von TLRs bei Krebserkrankungen	10
1.3.1. Toll-like Rezeptoren.....	10
1.3.2. Die Aktivierung von TLR4 durch LPS.....	12
1.3.3. Die pro-tumorigene Rolle von TLRs bei Krebserkrankungen	14
1.3.4. Die anti-tumorigene Rolle von TLRs bei Krebserkrankungen.....	16
1.4. Die Tumormikroumgebung und ihre Bestandteile.....	17
1.4.1. Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs).....	18
1.4.2. Immunzellen	20
1.4.3. Die extrazelluläre Matrix	25
1.5. Fibronektin	27
1.5.1. Der Aufbau von Fibronektin	28
1.5.2. Spleißisoformen von Fibronektin	29
1.5.3. Fibronektin als TLR-Agonist	32
1.6. Zielsetzung der Arbeit	34
2. Material und Methoden	36
2.1. Material	36
2.1.1. Hersteller	36
2.1.2. Geräte.....	38
2.1.3. Verbrauchsmaterial	39
2.1.4. Chemikalien, Reagenzien.....	41
2.1.5. Puffer und Lösungen	44
2.1.6. Primärantikörper	50
2.1.7. Sekundärantikörper.....	50
2.1.8. Antikörper für durchflusszytometrische Analysen.....	51
2.1.9. Nicht-Antikörper-basierte Fluoreszenzreagenzien.....	52
2.1.10. Primer und Sonden.....	52

2.2.	Methoden.....	53
2.2.1.	Tierexperimentelle Methoden	53
2.1.2.	Zellbiologische Methoden	58
2.1.3.	Molekularbiologische Methoden	68
2.1.4.	Proteinbiochemische Methoden.....	73
2.1.5.	Statistische Analyse	77
3.	Ergebnisse.....	79
3.1.	Entnahme und Charakterisierung von MSCs.....	79
3.1.1.	Reinheit entnommener MSCs	79
3.1.2.	Apoptose und Proliferation entnommener MSCs.....	79
3.2.	Der Einfluss von MSCs auf das Tumorwachstum	81
3.2.1.	Vorarbeiten.....	81
3.2.2.	Die Wirkung verschiedener Tumorzell:MSC-Verhältnisse auf das Tumorwachstum....	81
3.2.3.	Nachweisbarkeit der MSCs <i>in vivo</i>	84
3.2.4.	Übertragbarkeit der Inhibition des Tumorwachstums auf T-Zell-defiziente CD1nu-Tiere 85	
3.2.5.	Die Rolle des genetischen Hintergrunds bei der Tumordinhibition	86
3.2.6.	Die Unterdrückung des Tumorwachstums ist spezifisch für MSCs	87
3.2.7.	Übertragbarkeit der Inhibition des Tumorwachstums auf ein murines, orthotopes Brustkrebsmodell	90
3.3.	Die Ermittlung der Rolle von Fibronectin aus und auf MSCs in konditionellen Knockout- Modellen	91
3.3.1.	Der Einfluss von Fibronectin aus MSCs auf das Tumorwachstum	91
3.3.2.	Der Einfluss der Integrin β 1-Ausschaltung auf MSCs auf das Tumorwachstum	101
3.3.3.	Die Charakterisierung der inhibitorischen MSC-Subpopulation	105
3.4.	Der Effekt der Stimulation von MSCs mit Fibronectin	123
3.4.1.	Die Stimulation von MSCs mit Fibronectin.....	123
3.4.2.	Die Wirkung der CS1-Stimulation auf MSCs.....	140
3.4.3.	Die Modulation von Neutrophilen durch MSCs	153
3.4.4.	Die Auswirkung der Inhibition von TLR4 von MSCs auf das Tumorwachstum.....	159
4.	Diskussion.....	163
4.1.	Die Modulation des Tumorwachstums durch MSCs	163
4.1.1.	Die Förderung des Tumorwachstums durch MSCs	164
4.1.2.	Die inhibierende Wirkung von MSCs auf das Tumorwachstum	166
4.2.	Fibronectin als entscheidender Faktor zur Inhibition des Tumorwachstums.....	168
4.2.1.	Das Fibronectin der Mx- und Osx-Subpopulationen.....	168
4.2.2.	Die Identifikation der inhibitorischen Osx-Subpopulation anhand von Oberflächenmarkern	172

4.3. CS1 als Mediator der Tumoringhibition durch Neutrophile.....	176
4.3.1. Die Wirkung von CS1 bei der Tumoringhibition.....	176
4.3.2. Die ECM als TLR-Agonist bei der Hemmung der Tumoringression.....	177
4.3.3. Die TLR-Modulation auf MSCs verandert ihre immunmodulatorischen Fahigkeiten	179
4.3.4. Die Rolle der Wahrnehmung von Fibronektin mittels des β 1-Integrins	180
4.3.5. Neutrophile vermitteln die Inhibition des Tumoringwachstums.....	181
4.4. Schlussfolgerung.....	183
5. Zusammenfassung.....	185
6. Literaturverzeichnis.....	186
7. Lebenslauf	239
8. Danksagung	242

Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS	<i>Engl. a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif</i>
AKT	<i>Engl. AKT8 virus oncogene cellular homolog kinase</i>
AP-1	<i>Engl. activator-protein-1</i>
ATP	Adenintriphosphat
BRCA	<i>Engl. Breast cancer gene</i>
CAFs	<i>Engl. cancer associated fibroblasts</i>
CCL	CC-Chemokinligand
CD	<i>Engl. cluster of differentiation</i>
CS1	<i>Engl. Connecting-segment-1</i>
CXCL	C-X-C Motif Ligand
DAMPs	<i>Engl. danger associated molecular patterns</i>
DNA	<i>Engl. deoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	<i>Engl. double stranded ribonucleic acid</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDA/EDB	extra domain A/extra domain B
EMILIN2	<i>Engl. elastin microfibril interfacier 2</i>
ERK	<i>Engl. extracellular signal-regulated kinases</i>
FAP	Fibroblasten-Aktivierungsprotein
FNI/II/III	Fibronektin I/II/III Modul
FSP-1	<i>Engl. fibroblast specific protein-1</i>
G-CSF	<i>Engl. granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GMPs	<i>Engl. granulocyte-monocyte progenitor cells</i>
HER2	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ 2
HMGB1	<i>Engl. high-mobility-group-protein B1</i>
HR	Hormonrezeptor
HSP	<i>Engl. heat shock protein</i>
ICAM	<i>Engl. intercellular adhesion molecule</i>

IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IIICS	<i>Engl. type III-connecting-segment</i>
IKKs	IκB Kinasen
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
IRAK	<i>Engl. interleukin-1 receptor associated kinase</i>
IRF	<i>Engl. interferon regulatory factor</i>
JNK	<i>Engl. c-Jun N-terminal kinase</i>
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6C	Lymphozytenantigen 6C2
Ly6G	Lymphozytenantigen 6 Komplex, Locus G
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinasen
MCAM	<i>Engl. melanoma cell adhesion molecule</i>
MD2	<i>Engl. myeloid differentiation factor 2</i>
MDSC	<i>Engl. myeloid-derived suppressor cells</i>
MHC I/II	<i>Engl. major histocompatibility complex class I/II</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
MNNG	Methylnitronitrosoguanidin
mRNA	<i>Engl. messenger RNA</i>
MSCs	Mesenchymale Stromazellen
MyD88	<i>Engl. myeloid differentiation factor 88</i>
NETs	<i>Engl. neutrophil extracellular traps</i>
NFκB	<i>Engl. nuclear factor kappa B</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
oFN	Onkofötales Fibronektin
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PAMPs	<i>Engl. pathogen associated molecular patterns</i>
Pam3Cys	N-Palmitoyl-2,3-bis(palmitoyloxy)-2-propylcysteine

PDGFR α/β	<i>Eng. platelet-derived growth factor receptor α/β</i>
PDPN	Podoplanin
PECAM-1	<i>Eng. platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
pFN	Plasmafibronektin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
Poly(I:C)	Polyinosinsäure:Polycytidylsäure
PRRs	<i>Eng. pattern recognition receptors</i>
RIP1	<i>Eng. receptor-interacting protein 1</i>
ROS	<i>Eng. Reactive oxygen species</i>
Sca1	<i>Eng. Stem cell antigen 1</i>
ssRNA	<i>Eng. single stranded ribonucleic acid</i>
TAB	<i>Eng. TAK1-binding protein</i>
TAK1	<i>Eng. transforming growth factor-β-activated kinase 1</i>
TBK1	<i>Eng. TRAF family member-associated NF-κB activator-binding kinase 1</i>
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TIRAP/MAL	<i>Eng. TIR domain containing adaptor protein/MyD88 adaptor-like</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TME	Tumormikroumgebung
TNBC	<i>Eng. Triple negative breast cancer</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	<i>Eng. tumor necrosis factor receptor-associated factor 6</i>
TRAM	<i>Eng. TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>Eng. toll-interleukin-1 receptor-domain-containing adaptor protein-inducing interferon beta</i>
UBC13	<i>Eng. Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13</i>
UEV1A	<i>Eng. ubiquitin-conjugating E2 enzyme variant A</i>
UV	Ultraviolett
VCAM1	<i>Eng. vascular cell adhesion protein 1</i>
VLA	<i>Eng. very late antigen</i>
α SMA	<i>Eng. alpha smooth muscle actin</i>

1. EINLEITUNG

1.1. Krebs

Tumorzellen entwickeln sich durch vererbte oder erworbene genetische Mutationen aus ehemals gesunden Körperzellen, was als Transformation bezeichnet wird. Ursachen für solche genetischen Veränderungen können auf Grund von Fehlern während der DNA-Replikation entstehen. Aber auch externe Faktoren, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS, englisch für „reactive oxygen species“), Viren oder radioaktive Strahlung können Schäden am Erbgut auslösen (Dempke, 2008; Pecorino, 2012; Wagener und Müller, 2009; Weinberg, 2013). Die Mutation eines Gens, das die Bildung von Krebs begünstigt, stellt dabei den ersten Schritt der Karzinogenese dar und betrifft häufig Signalwege, welche Einfluss auf die Proliferation, Überlebensfähigkeit oder Differenzierung haben (Pecorino, 2012; Wagener und Müller, 2009; Weinberg, 2013). Die weiteren Phasen der Karziogenese sind die Promotion, Progression und Metastasierung. In der Promotion proliferiert die mutierte Zelle und gibt ihre genetischen Veränderungen an ihre Tochterzellen weiter. Die Tochterzellen sind wiederum durch das deregulierte Gen anfällig, weitere Mutationen zu erlangen, welche die Proliferationsrate der Krebszellen erhöhen oder sie widerstandsfähiger gegen schädliche Einflüsse machen. Wenn diese Zellen die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung in fremde Gewebe erhalten, ist die Entwicklung zum metastasierenden Tumor abgeschlossen. Während der Metastasierung verteilen sich Tumorzellen über das Lymph- und Blutgefäßsystem im Körper und wachsen zu Sekundärtumoren aus, wobei das gesunde Gewebe verdrängt wird (Siddiqui et al., 2015; Wagener und Müller, 2009; Weinberg, 2013).

1.1.1. Das Melanom

Bei Hautkrebs wird epidemiologisch zwischen Melanomen und Nicht-Melanomen unterschieden, wobei ein Melanom einen Tumor bezeichnet, der aus Melanozyten hervorgegangen ist. Die Gründe für das Entstehen eines Melanoms sind vielfältig und können sowohl in individuellen Risikofaktoren, wie beispielsweise der familiären Vorbelastung, dem Vorliegen von Nävi oder anderen genetischen Faktoren liegen (Bevona et al., 2003; Goldstein

und Tucker, 2001; Lynch und Shaw, 2016). Einer der wichtigsten Faktoren für das Entstehen eines Melanoms ist der intensive Kontakt mit Ultraviolettstrahlung, besonders während der Kindheit. Hierbei wird zwischen UV-A- (315 nm - 400 nm) und UV-B-Strahlung (280 nm - 315 nm) unterschieden, wobei UV-A-Strahlung DNA-Schäden hauptsächlich indirekt durch oxidativen Stress auslöst, wohingegen die zytotoxischere UV-B-Strahlung in der Lage ist, direkte DNA-Schäden durch die Entstehung von Photoprodukten, wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren oder 6-4-Photoprodukten, zu verursachen. Können die entstandenen DNA-Schäden nicht korrekt behoben werden, kommt es durch eine Ansammlung von Mutationen zur Entstehung eines Melanoms (Eklund und Malec, 1978; Proust, 2017; Sample und He, 2018).

1.1.2. Brustkrebs

Brustkrebs stellt weltweit mit 15,5% die zweithäufigste Krebserkrankung dar und ist nicht nur die zweithäufigste Krebs-assoziierte Todesursache, sondern auch der größte Sterbefaktor bei Frauen zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr (Boix-Montesinos et al., 2021; Ismail-Khan und Bui, 2010). Verschiedene Faktoren können die Entstehung von Brustkrebs fördern, wie Übergewicht, zu wenig Bewegung, eine hohe Aufnahme von Fetten oder Kinderlosigkeit (Alegre et al., 2013; González-Jiménez, 2018). Auch genetische Faktoren begünstigen das Auftreten dieser Krebsart. So haben 5-10% aller Brustkrebserkrankungen eine Mutation in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2 (englisch für „breast cancer susceptibility gene 1 / 2“) (Akram et al., 2017; Waks und Winer, 2019). Bei der Einteilung von Brustkrebs spielen zwei Faktoren eine übergeordnete Rolle, zum einen das Vorhandensein von Hormonrezeptoren (HR, englisch für „hormone receptor“), also des Estrogen- oder Progesteron-Rezeptors, und zum anderen die Präsenz des humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2, bzw. HER2/*neu*, englisch für „human epidermal growth factor receptor 2“). Im Zuge dessen lässt sich Brustkrebs in drei Klassen aufteilen: HR⁺HER2⁻, HER2⁺ und TNBC (englisch für „triple negative breast cancer“), bei dem keiner dieser Rezeptoren gebildet wird. TNBC stellt etwa 15% aller Brustkrebsfälle dar und ist gekennzeichnet durch eine besonders schlechte Prognose und Überlebensdauer und ist besonders schwierig zu behandeln (Akram et al., 2017; Boix-Montesinos et al., 2021; Ismail-Khan und Bui, 2010; Waks und Winer, 2019).

1.1.3. Charakteristika von Krebserkrankungen

Zur Beschreibung des heterogenen Krankheitsbilds „Krebs“ wurden die Eigenschaften der meisten oder möglicherweise auch aller Krebsarten als Kennzeichen von Krebs zusammengefasst (Hanahan und Weinberg, 2000). In den letzten Jahren wurden diese aufgrund des besseren Verständnis von Krebserkrankungen um etliche weitere Kennzeichen erweitert (Abbildung 1) (Hanahan, 2022; Hanahan und Weinberg, 2011).

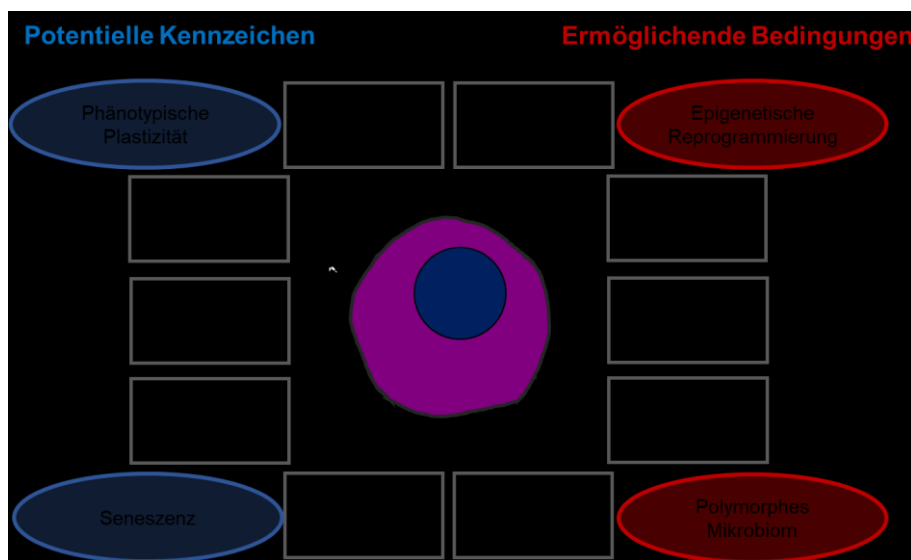


Abbildung 1: Kennzeichen von Krebs und deren potentielle Kennzeichen und ermöglichende Bedingungen.

Eigenschaften, in denen sich Krebszellen maßgeblich von gesunden Körperzellen unterscheiden und die ihren malignen Phänotyp begünstigen, sowie potentielle weitere Eigenschaften von Krebszellen und Umstände, die das Entstehen von Krebs ermöglichen (Modifiziert nach: Hanahan, 2022).

Einer der entscheidenden Punkte bei der Krebsprogression ist die phänotypische Plastizität von Tumoren. Tumore bestehen nicht nur aus einer Art von Tumorzellen, sondern aus vielen heterogenen Subtypen an Tumorzellen. Die im Tumor vorliegende genetische und epigenetische Instabilität, sowie die Modifikation des Proteoms ermöglichen dabei die Entstehung von Tumorzellen für den jeweils geeignetsten Phänotyp zum Voranschreiten der Tumorprogression unter dem jeweiligen Selektionsdruck (Agarwal et al., 2017; Devarakonda et al., 2015; Grzywa et al., 2017; Ramón y Cajal et al., 2020). Heterogenität findet sich jedoch nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in Zellen der Tumormikroumgebung (TME, englisch für „tumor microenvironment“). Hierbei wird die Tumorprogression nicht nur von Tumorzellen selbst, sondern auch von den Zellen vorangetrieben, die sie umgeben. Interaktionen von Krebszellen mit Immunzellen und Stromazellen führen beispielsweise dazu,

dass die Metastasierung begünstigt wird oder das Immunsystem supprimiert wird, um der Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen (Biswas und De, 2021; Ramón y Cajal et al., 2020).

1.2. Mesenchymale Stromazellen (MSCs)

MSCs sind multipotente, spindelförmige Zellen und weisen eine starke Adhärenz zu Plastik auf. Hierzu gehören Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten (Pittenger et al., 1999) oder Neuronen und Hepatozyten (Black und Woodbury, 2001; Hermann et al., 2004; Petersen et al., 1999). Aufgrund der Unsicherheiten über den Stammzellcharakter von MSCs empfahl die International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT), die Bezeichnung „mesenchymale Stromazelle“ zu verwenden und von der Bezeichnung „mesenchymale Stammzelle“ abzusehen, jedoch befindet sich bis heute letztere Bezeichnung in häufigerem Gebrauch (Dominici et al., 2006; Horwitz et al., 2005). Quellen für MSCs stellen das Knochenmark, das Fettgewebe, die Lunge, das Herz, die Plazenta oder die Nabelschnur dar (Barlow et al., 2008; Beltrami et al., 2003; Fraser et al., 2006; Griffiths et al., 2005; Majore et al., 2009; Tavassoli und Crosby, 1968). Die Charakterisierung der heterogenen Gruppe der MSCs steht seit mehreren Jahrzehnten im Fokus der Wissenschaft. Im Falle von menschlichen MSCs wird häufig die Expression der Marker CD (englisch für „cluster of differentiation“)⁷³, CD90 und CD105 auf der Zelloberfläche zur Identifikation verwendet. Zusätzlich sollten MSCs negativ für die Marker CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, sowie CD79a und MHC-Klasse-II-Komplexe sein (Dominici et al., 2006).

Besonders bekannt sind diese Zellen aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften, mit denen sie bei der Forschung an Transplantationen oder an Krebserkrankungen von besonderem Interesse sind (Galland und Stamenkovic, 2020; Kelly und Rasko, 2021). MSCs werden häufig als immunsuppressive Zellen bezeichnet (Galland und Stamenkovic, 2020; Kelly und Rasko, 2021). Tatsächlich ist der immunmodulatorische Zustand von MSCs jedoch kontextabhängig und kann durch die Stimulation von Toll-like Rezeptoren (TLRs), Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, englisch für „Pattern Recognition Receptors“) der angeborenen Immunität, auf diesen Zellen verändert werden (Shoshina et al., 2020; Waterman et al., 2010, 2012b, 2012a)

1.2.1. Die Rolle von MSCs bei Krebserkrankungen

Die Rolle von MSCs bei dem Wachstum von Krebserkrankungen ist bis heute Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen, da es zum einen Studien gibt, die MSCs als pro-tumorigen, andere jedoch als anti-tumorigen einstufen (Djouad et al., 2003, 2006; Lin et al., 2010a; Qiao et al., 2008a, 2008b). Der genaue Grund für diese Unterschiede ist nicht bekannt, könnte jedoch an der Heterogenität der MSC-Population, dem zugrunde liegenden Tumormodell, dem Zeitpunkt der MSC-Administration oder der zugeführten Zellzahl liegen (Klopp et al., 2011). MSCs bewegen sich aktiv auf Entzündungsherde zu und wandern dementsprechend auch in Tumore ein (Kidd et al., 2010; Sun et al., 2009; Waterman et al., 2012a). Die Anzahl einwandernder MSCs ist dabei sehr gering, jedoch sind diese Zellen auch in geringer Anzahl in der Lage, das Tumorwachstum zu modulieren (Waterman et al., 2012a). Fibroblasten im Tumor, auch CAFs (englisch für „cancer-associated fibroblasts“) genannt, stellen eine Subpopulation von mesenchymalen Stromazellen dar, weswegen auch alle weiter unten in Abschnitt 1.4.1. Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs) aufgelisteten Punkte auf MSCs zutreffen können (Hutton et al., 2021).

1.2.1.1. *Pro-tumorigene Effekte von MSCs durch die Modulation des Immunsystems*

Die genauen Mechanismen hinter den tumorfördernden Eigenschaften von MSCs sind nicht eindeutig geklärt, jedoch konnten zumindest einige Mechanismen aufgezeigt werden, in denen MSCs die Tumorprogression unterstützen. Hierbei spielt besonders die Suppression des Immunsystems eine Rolle. MSCs können die Proliferation von alloreaktiven, zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen, mittels löslicher Stoffe und direktem Zell-Zell-Kontakt inhibieren (Djouad et al., 2003; Engela et al., 2013a; Nasef et al., 2007). Eine weitere Population von T-Zellen, regulatorische T-Zellen oder T_{regs}, die anti-inflammatorische Funktionen hat, weist jedoch eine erhöhte Proliferation bzw. Induktion in der Anwesenheit von MSCs und beispielsweise durch die Produktion von TGFβ (englisch für „transforming growth factor β“) und Interleukin 2 (IL2) auf (Engela et al., 2013b; Patel et al., 2010). Es sind jedoch auch weitere Zytokine bekannt, mit denen MSCs die Aktivität von T-Zellen supprimieren, wie IL10, Prostaglandin E2, Stickstoffmonoxid oder Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) (Aggarwal und Pittenger, 2005; Batten et al., 2006; Meisel et al., 2004; Sato et al., 2007; Yang et al., 2009). Bei der Suppression

von NK-Zellen durch MSCs produzieren NK-Zellen eine geringere Menge des Zytokins Interferon γ (IFN γ) und exprimieren weniger Membranproteine der NK-Zell-Aktivierung, wie NKp30 und NKp44. Darüber hinaus ist auch die Bildung von Granzym B inhibiert, welches einen der Hauptakteure für NK-Zell- und T-Zell-vermittelte Lyse von Zielzellen darstellt (Aggarwal und Pittenger, 2005; Hu et al., 2019; Patel et al., 2010; Spaggiari et al., 2008).

1.2.1.2. *Anti-tumorigene Effekte von MSCs durch die Modulation des Immunsystems*

MSCs können das Immunsystem jedoch auch anti-tumorigen modulieren. Bei der Transplantation von Darmkrebszellen zusammen mit MSCs in einer Gelatinmatrix konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der Tumorzellen bei der Anwesenheit von MSCs im Verhältnis 1:1 und 1:10 (Tumorzellen:MSCs) verringert war. Hierbei war die Anzahl an Monozyten und Granulozyten in der Matrix erhöht. Da keine Beteiligung von T-Zellen gezeigt werden konnte, spricht dies für eine Abtötung der Tumorzellen durch myeloide Immunzellen (Ohlsson et al., 2003). In einem anderen Darmkrebsmodell wurde Ratten Methylnitronitrosoguanidin (MNNG) zur Induktion von Darmtumoren verabreicht. In Tieren, welche zusätzlich mit MSCs behandelt wurden, wurden kleinere und weniger Tumore im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen. Hierbei war sowohl die Anzahl an CD3⁺ T-Zellen erhöht, als auch die Anzahl an CD68⁺ Makrophagen verringert (François et al., 2019). Eine CD105⁻-Stromazellsubpopulation führte im Pankreaskarzinom zu einer Unterdrückung des Tumorwachstums, indem diese Zellen dendritische Zellen und damit einhergehend T-Zellen modulierten. Die Analyse mehrerer gesunder und maligner Gewebe konnte zeigen, dass diese Subpopulation in allen Proben nachweisbar ist, was eine anti-tumorigene Wirkung solcher Stromazellen in vielen Tumormodellen denkbar macht (Hutton et al., 2021).

1.2.2. Die Polarisierung von MSCs durch TLRs

Die Reaktion von MSCs auf TLR-Agonisten verändert sich bei der Stimulation unterschiedlicher TLRs. Es konnte nachgewiesen werden, dass humane MSCs mittels der Stimulation von TLR4 und TLR3 zu pro-inflammatorischen MSCs-, bzw. anti-inflammatorischen MSCs polarisierbar sind. In Anlehnung an die Polarisierungszustände von Makrophagen wurden diese als MSC1,

bzw. MSC2 bezeichnet (Shoshina et al., 2020; Tomchuck et al., 2008; Waterman et al., 2010, 2012b, 2012a). Pro-inflammatorische MSC1-Zellen exprimieren vermehrt pro-inflammatorische Zytokine, wie IL6 und IL8, wohingegen MSC2-Zellen vermehrt die anti-inflammatorischen Zytokine IL10, CC-Chemokinligand 5 (CCL5) oderIDO bilden (Shoshina et al., 2020; Waterman et al., 2010). MSC1-Zellen können das Tumorwachstum, Migration und Invasion sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* inhibieren, wohingegen MSC2-Zellen Tumorzellen unterstützen. Neben dem direkten Einfluss von MSCs auf die Tumorzellen konnten auch immunmodulatorische Änderungen festgestellt werden, da sowohl bei der Verwendung von MSC1, als auch von MSC2 eine erhöhte Immunzellinfiltration festgestellt werden konnte. Darüber hinaus veranlassten MSC1-Zellen die verstärkte Einwanderung von Makrophagen und die Degranulation von Mastzellen (Waterman et al., 2012a). An anderer Stelle führte jedoch auch die Stimulation von TLR3 zu pro-inflammatorischen Eigenschaften von MSCs, weswegen die genaue Reaktion auf TLR-Liganden vermutlich von vielen weiteren Faktoren abhängt (Dumitru et al., 2014; Ryu et al., 2015).

Die Behandlung von MSCs mit TLR-Agonisten führt üblicherweise zur Expression von chemotaktischen und pro-inflammatorischen Zytokinen, wie C-X-C Ligand 1 (CXCL1), CXCL5, CXCL6, CXCL8 und CXCL10 oder auch IL6, IL12, Tumornekrosefaktor α (TNF α), CCL5 und GM-CSF (Englisch für „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“) (Hwa Cho et al., 2006; Hwang et al., 2014; Ryu et al., 2015). Hierdurch vermitteln MSCs die Modulation von Immunzellen, wodurch Neutrophile nicht nur chemotaktisch angezogen werden, sondern auch eine erhöhte Lebensdauer aufweisen und eine Verstärkung ihrer Effektorfunktionen, wie der Phagozytose oder der Bildung von ROS, ausgelöst werden (Brandau et al., 2010; Cassatella et al., 2011; Hall et al., 2013a; Romieu-Mourez et al., 2009).

1.3. Die Rolle von TLRs bei Krebserkrankungen

1.3.1. Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren, oder TLRs, sind für die Produktion einer Vielzahl von Zytokinen verantwortlich (Grassin-Delyle et al., 2020). In Menschen existieren 10 TLRs, TLR1-10, wohingegen in Mäusen 12 TLRs vorliegen, die TLRs 1-9, sowie 11-13. TLR10 ist in Mäusen

aufgrund einer retroviralen Insertion nicht funktionsfähig (Kawai und Akira, 2010). Unter den TLRs 1-10 sind dabei TLR1, 2, 5, 6 und 10 extrazellulär lokalisiert, wohingegen TLR3, 7, 8 und 9 intrazellulär in Endosomen exprimiert sind. TLR4 kann sowohl intra-, als auch extrazellulär vorliegen (Kawai und Akira, 2010). Unterschiedliche TLRs sind dazu in der Lage mit unterschiedlichen Agonisten aus exogenen (z.B. Pathogenen) oder endogenen Quellen (z.B. sterbende Körperzellen) zu interagieren. Einige Beispiele solcher Liganden für humane TLRs sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Humane TLRs mit beispielhaften exogenen und endogenen Liganden.

Beispiele für PAMPs (englisch für „pathogen associated molecular patterns“) und DAMPs (englisch für „pathogen associated molecular patterns“) als Agonisten für Toll-like Rezeptoren. HMGB1 (Englisch für „high-mobility-group-protein B1“), HSP70 (englisch für „heat shock protein 70“), FNIII1c (Fibronectin Typ III-Modul 1c), dsRNA (englisch für „double stranded RNA“), ssRNA (englisch für „single stranded RNA“), mRNA (englisch für „messenger RNA“), LPS (Lipopolysaccharid), Pam3Cys (N-Palmitoyl-2,3-bis(palmitoyloxy)-2-propylcysteine), IgG (Immunglobulin).

TLR	Exogene Liganden (PAMPs)	Endogene Liganden (DAMPs)	Referenz
TLR1	<ul style="list-style-type: none"> Bakterielle triacylierte Lipopeptide (mit TLR2) 	<ul style="list-style-type: none"> β-defensin-3 (mit TLR2) 	Funderburg et al., 2007; Takeda et al., 2002
TLR2	<ul style="list-style-type: none"> Zymosan (mit TLR6) Bakterielle triacylierte Lipopeptide (mit TLR1) Mykoplasmale Lipopeptide (mit TLR6) 	<ul style="list-style-type: none"> β-defensin-3 (mit TLR1) HMGB1 HSP70 Fibronectin-Fragmente FNIII1c 	Ambesi et al., 2022; Asea et al., 2002; Funderburg et al., 2007; Hwang et al., 2015; Ozinsky et al., 2000; Park et al., 2004; Takeda et al., 2002
TLR3	<ul style="list-style-type: none"> dsRNA 	<ul style="list-style-type: none"> mRNA 	Karikó et al., 2004
TLR4	<ul style="list-style-type: none"> LPS Retrovirale Hüllproteine 	<ul style="list-style-type: none"> HMGB1 HSP70 EDA-Fibronectin Hyaluronsäure-Fragmente 	Asea et al., 2002; Okamura et al., 2001; Park et al., 2004; Rassa et al., 2002; Termeer et al., 2002
TLR5	<ul style="list-style-type: none"> Flagellin 	<ul style="list-style-type: none"> EDA-Fibronectin 	Ambesi et al., 2022
TLR6	<ul style="list-style-type: none"> Zymosan (mit TLR2) Mykoplasmale Lipopeptide (mit TLR2) 	<ul style="list-style-type: none"> Versican (mit TLR2) 	Kim et al., 2009; Ozinsky et al., 2000; Takeda et al., 2002
TLR7	<ul style="list-style-type: none"> ssRNA (viral) 	<ul style="list-style-type: none"> ssRNA 	Heil et al., 2004; Vollmer et al., 2005
TLR8	<ul style="list-style-type: none"> ssRNA (viral) 	<ul style="list-style-type: none"> ssRNA 	Heil et al., 2004; Vollmer et al., 2005
TLR9	<ul style="list-style-type: none"> Unmethylierte CpG-Motive (Bakterielle DNA) 	<ul style="list-style-type: none"> Chromatin-IgG-Komplexe Mitochondriale DNA 	Bao et al., 2016; Hemmi et al., 2000; Leadbetter et al., 2002
TLR10	<ul style="list-style-type: none"> <i>Helicobacter pylori</i> (mit TLR2) Pam3Cys (mit TLR2) dsRNA 		Lee et al., 2018; Nagashima et al., 2015; Oosting et al., 2014

1.3.2. Die Aktivierung von TLR4 durch LPS

Die Aktivierung von TLR4 durch Lipopolysacchrid (LPS) stellt einen der am besten erforschten Signalwege von TLRs dar. LPS bindet an das LPS-bindenden Protein (LBP, englisch für „LPS-binding protein“) (Tobias et al., 1986; Wright et al., 1989), welches die Interaktion von LPS mit CD14 ermöglicht (Wright et al., 1990; Yu und Wright, 1996). CD14 vermittelt daraufhin die Bindung von LPS an MD2 (englisch für „myeloid Differentiation factor 2“), einem essentiellen Adapterprotein von TLR4 (Mitsuzawa et al., 2006; Ryu et al., 2017; Shimazu et al., 1999). Zwei MD2-TLR4-Moleküle bilden einen Dimer, woraufhin die intrazelluläre Signalkaskade beginnt (Park et al., 2009). TLRs nutzen unterschiedliche Adapterproteine für die Signalweiterleitung. Die TLRs 1 und 2, sowie 5-10 nutzen MyD88 (englisch für „myeloid differentiation factor 88“) und TLR3 nutzt TRIF (englisch für „toll-interleukin-1 receptor-domain-containing adaptor protein-inducing interferon beta“). TLR4 ist hingegen in der Lage, beide Adapterproteine zu nutzen (Fore et al., 2020; Murphy und Weaver, 2018). Aus diesem Grund wird zwischen dem MyD88-abhängigem und dem MyD88-unabhängigem Signalweg unterschieden (Abbildung 2) (Ciesielska et al., 2020; Lu et al., 2008a; Yang et al., 2016).

1.3.2.1. Der MyD88-abhängige Signalweg von TLRs

Beim MyD88-abhängigen Signalweg, detailliert in Abbildung 2, A beschrieben, wird zunächst TIRAP/MAL (englisch für „TIR domain containing adaptor protein“, bzw. „MyD88 adaptor-like“) und MyD88 aktiviert (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2002). Über die aktivierte Signalkaskade kommt es zur Phosphorylierung von I κ B (englisch für „inhibitor of κ B“), welches hierdurch ubiquitinlyiert und abgebaut wird, woraufhin NF κ B (englisch für „nuclear factor kappa B“) in den Zellkern einwandern kann (Hayden und Ghosh, 2008; Murphy und Weaver, 2018; Pasparakis et al., 2006; Wu et al., 2006). NF κ B führt anschließend zur Expression von Chemokinen, pro-inflammatorischen Zytokinen und Metalloproteasen (Burke et al., 2014; Küper et al., 2012; Lim et al., 2007; Nyati et al., 2017; Park et al., 2015; Sun et al., 2017; Zhao et al., 2014). Während der MyD88-abhängigen Aktivierung von TLRs kommt es zeitgleich zur Aktivierung von mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK, englisch für „mitogen-activated

protein kinase“) (Küper et al., 2012; Nyati et al., 2017; Sato et al., 2005) und AKT (Arbibe et al., 2000; Bai et al., 2009).

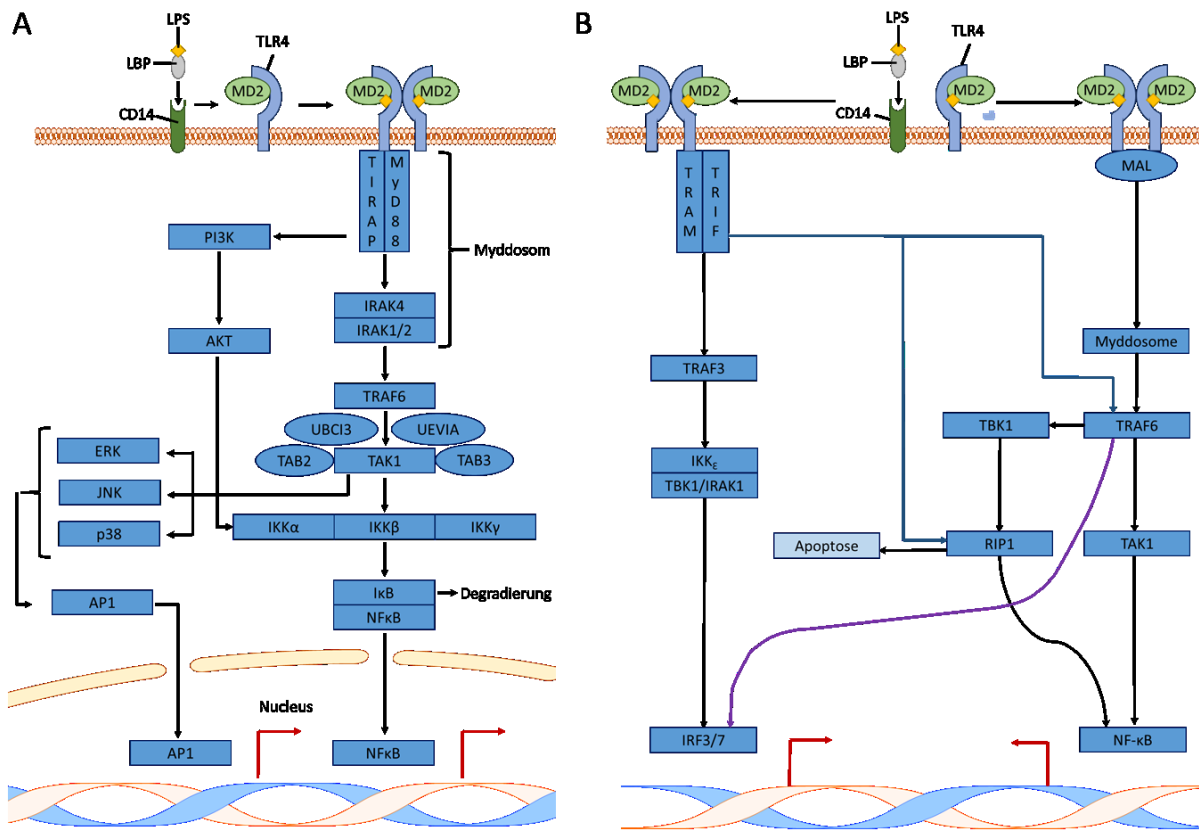


Abbildung 2: Die Aktivierung von TLRs

(A) Der MyD88-abhängige Signalweg. TLR4 interagiert mit TIRAP (englisch für „TIR domain containing adaptor protein“) und MyD88 (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2002). MyD88 bildet mit mehreren IRAKs (englisch für „interleukin-1 receptor associated kinase“) das Myddosom, in dem zuerst IRAK1 und IRAK2 phosphoryliert werden (Li et al., 2002; Lin et al., 2010b; Suzuki et al., 2002). Als nächstes wird die E3 Ubiquitin Ligase TRAF6 (englisch für „tumor necrosis factor receptor-associated factor 6“), zusammen mit UBC13 (englisch für „Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13“) und UEV1A (englisch für „ubiquitin-conjugating E2 enzyme variant A“) rekrutiert, die eine Polyubiquitinkette generiert (Deng et al., 2000; Fukushima et al., 2007; Gohda et al., 2004). TRAF6 interagiert mit TAK1 (englisch für „transforming growth factor- β -activated kinase 1“), welches zusammen mit TABs (englisch für „TAK1-binding protein“), I κ B Kinasen (IKKs, englisch für „ κ B kinase“) aktiviert (Ninomiya-Tsuji et al., 1999; Sato et al., 2005). NF κ B liegt im Zytoplasma vor und kann aufgrund seiner Bindung zu I κ B nicht in den Zellkern einwandern. TAK1 überträgt zusammen mit den TABs die Polyubiquitinkette auf IKK γ und phosphoryliert IKK β . IKK β phosphoryliert anschließend I κ B, welches ubiquitinyliert und abgebaut wird, wodurch NF κ B in den Zellkern gelangen kann (Hayden und Ghosh, 2008; Murphy und Weaver, 2018; Pasparakis et al., 2006; Wu et al., 2006). Zeitgleich kommt es zur Aktivierung von mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK, englisch für „mitogen-activated protein kinase“) in Form der Phosphorylierung von JNK, ERK und p38 mittels TAK1, was die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 zur Folge hat. AP-1 führt dann zur Expression pro-inflammatorischer Moleküle, wie NF κ B (Küper et al., 2012; Nyati et al., 2017; Sato et al., 2005). Auch der PI3K/AKT-Signalweg wird aktiviert, der die Aktivierung von NF κ B sowohl mittels der Phosphorylierung von IKK α und IKK β , als auch mit der direkten Phosphorylierung von NF κ B durch AKT fördern kann (Arbibe et al., 2000; Bai et al., 2009). (B) Der MyD88-unabhängige Signalweg. Das Adapterprotein TRAM (englisch für „TRIF-related adaptor molecule“) vermittelt die Interaktion von TLR4 mit TRIF (Oshiumi et al., 2003). TRIF interagiert im Anschluss mit TRAFs 3 und 6, wobei TRAF3 mit IKK ϵ , IRAK1 und TBK1 (englisch für „TRAF family member-associated NF- κ B activator-binding kinase 1“) interagiert und durch diese die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 (englisch für „interferon regulatory factor 3/7“) aktiviert. Diese vermitteln die Transkription der Typ I Interferone IFN α und IFN β (Fitzgerald et al., 2003; Häcker et al., 2006; Oganessian et al., 2006; Sakaguchi et al., 2003). Durch TRAF6 kann TRIF unabhängig von MyD88 die Aktivierung von MAPKs und NF κ B veranlassen und dadurch die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine vermitteln (Sato et al., 2003). Darüber hinaus kann TRIF zusätzlich über dessen Interaktion mit RIP1 (englisch für „receptor-interacting protein 1“) die Aktivierung von NF κ B vermitteln (Meylan et al., 2004). (Modifiziert nach: Yang et al., 2016).

1.3.2.2. *Der MyD88-unabhängige Signalweg von TLRs*

Der MyD88-unabhängige Signalweg ist in Abbildung 2, B beschrieben. Hier beginnt der Signalweg beim Adapterprotein TRAM (englisch für „TRIF-related adaptor molecule“), welches die Interaktion von TLR4 mit TRIF vermittelt (Oshiumi et al., 2003). Am Ende dieses Signalwegs werden die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 (englisch für „interferon regulatory factor 3/7“) aktiviert, die die Transkription Typ I Interferonen, also IFN α und IFN β , vermitteln (Fitzgerald et al., 2003; Häcker et al., 2006; Oganessian et al., 2006; Sakaguchi et al., 2003). Dieser Signalweg kann jedoch auch MyD88-unabhängig die Translokation von NF κ B in den Zellkern auslösen (Meylan et al., 2004; Sato et al., 2003).

1.3.3. Die pro-tumorigene Rolle von TLRs bei Krebserkrankungen

Toll-like Rezeptoren können die Tumorprogression sowohl fördern, als auch hemmen. Viele TLRs, oder auch Proteine des beispielsweise durch TLRs ausgelösten NF κ B-Signalwegs, sind in Tumoren überexprimiert, was mit dem Voranschreiten der Erkrankung korreliert (Lim et al., 2019; Long et al., 2020; Wang et al., 2010; Yuan et al., 2013).

1.3.3.1. *Tumorfördernde Eigenschaften von TLRs auf Krebszellen*

Mäuse, die kein TLR4 oder dessen Adapterprotein MyD88 exprimieren, haben eine größere Resistenz gegen die Entstehung von spontanen oder durch Karzinogene ausgelöste Tumore, da TLR4 zur Expression von Zytokinen führt (Long et al., 2020; Naugler et al., 2007; Rakoff-Nahoum und Medzhitov, 2007; Shi et al., 2020). Die ausgeschütteten Zytokine stimulieren Überlebenssignale in mutierten, malignen Zellen und unterdrücken somit ihre Apoptose (Balkwill und Coussens, 2004). Die Inaktivierung des NF κ B-Signalwegs führt zur Apoptose von malignen Zellen und verhindert damit die Entstehung von Leber- und Darmtumoren (Balkwill und Coussens, 2004; Greten et al., 2004; Pikarsky et al., 2004). Neben der Entstehung, kann auch das Fortschreiten des Tumors durch TLRs begünstigt werden. Der intrinsische TLR-Signalweg in Krebszellen fördert das Wachstum und begünstigt die Metastasierung *in vivo* (Das et al., 2020; Hua et al., 2009; Liao et al., 2012; Rathore et al., 2019; Rogava et al., 2022; Zhou et al., 2019). Die Mechanismen hierfür sind vielfältig und umfassen beispielsweise die

Unterdrückung der durch TNF α -vermittelten Apoptose, der Erhöhung der Expression des Integrins $\alpha\beta 3$ oder der Begünstigung des Stammzellcharakters von Krebszellen (Liao et al., 2012; Rogava et al., 2022; Zhou et al., 2019).

1.3.3.2. *Tumorfördernde Eigenschaften von TLRs auf Immunzellen*

Jedoch werden nicht nur Tumorzellen direkt, sondern auch Immunzellen des TMEs durch TLRs beeinflusst. Hierbei unterstützt die Aktivierung von TLRs das Tumorwachstum, indem Immunzellen in einen pro-tumorigenen Phänotyp polarisiert werden. So führt die Stimulation von TLR4 auf Tumorzellen durch Bakterien oder LPS zur Bildung von Zytokinen, wie IL1 β , was die Polarisierung von Makrophagen zu Tumor-unterstützenden M2-Makrophagen begünstigt (Das et al., 2020; Li et al., 2019a). Durch diese Polarisierung unterstützen Makrophagen beispielsweise eine verstärkte Angiogenese (Banerjee et al., 2011; Jin et al., 2014).

HSP72 aus Darm-, Brust- und Thymuskarzinomzellen veranlasst die Aktivierung des TLR2/MyD88-abhängigen Signalwegs in MDSCs (englisch für „myeloid-derived suppressor cells“) und löst deren Produktion von IL6 aus, wodurch sie das Tumorwachstum mittels Immunsuppression anregen (Chalmin et al., 2010). MDSCs stellen eine heterogene Gruppe aus unreifen Myeloidzellen und deren Progenitoren dar, die durch eine immunsuppressive Wirkung charakterisiert sind und die Tumorprogression dadurch unterstützen können (Gabrilovich und Nagaraj, 2009; Nagaraj und Gabrilovich, 2012; Veglia et al., 2021).

1.3.3.3. *Tumorfördernde Eigenschaften von TLRs auf Stromazellen*

Auch auf anderen Zellen des TMEs, wie Stromazellen in Form von Fibroblasten, lassen sich die meisten Toll-like Rezeptoren nachweisen (Jang et al., 2012; Yao et al., 2015). Die Expression von TLR4 auf Fibroblasten geht dabei mit Tumorrezidiven und einer verringerten Überlebensrate einher (Eiró et al., 2013). Ein möglicher Mechanismus hierfür ist beispielsweise, dass TLR4/MyD88-vermittelte Signalwege in Stromazellen zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine führen, die die Infiltration von Tumor-unterstützenden Immunzellen begünstigen und damit die Karzinogenese anregen (Koliaraki et

al., 2019). Außerdem führt Autophagie in Fibroblasten im Tumor zum Freiwerden von HMGB1, das an TLR4 auf Krebszellen binden kann und damit nachweislich den Stammzellcharakter und die Tumorigenität von Brustkrebszellen unterstützt (Zhao et al., 2017).

1.3.4. Die anti-tumorigene Rolle von TLRs bei Krebserkrankungen

Im Gegensatz zu den eben genannten Funktionen sind TLRs auch in vielen Situationen in der Lage, das Tumorwachstum einzuschränken. Als Molekül des Immunsystems können TLRs eine Vielzahl von Immunzellen in den pro-inflammatorischen und damit häufig auch anti-tumorigenen Zustand zu versetzen.

1.3.4.1. *Tumoringehibierende Eigenschaften von TLRs auf Immunzellen*

Ähnlich wie Makrophagen, können auch Neutrophile per TLR-Stimulation in anti-tumorigene N1-Neutrophile polarisiert werden (García-Culebras et al., 2019; Ma et al., 2016; Ohms et al., 2020). Ein Mechanismus der Tumorunterdrückung ist die verstärkte Chemotaxis. Die Injektion von MPL (Monophosphoryl Lipid A), einem modifizierten LPS, Poly(I:C) (Polyinosinsäure:Polycytidylsäure) und des Hüllproteins des japanischen Hämagglutinationsvirus reduzierte das Tumorwachstum von B16-Melanomen *in vivo*. Grund für die Verringerung des Tumorwachstums ist die chemotaktische Anziehung von Neutrophilen durch CXCL2, welches durch die Tumormikroumgebung als Antwort auf Poly(I:C) produziert wurde. Die Verwendung des Hüllproteins zusätzlich zu Poly(I:C) führt zu einem Anstieg von CXCL2, der jedoch nicht signifikant ist. Jedoch sind die einwandernden Neutrophile mit der Kombination aus Hüllprotein und Poly(I:C) zu einem signifikant größerem Anteil N1-polarisiert (Chang et al., 2016). Da die Polarisierung mit Poly(I:C) nicht signifikant ist, könnte dies dafür sprechen, dass die TME durch die TLR3-Stimulation durch Poly(I:C) allein durch eine Erhöhung der chemotaktischen Anziehung von Neutrophilen das Wachstum unterdrücken kann, wohingegen das Hüllprotein dies durch eine Polarisierung veranlasst. Auch die Zugabe von LPS in Walker256 Tumoren in Ratten führt durch TLR4-Aktivierung des TMEs zu einer erhöhten Infiltration von Neutrophilen, die das Tumorwachstum unterdrückten (Kuwabara et al., 2019).

1.3.4.2. *Tumorinhibierende Eigenschaften von TLRs auf Stromazellen*

TLRs können auch das Verhalten von Stromazellen anti-tumorigen beeinflussen. Während der Radiotherapie von Krebspatienten werden DAMPs aus sterbenden Tumorzellen freigesetzt, die Toll-like Rezeptoren auf Endothelzellen aktivieren können. In einem TNBC-Modell konnte in Mäusen gezeigt werden, dass dies zu einer erhöhten Expression chemotaktischer Moleküle durch Endothelzellen führt, wie beispielsweise CCL2, CXCL1 und CXCL2, was von einer erhöhten Infiltration von Neutrophilen und Monozyten begleitet wird. Zusätzlich wird die Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen aktiviert, die das Priming von T-Zellen durchführen (Krombach et al., 2019). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Wachstum von B16-Melanomen durch TLR5-/NFκB-Aktivierung durch Flagellen von Salmonellen inhibiert werden kann. Die Stimulation findet vermutlich in Immunzellen des TMEs statt, wobei die Beteiligung von Stromazellen nicht ausgeschlossen werden kann (Chen et al., 2021).

CAFs (englisch für „cancer-associated fibroblasts“) sind dafür bekannt, die T-Zell-Proliferation zu inhibieren. Jedoch bewirkt auch die Stimulation dieser Zellen mit dem TLR4-Agonisten Ligustilid oder einem Liposaccharid die Aktivierung des NFκB-Signalwegs, woraufhin T-Zellen wieder zur normalen Proliferation fähig sind (Ma et al., 2019b; Xu et al., 2019).

Mesenchymale Stromazellen (MSCs, englisch für „mesenchymal stromal cells“) können mittels der Modulation von TLRs polarisiert werden. Hierbei führt die Stimulation von TLR4 zu pro-inflammatorischen (MSC1) und die von TLR3 zu anti-inflammatorischen MSCs (MSC2), woraufhin MSC1-Zellen viele pro-inflammatorische Zytokine, wie IL6 oder IL8, exprimieren (Li et al., 2016; Waterman et al., 2010, 2012b, 2012a). TLR4-stimulierte MSC1-Zellen sind dadurch in der Lage, das Wachstum von Tumorzellen zu inhibieren (Waterman et al., 2012a). Die Modulation von MSCs mittels TLRs wurde in Abschnitt 1.2.2. Die Polarisierung von MSCs durch TLRs genauer beschrieben .

1.4. Die Tumormikroumgebung und ihre Bestandteile

Ein Tumor besteht aus vielen verschiedenen Zelltypen, welche zusammen mit Blutgefäßen und der extrazellulären Matrix als Tumormikroumgebung (TME) bezeichnet werden. Die dort

stattfindenden Interaktionen können das Tumorwachstum modulieren, inhibieren und unterstützen (Abbildung 3).

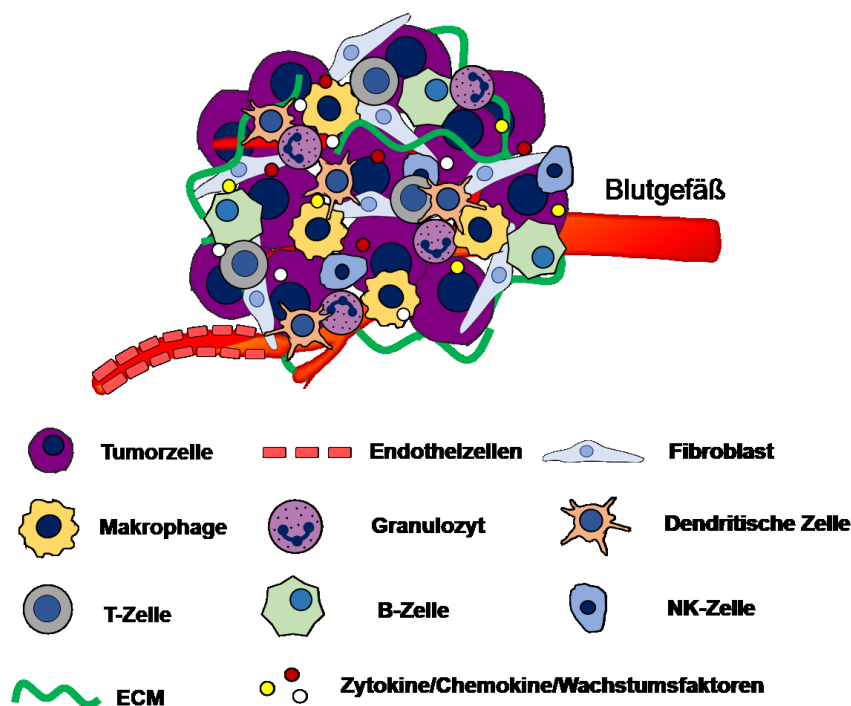


Abbildung 3: Zusammensetzung der Tumormikroumgebung

Die Tumormikroumgebung besteht neben Tumorzellen an sich, auch aus einer heterogenen Mischung verschiedener Zellen, Bestandteilen der extrazellulären Matrix, Blutgefäßen und löslichen Faktoren, wie beispielsweise Zytokinen. Zu solchen Zellen gehören unter anderem sogenannte Tumor-assoziierte Fibroblasten, welche das Tumorwachstum über unterschiedliche Mechanismen unterstützen, oder auch myeloide und lymphoide Immunzellpopulationen. Tumorzellen modulieren wiederum die sie umgebenden Zellen, mittels der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, anti-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, oder der Produktion von extrazellulärer Matrix. Zur Nährstoffversorgung der Tumorzellen wird zusätzlich die Bildung von Blutgefäßen, die Angiogenese, angeregt (Modifiziert nach: Alsibai & Meseure, 2018).

1.4.1. Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs)

Stromazellen sind ein wichtiger Teil des TMEs und sind ein Faktor beim Voranschreiten der Tumorentwicklung (Biswas und De, 2021; Ramón y Cajal et al., 2020). Bei CAFs handelt es sich um eine äußerst heterogene Population spindelförmiger Zellen, die einen großen Teil des Tumorstromas bilden (Chen und Song, 2019). Dieser Zelltyp teilt sich in viele Subpopulationen auf, die unter anderem mesenchymale oder inflammatorische Funktionen innehaben können (Hutton et al., 2021). Aufgrund ihrer Heterogenität ist es nicht möglich, CAFs eine bestimmte Zusammenstellung von Markern zuzuordnen, jedoch werden α SMA, Vimentin, FSP-1 (englisch für „fibroblast specific protein-1“), FAP (englisch für „fibroblast activation protein“), CD90, CD140a und CD140b häufig für ihre Identifikation genutzt (Grünwald et al., 2021; Jiang et al.,

2020; Jung et al., 2013; Lao et al., 2016; Parajuli et al., 2017; Primac et al., 2019). Erschwert wird die Charakterisierung von CAFs dadurch, dass sie aus den verschiedensten Vorläuferzellen hervorgehen können, wie Adipozyten, mesenchymalen Stromazellen (MSCs), Perizyten, Endothel- oder Epithelzellen (Bochet et al., 2013; Jung et al., 2013; Karnoub et al., 2007; Ning et al., 2018; Sugimoto et al., 2006; Xing et al., 2010).

1.4.1.1. Tumorfördernde Funktionen von CAFs

Der sich entwickelnde Tumor kann CAFs nicht nur aus dem umliegenden Gewebe, sondern auch aus entfernten Organen, wie dem Knochenmark oder dem Fettgewebe rekrutieren und differenzieren. Hierbei spielen beispielsweise TGF β , CXCL12 oder CXCL16 eine Rolle (Jung et al., 2013; Kidd et al., 2012; Quante et al., 2011).

CAFs wiederum sind in der Lage, immunsuppressive Immunzellen in Form von Makrophagen, dendritischen Zellen, MDSCs, Neutrophilen oder bestimmten Populationen von T-Zellen zum Tumor zu rekrutieren und/oder ihr Verhalten zu modulieren (Cheng et al., 2018; Mao et al., 2021; Mhaidly und Mechta-Grigoriou, 2021; Munir et al., 2020). CAFs können, Monozyten chemotaktisch anziehen, wodurch sie diese zu pro-tumorigenen M2-Makrophagen zu polarisieren (Comito et al., 2014; Gok Yavuz et al., 2019; Zhang et al., 2019). Darüber hinaus können CAFs ebenfalls M2-Makrophagen aus M1-Makrophagen transdifferenzieren (Comito et al., 2014; Gok Yavuz et al., 2019). Auch die Abgabe von Matrixproteinen, wie Hyaluronsäure, rekrutiert Makrophagen, um die Angiogenese zur Versorgung des Tumors zu unterstützen (Kobayashi et al., 2010).

1.4.1.2. Tumoringehibierende Funktionen von CAFs

Trotz ihrer vielfältigen Tumor-unterstützenden Funktionen, sind auch Fälle bekannt, in denen CAFs das Wachstum von Tumoren inhibieren können. Tatsächlich führt die Depletion von α SMA-exprimierenden Zellen und dem Fehlen ihrer Matrix im Pankreaskarzinom zu einer erhöhten epithelial-mesenchymalen Transition von Tumorzellen und unterstützt auch den Stammzellcharakter, was zu einer verkürzten Lebensdauer der Versuchstiere führt (Özdemir

et al., 2014). Eine Subpopulation mit dieser Fähigkeit im Pankreaskarzinom stellt eine CD105-negative CAF-Subpopulation dar, deren Abundanz im Tumor beispielsweise mit der Häufigkeit bestimmter zytotoxischer T-Zell Subpopulationen korreliert. Die Injektion von CD105-negativen Fibroblasten unterdrückte das Tumorstadium *in vivo*, indem sie dendritische Zellen und damit T-Zellen modulierten, ohne selbst jedoch Antigene an T-Zellen zu präsentieren (Hutton et al., 2021). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass Hyaluronsäuresynthase 2, bzw. Hyaluronsäure von mesenchymalen CAFs und der hepatische Wachstumsfaktor aus inflammatorischen CAFs zwar die Metastasierung von Pankreas- und Darmkarzinomen fördern, mesenchymale CAFs jedoch auch gleichzeitig die Tumorstadium einschränken können. Dies geschieht mittels der Bildung von Kollagen I, welches sowohl die Proliferation, als auch die Invasion der Tumorzellen inhibierte. Dementsprechend führte die Deletion von Kollagen I im Pankreas- und Darmkrebsmodell *in vivo* zu einer verstärkten Metastasierung in die Leber (Bhattacharjee et al., 2021).

1.4.2. Immunzellen

Immunzellen sind ein essentieller Teil des TME und sind maßgeblich am Voranschreiten der Tumorentwicklung beteiligt (Biswas und De, 2021; Ramón y Cajal et al., 2020). Das Immunsystem dient dem Körper nicht nur als Abwehr gegen Pathogene, wie Bakterien oder Viren, sondern auch als Antwort gegen Fremdkörper oder Krebserkrankungen. Hierzu entwickelten sich im Laufe der Evolution zwei Arten der Immunantwort, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das adaptive Immunsystem besteht aus T- und B-Zellen (Murphy und Weaver, 2018). T-Zellen werden im Knochenmark generiert, wandern anschließend zur Reifung in den Thymus ein, woraufhin MHC-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche gebildet werden. Außerdem entstehen T-Zell-Rezeptoren, die zur Erkennung spezifischer Antigene dienen. T-Zellen durchlaufen daraufhin die positive Selektion, bei der sichergestellt wird, dass sie schwach an körpereigene MHC-Moleküle binden können und die negative Selektion, die dazu dient auszuschließen, dass diese Bindung zu stark ist (Murphy und Weaver, 2018). T-Zellen werden daraufhin von Zellen der angeborenen Immunität aktiviert, indem Antigen-präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen Quellen von Antigenen aufnehmen und diese Antigene auf ihren MHC-Klasse-II-Komplexen an T-Zellen präsentieren (Gemic et al., 2019; Li

et al., 2019b). T-Zellen aktivieren daraufhin B-Zellen, die zu Plasmazellen differenzieren und Antikörper produzieren (Murphy und Weaver, 2018).

Zelltypen des angeborenen Immunsystems umfassen Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, NK-Zellen, Eosinophilen, Basophilen und Neutrophile (Haas und Obenauf, 2019; Murphy und Weaver, 2018). Eine Infektion oder das Auftreten von Gewebeschäden wird von Makrophagen im Gewebe wahrgenommen, woraufhin diese Entzündungsreaktionen, beispielsweise durch die Ausschüttung von Zytokinen, auslösen, die daraufhin Granulozyten in das Gewebe rekrutieren, wo diese Zellen die erste Abwehr gegen eine Infektion bilden (Murphy und Weaver, 2018). In der Regel reagieren myeloide Zellen mittels der Erkennung von exogenen „Pathogen-assoziierten molekularen Mustern“ (PAMPs, englisch für „pathogen-associated molecular patterns“). Zusätzlich existieren noch endogene „Gefahren-assoziierte molekulare Muster“ (DAMPs, englisch für „damage-associated molecular patterns“), die häufig von sterbenden Zellen abgegeben werden, wie DNA, Hitzeschockproteine (HSPs) oder HMGB1 (englisch für: „High mobility group box 1 protein“). Auch Teile der extrazellulären Matrix, wie die EDA-Domäne von Fibronectin, können als DAMPs agieren (Kawai und Akira, 2010; Kelsh-Lasher et al., 2017; Okamura et al., 2001). Die Erkennung solcher Moleküle erfolgt mittels PRRs wie Toll-like-Rezeptoren (Murphy und Weaver, 2018; Newton und Dixit, 2012).

1.4.2.1. *Neutrophile*

Neutrophile sind als Teil des Immunsystems in der Tumormikroumgebung und in verschiedenen Tumoren nachweisbar (Eruslanov et al., 2014; Finisguerra et al., 2015; Gershkovitz et al., 2019; McFarlane et al., 2021; Sun et al., 2014). Sie stellen die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen Infektionen dar (Blanco-Camarillo et al., 2021; Filippi, 2019; Ohms et al., 2020). Neutrophile werden als kurzlebige Zellen betrachtet, deren Überlebensdauer weniger als 24 Stunden beträgt, wobei es an anderer Stelle möglich war, eine Lebensdauer von 5,4 Tagen nachzuweisen. Beim Menschen werden ca. 10^{11} dieser Zellen pro Tag produziert und stellen damit mit ca. 70% aller Immunzellen im Blut den häufigsten Immunezelltypus in der Zirkulation dar (Blanco-Camarillo et al., 2021; Yvan-Charvet und Ng,

2019). Bei Mäusen machen Neutrophile nur einen Anteil von ca. 20% - 30% der Immunzellen im Blut aus (Lieschke et al., 1994).

1.4.2.1.1. Chemotaktische Anziehung von Neutrophilen

Im Knochenmark bindet CXCL12, auch SDF-1 α (englisch für „stromal-derived factor 1 α “) genannt, an den CXCR4-Rezeptor von Neutrophilen, wodurch sie dazu veranlasst werden im Knochenmark zu verbleiben. Werden Neutrophile jedoch Liganden für ihren Rezeptor CXCR2 ausgesetzt, wie beispielsweise CXCL1 (alternativ KC, englisch für „keratinocyte chemoattractant“) oder CXCL2 (alternativ MIP2- α , englisch für „macrophage inflammatory protein 2-alpha“), wirken diese antagonistisch gegenüber der Retentionswirkung der CXCL12-CXCR4-Interaktion und die Zellen werden aus dem Knochenmark mobilisiert und gehen in die Blutbahn über. Während Neutrophile des Knochenmarks eine hohe Expression von CXCR4 und eine niedrige Expression von CXCR2 aufweisen, werden die Rezeptoren in der Blutbahn hingegen herunter- bzw. hoch-reguliert (Eash et al., 2009, 2010; Hedrick und Malanchi, 2021; Martin et al., 2003; Wengner et al., 2008). Solche Chemokine dienen auch als Reiz für die Migrationsrichtung von Neutrophilen, indem ein Gradient von Chemokinen, welche mittels Heparansulfaten auf Endothelzellen befestigt sind, diese Immunzellen an den Gefäßwänden entlang führt (Massena et al., 2010). Besonders potente Chemokine für die Anziehung von Neutrophilen sind MIF, CXCL1, CXCL2 und im Menschen IL8 (Brandau et al., 2010; Means et al., 2003; Romieu-Mourez et al., 2009; Vieira et al., 2009).

1.4.2.1.2. Biologische Funktionen aktivierter Neutrophiler

Neutrophile erfüllen diverse Funktionen, um beispielsweise Pathogene zu bekämpfen. Hierzu gehört beispielsweise die NETose, was die Bildung von Neutrophilen extrazellulären Fallen, oder auch NETs (englisch für „neutrophil extracellular traps“) bezeichnet, bei denen klebrige Netze aus DNA gebildet werden, oder auch die Phagozytose von Krankheitserregern (Kaplan und Radic, 2012; van Kesse et al., 2014; Lee et al., 2003; Papayannopoulos, 2017; Yipp und Kubes, 2013). Weitere Mechanismen, mit denen Neutrophile in der Lage sind, Mikroben abzutöten oder Entzündungsprozesse zu regulieren, sind die Bildung von reaktiven Sauerstoff-

und Stickstoffspezies, sowie die Bildung von Zytokinen (Eyles et al., 2006; Fialkow et al., 2007; Tamassia et al., 2018; Tecchio et al., 2014). Neutrophile enthalten sogenannte Granulae. Diese stellen kleine Kompartimente innerhalb der Zellen dar, in denen antimikrobielle Proteine, wie beispielsweise Defensine, Lysozyme, oder auch Proteasen enthalten sind (Moraes et al., 2006; Tecchio et al., 2014; Xu und Lu, 2020).

1.4.2.1.3. Die Identifikation von Neutrophilen anhand von Markern

In Menschen ist die Identifikation von Neutrophilen, häufig zusammen mit dem CD11b-Marker, beispielsweise durch die Marker CD13, CD15, CD16, CD33, CD63 und CD66b möglich, häufig in unterschiedlichen Kombinationen zu einander (Clope et al., 2013; Eruslanov et al., 2012; Lu et al., 2020). In Mäusen hingegen findet die Identifikation von Neutrophilen mittels anderer Marker statt. Hierbei werden meist Antikörper gegen den Oberflächenrezeptor Ly6G genutzt, der unter reifen Immunzellen fast ausschließlich von Neutrophilen exprimiert wird (Biswas et al., 2017; Lee et al., 2013; Loughner et al., 2016). Während demnach der Ly6G-Marker theoretisch gezielt Neutrophile identifizieren könnte, stellen MDSCs eine Ausnahme dar. Sie können, neben Ly6C, ebenfalls Ly6G exprimieren, weswegen es nicht möglich ist, Neutrophile anhand von Markern von MDSCs zu unterscheiden (Hegde et al., 2021; Vanhaver et al., 2021; Veglia et al., 2021).

1.4.2.1.4. Neutrophile in der anti-Tumor Immunität

Die Tatsache, dass Neutrophile Tumorzellen abtöten, ist seit Jahrzehnten bekannt (Godleski et al., 1970). Dennoch wurde diesen Zellen lange Zeit im Kontext der Tumorforschung wenig Beachtung geschenkt. In den letzten Jahren hingegen kam aufgrund ihrer Heterogenität und Funktion als Tumorpromoter oder –suppressor ein erhöhtes Interesse an dieser Immunzellpopulation auf (Berry et al., 2017; McFarlane et al., 2021; Wu et al., 2020a).

1.4.2.1.4.1. *N1- und N2-Polarisierung von Neutrophilen*

Ein Versuch die Heterogenität von Neutrophilen im Tumor zu beschreiben, ist die Klassifizierung in N1- (anti-tumorigen) und N2-Neutrophile (pro-tumorigen), in Anlehnung an die M1- und M2-Polarisierung von Makrophagen (Fridlender et al., 2009; Ohms et al., 2020; Powell und Huttenlocher, 2016). Die N1-Polarisierung kann dabei durch Typ I und Typ II Interferone, LPS, die Wirkung des TLR4/NFκB-Signalwegs oder TNFα ausgelöst werden, wohingegen der N2-Zustand durch die Aktivierung von IRAK-M oder die Anwesenheit von TGFβ, IL-10 oder G-CSF (englisch für „granulocyte colony-stimulating factor“) begünstigt wird (Andzinski et al., 2015, 2016; Comen et al., 2016; Fridlender et al., 2009; García-Culebras et al., 2019; Ohms et al., 2020; Sagiv et al., 2015; Sun et al., 2014; Zhang et al., 2020). N1-Neutrophile weisen sich durch die Expression von ICAM1 und TNFα aus, wohingegen N2-Neutrophile VEGF, MMP9 und Arginase-1 exprimieren (Andzinski et al., 2016; Fridlender et al., 2009; Jablonska et al., 2010; Mishalian et al., 2013; Shaul et al., 2016). Während Neutrophile und ihre Funktionen anfänglich als schädlich für alle Zellen und Gewebe angesehen wurden, konnte in den genannten Prozessen mehrfach gezeigt werden, dass Neutrophile nicht nur gezielt Krebszellen abtöten oder in einen Zellzyklusarrest überführen, sondern auch ihre Effektormechanismen, wie Elastase, spezifisch gegen Tumorzellen wirken und gesunde Zellen davon kaum betroffen sind (Cui et al., 2021; Sionov et al., 2019; Sun et al., 2018; Wang, 2018; Yan et al., 2014).

1.4.2.1.4.2. *Mechanismen von Neutrophilen zur Inhibition der Tumorprogression*

Es sind mehrere Mechanismen bekannt, mit denen Neutrophile anti-tumorigen wirken können. Eine Möglichkeit von Neutrophilen Krebszellen abzutöten ist der oxidative Burst, bei dem reaktive Sauerstoffspezies, wie H₂O₂ ausgestoßen werden (Gershkovitz et al., 2018; Granot et al., 2011; Yan et al., 2014; Zivkovic et al., 2007). So wurde jüngst gezeigt, dass Neutrophile durch die besagte Bildung von H₂O₂ oder der Produktion von IL1β die Metastasierung inhibieren (Castaño et al., 2018; Granot et al., 2011; Li et al., 2020; Wculek und Malanchi, 2015). Auch die NETose kann sich zytotoxisch auf Krebszellen auswirken (Andzinski et al., 2016; Hirschhorn et al., 2021; Millrud et al., 2017). Hierfür sind beispielsweise die bei der NETose ausgestoßenen Enzyme (z.B. Elastase) verantwortlich, deren direkte und

indirekte, durch T-Zellen vermittelte, zytotoxische Wirkung gegen Krebszellen bereits mehrfach gezeigt wurden (Cui et al., 2021; Mittendorf et al., 2012; Odajima et al., 1996). Neutrophile Elastase wird von Krebszellen aufgenommen und legt proteolytisch die intrazelluläre Domäne von CD95, auch Fas genannt, frei. Dies führt zur ROS- und T-Zell-abhängigen Apoptose von Krebszellen (Cui et al., 2021). Die Interaktion von Fas auf Tumorzellen mit Fas-Ligand auf Neutrophilen kann auch zu einem Zellzyklusarrest der Krebszellen führen (Sun et al., 2018).

Die tumorunterdrückende Wirkung von Neutrophilen ist jedoch möglicherweise stark vom Zeitpunkt der Tumorprogression abhängig, weswegen Neutrophile insbesondere in der frühen Phase des Tumorwachstums anti-tumorigen wirken (Blaisdell et al., 2015; Eruslanov, 2017; Eruslanov et al., 2012, 2014; Singhal et al., 2016; Zivkovic et al., 2007). So war es möglich zu zeigen, dass während der frühen Phase des Tumorwachstums anti-tumorigene Neutrophile mit der Tumorprogression zu Tumor-unterstützenden Neutrophilen polarisieren (Mishalian et al., 2013). Alternativ kann der Tumor auch die Einwanderung anti-tumorigener Neutrophile unterdrücken, nachdem sein Wachstum weiter vorangeschritten ist. In diesem Zusammenhang wurde in Ratten gezeigt, dass Walker 256-Mammatumoren nur während der ersten 5 Tage eine erhöhte Anzahl an Neutrophilen aufweisen, die ab Tag 6 rapide absinkt (Kuwabara et al., 2019).

1.4.3. Die extrazelluläre Matrix

Der Begriff extrazelluläre Matrix (ECM, englisch für „extracellular matrix“) bezeichnet Moleküle, die außerhalb von Zellen im Interzellularraum angesiedelt sind. In Säugetieren existieren mehr als 300 extrazelluläre Makromoleküle, die sich in Kollagene, Proteoglykane, wie beispielsweise Heparansulfate, Versican oder Hyaluronsäure, und Glykoproteine, wie Laminine, Elastin, Tenascine oder Fibronectin, einteilen lassen. Extrazelluläre Matrixmoleküle können eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren oder Zytokine einlagern (Winkler et al., 2020). Die ECM wird dabei in zwei Kategorien eingeteilt. Zum einen gibt es die Basalmembran aus Kollagen IV, Lamininen, Nidogenen und Perlecan und zum anderen die interstitielle Matrix aus Kollagene I und III, Fibronectin, Decorin, Hyaluronsäure, Elastin und Tropoelastin. Die Basalmembran befindet sich unter Endothel- und Epithelzellen und bildet eine etwa 50-100 nm dicke Schicht, die zwischen diesen Zellen und der Lamina Propria liegt (Pompili et al., 2021).

1.4.3.1. Tumorfördernde Eigenschaften der ECM

Die extrazelluläre Matrix wird während der Tumorprogression nicht nur niedergelegt, sondern auch modelliert, wodurch Matrix-gebundene lösliche Faktoren freigesetzt oder Matrixproteine in bioaktive Fragmente zerkleinert werden können. Die mechanische Streckung von Matrixfasern kann weitere, vorher kryptische Bindungsstellen zugänglich machen oder den Weg für migrierende Zellen freilegen. Durch diese Mechanismen ist die ECM in der Lage, die epitheliale-mesenchymale Transition, Migration, Invasion, Metastasierung und Therapieresistenz der Tumorzellen, sowie der Polarisierung von Stromazellen in CAFs und die Angiogenese zu fördern und damit die Tumorprogression voranzutreiben (Henke et al., 2020; Hielscher et al., 2016; Winkler et al., 2020; Xiong und Xu, 2016). So konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass sowohl Brust- als auch Prostatakrebspatienten eine verringerte Überlebensdauer aufweisen, wenn ein besonders hoher Fibronektin Gehalt in den Tumoren vorlag (von Au et al., 2013). In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass sowohl der Knockdown von Fibronektin in MDA-Brustkrebszellen, als auch die pharmakologische Unterdrückung seiner Akkumulation mittels des bakteriellen Peptids pUR4, in einer Inhibition der Tumorprogression resultierte (Ghura et al., 2021).

Das Gewicht eines Tumors besteht bis zu 60% aus extrazellulärer Matrix (Henke et al., 2020). Stromazellen stellen die Hauptquelle für diese Proteine dar, wobei seit einigen Jahren auch der Beitrag der von Tumorzellen produzierten Matrix zunehmend an Bedeutung gewinnt (Henke et al., 2020; Winkler et al., 2020; Xiong und Xu, 2016). Auch Immunzellen wie Makrophagen können im Tumor ECM produzieren, was eine wichtige Rolle bei dem Voranschreiten von Tumorerkrankungen spielen kann (Afik et al., 2016). Während der Progression von Tumorerkrankungen verändern sich die abgegebenen Matrixmoleküle und deren Verhältnis im Vergleich zu gesunden Geweben und tragen dazu bei das Krebswachstum zu modulieren (Bar et al., 2004; Barsky et al., 1982; Deak et al., 1991; Kauppila et al., 1998). In Tumoren konnte eine erhöhte Expression von Kollagen I, aber eine verminderte Expression von Kollagen IV im Vergleich zu gesunden Geweben nachgewiesen werden. Interessanterweise führte die Deletion von Kollagen I in Lungenkrebszellen zu einer erhöhten Migrations- und Invasionsfähigkeit, wohingegen die Bildung von Kolonien *in vitro* vermindert wurde, was darauf hinweist, dass Kollagen I die Invasion von Tumorzellen hemmen kann,

jedoch zeitgleich ihre Fähigkeit proliferierende Tumorklone zu bilden, verstärkt (Fang et al., 2019).

1.4.3.2. *Tumorinhibierende Eigenschaften der ECM*

Aufgrund des zuletzt genannten Beispiels wird deutlich, dass die ECM trotz ihrer pro-tumorigenen Effekte auch eine wichtige Rolle in der Unterdrückung von Tumorerkrankungen spielt. CAFs, die aus hepatischen Sternzellen polarisiert sind, produzieren während der Tumorprogression sowohl HGF als auch Hyaluronsäure welche das Tumorstadium begünstigen. Zeitgleich wird jedoch auch Kollagen I produziert, welches das Tumorstadium aufgrund der Entstehung einer mechanischen Barriere einschränken kann. Die Deletion von Kollagen I aus diesen Stromazellen führt deshalb zu einer verstärkten Metastasierung von Pankreas- und Darmkarzinomen (Bhattacharjee et al., 2021).

Ein weiteres Molekül der extrazellulären Matrix, EMILIN2, ist in Magenkrebs herunterreguliert. EMILIN2 verringert die Proliferation von Tumorzellen und erhöht auch deren Apoptose. EMILIN2 löst die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL8, aus oder polarisiert Makrophagen in den anti-tumorigenen M1-Phänotyp (Andreuzzi et al., 2020, 2022), was auch für Tenascin-C gezeigt werden konnte (Deligne et al., 2020).

Da eine verringerte Expression von Fibronectin die Folge von maligner Transformation sein kann und die darauf folgende Reduktion der Adhäsion das Risiko zur Metastasierung erhöht, kann Fibronectin so die Tumorprogression beeinflussen (Beier et al., 2007; Chen et al., 1976; Hynes et al., 1979; McDoniels-Silvers et al., 2002; Stenman und Vaheri, 1981). Verstärkt wird diese Vermutung dadurch, dass die Spaltung von Fibronectin durch DDR2 in einem Modell für Ovarkarzinome in der Tat zu einer verstärkten Metastasierung führte (Grither et al., 2018).

1.5. Fibronectin

Fibronectin ist ein Protein der extrazellulären Matrix, welches in Geweben und Flüssigkeiten von Wirbeltieren auftritt und als Monomer eine Masse von etwa 250 kDa aufweist. Fibronectin tritt in der Regel jedoch als Dimer auf, das durch Disulfidbindungen am c-terminalen Ende verbunden sind (Hynes, 1990). Fibronectin bildet je nach Gewebe ein

Netzwerk, welches sich im Aufbau der Proteine unterscheidet und dient als Verbindungsstück zu anderen Proteinen der ECM (Dalton und Lemmon, 2021). Das Vorhandensein einer stabilen Fibronektinmatrix ist dabei notwendig für die Niederlegung anderer Matrixmoleküle, wie Kollagen (Sottile et al., 2007). Fibronektin ist essentiell für das Überleben eines Organismus, da die globale Deletion zum Absterben von murinen Embryos im Mutterleib führt. Solche Embryos sind fehlgebildet und weisen Defekte im Neuralrohr, der Vaskularisierung und in der Entwicklung des Herzens auf (George et al., 1993).

Fibronektin wird von verschiedenen Zelltypen, wie auch mesenchymalen Stromazellen, produziert und sezerniert. Das abgegebene Fibronektin beeinflusst dabei viele unterschiedliche Zellprozesse, wie beispielsweise Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und die Überlebensfähigkeit der Zelle (Dalton und Lemmon, 2021). Aus diesem Grund ist Fibronektin auch im Tumorkontext von großer Bedeutung. Es ist bekannt, dass Fibronektin das Tumorstadium sowohl inhibieren, als auch verstärken kann (Lin et al., 2019). So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Versuchstieren mit Fibronektin *in vivo* sowohl die gebildeten Metastasen, als auch das Tumorstadium und die Angiogenese reduzieren kann (Pasqualini et al., 1996; Yi und Ruoslahti, 2001). Andererseits konnten in Vorarbeiten innerhalb der Gruppe bereits mehrere pro-tumorigene Eigenschaften von Fibronektin nachgewiesen werden (von Au et al., 2013; Ghura et al., 2021). Von besonderer Bedeutung sind dabei die verschiedenen Isoformen von Fibronektin. In Vorarbeiten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das von Osteoblasten gebildete EDA-Fibronektin das Tumorstadium verstärken kann, indem es das Immunsystem mittels des $\alpha 5\beta 1$ -Integrins moduliert (Rossnagl et al., 2016).

1.5.1. Der Aufbau von Fibronektin

Der schematische Aufbau von Fibronektin ist in Abbildung 4 wiedergegeben. Ein Fibronektin-Monomer besteht aus mehreren Domänen, die anhand von proteolytischer Fragmentierung und der Analyse rekombinanter DNA durch ihre Bindungspartner benannt wurden: Heparin, Kollagen, Gelatine, Fibrin, Bakterien, Gewebs-Transglutaminase und die Zellbindende-Domäne (Dalton und Lemmon, 2021; Pankov und Yamada, 2002). Fibronektin ist in Modulen aufgebaut. Es existieren 12 FN I-Module, 2 FN II-Module und 15 FN III-Module. Ein Typ I-Modul besteht aus 40, ein Typ II-Modul aus 60 und ein Typ III-Modul aus 90 Aminosäuren (Pankov und Yamada, 2002). Grundsätzlich existieren noch zwei weitere Typ III Module von

Fibronektin, das EDA- und das EDB-Modul, welche durch alternatives Spleißen entstehen und wodurch in Fibronektin-Isoformen gebildet werden können (Dalton und Lemmon, 2021; Pankov und Yamada, 2002). Zusätzlich kann Fibronektin post-translational durch N- und O-Glykosylierungen modifiziert werden (Pankov und Yamada, 2002). Eine bestimmte Form von Fibronektin, das sogenannte onkofötale Fibronektin (oFN, englisch für „oncofetal fibronectin“), welches hauptsächlich während der Embryonalentwicklung oder in malignen Geweben gebildet wird, wird durch eine solche O-Glykosylierung in der variablen Region, auch IIIICS (englisch für „type III connecting segment“-)Region genannt, gekennzeichnet (Freire-de-Lima et al., 2011; Matsuura und Hakomori, 1985). Wichtige Bindepartner für Fibronektin stellen Integrine dar. Fibronektin hat Bindestellen für eine Vielzahl von Integrinen, wobei die am besten beschriebene Interaktion zwischen Integrinen und Fibronektin die Bindung des Integrins $\alpha 5\beta 1$ an die RGD-Sequenz der zellbindenden Region darstellt. Die Bindung wird dabei durch Integrin $\alpha 5$ vermittelt. Neben Integrin $\alpha 5\beta 1$, binden viele weitere Integrine an Fibronektin, wie $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 9\beta 1$ oder $\alpha v\beta 3$ (Dalton und Lemmon, 2021; Pankov und Yamada, 2002). Die Bindung von Molekülen der ECM an Integrine hat im Anschluss die Aktivierung der Kinasen FAK (englisch für „focal adhesion kinase“), ERK (englisch für „extracellularly activated kinase“), AKT (englisch für „AKT8 virus oncogene cellular homolog kinase“) und JNK (englisch für „c-Jun N-terminal kinase“) zur Folge. Hierdurch werden anschließend verschiedene Prozesse in der Zelle beeinflusst, wie die Differenzierung, Migration und das Überleben (Ellert-Miklaszewska et al., 2020).



Abbildung 4: Schematische Struktur eines Monomers von Fibronektin. (Modifiziert nach: Freire-de-Lima et al., 2011).

1.5.2. Spleißisoformen von Fibronektin

Das Auftreten von Spleißvarianten von Fibronektin ist in der adulten Lebensphase im Vergleich zur Embryonalentwicklung oder dem Jugendalter herabreguliert, wobei Unterschiede zwischen unterschiedlichen Körpergeweben nachgewiesen werden konnten (Chauhan et al., 2004; Magnuson et al., 1991; Pagani et al., 1991; Peters und Hynes, 1996; Peters et al., 1996).

Die verschiedenen Isoformen von Fibronectin spielen während der Embryogenese eine wichtige Rolle und beeinflussen dabei die Vaskularisierung oder die Entwicklung der Chorda dorsalis (Peters und Hynes, 1996). Die Expression dieser beiden Fibronectin-Module, wird im Erwachsenenalter wieder induziert, wenn Leber- oder Tumorerkrankungen auftreten oder eine Wundheilung stattfindet (Carnemolla et al., 1989; French-Constant et al., 1989; Kawelke et al., 2008; Matsumoto et al., 1999).

1.5.2.1. EDA- und EDB-Fibronectin

Bei der EDA-Isoform befindet sich das EDA-Modul zwischen den FNIII11- und FNIII12- Modulen (Pankov und Yamada, 2002). EDA-Fibronectin kann während der Tumorbildung verstärkt an sich neu bildenden Blutgefäßen nachgewiesen werden, was EDA zu einem guten Marker für Tumorerkrankungen macht (Rybak et al., 2007). Da die Bildung des EDA-Moduls während Krebserkrankungen hochreguliert wird, stellt es ein vielversprechendes Ziel für die Krebstherapie dar (Femel et al., 2014; Martín-Otal et al., 2022). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass EDA-Fibronectin das Tumorwachstum über mehrere Mechanismen unterstützt, indem es das Immunsystem moduliert, die Lymphangiogenese unterstützt oder das Wachstum und die Metastasierung begünstigt (Amin et al., 2021; Ou et al., 2013, 2014, 2010). Es wurde vermutet, dass EDA-Fibronectin bei der Vaskularisierung von Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle spielt, da es auch während der Embryogenese hierfür von Bedeutung ist. Jedoch konnte die Verwendung von EDA-null-Mäusen zeigen, dass das Fehlen von EDA weder die Tumorangiogenese, noch das Tumorwachstum beeinflussen konnte (Astrof et al., 2004). Es konnte dennoch nachgewiesen werden, dass das EDA-Fibronectin aus Tumorzellen lymphatische Endothelzellen zur Bildung von Röhrenstrukturen, also zur Lymphangiogenese, veranlasst (Ou et al., 2010).

Das EDB-Modul befindet sich zwischen den Modulen FNIII7 und FNIII8 (Pankov und Yamada, 2002). Da EDB, ähnlich wie EDA, in Tumoren gebildet wird, handelt es sich auch bei dieser Isoform um ein mögliches Ziel für die Tumorthherapie (Eigentler et al., 2011; Huijbers et al., 2012; Johannsen et al., 2010; Wagner et al., 2021). Mäuse, in denen EDB-Fibronectin ausgeschaltet wurde, entwickeln sich normal, wobei ihre Fibroblasten *in vitro* langsamer proliferierten und weniger Fibronectin produzierten (Fukuda et al., 2002). Die Anwesenheit

von EDB-Fibronektin veranlasst die verstärkte Proliferation von Endothelzellen *in vitro*, erhöht die Expression von VEGF und führt zur Bildung von röhrenartigen Strukturen. Die Ausschaltung von EDB mittels siRNA reduzierte die Expression von VEGF und inhibierte auch die Proliferation von Endothelzellen (Khan et al., 2005). Auch wenn diese Erkenntnisse und die Anwesenheit von EDB bei der embryonalen Vaskularisierung die Vermutung nahelegt, dass dieses Molekül die Tumorangio-genese positiv beeinflusst, zeigten EDB-null-Mäuse ähnlich wie bei EDA keine Veränderungen in der Tumovaskularisierung oder -größe (Astrof et al., 2004). Die doppelte Ausschaltung von EDA- und EDB-Fibronektin führt jedoch zu starker embryonaler Lethalität aufgrund von Defekten bei der Angiogenese (Astrof et al., 2007).

1.5.2.2. *Connecting-segment-1 (CS1)*

Die IIICS-Region unterliegt ebenfalls dem alternativen Spleißen, wodurch insgesamt etwa 20 Spleißvarianten im Menschen bekannt sind. Beim Menschen sind 5 unterschiedliche Versionen der IIICS-Region bekannt, die entweder alle 120 oder nur 95, 89 oder 64 Aminosäuren umfasst oder auch vollständig fehlen kann (White und Muro, 2011). Das Vorhandensein dieser Region ist essentiell für die Sekretion dieses Moleküls (Schwarzbauer et al., 1989). CS1 (englisch für „connecting segment 1“) ist ein Teil der IIICS-Region (Humphries et al., 1987). CS1 bindet an die Integrine $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$ (Guan und Hynes, 1990; Mould et al., 1990; Rugg et al., 1992; Wayner et al., 1989). CS1 stellt die 25 ersten, N-terminalen, Aminosäuren der IIICS-Region dar, wobei die kleinste, notwendige Einheit an Aminosäuren, die für die Bindefähigkeit von CS1 notwendig sind, Leucin-Asparaginsäure-Valin darstellen, welche somit die LDV-Sequenz bilden (Komoriyas et al., 1991). Aufgrund der Wichtigkeit von Integrin $\alpha 4\beta 1$ (im immunologischen Kontext meist VLA4 oder CD49d/CD29 genannt) bei der Anheftung von Immunzellen an Gefäße mittels VCAM1 von Endothelzellen, wird CS1 häufig als Inhibitor dieses Vorgangs eingesetzt (Berg et al., 1997; Van Dinther-Janssen et al., 1993; Dong et al., 2017; Liu et al., 2015). Die Expression von CS1 durch Endothelzellen, die durch Inflammation ausgelöst wird, kann dadurch spezifisch die Adhäsion und damit die Infiltration von Immunzellen fördern, womit CS1 einen Mediator inflammatorischer Immunreaktionen darstellt (Berg et al., 1997; Van Dinther-Janssen et al., 1993; Elices et al., 1994).

1.5.2.3. CS1 im Kontext von Krebserkrankungen

Die Expression der IIICS-Region, welche die CS1 enthält, ist in vielen Krebszellen hochreguliert (Hershberger und Culp, 1990). Auch bei oralen Plattenepithelkarzinomen ist die Expression von CS1 in malignen Geweben im Vergleich zu gesunden Geweben erhöht und fördert die Migration und die Invasion dieser Zellen (Kamarajan et al., 2010). Jedoch nimmt die Expression von CS1 mit steigendem Krankheitsgrad ab (Kamarajan et al., 2010), was die Vermutung nahelegt, dass CS1 das Tumorwachstum zwar fördern kann, aber in bestimmten Situationen nachteilig für maligne Zellen sein könnte. Aus diesem Grund kann CS1, ähnlich wie bei Immunzellen, eingesetzt werden, um die Festsetzung der Zellen zu verhindern. Die Injektion von CS1 zusammen mit B16-Zellen inhibiert die Metastasierung in die Lunge. Auch die intravenöse CS1-Injektion nach der Entfernung des Primärtumors in einem Modell für spontane Metastasenbildung konnte die Kolonisierung der Lunge unterdrücken (Saiki et al., 1990).

1.5.3. Fibronektin als TLR-Agonist

Bisher sind mehrere in Fibronektin enthaltene Liganden für TLRs bekannt. Es handelt sich dabei zum einen um EDA-Fibronektin und zum anderen die Typ-III-Module FNIII1c, sowie FNIII13-14 und weiteren Fibronektin-Fragmenten (Hwang et al., 2015; Kelsh et al., 2014; Okamura et al., 2001; Sofat et al., 2012). Zellen reagieren jedoch unterschiedlich auf TLR-Agonisten. So konnte gezeigt werden, dass MDA-MD-231-Zellen EDA-Fibronektin hauptsächlich mittels TLR2 und nur zu einem kleinen Teil mittels TLR5 erkennen und daraufhin IL8 exprimieren, wohingegen MDA-MB-468 ausschließlich TLR5 hierfür nutzen. Zusätzlich führt das Fibronektin-Fragment FNIII1c in MDA-MB-231-Zellen zur TLR2-abhängigen Produktion von IL8, wohingegen MDA-MB-468-Zellen keine Reaktion auf dieses Fragment zeigten, was die verschiedenen Reaktion verschiedener Zelltypen auf unterschiedliche TLR-Agonisten unterstreicht (Ambesi et al., 2022).

1.5.3.1. *FNIII1c als TLR-Agonist*

FNIII1c wird von TLR2, TLR4 und TLR5 erkannt und führt bei der Erkennung durch humane MSCs, Fibroblasten oder Krebszellen zur Aktivierung des NFκB-Signalwegs und zur Expression von CXCL1, CXCL2, CXCL3, sowie TNFα und IL8 (Ambesi et al., 2022; Cho et al., 2020; Kelsh et al., 2014; Tomchuck et al., 2008; You et al., 2010; Zheng et al., 2011). Wichtig für die Erkennung dieses Teils von Fibronectin ist das Vorhandensein von membrangebundenem, nicht löslichem CD14 und dass FNIII1c, beispielsweise durch mechanische Kräfte oder die Proteolyse durch MMPs, zumindest zum Teil entfaltet wird (Kelsh et al., 2014; You et al., 2010; Zheng et al., 2011, 2020). Darüber hinaus führt FNIII1c synergistisch zusammen mit EDA-Fibronectin zu einer verstärkten pro-inflammatorischen Antwort (Kelsh et al., 2014; Zheng et al., 2020).

1.5.3.2. *EDA-Fibronectin als TLR-Agonist*

EDA-Fibronectin stellt dabei den ersten Teil von Fibronectin dar, der als TLR-Agonist beschrieben wurde und interagiert mit TLR2, TLR4 und TLR5 (Ambesi et al., 2022; Okamura et al., 2001; Zheng et al., 2020). Bindet EDA-Fibronectin an TLRs, kommt es zur Bildung von pro-inflammatorischen Proteinen, wie TNFα, IL1β, IL6, IL8, IL12, CXCL1, CXCL2, CXCL3 und MMP9 (Amin et al., 2021; Gondokaryono et al., 2007; Julier et al., 2015; Kelsh et al., 2014; Malara et al., 2019; Okamura et al., 2001; Zheng et al., 2020). Die TLR-Aktivierung von EDA-Fibronectin ist im Falle der Bindung an TLR4 abhängig von MD-2, jedoch nicht von CD14 (Gondokaryono et al., 2007; Okamura et al., 2001).

1.5.3.3. *Fibronectin-Fragmente als TLR-Agonisten*

FNIII13-14 führt in primären porcinen Chondrozyten allein und im Synergismus mit IL1α und TNFα zu einer erhöhten Expression der Aggrecanasen ADAMTS (englisch für „a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif“)-4 und -5, MMP3 und HSP70, sowie anderen pro-inflammatorischen Proteinen. Die Nutzung von TLR4- und MyD88-knockout Mäusen deutete daraufhin, dass TLR4 den Rezeptor für FNIII13-14 darstellt (Sofat et al., 2012).

Während es sich bei allen genannten Beispielen um einzelne FNIII-Module handelte, wurden auch größere Teile Fibronektins in der Form von Fibronektin-Fragmenten identifiziert. Bei den bisher erforschten Fibronektin-Fragmenten handelt es sich um N-terminale 70kDa-, 45kDa-, 29/30kDa-, sowie das zellbindende 120kDa-Fragment (Hwang et al., 2015; Su et al., 2005). Das 70kDa-Fragment entspricht den Modulen FNI1-9 und FNII1-2, das 29/30kDa-Fragment den Modulen FNI1-5, das 45kDa-Fragment aus FNI6-9 und FNII1-2 und das 120kDa-Fragment aus den Modulen FNIII2-11 (Hsu et al., 2016; Tsang et al., 2012). Direkt nachgewiesen wurde die Aktivierung von TLR2 mit dem 29/30kDa-Fragment. Hierbei wurden humane Chondrozyten, Fibrochondrozyten und Fibroblasten mit diesem Fragment stimuliert, was unter anderem zur Expression von TNF α , IL1 β , iNOS, MMP1, MMP3 und MMP13 führte, deren Bildung durch Inhibition von TLR2 vermindert wurde (Hwang et al., 2015, 2019, 2021; Lu et al., 2021).

Für die 45kDa- und 120kDa-Fibronektin-Fragmente gibt es hingegen nur indirekte Hinweise auf eine Erkennung durch TLR-Rezeptoren (Hwang et al., 2015). Die Stimulation humaner Chondrozyten mit diesen Fragmenten führt zu einer MyD88-abhängigen Aktivierung von NF κ B und einem Anstieg der Expression von TLR2 (Hwang et al., 2015; Su et al., 2005). In humanen MSCs führt das 45kDa-Fragment ebenfalls zu einer leichten Aktivierung des NF κ B-Signalwegs und der Ausschüttung von TNF α (Tomchuck et al., 2008). In Chondrozyten führte dieses Fragment außerdem zur Produktion von MMP3 und MMP13. Da die autokrine Produktion von IL1 als Folge einer möglichen Integrin-Fibronektin-Bindung hierbei ausgeschlossen wurde, macht dies TLRs als möglichen Rezeptor für dieses Fragment denkbar (Stanton et al., 2002). Letztendlich führt das 120kDa-Fragment von Fibronektin zu einer Erhöhung der Expression von TLR2 in humanen Chondrozyten und der Expression von CXCL1, CXCL2 und CXCL3 in humanen Fibroblasten (Hwang et al., 2015; Yano und Ogura, 2018). Da die Expression von CXCL1 durch die Inhibition von IRAK1/4 reduziert wurde, könnte die Erkennung dieses Fragments ebenfalls TLR-vermittelt sein (Yano und Ogura, 2018).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Ermittlung des Zusammenhangs von Fibronektin und mesenchymalen Stromazellen auf das Tumorwachstum. Dabei wurde sowohl die Rolle des von MSCs produziertem Fibronektin aus verschiedenen Subpopulationen ermittelt, als auch die

Wahrnehmung von Fibronectin durch MSCs thematisiert. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die immunmodulatorischen Eigenschaften von MSCs gelegt.

Daraus ergaben sich folgende Fragen:

1. Wie beeinflussen MSCs das Tumorwachstum? Verändert die Produktion von Fibronectin aus MSC-Subpopulationen diesen Effekt? Durch welche Subpopulation wird Fibronectin dabei wahrgenommen?
2. Welche Rolle nimmt die Stimulation von MSCs mit Fibronectin bei der Inflammation ein? Welche Immunzellen werden moduliert und welcher Mechanismus liegt dieser Modulation zugrunde?
3. Durch welche Oberflächenmarker lässt sich die entscheidende Subpopulation definieren?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Hersteller

<u>Hersteller</u>	<u>Standort</u>
Abcam plc	Cambridge, UK
Adipogen AG	Liestal, Schweiz
Agfa Healthcare GmbH	Köln
A. Hartenstein GmbH	Würzburg
Alcan Packaging Neenah	Wisconsin, USA
Analytik Jena AG	Jena
AppliChem GmbH	Darmstadt
ASYS Hitech GmbH	Eugendorf, Österreich
Baxter International	Deerfield, Illinois, USA
BD Biosciences	Heidelberg
Bender & Hobein AG	Zürich, Schweiz
BioCat GmbH	Heidelberg
BioLegend Europe BV	Uithoorn, Niederlande
Bioline	London, England
Biometra GmbH	Göttingen
Biomers	Ulm
Bio-Rad Laboratories GmbH	München
Bio-Techne (R&D, Tocris)	Wiesbaden-Nordenstadt
Biozym Scientific GmbH	Oldendorf
Brand GmbH & Co. KG	Frankfurt am Main
Braun	Tuttlingen
Canon Inc.	Tokyo, Japan
Carl Roth GmbH & Co.KG	Karlsruhe
Charles River Laboratories	Sulzfeld
CST Cell Signaling	Frankfurt am Main
Dako Deutschland GmbH	Hamburg
Dunn Labortechnik GmbH	Asbach

Eppendorf AG	Hamburg
Fermentas GmbH	St. Leon-Rot
GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg
Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
Gilson Inc.	Middleton Wisconsin, USA
Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG	Wehrheim
Heraeus Sepatech GmbH	Osterode am Harz
Hiss Diagnostics	Freiburg
Integra Biosciences AG	Biebertal
Invitrogen GmbH	Karlsruhe
InvivoGen Europe	Toulouse, Frankreich
Kern & Sohn GmbH	Balingen
Kinesis GmbH	Langenfeld
Knick GmbH & Co. KG	Berlin
Leica Microsystems	Wetzlar
Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen
Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach
Merck KGaA	Darmstadt
Messer Group GmbH	Sulzbach
NeoLab	Heidelberg
New Brunswick Scientific	Edison NJ, USA
New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main
Nikon GmbH	Düsseldorf
Nordmark Arzneimittel GmbH	Uetersen
OLS OMNI Life Science	Bremen
Pan Biotech GmbH	Aidenbach
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
PromoCell GmbH	Heidelberg
Roche Diagnostics	Mannheim
Sarstedt	Nürnberg
Serva	Heidelberg
Semperit AG	Wien, Österreich
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Taufkirchen

Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz
Sirius Biotech S.r.L.	Genoa, Italien
Sony Corporation	Tokyo, Japan
Systemec GmbH	Wettenberg
Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim
Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham MA, USA
Vilber	Eberhardzell
VWR International GmbH	Darmstadt
Whatman International Ltd.	Maldstone, UK
Zentrallager Theoretikum	Heidelberg

2.1.2. Geräte

Geräte	Hersteller
Absorptions-Mikroplatten-Reader	Microplate Reader Sunrise, Tecan
Autoklav	Tuttnauer Systemec 5075 EL, Systemec
Blotsystem	PerfectBlue™ 'Semi-Dry'-Elektroblotter, Peqlab
Chemilumineszenz-Gerät	Fusion FX7, Vilber
Durchflusszytometer	LSRII, BD Biosciences BD LSRFortessa X-20, BD Biosciences
Entwicklungsgerät	Typ CP1000, Agfa
Fluoreszenz-Plattenleser	Spark, Tecan
Gelsystem DNA	PerfectBlue 40-1410, Peqlab
Gelsystem Protein	Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad
Geldokumentation	UVP UVsolo touch., Analytik Jena
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf
Inkubatoren	Innova CO-170, New Brunswick Scientific Heraeus Cytoperm 2, Thermo Fisher Scientific
IVIS-100 Imaging System	Xenogen bzw. Caliper Life Sciences
Magnetrührer	Yellow line MSH basic, Roth
Mikroskop	DM IL, inverses Routinemikroskop, LeicaVanoX-S, Olympus, mit Sony Kamera (CCD)
Mikrowellengerät	Microwellenherd MK-113, J.S.C.
Niederspannungsnetzgeräte	Standard Power Pack P25, Biometra

	Model 200/2.0 Power Supply, Bio-Rad
Pipetten	PIPETMAN Classic P10, Gilson PIPETMAN Classic P20, Gilson PIPETMAN Classic P200, Gilson PIPETMAN Neo P1000N, Gilson
Pipettierhilfe	Pipetboy Comfort Classic, IBS Integra
pH-Meter	Typ 761 Calimatic, Knick
Photometer	BioPhotometer Plus, Eppendorf
Plattenwascher	anthos fluido Typ 24200, ASYS
qPCR Cycler	Light Cycler 2.0 Instrument, Roche
Scanner	CanoScan LiDE 60, Canon
Sterilbänke	Holten LaminAir 1.2, Thermo Fisher Scientific HERAsafe HS 12, Thermo Fisher Scientific
Stickstofftank	Chronos Biosafe, Messer
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems T Personal Thermocycler, Biometra
Trockenschrank	Sterilisateur, Memmert
Ultragefrierschrank	Innova U725, New Brunswick Scientific
Ultraschallbad	Branson 2200, Branson
Vortex	Vortex Genie 2, Bender & Hobein
Waagen	Laborwaage, PRS 4200-2, Kern Feinwaage, ABJ 120-4M, Kern
Wasserbad	Typ 1004, Gesellschaft für Labortechnik
Zellsortierer	BD FACSAria III Cell Sorter, BD Biosciences
Zellzählapparatur	Typ TT CASY; Innovatis, Roche
Zentrifugen	Typ 1-14, Sigma Laborzentrifugen Biofuge 15, Heraeus Heraeus Multifuge 1 S-R, Thermo Fisher Scientific Light Cycler 2.0 Sample Carousel (20 µl), Roche

2.1.3. Verbrauchsmaterial

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Produktnummer, Hersteller</u>
Abdeckfolie	#30001358, Tecan

Aluminiumfolie	#2596.1, Carl Roth
CASYCups	#5651794, OLS OMNI Life Science
Deckgläser 24x60, Ø 10 mm	#0102242, Marienfeld #0111500, Marienfeld
Einmalinjektionskanülen	#304000 Microlance, 30G, BD Biosciences #302200 Microlance, 27G, BD Biosciences
Einmalröhrchen	#55.1578, Polypropylen, 12/75 mm, Sarstedt
Frischhaltefolie	#59206, Zentrallager Theoretikum (Universität Heidelberg)
LightCycler Capillaries (20µl)	# 04929292001, Roche
Handschuhe	#3780872, Sempercare, Semperit AG
Homogenisator-Stempel	#6-1060, NeoLab
Kryoröhrchen	#123263, Greiner Bio-One
Magnet	#12002D Dynal MPC-6, Thermo Fisher Scientific
Microvette	#20.1288, 200 K3E (Blutplasma), Sarstedt #20,1291, 200 Z-Gel (Blutserum), Sarstedt
Mykoplasmen-Detektions-Kit	#PK-CA91-1048, PromoCell
Nitrozellulose-Membran	#10600016, Amersham Protran, GE Healthcare
Objektträger	#J1800AMNT, Superfrost Plus, Thermo Fisher Scientific
Parafilm	#P-996, Alcan Packaging
Pasteurpipetten	#197734230, NeoLab #747720, Brand
PCR-Reaktionsgefäße	#711080, Biozym
Petrischalen	#633171, Greiner Bio-One #664160 Cellstar, Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	#VT0001X, Biozym #VT0004X, Biozym #740290, Greiner Bio-One
Reaktionsgefäße	#72.706 1,5 ml, Sarstedt #72.695 2 ml, Sarstedt
Röntgenfilme	#RF12 Fuji Medical Super RX, A. Hartenstein
Serologische Pipetten	(2, 5, 10 & 25 ml), Greiner Bio-One
Spritzen	#300013 Plastipak, BD Biosciences

Sterilfilter	#ESF-PV-30-022, KX Syringe Filter PVDF, Kinesis #1564020 Nalgene, Thermo Fisher Scientific
Whatman Papier	#3030917 3MM CHR, Whatman International Ltd.
Zellkulturflaschen	#169900 25 cm ² , Nunc, Thermo Fisher Scientific #156800 75 cm ² , Nunc, Thermo Fisher Scientific #159926 175 cm ² , Nunc, Thermo Fisher Scientific
Zellkulturplatten	#150239 6-Well, Nunc, Thermo Fisher Scientific #150200 12-Well, Nunc, Thermo Fisher Scientific #144530 24-Well, Nunc, Thermo Fisher Scientific #150787 48-Well, Nunc, Thermo Fisher Scientific #269620 96-Well, Nunc, Thermo Fisher Scientific
Zellsiebe	#542040 40 µm, Greiner Bio-One #542070 70 µm, Greiner Bio-One #542000 100 µm, Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen	#188271 15 ml, Greiner Bio-One #227261 50 ml, Greiner Bio-One

2.1.4. Chemikalien, Reagenzien

Aceton	#40143 Zentrallager Theoretikum
Agarose	#BIO-41025, Bioline
Albumin Fraktion V (BSA)	#8076.2, Carl Roth
α-MEM Medium	# 22561, Gibco, Invitrogen
Aqua ad iniectabilia	#23114.01, Braun
Biotin-11-dUTP	#R0081, Thermo Fisher Scientific
Cell dissociation buffer	#12151-014, Gibco, Invitrogen
DAPI	#6335.1, Carl Roth
Detektionsreagenz ECL	#32106, ECL Western-Blotting-Substrat, Thermo Fisher Scientific
Dimethylsulfoxid (DMSO)	#D2650, Sigma-Aldrich
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	#A3567, 0500, Applichem
DMEM Medium	#41966052, Gibco, Invitrogen

DNA Exitus Plus	#A7089, Applichem
DNA-Marker 100 bp	#T835., Carl Roth
DNase	#79256, Qiagen
dNTP Mix	#BIO-39044, Bionline
DPBS	#14190, Gibco, Invitrogen
Dynabeads Schaf anti-Ratte IgG	#110.35, Invitrogen
Dynabeads Protein G	#10004D, Invitrogen
EDTA	#E5134, Sigma-Aldrich
Enhancer (PCR)	#01-1030, Peqlab
Essigsäure	#10296, Grüssing GmbH
Ethanol	#32205, Riedel-de Haën, Zentrallager
FCS (Fetal Calf Serum)	#P30-3302, Pan Biotech
Fibronektinstandard (ELISA)	#IFMBN, Dunn
Formaldehyd	#31245, Riedel-de Haën, Zentrallager
Fixable Viability Stain 450	#562247, BD Biosciences
Isofluran	#FDG9623, Baxter
Kochsalzlösung (0,9% NaCl)	#190/12606084, B. Braun
Kollagenase NB4	#17454, Nordmark
Luziferin	#P1043, Promega
Anti-Rat and Anti-Hamster Ig κ / Negative Control Compensation	
Particles Set	#552845, BD Biosciences
β-Mercaptoethanol	#444203-250ML, Merck
Methanol	#32213-2.5L, Sigma-Aldrich
2-Methylbutan	#A1263,1000, Applichem
MgCl ₂ (PCR)	#01-1030, Peqlab
Micro BCA Protein Assay	#23235, Thermo Scientific
Milchpulver	#T145.1, Carl Roth
Mowiol 4-88 Reagent	#475904, Merck
Natriumchlorid	#64026, Riedel-de Haën, Zentrallager
Natrium Deoxycholat	#3484.1, Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat	#106346, Merck
Natriumfluorid	#S6776, Sigma-Aldrich

Natriumhydrogencarbonat	#106323, Merck
Natriumhydroxid	#30620, Sigma-Aldrich
Natriumnitrat	#237213, Sigma-Aldrich
Natriumorthovanadat	#S6508-50G, Sigma-Aldrich
Natriumthiosulfat	#S7026, Sigma-Aldrich
PageRuler Plus vorgefärbte	
Proteinleiter (10 – 250 kDa)	#26619, Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd	#16005, Riedel-de Haën, Zentrallager
Penicillin/Streptomycin	#15140-122, Gibco, Invitrogen
Phenylmethansulfonylfluorid	#A0999,0005, AppliChem
2-Propanol	#69595, Riedel-de Haën, Zentrallager
Plasmocin	#ant-mpt-1, Invivogen
Poly(I:C)	#IAX-200-021-3005, Adipogen
Propidiumiodid	#421301, Biolegend
Proteinase K	#3115852001, Roche
RedSafe	#21141, Hiss Diagnostics
RevertAid Reverse Transcriptase	
zusammen mit 5x Reaktionspuffer	#EP0442, Fermentas
RiboLock RNase Inhibitor	#EO0381, Fermentas
RNAzol RT	#R4533, Sigma-Aldrich
Salzsäure	#Z-23-88, Zentrallager Theoretikum
Schwefelsäure	#13073, Grüssing GmbH
SensiMix™ Capillary Kit	#QT405-01, Bioline
Tag-it Violet Proliferation and	
Cell Tracking Dye	#425101, Biolegend
Taq DNA-Polymerase	#01-1030, Peqlab
Taq DNA-Polymerase	MPI für Biochemie Martinsried
Tissue-Tek	#4583, O.C.T. Compound, Sakura, VWR
TMB	#613544, Merck
Tris	#4855.2, Carl Roth
Tris-HCl	#9090.3, Carl Roth
Triton X-100	#108603, Merck
Trypanblaue Lösung 0,4%	#15250061, Gibco, Invitrogen

Trypsin-EDTA	#25300, Gibco, Invitrogen
Tween 20	#9127.1, Carl Roth
Zombie Aqua Fixable Viability Kit	#423102, Biolegend
Zombie Violet Fixable Viability Kit	#423114, Biolegend

2.1.5. Puffer und Lösungen

ACK-Lysepuffer

- 4,2 g Ammoniumchlorid
- 0,5 g Kaliumhydrogencarbonat
- 100 µl 0,5 M EDTA (pH 7,5)
- auf 500 ml H₂O auffüllen
- Sterilfiltriert bei 4 °C lagern

Agarose-Gel

- 1,5 % bzw. 3 % Agarose einwiegen
- 1 x TAE-Puffer auffüllen
- in der Mikrowelle unter Kochen lösen
- abkühlen lassen und bei etwa 60°C 2 µl RedSafe zugeben und mischen
- in Gelschlitten gießen und aushärten lassen

Annexin V Bindepuffer

- 10mM HEPES pH 7,4
- 140mM NaCl
- 2,5mM CaCl
- Auf 50 ml mit H₂O auffüllen

Beschichtungspuffer (ELISA)

- 15 mM Na₂CO₃
- 18 mM NaHCO₃
- auf 500 ml mit H₂O auffüllen
- pH auf 9,6 einstellen

Blockierlösung (Western Blot)

- 2,5 g BSA
- In 50 ml PBS-T lösen

Blockierpuffer (ELISA)

- 3 % BSA
- in PBS-T lösen

Cytoplasmic Extraction Buffer (Fraktionierung)

- 10 mM HEPES
- 1,5 mM MgCl₂
- 10 mM KCl
- 0,5 mM DTT (Dithiothreitol) (Optional)
- 1 mM EDTA
- 0,05% NP40 (Nonidet-40) (Wird bei der Wasch-Lösung weggelassen)
- 1 mM PMSF
- 5 mM NaF
- 1 mM Natrium-orthovanadat
- pH = 7,9

DEPC-H₂O

- 1ml Diethylcarbonat in 1000 ml H₂O geben
- Inkubation für 2h bei RT zur Inaktivierung von RNasen
- Autoklavieren zur Inaktivierung von DEPC-Resten

DNA-Lysepuffer:

- 100 mM Tris (pH 8,5)
- 200 mM NaCl
- 5 mM EDTA (pH 8,0)
- 0,2 % SDS
- in 10 ml H₂O sterilfiltrieren

FACS-Puffer

- 2,5 % FCS in DPBS

Isolationspuffer (Dynabeads Schaf-Anti-Ratte-IgG)

- 0,1% BSA
- 2 mM EDTA
- pH = 7,4
- in DPBS

Laufpuffer 10X (Western Blot)

- 30,25 g Tris
- 144 g Glycin
- 10 g SDS
- auf 1 l mit H₂O auffüllen

Luziferin-Mix (Zytotoxizitätsassay)

- 150µg/ml in DPBS

Nuclear Extraction Buffer (Fraktionierung)

- 20 mM TRIS
- 1,5 mM MgCl₂
- 400 mM NaCl
- 0,5 mM DTT (Dithiothreitol) (Optional)
- 0,2 mM EDTA
- 25% Glycerol
- 1 mM PMSF
- 5 mM NaF
- 1 mM Natrium-orthovanadat
- pH = 7,9

Paraformaldehyd-Lösung 4%

- 22,5 ml H₂O_{dd}
- 5 µl 10 M NaOH auf 60°C erhitzen
- 1g Paraformaldehyd zugeben
- 2,5 ml 10X PBS hinzufügen und auf Eis abkühlen lassen
- pH-Wert auf 7,4 einstellen
- Aliquots bei 4°C oder bei langfristiger Lagerung bei -20°C aufbewahren

PBS (10X)

- 400 g NaCl
- 58 g Na₂HPO₄
- 10 g KH₂PO₄
- 10 g KCl
- auf 5 l mit H₂O_{dd} auffüllen, pH-Wert auf 7,0 einstellen

PBS (1X)

- 100 ml PBS (10X)
- 900 ml H₂O_{dd} hinzugeben

PBS-T

- 0,05 % Tween-20
- In 1X PBS lösen

Probenpuffer 4X (DNA)

- 50 % Glycerin
- In 4X TBE
- Spatelspitze Bromphenol hinzugeben

5X SDS-Ladepuffer (Protein)

- 0,15 ml H₂O_{dd}
- 1,25 ml 0,5 M Tris (pH 6,8)
- 1 ml Glycerol
- 2 ml 10 % SDS
- 0,1 ml 1% Bromphenolblau
- 0,5 ml β-Mercaptoethanol (nur bei reduzierenden Bedingungen)

Protein-Lysepuffer

- 20 mM Tris-HCl
- 150 mM NaCl
- 10 % Glycerin
- 0,5 % Triton X-100
- 2 mM EDTA
- 10 mM NaF
- 1 mM PMSF
- 1 mM Na₃VO₄

Proteinase K-Lösung

- 20 mg/ml Proteinase K in H₂O_{dd} lösen

Stopplösung (ELISA)

- 0,5 M H₂SO₄

Stripping-Puffer (Western Blot)

- 15g Glycin
- 1g SDS
- 10 ml Tween-20
- auf 1 l mit H₂O_{dd} auffüllen
- pH-Wert auf 2,2 einstellen

TAE-Puffer (50X)

- 242 g Tris
- 57,1 ml reine Essigsäure
- 100 ml 0,5 M EDTA
- auf 1 l mit H₂O auffüllen
- pH-Wert auf 8,3 einstellen

TBE-Puffer (10X)

- 108 g Tris
- 55,6 g Borsäure
- 4,65 g EDTA
- mit 1 l H₂O auffüllen

Transferpuffer 10X (Western Blot)

- 29,2 g Glycin
- 58 g Tris
- 37,6 ml 10 % SDS Lösung
- auf 1 l mit H₂O auffüllen

Verdaumedium (Tumor)

- 1 mg/ml Kollagenase NB4 pro Tumor
- 0,5 µl/ml DNase I pro Tumor
- In 1 ml DMEM pro Tumor lösen

Verdünnungspuffer (ELISA)

- 1,5 % BSA
- gelöst in PBS-T

2.1.6. Primärantikörper

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper.

Antikörper	Spezies	Klon	Produktnummer/ Hersteller	Anwendung
AKT	Kaninchen	Polyklonal	#9272 Cell Signaling	Western Blot
CD45-purified	Ratte	Monoklonal (30-F11)	#103102 Biolegend	MSC- Isolation
EDA-Fibronectin	Maus	Monoklonal (FN3E2)	#ab131065 Abcam	ELISA
EDB-Fibronectin	Maus	Monoklonal (L19; Radretumab)	#MBS156298 MyBiosource	ELISA
ERK 1/2	Kaninchen	Polyklonal	#9102 Cell Signaling	Western Blot
FAK	Kaninchen	Polyklonal	#3285 Cell Signaling	Western Blot
Fibronectin	Kaninchen	Polyklonal	#F3648 Sigma Aldrich	ELISA
GAPDH	Kaninchen	Polyklonal	#G9545 Sigma Aldrich	Western Blot
Histon H3	Kaninchen	Polyklonal	#9715 Cell Signaling	Western Blot
IκBα	Kaninchen	Monoklonal	#4812 Cell Signaling	Western Blot
JNK/SAPK	Kaninchen	Polyklonal	#9252 Cell Signaling	Western Blot
NFκB (p65)	Kaninchen	Monoklonal	#4764 Cell Signaling	Western Blot
phos- IκBα (Ser32)	Kaninchen	Monoklonal	#2859 Cell Signaling	Western Blot
phos-AKT (Ser473)	Kaninchen	Polyklonal	#9271 Cell Signaling	Western Blot
phos-ERK 1/2 (Thr 202/Tyr 185)	Kaninchen	Polyklonal	#4376 Cell Signaling	Western Blot
phos-FAK (Tyr 397)	Kaninchen	Monoklonal	#8556 Cell Signaling	Western Blot
phos-JNK (Thr 183/Tyr 185)	Kaninchen	Polyklonal	#9251 Cell Signaling	Western Blot
phos-NFκB (Ser536)	Kaninchen	Monoklonal	#3033 Cell Signaling	Western Blot

2.1.7. Sekundärantikörper

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper.

Antikörper	Konjugat	Produktnummer/ Hersteller	Anwendung
Anti-Fibronectin	HRP	#IRBAMSFBNGFHRP1MG Loxo	ELISA
Ziege anti-Kaninchen	HRP	#111-035-045 Dianova	Western Blot

2.1.8. Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Tabelle 4: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Antikörper	Konjugat	Produktnummer/ Hersteller	Verdünnung
β2 mikroglobulin	PE	#ab49424 Abcam	1:1600
CD105	PerCP-Cy5.5	#120415 Biolegend	1:100
	APC-Cy7	#120431 Biolegend	1:100
CD11b	Alexa Fluor 700	#101222 Biolegend	1:1600
	BV605	#101257 Biolegend	1:400
	PerCP-Cy5.5	#101228 Biolegend	1:200
CD140a	APC	#135908 Biolegend	1:50
CD140b	Biotin	#136010 Biolegend	1:100
CD146	APC	#134712 Biolegend	1:100
CD31	PE	#102508 Biolegend	1:100
	BV510	#563089 BD Biosciences	1:100
CD3ε	PE	#100308 Biolegend	1:400
CD4	PerCP-Cy5.5	#100540 Biolegend	1:400
CD44	APC-Cy7	#103028 Biolegend	1:100
CD45	Alexa Fluor 647	#103124 Biolegend	1:400
	APC-Cy7	#103116 Biolegend	1:400
	Pacific Blue	#103126 Biolegend	1:400
CD8a	Alexa Fluor 647	#100724 Biolegend	1:800
CD90	BV605	#105343 Biolegend	1:100
F4/80	PE	#123110 Biolegend	1:400
	FITC	#123017 Biolegend	1:400
FAP	Alexa Fluor 488	#FAB9727G-100UG R&D Systems	1:50
Ly6C	Alexa Fluor 647	#128010 Biolegend	1:400
	BV711	#128037 Biolegend	1:400
	PerCP-Cy5.5	#128012 Biolegend	1:400
Ly6G	Alexa Fluor 647	#127610 Biolegend	1:200
	PE-Cy7	#127618 Biolegend	1:100
Podoplanin	PerCP-Cy5.5	#127421 Biolegend	1:100
Sca1	FITC	#122506 Biolegend	1:400
Streptavidin	Pacific Orange	#S32365 Invitrogen	1:400
Ter119	Pacific Blue	#116232 Biolegend	1:200
Integrin α4	PE	#103706 Biolegend	1:100
Integrin β1	APC	#102215 Biolegend	1:100
TLR2	PE	#148603 Biolegend	1:100
TLR4	PE	#145403 Biolegend	1:100
TLR5	PE	#148107 Biolegend	1:100

2.1.9. Nicht-Antikörper-basierte Fluoreszenzreagenzien

Tabelle 5: Sonstige verwendete Fluoreszenzreagenzien für die Durchflusszytometrie.

Reagenz	Konjugat	Produktnummer/ Hersteller	Verdünnung/ Konzentration
Annexin V	Alexa Fluor 647	#640912 Biolegend	1:50
CFSE Cell Division Tracker	-	#423801 Biolegend	5µM
Propidium Iodid (PI)	-	#421301 Biolegend	1:300
Tag-it Violet	-	#425101, Biolegend	1:1000
Zombie Aqua Fixable Viability Dye	-	#423102 Biolegend	1:200
Zombie Violet Fixable Viability Dye	-	#423114 Biolegend	1:200

2.1.10. Primer und Sonden

2.1.10.1. Primer für die Genotypisierung

Tabelle 6: Primer für die Genotypisierung

Gen	5'-Primer	3'-Primer
Collagen-α1(I)-Cre Promotor	CAGCTCTCCATCAAGATGGT	ATGTTTAGCTGGCCCAAATG
eGFP	TCGTGACCACCCTGACCTA	TCGTCCATGCCGAGAGTGAT
Fibronektin	TGTCCCATATAAGCCTCTGCT	ACCCCTGAGCATCTTGAGTG
Integrin β1	AGGTGCCCTTCCCTCTAGA	GTGAAGTAGGTGAAAGGTAAC
Mx1-Cre Promotor	GCAAGCTCAGGCTTTTTAC	ATGTTTAGCTGGCCCAAATG
Osx-Cre Promotor	CTCTTCATGAGGAGGACCCT	GCCAGGCAGGTGCCTGGACAT
Vav-iCre Promotor	AGATGCCAGGACATCATCAGGAACCT	ATCAGCCACACCAGACACAGAGATC
Tomato Wildtyp	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC
Tomato Mutant	GGCATTAAAGCAGCGTATCC	CTGTTCTGTACGGCATGG

2.1.10.2. Primer und Sonden für die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Tabelle 7: Primer und Sonden für die qPCR

Gen	5'-Primer	3'-Primer	Sonde
CXCL1	CAGGACTCAGAGCCTCTAACCA	GTGGCTGGGATCATGGTG	#109
CXCL2	ATGGCATCTTATTTAATGTTTA	CTCAGAAATAGCAATATAACTC	CTCTAACCTCAAGTTA AGAATAGGCT
HPRT	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	#95
IFNβ	GCAAGAGGAAAAGATTGAC	TCTGGTAAGTCTTCAATG	ATCTCTGCTCGGACCAC CATC
IL1β	TTGACGGACCCCAAAAGAT	TTGTTGATGTGCTGCTGTGA	#42
IL6	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA	#6
TNFα	CTGTAGCCACGTCGTAGC	TTGAGATCCATGCCGTTG	#102

2.2. Methoden

2.2.1. Tierexperimentelle Methoden

2.2.1.1. Versuchstiere und Haltung

Für diese Arbeit wurden Versuchstiere der Art *Mus musculus*, der Hausmaus, verwendet. Die Tiere wurden in der Tierhaltung der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) der Universität Heidelberg unter standardisierten Bedingungen und spezifiziert pathogenfrei (SPF) sowohl gezüchtet, als auch gehalten. Für die Tumordinjektion war die Betäubung mittels Isofluran erforderlich. Hierzu wurden die Tiere direkt im Klinisch Experimentellen Bereich (KEB) oder dem Maushotel der IBF in einer Inhalationskammer (1-2%) narkotisiert, woraufhin die Injektion in die Flanke erfolgte. Daraufhin erfolgte die Haltung der Tiere im KEB, beziehungsweise dem Maushotel der IBF. Die entsprechenden Versuche wurden vom Regierungspräsidium Karlsruhe unter den Aktenzeichen G-21/18 (Kurztitel: Einfluss von MSCs auf das Tumorwachstum), G-249/18 (Kurztitel: Einfluss der Matrixbildung von MSCs auf Melanome), G-242/19 (Kurztitel: Einfluss des Fehlens von Integrin $\beta 1$ in MSCs), G-5/21 (Kurztitel: CS1 und Integrin $\beta 1$ -Ausschaltung in MSCs), G-102/21 (Kurztitel: MSC Subpopulationen und Melanom), G-216/21 (Kurztitel: MSCs und Granulozyten im Melanom), G-219/21 (Kurztitel: Fibronectin in MSCs und Melanomwachstum), G-222/21 (Kurztitel: Integrin beta1 in MSCs und Melanomwachstum), G-230/21 (Kurztitel: Einfluss von MSCs auf Tumorwachstum), G-277/21 (Kurztitel: MSCs und Granulozyten im Melanom in C57BL/6), G-280/21 (Kurztitel: Einfluss von MSCs auf Brustkrebs), G-283/21 (Kurztitel: Fibronectin einwandernder MSCs des Melanoms) und G-284/21 (Kurztitel: Fibronectinrezeptoren im Melanom) genehmigt.

2.2.1.2. Mausstämme

Der verwendete Mausstamm geht auf den CD1-Stamm (englisch für „Caesarean Derived 1“) von Charles River zurück. Bei diesen Mäusen handelt es sich zum einen um heterozygote immunkompetente Mäuse und zum anderen um homozygote, immundefiziente, nackte Mäuse. Letztere werden auch als athymische oder thymusaplastische Mäuse bezeichnet.

Diesen haarlosen Tieren fehlt der Thymus, wodurch sie nicht in der Lage sind, reife T-Lymphozyten zu bilden, die zu einer wildtypischen, effizienten Immunreaktion führen würden, wodurch diese Tiere als immundefizient bezeichnet werden (Pelleitier und Montplaisir, 1975). Da athymische Weibchen zusätzlich unterentwickelte Brustdrüsen aufweisen und somit keine Jungtiere aufziehen können, ist es um homozygote Nachkommen zu erhalten notwendig heterozygote, behaarte Weibchen, mit homozygoten nackten Männchen zu verpaaren. Diese immundefizienten Nacktmäuse sind deshalb bestens dazu geeignet, auch humane Tumorarten zu erforschen, da diese nicht von den Versuchstieren abgestoßen werden. Mit dieser Linie wurden wildtypische Versuchstiere, als auch konditionelle-Knockout-Tiere für Fibronectin und das Integrin $\beta 1$ erstellt.

Zusätzlich wurden Tiere der C57BL/6-Linie verwendet, die eine der am häufigsten verwendeten Mauslinien der Forschung. Versuche wurden mit wildtypischen Tieren dieser Linie durchgeführt.

2.2.1.3. Konditionelle Knockout-Tiere

Da sich eine Ausschaltung von Fibronectin und dem Integrin $\beta 1$ als embryonal letal herausstellt, wurden konditionelle Knockout-Mäuse mit Hilfe des Cre/loxP Systems erstellt. Hierbei werden beide Allele des Zielgens, diesem Falle Fibronectin und das Integrin $\beta 1$, ist von loxP-Stellen flankiert (floxed, fl/fl), welche durch die ebenfalls exprimierte Cre-Rekombinase erkannt werden. Das Enzym Cre-Rekombinase bindet daraufhin an die entsprechenden loxP-Stellen, wodurch der dazwischenliegende DNA-Bereich herausgeschnitten wird und die DNA-Enden verbunden werden. Durch die Expression der Cre-Rekombinase in Verbindung mit gewebsspezifischen Promotoren ist es möglich, die Deletion eines Zielgens nur in einem bestimmten, spezifischen Gewebe zu gewährleisten.

2.2.1.3.1. Der Mx1-Cre-Promotor

Der Mx1-Promotor, oder auch Mx-Promotor, wird natürlicherweise durch die Infektionen und die damit verbundene Anwesenheit von Interferonen aktiviert, wobei es experimentell möglich ist, synthetisches Poly(I:C) (englisch für „polyinosinic-polycytidylic acid“) zu injizieren, was

ebenfalls die Ausschüttung von Interferonen induziert (Kühn et al., 1995). Der Mx1-Promotor wurde durch drei Injektionen Poly(I:C) in 0,9% NaCl aktiviert. Die Injektion von Poly(I:C) wurde intraperitoneal (i.p.) im Abstand von 2 Tagen durchgeführt. Injiziert wurden jeweils 20µg/g Körpergewicht bzw. 10µl/g. Der Promotor ist beispielsweise in der Niere, der Leber oder dem Herzen aktiv und wird in hämatopoetischen Zellen, sowie in MSCs, osteoblastischen Zellen und in einigen adipogenen Zellen exprimiert (Kühn et al., 1995; Park et al., 2012). Durch die Aktivierung des Mx-Promotors kam es zur Ausschaltung von Fibronectin bzw. des Integrins $\beta 1$ in großen Teilen Knochenmark.

2.2.1.3.2. Der Osx-Cre-Promotor

Der Osx-Promotor ist in Präosteoblasten aktiv, die einen Teil des Stromas des Knochenmarks darstellen. Das Osx-Gen ist in Präosteoblasten essentiell, um Schlüsselgene zu aktivieren, um die weitere Differenzierung zu Osteoblasten zu gewährleisten (Nakashima et al., 2002; Rodda und McMahon, 2006). Zusätzlich wird dieser Promotor außerdem in Fibroblasten, wie tumorassoziierten Fibroblasten, oder auch in hämatopoetischen Zellen exprimiert (Ricci et al., 2020). Mit Hilfe dieses Promotors war es möglich, Fibronectin und das Integrin $\beta 1$ gezielt in Präosteoblasten des Knochenmarks auszuschalten.

2.2.1.3.3. Der Vav-iCre-Promotor

Der ursprüngliche Vav-Cre-Promotor ist nicht nur in den meisten hämatopoetischen Zellen, sondern auch in den Eierstöcken und Endothelzellen aktiv, die ebenfalls einen Anteil des Stromas des Knochenmarks ausmachen (Georgiades et al., 2002). Der in dieser Studie verwendete Vav-Promotor verwendet jedoch eine verbesserte Cre-Rekombinase, iCre (englisch für „improved Cre“) genannt, deren Codons so verändert wurden, dass eine epigenetische Inaktivierung unwahrscheinlicher wird (Shimshek et al., 2002). Der so entstandene Vav-iCre-Promotor ist damit ebenfalls in hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen aktiv und zeigt ebenfalls eine Expression in den Testes (de Boer et al., 2003; Joseph et al., 2013; Ueda et al., 2019). Somit war es durch diesen Promotor möglich, Fibronectin und Integrin $\beta 1$ gezielt in endothelialen Zellen des Knochenmarkstromas auszuschalten.

2.2.1.3.4. Der Col- α 1(I)-Cre-Promotor

Beim Col- α 1(I)-Promotor handelt es sich um ein 2,3 Kilobasen-großes Genfragment, welches die gezielte Ausschaltung von Genen in Osteoblasten ermöglicht (Dacquin et al., 2002). Diese sind im Knochen und nicht im Knochenmarksstroma vorhanden und dienen deshalb als Kontrolle für die anderen verwendeten Promotoren.

2.2.1.4. Das B16-Melanom-Modell

Die Mäuse wurden in einer Inhalationskammer mit Isofluran (1-2%) narkotisiert. Im Falle von C57BL/6-Tieren wurden 10^6 B16-Zellen abhängig vom Versuchsaufbau mit mit 100.000, 1.000.000 oder 2.000.000 MSCs in einem Gesamtvolumen von 100 μ l DPBS vermischt und in die rechte Flanke injiziert. Das Tumorwachstum betrug daraufhin 7 Tage.

Bei der Nutzung von immunkompetenten CD1nu-Tieren wurden 10^6 B16-Zellen mit mit 100.000 MSCs vermischt und ebenfalls in die rechts Flanke injiziert. Das Wachstum betrug in diesem Modell 14 Tage.

Neben den erwähnten immunkompetenten Mauslinien wurden auch athymische CD1nu-Tiere genutzt, welche keine reifen T-Zellen bilden können. Hier wurden ebenfalls 10^6 B16-Zellen mit mit 100.000 MSCs in die rechte Flanke der Versuchstiere injiziert, woraufhin der der Versuch, wie bei C57BL/6-Tieren, nach 7 Tagen endete.

In allen Tumormodellen wurden die Tumore wurden am Versuchende gewogen und ihr Volumen mittels Kaliper vermessen. Daraufhin wurden sie für eine Stunde in Verdauung mit Kollagenase (1 mg/ml) und DNase (0,5 μ l/ml) in DMEM-Medium bei 37°C verdaut. Als nächstes wurden unverdaute, größere Tumorstücke durch ein 100 μ m Zellsieb entfernt. Die so gewonnenen Tumorzellen waren nun für weitere Versuche, wie durchflusszytometrische Analysen, verwendbar.

2.2.1.5. Das orthotope EO771-Brustkrebsmodell

Die Mäuse wurden in einer Inhalationskammer mit Isofluran (1-2%) narkotisiert, woraufhin die Injektion von 10^6 EO771-Zellen, vermischt mit 100.000 MSCs, in einem Gesamtvolumen von 50 μ l DPBS in die linke abdominale Brustdrüse von Weibchen der C57BL/6-Linie erfolgte. Die Tumore wurden nach 14 Tagen entnommen.

Die Tumore wurden daraufhin gewogen und ihr Volumen mittels Kaliper vermessen. Daraufhin wurden sie für eine Stunde in Verdauungslösung mit Kollagenase und DNase in DMEM-Medium bei 37°C verdaut. Im Anschluss wurden unverdaute, größere Tumorstücke durch ein 100 μ m Zellsieb entfernt. Die so gewonnenen Tumorzellen waren nun für durchflusszytometrische Analysen verwendbar.

2.2.1.6. Die Depletion Ly6G-exprimierender Zellen im B16-Melanom-Modell

Zwei Tage vor Versuchsbeginn wurden entweder Isotyp-Kontroll-Antikörper oder anti-Ly6G-Antikörper (je 50 μ g in 50 μ l) intraperitoneal in C57BL/6-Mäuse injiziert. Zusätzlich wurden jeden zweiten Tag, startend an Tag eins, zwei Stunden vor der Injektion des anti-Ly6G-Antikörpers ein anti-Ratte κ -Leichte-Kette-Antikörper (50 μ g in 50 μ l) intraperitoneal injiziert, um die Effektivität der Depletion zu verbessern (Boivin et al., 2020). Am Tag der Tumordinjektion wurden die Tiere in einer Inhalationskammer mit Isofluran (1-2%) narkotisiert und 10^6 B16-Zellen zusammen mit 100.000 MSCs in einem Gesamtvolumen von 100 μ l DPBS in die rechte Flanke injiziert. Daraufhin betrug das Tumorwachstum 7 Tage. Am Tag des Versuchsendes wurden die Tumore gewogen und ihr Volumen mittels Kaliper vermessen. Zusätzlich wurde Blut aus dem Herzen entnommen um die Depletion der Ly6G-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch nachzuweisen. Die Tumore wurden anschließend für eine Stunde in Verdauungslösung mit Kollagenase und DNase in DMEM-Medium bei 37°C verdaut. Daraufhin wurden unverdaute, größere Tumorstücke durch ein 100 μ m Zellsieb entfernt. Die so gewonnenen Tumorzellen waren nun für durchflusszytometrische Analysen verwendbar.

2.2.1.7. Intrazelluläre Färbung von Ly6G zur Bestätigung der Depletion

Um die Rolle von Ly6G-exprimierenden Zellen beim Tumorwachstum zu ergründen, wurden diese mittels intraperitonealer Injektion von Antikörpern depletiert. Um den Erfolg der Depletion zu bestätigen, wurde am Versuchsende das Blut der Versuchstiere aus dem Herzen entnommen und in mit EDTA beschichtete Reaktionsgefäße gegeben, um die Blutgerinnung zu unterbinden. Anschließend wurden zunächst die Erythrozyten mittels zweimaliger ACK-Lyse entfernt. Die Immunzellen wurden in DPBS gewaschen, für 10 Minuten in 1% PFA bei 4°C fixiert und dreimal PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mittels der Zugabe von 0,1% Triton-X-100 für 10 Minuten bei 4°C permeabilisiert und erneut dreimal in DPBS gewaschen. Dieser Vorgang diente dazu, sowohl extra- als auch intrazellulär vorliegende Ly6G-Moleküle für die durchflusszytometrische Färbung zugänglich zu machen, um auszuschließen, dass die jeweiligen Zellen durch die während des Versuchszeitraums injizierten Antikörper maskiert und somit nicht detektierbar wären (Boivin et al., 2020). Anschließend wurden die übrigen Blutzellen mit Antikörpern gegen Ly6G gefärbt, erneut gewaschen und die vorliegenden Ly6G-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.1.8. Probenentnahme nach der Tötung der Versuchstiere

Nach Ablauf des Versuchszeitraums erfolgte die Narkotisierung aller Tiere mit Ketamin/Xylazin (Ketamin 120 mg/kg/Xylazin 16 mg/kg), welches in 0,9% Kochsalzlösung gelöst wurde, woraufhin 10µl/g Körpergewicht der Mixtur i.p. verabreicht wurden. Unter tiefer Narkose wird die Bauchwand -Haut und Muskel- mit einer Schere getrennt und die Vena Cava durchtrennt. Letztendlich wird durch einen Schnitt in das Herz wird der Tod sichergestellt. Die noch vitalen Tumore wurden daraufhin zügig entnommen.

2.1.2. Zellbiologische Methoden

2.1.2.1. Isolation von murinen Knochenmarkszellen

Zur Isolation von murinen Knochenmarkszellen wurden die Tiere zunächst mittels zervikaler Dislokation getötet und die Femura und Tibia abgetrennt. Nach der Entfernung des Haut- und

Muskelgewebes wurden die Knochen mit 70%igem Ethanol abgerieben und in eine sterile Petrischale gegeben. Die darauffolgenden Schritte wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Nach dem Abschneiden der Knochenenden der Femura und Tibia, wurden die Knochen mit einer mit DPBS gefüllten Spritze und einer 27G-Kanüle in ein 15ml Zentrifugationsröhrchen auf Eis ausgespült. Um ungewollte Erythrozyten zu entfernen, wurde das Knochenmark für 5 Minuten bei 500xg zentrifugiert, das DPBS abgenommen und die abzentrifugierten Zellen in ACK-Lysepuffer aufgenommen. Nach der Zugabe des gleichen Volumens DPBS wurden die Zellen erneut zentrifugiert und daraufhin in DPBS aufgenommen, woraufhin die Zellen für den weiteren Versuchsverlauf verwendet werden konnten.

2.1.2.2. Isolation von mesenchymalen Stromazellen

Die Isolation von mesenchymalen Stromazellen, erfolgte mittels der Verwendung von Protein G Kügelchen (Dynabeads, Invitrogen) aus dem Knochenmark. Hierbei handelt es sich um magnetische Kügelchen mit einer Größe von 2,8 μm , an die beinahe alle Säugetier-Immunglobuline mit der konstanten Fc-Region binden, wodurch die Fab-Abschnitt, also die antigenbindende-Region, des Antikörpers frei liegt. Für 1×10^7 Zellen wurden 50 μl der Kügelchen verwendet. Diese magnetischen Kügelchen wurden zunächst in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit mindestens demselben Volumen an DPBS gewaschen. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin an einem Magneten angebracht, was die Abnahme der Flüssigkeit ohne die Kügelchen ermöglichte. Pro 50 μl „Dynabeads Protein G“ wurden daraufhin 250 μl DPBS, sowie 25 μl an unkonjugierten anti-Maus CD45-Antikörpern (#103102, Biolegend) hinzugegeben. Die Antikörper-Kügelchen-Mixtur wurde daraufhin für 30 Minuten bei RT geschüttelt (750 rpm), wodurch die Antikörper an die Kügelchen binden konnten. Nach Ablauf von 30 Minuten wurden die Kügelchen 3 Mal mit DPBS gewaschen. Im weiteren Verlauf wurden erneut 250 μl DPBS pro 50 μl magnetischer Kügelchen, sowie murines Knochenmark (aufgenommen in 250 μl pro 1×10^7 Zellen), hinzugegeben. Die Zellen wurden auf diese Art erneut für 30 Minuten bei RT geschüttelt (500 rpm). Während dieser Zeit werden hämatopoietischen Zellen aus den Knochenmark von den Antikörpern an den Kügelchen gebunden, da diese das CD45-Antigen exprimieren. Bei den übrigen Zellen handelt es sich somit um die im Knochenmark enthaltenen mesenchymalen Stromazellen. Diese Art der

Zellgewinnung nennt sich negative Depletion. Nach dem Ablauf von 30 Minuten wurde das Reaktionsgefäß erneut am Magneten angebracht und die erwünschten Zellen abgenommen. Um auszuschließen, dass magnetische Kügelchen und vor allem die an diese gebundenen hämatopoietischen Zellen und anti-Maus CD45-Antikörper in die folgenden Versuche überführt werden, wurden dieser Schritt drei Mal wiederholt. Die somit gewonnenen MSCs konnten somit für weitere Versuche verwendet werden. Wurden die MSCs mit Tag-it Violet markiert, wurden 10^7 in 1 ml DPBS aufgenommen und 1 μ l Tag-it Violet zugegeben. Nach 20 Minuten bei 37°C wurden die Zellen zwei Mal mit 10 ml DPBS gewaschen (je 5 Min., 500xg) und für weitere Versuche verwendet.

2.1.2.3. Isolation von CD45⁺-Zellen

CD45⁺-Zellen wurden ebenfalls als Kontrollzellen aus dem Knochenmark gewonnen. Die Gewinnung dieser Zellen erfolgte mittels positiver Selektion mit magnetischen Beads (Dynabeads Schaf-Anti-Ratte-IgG, Invitrogen). Hierbei werden magnetische Beads, ähnlich wie bei der Isolation von MSCs, mit Antikörpern gegen das CD45-Antigen gekoppelt, indem beides für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Knochenmarkszellen zu den Beads gegeben und 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit werden die Zellen abgenommen, die nicht an den Beads hängen, abgenommen und die Beads, an denen die CD45⁺-Zellen gekoppelt sind, vorsichtig 3 Mal mit DPBS gewaschen. Anschließend werden die Beads mittels eines BSA- und EDTA-haltigen Isolationspuffers von den Beads getrennt, indem 1 ml des Puffers auf die Bead-Zellen-Mixtur gegeben wird und das Reaktionsgefäß im Magneten positioniert wird. Nach dem Ablauf von 3 Minuten werden die freigewordenen Zellen abgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser Schritt wird anschließend weitere vier Mal wiederholt, um so viele Zellen wie möglich zu gewinnen.

2.1.2.4. Stimulation von Zellen

MSCs, die mit Fibronectin stimuliert wurden, wurden mit Plasmafibronektin aus humanem Plasma stimuliert (0,73 μ M). Das CS1-Peptid (DELPLVTLPHPNLHGPEILDVPST) und das

Scrambled-Peptid (GDPELNITLSVPLPTHLQEPDPVLH) wurden bei der Firma BioCat mit einer Reinheit von mindestens >80% synthetisiert und die Reinheit vom Hersteller mittels HPLC bestätigt. TFA wurde dieses durch Acetatsalz ersetzt. Das Integrin $\alpha 5\beta 1$ -bindende Peptid (CRETAWAC) wurde in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt. Das Lösen der Peptide erfolgte in sterilem DPBS. Die Stimulation von MSCs mit den Scr- und CS1-Peptiden erfolgte mit einer Konzentration von 7,3 μM in sterilem α -MEM Medium ohne FCS oder Penicillin oder Streptomycin, um eine Beeinflussung der Zellen durch andere Faktoren auszuschließen. Für *in vivo* Versuche wurden die Zellen für 24h stimuliert, für andere Versuche, wie beispielsweise Western Blots, erfolgte die Stimulation für die angegebenen Zeitpunkte. Die MSCs wurden nach der Stimulation mit Peptiden stets drei Mal in DPBS gewaschen (500xg für 5 Minuten).

Bei der Inhibition verschiedener Rezeptoren auf den MSCs wurde der entsprechende Inhibitor eine Stunde vor der Stimulation auf die Zellen gegeben. Daraufhin erfolgte die Stimulation wie oben beschrieben. Bei den verwendeten Inhibitoren handelt es sich um einen Integrin $\alpha 4\beta 1/\alpha 4\beta 7$ -Inhibitor BIO5192 (Tocris, 30 μM), einen TLR2-Inhibitor TLR2-IN-C29 (Selleck Chemicals, 30 μM), die TLR4-Inhibitoren TLR4-IN-C34 (Sigma Aldrich, 30 μM) und TAK-242 (Sigma Aldrich, 30 μM) und einen TLR5-Inhibitor TH-1020 (R&D Systems, 3 μM), bei dem die CS1-Konzentration auf 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ reduziert wurde.

2.1.2.5. Kultivierung von Zellen

Wenn MSCs für Experimente mit Peptiden stimuliert werden sollten, wurden sie in α -MEM Medium ohne FCS oder Penicillin oder Streptomycin in 15 ml Zentrifugenröhrchen kultiviert. Die Kultivierung erfolgte dabei unter sterilen Bedingungen in einem Inkubator mit 95%iger Luftfeuchtigkeit und einem CO_2 -Gehalt von 5% bei 37°C. Die jeweiligen Peptide wurden nach einer Stunde zu den Zellen gegeben.

Bei der Kultivierung von MSCs verschiedener Genotypen zur Generierung von Proben für ELISAs, wurden diese in α -MEM Medium ohne FCS oder Penicillin oder Streptomycin in 12-Lochplatten ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit sterilem DPBS gewaschen, in Proteinlysepuffer aufgenommen und zusammen mit dem Medium bei -80°C. bis zur Messung eingefroren.

Für die Generierung von Proben für stimulierte MSCs für Western Blots wurden die Zellen in 6-Lochplatten ausgesät und über Nacht in α -MEM Medium ohne FCS oder Penicillin/Streptomycin kultiviert, um die Zellen auszuhungern. Anschließend wurde die Zellen mit den angegebenen Peptiden für die angegebene Zeit stimuliert und in Proteinlysepuffer aufgenommen, bzw. der Puffer für die Fraktionierung von Zytoplasma und Zellkernen hinzugegeben, worauf in in Abschnitt „2.1.2.1. Fraktionierung der Zellen in Zytoplasma und Zellkern-Fraktion“ genauer eingegangen wird.

Für die Erstellung von Proben für qPCR-Analysen wurden die Zellen in 12-Lochplatten ausgesät und in α -MEM Medium ohne FCS oder Penicillin oder Streptomycin kultiviert. Nach einer Stunde wurden die entsprechenden Peptide zugegeben und die Zellen nach 24 Stunden in RNAzol aufgenommen.

Die Kultivierung von NIH3T3, B16- und EO771-Zellen fand in DMEM Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin und Streptomycin statt. Das Medium der MDA-Zellen enthielt zusätzlich 1,6% Geneticin. Die Passage der Zellen erfolgte alle zwei bis drei Tage, wobei das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit sterilem DPBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen mit einer 0,05 % Trypsin/EDTA-Lösung für etwa drei Minuten bei 37°C im Inkubator von der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden daraufhin in Medium aufgenommen und zur Entfernung der Trypsin/EDTA-Lösung für fünf Minuten bei 500xg zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde abschließend abgesaugt, woraufhin die Zellen in einer für die Passage entsprechenden Menge Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche ausgesät wurden. Zur Kryokonservierung wurden 1×10^6 Zellen keimfrei in 1 ml DMEM Medium mit 10% FCS und 10% DMSO in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Zellen wurden dann bei einer kontinuierlichen Temperaturabnahme von 1°C pro Minute bei -80°C für 24h eingefroren, woraufhin die langfristige Lagerung bei -196°C in flüssigem Stickstoff erfolgte.

2.1.2.6. Durchflusszytometrische Analysen

Die durchflusszytometrische Analyse ermöglicht es, Zellen sowohl anhand ihrer Größe und Granularität, als auch durch ihre Expression an intra- oder extrazellulären Molekülen zu charakterisieren. Bei der Färbung von Oberflächenmolekülen kommt es zur Bindung von Fluorophor-gekoppelten Antikörpern gegen das jeweilige Molekül. Das jeweilige Fluorophor

wird daraufhin mittels eines Lasers einer bestimmten Wellenlänge angeregt, woraufhin die Emission des Fluorophors, abhängig von der Intensität des Farbstoffs und der Dichte des Oberflächenmoleküls, als einzelnes Signal von einem Filter für eine definierte Wellenlänge an Licht wahrgenommen und von der Software, Diva von BD Bioscience, dargestellt wird. Die Färbung von Zellen mit Antikörpern oder lebend/tot-Farbstoffen erfolgt dabei in 100µl FACS-Puffer mit dem entsprechenden Antikörper-Mix pro 1×10^6 Zellen für 30 Minuten bei 4°C. Nach dem Ablauf der Inkubation werden die Zellen mit mindestens dem doppelten Volumen an FACS-Puffer gewaschen und für 5 Minuten bei 500xg zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen und die Zellen in 100µl FACS-Puffer pro 1×10^6 Zellen aufgenommen. Als Negativkontrolle dienen hierbei ungefärbte Zellen. Im Falle einer Sekundärfärbung, wie es beispielsweise bei der Nutzung von Biotin-gekoppelten Antikörpern notwendig ist, wurden die beschriebenen Schritte nochmals mit den jeweiligen Sekundärantikörpern wiederholt. Im Falle von Biotin-gekoppelten Antikörpern wurden deshalb Fluorophor-gekoppeltes Streptavidin, der Bindepartner von Biotin, genutzt.

Da es bei der Emission von Fluorophoren in den meisten Fällen zu einer gewissen Überschneidung der detektierten Signale kommt, ist es notwendig, diese Überlappung zu kompensieren. Hierzu wurden Kompensationskügelchen verwendet, an die die jeweiligen Antikörper binden und detektiert werden können, wobei zu beachten ist, dass für jedes verwendete Fluorophor ein eigener Ansatz hergestellt werden muss. Zur Kompensation wird laut Herstellerangaben jeweils ein Tropfen (etwa 60 µl) von Antikörper-bindenden und nicht-Antikörper-bindenden Kügelchen verwendet. Hierzu werden 100µl FACS-Puffer hinzugefügt, sowie 20µl des jeweiligen Antikörpers in der gleichen Verdünnung, wie er auch für die Detektion von Proben verwendet wird. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei RT wurden die Beads für 5 Minuten bei 500xg zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Kügelchen in 100µl FACS-Puffer aufgenommen. Um bei der Messung eine Über-Kompensation zu vermeiden, war es notwendig, dass jedes Fluorophor in seinem jeweiligen Kanal das stärkste Signal emittierte und dass die so ermittelten Einstellungen der Laser-Stärken zur Anregung der Fluorophore ebenso für die Messung der Proben verwendet wurde. Die Evaluation der Daten geschah daraufhin mittels der FlowJo-Software von BD Biosciences.

2.1.2.7. Zellsortierung

Für die Sortierung von Zellen wurden die Zellen, wie zuvor in Abschnitt „2.1.2.6. Durchflusszytometrische Analysen“ beschrieben, gefärbt. Anschließend wurden die Zellen in einem Zentrifugengefäß in den Zellsortierer geladen und die Sortierung der gewünschten Zellpopulation basierend auf dem Signal der fluoreszierenden Antikörper gestartet. Sowohl das Ausgangsgefäß, als auch die Zentrifugenröhrchen, in die die Zellen sortiert wurden, wurden auf 4°C gekühlt. Die Zellen wurden in sterilem PBS sortiert und die Durchflussrate des Zellsortierers wurde für die größtmögliche Effizienz auf die langsamste Stufe (1.0) gestellt. Als Sortier-Einstellung des Geräts war dabei auf „Purity“ gewählt, was bedeutet, dass der Zellsortierer nur Tröpfchen annimmt, in denen ausschließlich das gewünschte Fluoreszenzsignal vorhanden ist. In anderen Modi wird ein Tropfen ausgewählt, wenn er positiv für das entsprechende Signal ist, ungeachtet anderer Fluoreszenzsignale und damit auch anderer Zelltypen.

2.1.2.8. AnnexinV-PI-Apoptose-Assay

Zu Bestimmung des apoptotischen Zustands von Zellen wurde die AnnexinV-PI-Färbung verwendet. Hierfür wurden die Zellen zunächst bei 500xg bei für 5 Minuten abzentrifugiert und anschließend mit kaltem DPBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in 50 µl Annexin-Bindepuffer mit 1 µl AnnexinV resuspendiert. AnnexinV stellt einen Marker für die frühe Apoptose dar. Nach 20 Minuten Inkubationszeit bei RT wurde die Reaktion mit 100 µl Annexin-Bindepuffer abgestoppt. Ungefähr fünf Minuten vor der Messung am Durchflusszytometer wurde 1 µl PI-Lösung zur jeweiligen Probe pipettiert und gemessen.

2.1.2.9. Ki67-Proliferations-Assay

Auch der proliferative Zustand der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie mit dem Proliferationsmarker Ki67 bestimmt. Hierfür wurden die Zellen zunächst für fünf Minuten bei 500xg zentrifugiert und mit kaltem DPBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4°C mit 1% PFA fixiert und zwei Mal mit kaltem DPBS gewaschen. Im nächsten Schritt werden die Zellen mit 0,1% Triton-X 100 für 10 Minuten bei 4°C permeabilisiert,

woraufhin erneut zwei Waschschriffe folgten. Anschließend wurden die permeabilisierten Zellen in FACS-Puffer aus DPBS und 5% FCS für 15 Minuten bei 4°C geblockt. Die Zellen wurden anschließend 30 Minuten bei 4°C mit einem PE-gekoppelten anti-Ki67 Antikörper (1:100) gefärbt, nochmals mit DPBS gewaschen (500xg, 5 Minuten) und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.1.2.10. Erstellung konditionierter Medien von stimulierten MSCs

Zur Erstellung von konditionierten Medien von stimulierten MSCs, wurden die Zellen in Medium oder FCS oder Antibiotika in 6-Lochplatten ausgesät und das CS1- oder Scrambled-Peptid nach einer Stunde hinzugegeben. Nach der Stimulation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit sterilem DPBS gewaschen, woraufhin α -MEM Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin und Streptomycin für 24 Stunden auf die Zellen gegeben wurde. Die konditionierten Medien der unterschiedlich behandelten MSCs wurden daraufhin abgenommen und frisch für weitere Versuche verwendet.

2.1.2.11. Isolation von Neutrophilen

Die Isolation von Neutrophilen per Histopaque-Dichtegradient durchgeführt. Hierfür wurde entweder Knochenmark oder Blut aus dem Herzen entnommen, wobei letzteres in ein EDTA-beschichtetes Reaktionsgefäß gegeben wurde, um die Blutgerinnung zu verhindern. Das Blut wurde daraufhin für 10 Minuten bei 300xg bei RT zentrifugiert, das Plasma abgenommen und die dünne Immunschicht auf den Erythrozyten vorsichtig abgenommen. Das Knochenmark hingegen wurde durch ein 40 μ m Zellsieb pipettiert.

Die Histopaque-Reagenzien und die Proben, aus denen Neutrophile gewonnen werden sollten, wurden auf Raumtemperatur gebracht, damit alle Bestandteile des Gradienten in der richtigen Dichte vorliegen. Für die Schichtung des Histopaque-Gradienten wurden zunächst drei ml der unteren Phase Histopaque, Histopaque-1119, in ein 15 ml Zentrifugengefäß gefüllt, ohne dass eine Luftblase im Konus verbleibt. Anschließend werden vorsichtig drei ml der oberen Phase, Histopaque-1077, am Rand des Zentrifugengefäßes herablaufend auf die erste Phase pipettiert. Dabei ist es notwendig darauf zu achten, dass eine scharfe Abgrenzung

zwischen den beiden Phasen vorhanden bleibt. Als nächstes wurden das Knochenmark, bzw. das Blut, aus denen Neutrophile gewonnen werden sollen, ebenso vorsichtig auf die Histopaque-1077-Schicht pipettiert. Das Knochenmark einer Maus wurde hierbei in 1 ml PBS aufgenommen. Im nächsten Schritt wurden die Gradienten für 30 Minuten bei 872xg ohne Bremse zentrifugiert. Nach diesem Schritt bilden sich verschiedene Phasen: In der obersten Phase befindet sich das Plasma/PBS an dessen Übergang sich alle Immunzellen, außer Neutrophile befinden. Danach folgt die Histopaque-1077-Schicht, an deren Übergang zur Histopaque-1119-Schicht sich die Neutrophilen sammeln. Darunter befindet sich noch die Histopaque-1119-Schicht und darunter sich im Konus des Zentrifugengefäßes die Erythrozyten befinden (Abbildung 5).

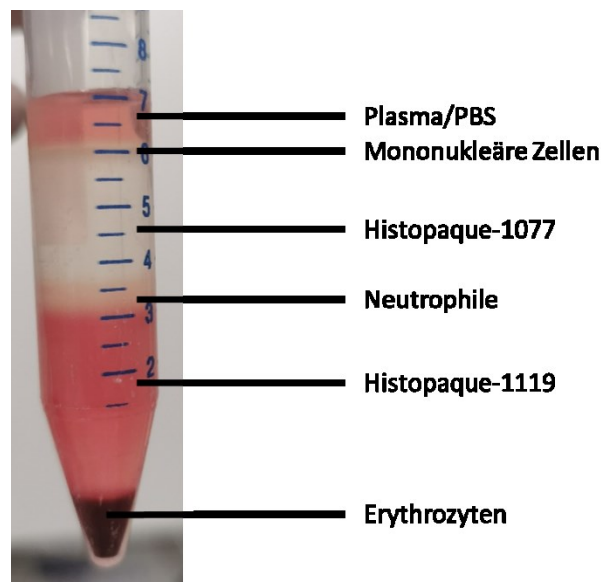


Abbildung 5: Phasenbildung nach der Zentrifugation des Histopaque-Dichtegradienten.

2.1.2.12. Transwell-Assay für die Chemotaxis von Neutrophilen

Zur Bestimmung der chemotaktischen Anziehung von Neutrophilen wurden Neutrophile aus dem Mausblut genutzt. Diese wurden nach der Isolation für 20 Minuten bei 37°C mit 5 µM CFSE in α -MEM Medium ohne FCS oder Penicillin und Streptomycin gefärbt und anschließend zwei Mal mit dem 20-fachen Volumen an DPBS gewaschen (je 300xg für 10 Minuten bei RT). In diesem Versuch wird ein „Transwell-System“ verwendet, bei dem ein Einsatz in ein Loch einer 24-Lochplatte eingesetzt wird. In der Lochplatte selbst befindet sich die jeweilige

Substanz, die auf ihre chemoattraktive Wirkung getestet werden soll, in diesem Falle 450 µl konditionierte Medien von MSCs, die mit 300 µl α-MEM Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin und Streptomycin gemischt wurden. In den Einsatz wurden 10.000 der CFSE-markierten Neutrophilen in 300µl αMEM-Medium ohne FCS oder Penicillin und Streptomycin eingefüllt. Die Einsätze enthalten 3 µm große Poren, durch die ein potentielles Chemoattraktans in die obere Kammer eindringen kann und durch die die Zellen in das Loch der Lochplatte migrieren können, wenn sie von dem Inhalt der konditionierten Medien angezogen werden (Abbildung 6).

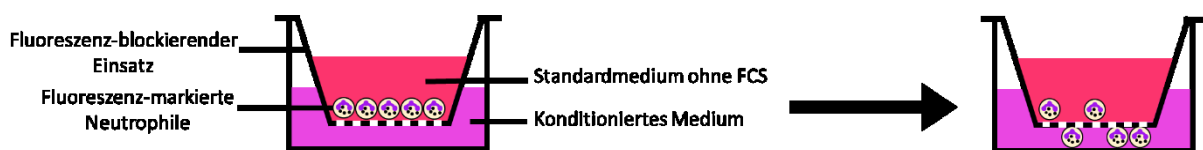


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Transwell-Assays.

Die Zellen befanden sich daraufhin für 23 Stunden im Plattenleser (Spark, Tecan), der auf 37°C beheizt wurde und in dem die Fluoreszenzintensität am Boden der Lochplatte einmal pro Stunde gemessen wurde. Der Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität wurde daraufhin prozentual auf das Signal des Lochs in der Lochplatte bezogen, bevor Neutrophile begonnen haben durch den Einsatz zu migrieren.

2.1.2.13. Biolumineszenz-basierter Zytotoxizitätsassay

Die Fähigkeit von Neutrophilen Krebszellen abzutöten ist seit einiger Zeit bekannt (Godleski et al., 1970). Um zu bestimmen, ob MSCs in der Lage sind, dieses Verhalten von Neutrophilen gegenüber Krebszellen zu modifizieren, wurde ein Zytotoxizitätsassay mit diesen Zellen durchgeführt. Hierbei wurden je 10.000 EO771- oder MDA-MB-231-Brustkrebszellen, die mit einem Luziferase-Konstrukt ausgestattet und freundlicherweise von Caren Zöller zur Verfügung gestellt wurden, in eine schwarze 96-Lochplatte ausgesät, woraufhin ihnen über Nacht erlaubt wurde, sich zu adhären. Am nächsten Tag wurden Neutrophile aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert und diese zusammen mit konditionierten Medien von MSCs auf die Tumorzellen gegeben. Die verwendeten Verhältnisse von Tumorzellen zu Neutrophilen

betrug dabei 1:2, 1:5 und 1:10. Nach 24 Stunden wurde der Überstand auf den Tumorzellen entfernt und die Löcher der Lochplatte ein Mal vorsichtig mit DPBS gewaschen, woraufhin 200 µl Luziferin (150 µg/ml) auf die Zellen gegeben wurde. Nach einer fünf-minütigen Wartezeit wurde das entstehende Biolumineszenzsignal 10 Sekunden lang mittels des IVIS Spectrum In-vivo-Bildgebungssystems gemessen.

2.1.3. Molekularbiologische Methoden

2.1.3.1. *DNA-Isolation aus Biopsien von Mäusen*

Zur DNA-Isolation aus Mäusen wurde zunächst ein etwa 1 mm³ großes Stück einer Ohr-, bzw. Schwanzbiopsie in eine Verdauungslösung, bestehend aus 92 µl DNA-Lysepuffer und 8 µl Proteinase K (20 mg/ml), gegeben. Nach der Lyse des Gewebes bei 56°C für mindestens 3 Stunden oder über Nacht in einem Wasserbad, kam es zur Inaktivierung der Proteinase K bei 95°C für 10 Minuten in einem Heizblock. Abschließend wurden nicht-lysierbare Bestandteile, wie beispielsweise Haare, durch einen Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 12.000xg pelletiert, wobei der Überstand anschließend für eine Polymerasekettenreaktion verwendet werden konnte.

2.1.3.2. *Genotypisierung konditioneller Knockout-Tiere*

0,5 µl der gewonnenen genomischen DNA wurden zu 24,5 µl eines PCR-Ansatzes gegeben. Alle Primer wurden über die Firma Biomers synthetisiert. Der PCR-Ansatz, sowie das verwendete Programm des Thermocyclers waren wie folgt:

PCR-Ansatz: Genotypisierung

- H ₂ O	15,25 µl
- 10X Reaktionspuffer	2,50 µl
- Enhancer	2,00 µl
- MgCl ₂	1,50 µl
- dNTPs (25 µM)	1,00 µl
- 5'Primer (25 µM)	1,00 µl
- 3'Primer (25 µM)	1,00 µl
- Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
- DNA-Lysat	0,50 µl

Programm des Thermocyclers: Genotypisierung

- 95°C	3min	} 10x (Vor-Amplifikation)
- 95°C	30s	
- 63°C (-1°C/Zyklus)	30s	
- 72°C	30s	
- 95°C	30s	} 35x (Amplifikation)
- 53°C	30s	
- 72°C	30s	
- 72°C	3min	
- 4°C	∞	

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese visualisiert. Hierzu wurde ein 1,5%-3%iges Agarose-Gel mit RedSafe (5 µl/100 ml) gegossen, die PCR-Proben mit 10 µl 4x DNA-Ladepuffer versetzt und 15 µl der resultierenden Proben auf das Gel aufgetragen. Anschließend wird das Gel auf einem Schlitten in 1x TAE-Puffer gegeben und für etwa 30 Minuten eine Spannung von 150 Volt angelegt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten abschließend unter UV-Licht visualisiert werden.

2.1.3.3. *Mykoplasmen-Detektion mittels PCR*

Bei Mykoplasmen handelt es sich um kleine, zellwandlose Prokaryoten, welche meist parasitär intrazellulär von Wirtszellen, wie beispielsweise Säugetierzellen, leben (Cypionka, 2010). Da Mykoplasmen gegen die meisten Standard-Antibiotika resistent sind und sie durch ihre

geringe Größe nicht lichtmikroskopisch erkennbar sind, hat sich die Detektion einer Mykoplasmen-Kontamination mittels PCR als wirkungsvoll herausgestellt, um eine Beeinflussung des Zellverhaltens ausschließen zu können. Die Detektion von Mykoplasmen findet dabei sowohl im Lysat konfluenter Zellen, als auch im Zellkulturmedium, welches zuvor drei bis fünf Tage auf den zu überprüfenden Zellen verleben muss, statt. Der PCR-Ansatz und das Programm des Thermocyclers lauten wie folgt:

PCR-Ansatz: Mykoplasmen

- H ₂ O	15,3 µl
- 10X Reaktionspuffer	2,5 µl
- Primer/Nukleotid-Mix	2,5 µl
- Interne-Kontroll-DNA	2,5 µl
- Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
- DNA-Lysat/Zellkulturmedium	2 µl

Programm des Thermocyclers: Mykoplasmen

- 95°C	3min	} 39x (Amplifikation)
- 95°C	30s	
- 55°C	30s	
- 72°C	30s	
- 4°C	∞	

Nach Ablauf der Polymerasekettenreaktion wurden 10µl des entstandenen Produkts mit 10 µl des im Kit enthaltenen „DNA sample buffer“ vermischt und auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach dem Anlegen einer Spannung von 150 Volt für 30 Minuten konnte das Gel unter UV-Licht visualisiert werden. Zur Kontrolle des korrekten Ablaufs der PCR ist dabei eine Kontroll-Bande bei 191 Basenpaaren zu sehen, während bei einem positiven Ergebnis der Anwesenheit von Mykoplasmen eine Bande bei 265-268 Basenpaaren zu erkennen ist. Zur Entfernung von Mykoplasmen kann Plasmocin in einer Konzentration von 25 µg/ml zu den Zellen gegeben werden, welches für 2 Wochen alle 3 Tage erneut hinzugegeben wird. Nach dem Ablauf der Behandlung kann die Eliminierung der Mykoplasmen-Kontamination mittels erneuter PCR nachgewiesen werden.

2.1.3.4. *Isolation von RNA*

Zur Analyse der RNA-Expression von Zellen oder Gewebe, wurden laut Herstellerangaben 1×10^7 Zellen, bzw. 1 mg Gewebe, in 1 ml RNAzol aufgenommen und lysiert. Anschließend wurden die Proben entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren. Zur Präzipitation von DNA, Proteinen und Polysacchariden, wurde das 0,4-fache Volumen an RNase freiem DEPC- H_2O hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 15 Minuten und einer 15-minütigen Zentrifugation bei 12.000xg wurde der RNA-enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde anschließend mit dem 0,4-fachen Volumen an 75%igen Ethanol für 8 Minuten bei RT gefällt. Nach der Zentrifugation der Proben für 7 Minuten bei 12.000xg wurde der Überstand vorsichtig von der RNA abgenommen und verworfen. Die RNA wurde mittels der Zugabe von 75%igen Ethanol gewaschen und erneut für 3 Minuten bei 12.000xg zentrifugiert. Die erhaltende RNA wurde abschließend in $25\mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser resuspendiert.

2.1.3.5. *DNase-Verdau der isolierten RNA*

Da die Primer und Sonden mehrerer Gene, deren mRNA-Expression untersucht werden sollte, sowohl an der mRNA, als auch der genomischen DNA des Zielgens binden (CXCL1, CXCL2, IFN β), wurden DNA-Kontaminationen aus der isolierten RNA mittels DNase-Verdau entfernt. Hierzu wurden $12,5\ \mu\text{l}$ der RNA zusammen mit $5,3\ \mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser, $2\ \mu\text{l}$ RDD DNA-Verdau-Puffer und $0,2\ \mu\text{l}$ DNase für 30 Minuten bei 37°C verdaut. Die DNase wurde daraufhin mit der Zugabe von $2\ \mu\text{l}$ einer 25 mM EDTA-Lösung inhibiert und daraufhin für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert (Santos et al., 2016).

2.1.3.6. *cDNA-Synthese*

Zur Untersuchung der mRNA-Expression eines bestimmten Gens mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion, ist es notwendig die isolierte RNA mittels reverser Transkription in cDNA umzuschreiben. Für diesen Vorgang wird $1\mu\text{l}$ Oligo dT-Primer (10 mM) zu $10\mu\text{l}$ der

RNA gegeben und für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 9µl des Ansatzes zur reversen Transkription hinzugegeben. Der Ansatz für eine Probe lautet wie folgt:

Reverse-Transkription-Ansatz: cDNA Synthese

- Nukleasefreies H ₂ O	2,4 µl
- dNTPs (10 mM)	2 µl
- 5X Reaktionspuffer	4 µl
- RiboLock RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
- RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µl)	2,5 µl

Die reverse Transkription findet daraufhin bei 42°C für 60 Minuten im Thermocycler statt, woraufhin die Proben für die qPCR verwendet werden konnten.

2.1.3.7. *Quantitative „real-time“ Polymerasekettenreaktion (qPCR)*

Für die Durchführung der qPCR wurde das SensiFAST Probe No-ROX-Kit verwendet. Die für die qPCR verwendeten Sonden und Primer wurden mit der Universal ProbeLibrary Assay Design Center Software von Roche erstellt und verwendet. Für die mRNA von Genen, für die weder Primer und noch Sonden vorlagen, wurden diese selbst erstellt (Tabelle 7). Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 15µl und das zugehörige Programm lautet wie folgt:

qPCR-Ansatz

- Nukleasefreies H ₂ O	2,4 µl
- SensiFAST Enzyme Mix	7,5 µl
- 5´Primer (10 µM)	0,6 µl
- 3´Primer (10 µM)	0,6 µl
- 20X BSA (1mg/ml)	0,75 µl
- Hydrolysis Probe	0,15 µl
- cDNA	3 µl

Programm des Light Cycler II: qPCR

- 95°C	10min	} 48x (Amplifikation)
- 95°C	10s	
- 55°C	30s	
- 72°C	1m	
- 40°C	30s	

Die mRNA-Expression des jeweiligen Gens von Interesse wurde daraufhin mittels der $\Delta\Delta C_t$ -Berechnungs-Methode bestimmt und relativ zum HPRT-Gen der zugehörigen Probe korrigiert.

2.1.4. Proteinbiochemische Methoden

2.1.4.1. Herstellung von Proteinlysaten

Zur Erstellung von Proteinlysaten für Western Blots oder ELISAs wurde das Medium auf den jeweiligen Zellen abgenommen und diese mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einen Proteinlysepuffer aufgenommen, welcher sowohl Proteinase- (1 mM PMSF), als auch Phosphatasehemmer (1 mM Natriumorthovanadat) beinhaltet. Die Zellen wurden anschließend für 20 Minuten in einem Eis-gefülltem Ultraschallbad sonifiziert. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 12.000xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben entweder direkt für Experimente verwendet.

2.1.4.2. Fraktionierung der Zellen in Zytoplasma und Zellkern-Fraktion

Der Transkriptionsfaktor NF κ B liegt im Zytosol vor und kann der Zellkern nur erreichen, wenn der entsprechende Signalweg aktiviert wird und I κ B, das Protein, das die Translokation von NF κ B verhindert abgebaut wird (Yang et al., 2016). Aus diesem Grund wurden MSCs in ihr jeweiliges Zytosol und ihre Zellkerne fraktioniert, um die Einwanderung von NF κ B in den Zellkern zu bestimmen. Hierfür wurde zunächst das Medium von Zellen abgesaugt und diese zwei Mal mit eiskaltem DPBS gewaschen. Anschließend wurde „Cytoplasmic Extraction Buffer“ mit NP-40 hinzugegeben und Lösung im Well durch Schwenken der Platte verteilt. Die Zellen

schwellen anschließend für 20 Minuten auf Eis an und werden dabei mehrmals, spätestens alle 5 Minuten, geschwenkt. Nach Ablauf der Zeit werden die Zellen mittels eines Zellschabers von den Wells gelöst. Der Puffer wird aufgenommen und vorsichtig in ein Reaktionsgefäß pipetiert. Jede Probe wird im Anschluss 10 Sekunden lang auf höchster Stufe gevortext, um die Zellmembran um die Zellkerne herum zu zerstören. Die Zellkerne bleiben intakt, solange sie nicht durch starkes pipettieren oder zu langes vortexen zerstört werden. Die Flüssigkeit wird daraufhin bei 700xg für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren. Hierbei handelt es sich um die Zytoplasma-Fraktion. Die zurückbleibenden festen Bestandteile aus Zellkernen werden nun drei Mal mit „Cytoplasmic Extraction Buffer“ ohne NP-40 gewaschen (jeweils 10 Min bei 700xg und kurz vortexen). Die Zellkerne werden nun in 50 µl „Nuclear Extraction Buffer“ aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Die Kerne nun für 20 Minuten in einem mit Eis gefülltem Ultraschallbad sonifiziert und mehrfach, spätestens alle 5 Minuten, bei höchster Stufe gevortext. Dadurch platzen die Zellkerne. Die Reaktionsgefäße werden zum Abschluss bei 12.000xg für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Hierbei handelt es sich um den Inhalt der Zellkerne. Die jeweiligen Fraktionen können anschließend für Western Blots verwendet werden.

2.1.4.3. *Ermittlung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA) - Assay*

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Proben wurde der Micro BCA Protein-Assay-Kit verwendet. Die gesammelten Proteinlysate wurden 1:100 in H₂O verdünnt. Anschließend wurde eine Standardkurve aus dem im Kit enthaltenen BSA mit den Konzentrationen 200, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1, 0,5 und 0 µg/ml erstellt. Daraufhin wurden sowohl von den Proben, als auch vom Standard, jeweils 150 µl in jede Vertiefung der 96-Lochplatte pipetiert, gefolgt von 150 µl der laut Herstellerangaben angesetzten „working solution“. Nach der Inkubation der Platte für zwei Stunden bei 37°C wurde abschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Mit Hilfe der Magellan V6.4 Software die Standardkurve erstellt und die Proteinkonzentrationen bestimmt.

2.1.4.4. SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts erfolgte anhand des Anlegens eines elektrischen Feldes mit der Natriumdodecylsulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierzu wurden die entsprechenden Proben zunächst mit 4X SDS-Ladepuffer (denaturierend) im Verhältnis 1:5 versetzt und für 3 Minuten bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf ein Gel, bestehend aus den zwei Komponenten, dem 5%igen Sammelgel und dem Trenngel, aufgetragen. Die Zusammensetzung eines 10%igen Gels lautet wie folgt:

10%iges SDS-PAGE-Gel

	<u>Sammelgel (5%)</u>	<u>Trenngel (10%)</u>
- H ₂ O	1,8 ml	4,2 ml
- 30%ige Acrylamid-Lösung	0,5 ml	3,3 ml
- 0,5 M Tris/HCl pH = 6,8	0,8 ml	-
- 1,5 M Tris/HCl pH = 8,8	-	2,5 ml
- 10% APS	30 µl	100 µl
- TEMED	3 µl	7 µl

Nach dem Auftragen wird zum Fokussieren der Proben zunächst für 15 Minuten eine Spannung von 100 Volt angelegt, gefolgt von dem Anlegen einer Spannung von 130 Volt für ein bis zwei Stunden.

2.1.4.5. Western Blotting („semi-dry“)

Um die bei der SDS-Page aufgetrennten Proteine mittels Antikörpern nachweisen zu können, müssen die Proteine mittels „semi dry“-Blotting-Methode auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Hierzu wurden zunächst drei in methanolhaltigen Transferpuffer getränkte Abschnitte Whatman Papier, gefolgt von der Nitrozellulosemembran, auf die Anode gelegt. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei auf der Membran platziert und weitere drei getränkte Whatman Papier Abschnitte auf das Gel gelegt. Abschließend wurde die Kathode

auf dem Aufbau platziert und vorsichtig festgeschraubt. Anschließend fand der Proteintransfer für 50 Minuten bei 12 Volt statt.

2.1.4.6. *Immundetektion von Proteinen*

Nach der Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran, wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in PBS-T mit 5% BSA geblockt. Anschließend wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten mit PBS-T gewaschen. Danach wurde der entsprechende Primärantikörper in der benötigten Verdünnung in PBS-T mit 5% BSA auf die Membran gegeben und bei über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Antikörper abgenommen und die Membran drei Mal für 20 Minuten mit PBS-T gewaschen, bevor der jeweilige HRP-gekoppelte Antikörper in PBS-T mit 1% BSA hinzugegeben wurde. Dieser wurde für eine Stunde bei RT unter Schwenken auf der Membran belassen. Um überschüssige Sekundärantikörper zu entfernen, wurde die Membran erneut drei Mal für 20 Minuten mit PBS-T gewaschen. Die Messung des Chemilumineszenzsignals erfolgte daraufhin mit an einem Fusion FX7-Gerät. Die Auswertung der Banden erfolgte mit der Software Image J mittels einer densitometrischen Dichtemessung, wobei das jeweilige Protein von Interesse entweder zu GAPDH (bei Proteinen aus dem Zytosol) oder Histon H3 (bei Proteinen aus dem Zellkern) der zugehörigen Probe normalisiert wurde. Nach der Detektion wurden die Antikörper mit „Stripping Buffer“ (zwei Mal, jeweils 15 Minuten) von der Membran entfernt und diese erneut mit 5% BSA in PBS-T für eine Stunde geblockt.

2.1.4.7. *„Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA)*

Der ELISA ermöglicht es, lösliche Proteine mittels spezifischer Antikörper zu detektieren und quantifizieren. Hierzu wurde der sogenannte „Sandwich-ELISA“ verwendet, wobei eine 96-Lochplatte zunächst mit einem Antikörper gegen das Protein von Interesse beschichtet wird, woraufhin das Zelllysat oder Medium, in dem das Protein enthalten ist, hinzugegeben wird, welches dann letztendlich mittels eines zweiten, HRP-gekoppelten Antikörpers gegen das Protein von Interesse detektiert werden kann. Im ersten Schritt dieses Verfahrens wurden die Platten über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Antikörper gegen murines Gesamtfibronektin, EDA-Fibronektin, EDB-Fibronektin oder onkofötales Fibronektin in Beschichtungspuffer (50 µl)

beschichtet. Nachdem die Lochplatte am darauffolgenden Tag drei Mal mit PBS-T gewaschen wurde, wurde sie in einer Blockierlösung mit 3% BSA für 1 Stunde bei RT blockiert. Nach dem erneuten, dreimaligen Waschen mit PBS-T wurden sowohl die Proben, als auch die Standards, welche in Verdünnungspuffer verdünnt wurden, in einem Volumen von 50 µl auf die Lochplatte gegeben. Die Konzentrationen der Standards für murines Gesamtfibronektin waren 2000, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 und 0 ng/ml. Die Konzentrationen der Standards für EDA-Fibronektin wurden aus der murinem Leberlysate erstellt und enthielt 2,25, 1,8, 1,6, 1,3, 0,75, 0,37 und 0 ng/ml EDA-Fibronektin. Die Konzentration für die Standards für EDB-Fibronektin, ebenfalls aus der murinen Leber gewonnen, waren 0,3, 0,27, 0,25, 0,16, 0,095, 0,089, 0,057, 0,021 und 0 ng/ml. Die Konzentration des Standards für oFN aus der murinen Leber betrug 0,39, 0,37, 0,31, 0,17, 0,1, 0,07, 0,04 und 0 ng/ml. Proben für Gesamtfibronektin wurden entweder 2- oder 4-fach verdünnt, während die Proben für die Fibronektin-Isoformen unverdünnt auf die Platte gegeben wurden. Nachdem die Proben und Standards für zwei Stunden bei RT in der 96-Lochplatte inkubierten, kam es zum dreimaligem Waschen der Platte mit PBS-T, woraufhin 50 µl des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers gegen Fibronektin in Verdünnungspuffer in einer Verdünnung von 1:5000 im Falle von murinem Gesamtfibronektin und in einer Verdünnung von 1:2500 für EDA-, EDB- und oFN hinzugegeben wurden. Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei RT wurde die Platte erneut drei Mal mit PBS-T gewaschen, woraufhin 50 µl TMB in jede Vertiefung gegeben wurde und die Lösung für 45 Minuten lang im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl Stopplösung unterbrochen und die Platten sofort bei 450 nm im Mikroplatten-Reader analysiert. Die Auswertung der Daten geschah daraufhin mit Hilfe der Magellan V6.4 Software.

2.1.5. Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten fand mit Hilfe der Software GraphPad Prism (V5, GraphPad Software Inc.) statt. Statistische Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit einem zweiseitigen t-Test bestimmt, wobei diese bei mehr als zwei Gruppen zunächst mittels einer ANOVA (engl. „analysis of variance“) evaluiert wurden. Wenn die ANOVA signifikant unterschiedliche Mittelwerte detektierte, wurden mit dem ungepaarten t-Test unabhängige

Stichproben analysiert. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 festgelegt, wobei die Stärke der Signifikanz als Asterisk in folgender Art angegeben wurden: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Fehlerbalken wurden als Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Entnahme und Charakterisierung von MSCs

3.1.1. Reinheit entnommener MSCs

Um aussagekräftige Ergebnisse über die Rolle von MSCs beim Tumorwachstum zu erhalten, ist eine möglichst hohe Reinheit dieser Zellen notwendig. Deshalb wurden die aus dem Knochenmark gewonnenen Stromazellen dieser Arbeit mittels magnetischer Beads von den vorhandenen Immunzellen getrennt. Die durch die negative Depletion gewonnenen Zellen wurden anschließend mit einem Fluorophor-gekoppelten Antikörper gegen CD45, ein Oberflächenmolekül auf Immunzellen, gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 7).

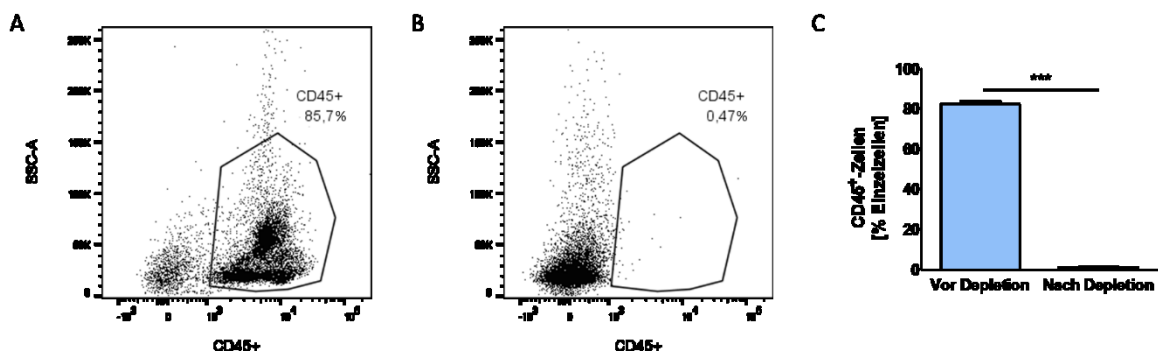


Abbildung 7: Bestimmung der Reinheit der Stromazellen nach Depletion.

(A-B) Repräsentatives Punktdiagramm des Immunzellgehalts des Knochenmarks vor (A) und nach (B) der Depletion. (C) Durch die Depletion von Immunzellen durch magnetische Beads reduziert den Gehalt an CD45⁺-Zellen von 82,5% ± 1,4% auf 1,1% ± 0,2% (n = 20/20). ***p<0,001.

Durch die Depletion wurde die Anzahl an Immunzellen in der Zellsuspension von ca. 82,5 auf ca. 1,1% reduziert, wonach der Großteil der erhaltenen Zellen nur noch aus Stromazellen besteht.

3.1.2. Apoptose und Proliferation entnommener MSCs

Es konnte bereits gezeigt werden, dass apoptotische MSCs eine besonders starke immunsuppressive Wirkung im Vergleich zu lebenden MSCs aufweisen (Chang et al., 2012;

Sung et al., 2013). Aus diesem Grund ist eine hohe Viabilität der Zellen nach Isolation wichtig. Um zu überprüfen, wie viele Stromazellen nach der Depletion absterben, wurde deshalb die Apoptose mittels einer AnnexinV-Propidium Iodid (PI)-Färbung durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 8).

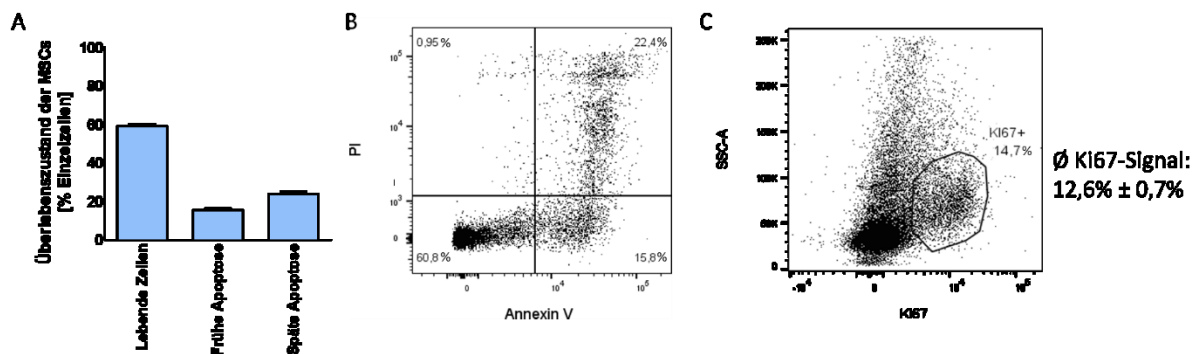


Abbildung 8: Bestimmung des Überlebenszustands und der Proliferation von MSCs.

(A) Die Anzahl der lebenden MSCs nach der Depletion beträgt $59,09\% \pm 1,1\%$, wohingegen Zellen in der frühen Apoptose $15,47\% \pm 0,96\%$ und Zellen in der späten Apoptose $23,94\% \pm 1,2\%$ umfassen ($n = 13/13/13$). (B) Repräsentatives Punktdiagramm des AnnexinV-PI-Apoptose-Assays im Durchflusszytometer. (C) Repräsentatives Punktdiagramm der Bestimmung der Proliferation am Durchflusszytometer mittels des Ki67-Markers. Der Durchschnitt der Menge an proliferierenden MSCs beträgt $12,6\% \pm 0,7\%$. ($n = 13$).

Die Viabilität der Zellen nach Depletion beträgt ca. 60% (Abbildung 8, A-B). Dem gegenüber befinden sich ca. 15% der Zellen in der frühen Apoptose, erkennbar an der ausschließlich positiven Färbung an Annexin V. Etwa 24% der Zellen weisen außerdem zusätzlich eine positive Färbung für PI auf, weswegen diese Zellen sich in der späten Apoptose befinden, bzw. bereits abgestorben sind. Somit sind etwa zwei Drittel aller gewonnenen Zellen lebendig und für weitere Versuche verwendbar.

Neben der Apoptose stellt auch die Proliferation einen wichtigen Punkt in der Charakterisierung von Zellen dar. MSCs sind Zellen mit einem hohen proliferativen Potential (Widowati et al., 2019). Aus diesem Grund wurden MSCs nach der Entnahme fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki67 gefärbt (Abschnitt 8, C). Zellen, die positiv für dieses intrazelluläre Protein sind, befinden sich in der Proliferation. Bei der Charakterisierung der Proliferation entnommener MSCs stellte sich heraus, dass zum Zeitpunkt der Entnahme etwa 12,6% aller MSCs proliferieren.

3.2. Der Einfluss von MSCs auf das Tumorwachstum

3.2.1. Vorarbeiten

Der Einfluss von mesenchymalen Stromazellen auf das Wachstum von Tumoren stellt einen umfassend diskutierten Aspekt der Forschung dar. Vorausgegangene Arbeiten innerhalb der Gruppe konnten bereits das Potential einer MSC-Subpopulation zeigen, das Tumorwachstum zu unterdrücken (Rosnagl et al., 2018). Hierzu wurde ein intratibiales Brustkrebs-Modell für das Wachstum von Knochenmetastasen genutzt. Dabei zeigte sich, dass die Vermischung und Injektion der Tumorzellen zusammen mit aus dem Knochenmark gewonnenen CD45⁺Sca1⁺-Stromazellen (Sca1: englisch für: „stem cell antigen 1“) im Verhältnis 1:2 (Tumorzellen:Stromazellen) das Tumorwachstum inhibierte, was bei der Injektion zusammen mit Tumor-assoziierten Fibroblasten, CAFs, nicht der Fall war. Da die Wirkung von MSCs von diversen Faktoren abhängt, wie dem zugrundeliegenden Tumormodell, der Anzahl der injizierten Stromazellen und der jeweils verwendeten Subpopulation an MSCs, sollte der Einfluss dieser Stromazellen im B16-Melanom-Modell weiter charakterisiert werden.

3.2.2. Die Wirkung verschiedener Tumorzell:MSC-Verhältnisse auf das Tumorwachstum

Die Auswirkung von MSCs auf das Tumorwachstum

Im ersten Schritt sollte charakterisiert werden, ob mesenchymale Stromazellen im B16-Melanom-Modell ebenfalls in der Lage sind, das Tumorwachstum zu beeinflussen. In diesem Modell wurden 1.000.000 B16-F10-Tumorzellen subkutan in die Flanke von C57BL/6-Mäusen injiziert und die entstandenen Tumore nach 7 Tagen entnommen. Für die Untersuchung der Rolle der Stromazellen wurden diese zusammen mit den B16-Melanomzellen injiziert. Die verwendeten Zellzahlen der Stromazellen waren in den jeweiligen Gruppen 100.000, 1.000.000 und 2.000.000, woraus sich bei der Vermischung mit 1.000.000 B16-Zellen die Verhältnisse 1:0,1, 1:1 und 1:2 ergaben. Nach einer Woche wurden die Tumore entnommen und das Volumen und das Gewicht bestimmt (Abbildung 9).

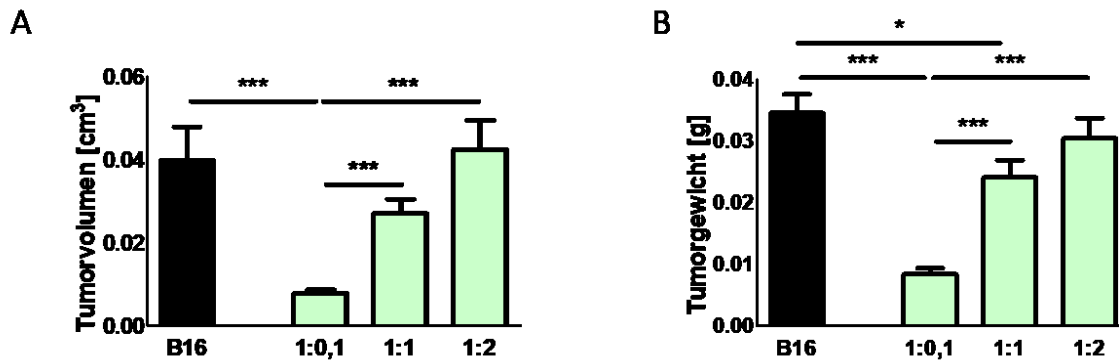


Abbildung 9: Tumorvolumen und -gewicht bei unterschiedlichen Verhältnissen von Tumorzellen zu MSCs

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000, 1.000.000 und 2.000.000 MSCs in die Flanke von C57BL/6-Mäusen injiziert, woraus sich die Verhältnisse 1:0,1, 1:1 und 1:2 ergaben. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: $0,04\text{cm}^3 \pm 0,008\text{cm}^3$, 1:0,1: $0,0078\text{cm}^3 \pm 0,00092\text{cm}^3$, 1:1: $0,027\text{cm}^3 \pm 0,0035\text{cm}^3$, 1:2: $0,042\text{cm}^3 \pm 0,0071\text{cm}^3$), (n=12/12/12/12). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: $0,035\text{g} \pm 0,003\text{g}$, 1:0,1: $0,0084\text{g} \pm 0,00098\text{g}$, 1:1: $0,024\text{g} \pm 0,0027\text{g}$, 1:2: $0,03\text{g} \pm 0,0033\text{g}$), (n=12/12/12/12) * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Die Zugabe von 100.000 MSCs verringerte das Wachstum der Tumore sowohl in Bezug auf Volumen (Abbildung 9, A) als auch Gewicht (Abbildung 9, B), signifikant. Auch bei der Nutzung von 1.000.000 MSCs war eine Reduktion des Tumorgewichts festzustellen, jedoch führte die Zugabe einer höheren Anzahl von MSCs zu einer immer geringeren Inhibition des Tumorwachstums, was letztendlich dazu führte, dass die Injektion von 2.000.000 MSCs keine Unterdrückung des Wachstums mehr zeigte. Dementsprechend sind auch das Volumen und Gewicht der Tumore mit 100.000 MSCs geringer, als in den anderen beiden Gruppen, in denen mehr Stromazellen injiziert wurden.

Die Auswirkung von MSCs auf die infiltrierenden Immunzellen

MSCs sind für ihre immunmodulatorischen Eigenschaften bekannt, mit denen sie Einfluss auf die Tumorprogression nehmen können (François et al., 2019; Galland und Stamenkovic, 2020; Kelly und Rasko, 2021; Ohlsson et al., 2003). Aus diesem Grund wurden die entnommenen Tumore verdaut und die Immunzellen mittels fluoreszierender Antikörper gefärbt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Tumore wurden verschiedene Marker für Immunzellen analysiert. CD45 bezeichnet dabei den allgemeinen Marker für alle hämatopoietischen Zellen mit einem Zellkern (Donovan und Koretzky, 1993), wohingegen CD11b hauptsächlich von Myeloidzellen exprimiert wird (Hey et al., 2016). Andere Marker waren F4/80, der

beispielsweise von Makrophagen exprimiert wird (Khazen et al., 2005), Ly6C, welcher auf Monozyten und Granulozyten zu finden ist (Hey et al., 2016) und Ly6G, der in Mäusen auf Neutrophilen gebildet wird (Biswas et al., 2017; Lee et al., 2013; Loughner et al., 2016). Auch T-Zellen spielen eine sehr wichtige Rolle bei der anti-Tumor-Immunität (Chang et al., 2016; Hutton et al., 2021; Takahashi et al., 2017). CD3 stellt einen allgemeinen T-Zell-Marker dar, wohingegen CD4 und CD8 auf T-Helferzellen bzw. zytotoxischen T-Zellen exprimiert werden (Murphy und Weaver, 2018). Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung 10 wiedergegeben.

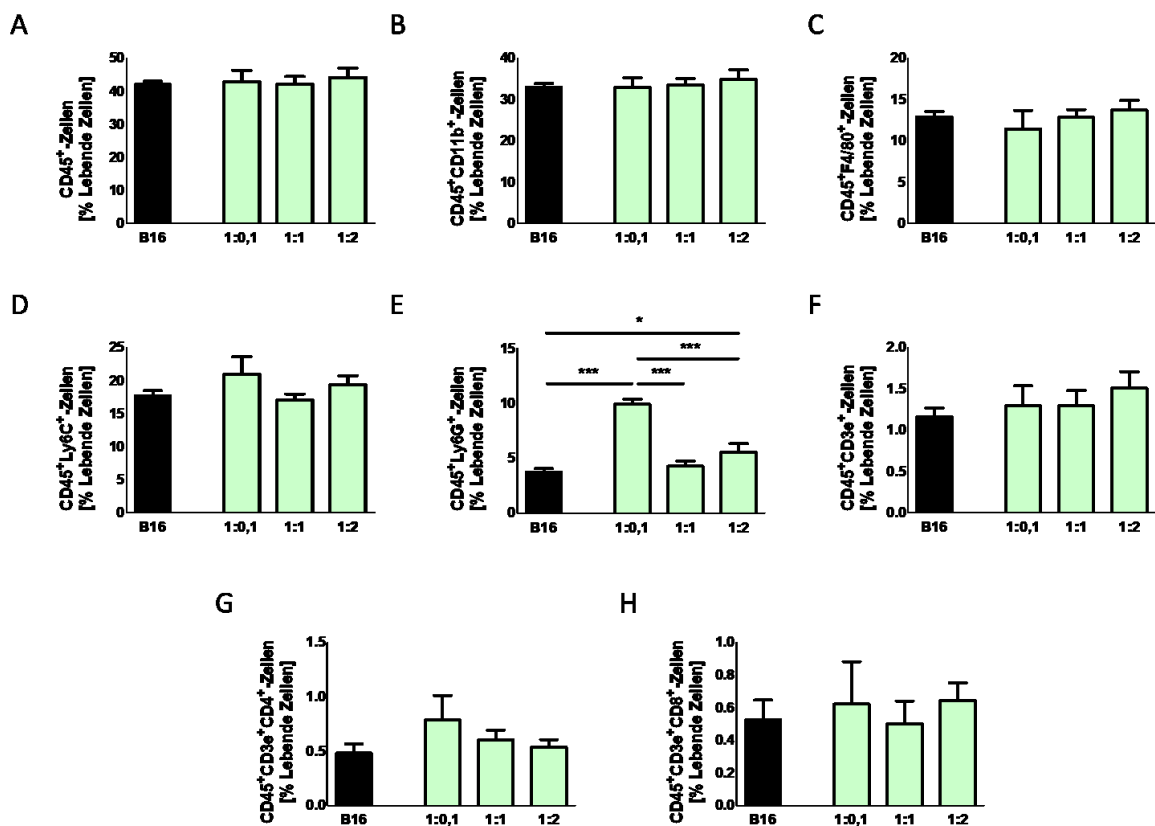


Abbildung 10: Immunzellinfiltration bei der Injektion MSCs in verschiedenen Verhältnissen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 MSCs in die Flanke von C57BL/6-Mäusen injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie ausgewertet. (A) CD45⁺-Zellen (B16: 42,06% ± 0,98%, 1:0,1: 42,83% ± 3,54%, 1:1: 42,19% ± 2,27%, 1:2: 44,23% ± 2,79%), (n=12/12/12/12). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 33,01% ± 0,89%, 1:0,1: 32,92% ± 2,34%, 1:1: 33,52% ± 1,58%, 1:2: 34,93% ± 2,23%), (n=12/12/12/12). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 12,89% ± 0,69%, 1:0,1: 11,46% ± 2,25%, 1:1: 12,83% ± 0,96%, 1:2: 13,72% ± 1,16%), (n=12/12/12/12). (D) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16: 17,72% ± 0,77%, 1:0,1: 20,97% ± 2,64%, 1:1: 17,03% ± 0,94%, 1:2: 19,38% ± 1,38%), (n=12/12/12/12). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 3,73% ± 0,31%, 1:0,1: 9,9% ± 0,48%, 1:1: 4,26% ± 0,46%, 1:2: 5,54% ± 0,77%), (n=12/12/12/12). (F) CD45⁺CD3e⁺-Zellen (B16: 1,16% ± 0,11%, 1:0,1: 1,29% ± 0,24%, 1:1: 1,3% ± 0,19%, 1:2: 1,51% ± 0,2%), (n=12/6/12/12). (G) CD45⁺CD3e⁺CD4⁺-Zellen (B16: 0,48% ± 0,083%, 1:0,1: 0,79% ± 0,22%, 1:1: 0,61% ± 0,088%, 1:2: 0,54% ± 0,069%), (n=12/6/12/12). (H) CD45⁺CD3e⁺CD8⁺-Zellen (B16: 0,53% ± 0,12%, 1:0,1: 0,62% ± 0,26%, 1:1: 0,5% ± 0,14%, 1:2: 0,64% ± 0,11%), (n=12/6/12/12). *p<0,05, ***p<0,001.

Die durchflusszytometrische Analyse der Tumore ergab keine Unterschiede an Immunzellen, ermittelt mit dem CD45-Marker, zwischen den verschiedenen Gruppen (Abbildung 10, A). Ebenso gab es keine Veränderungen der Infiltration von CD45⁺CD11b⁻, CD45⁺F4/80⁺- und CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (Abbildung 10, B-D). Veränderungen bei der Infiltration von myeloiden Immunzellen konnten bei CD45⁺Ly6G⁺-Immunzellen festgestellt werden (Abbildung 10, E), einem Marker von Neutrophilen (Biswas et al., 2017; Lee et al., 2013; Loughner et al., 2016). Der Anteil von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen war beim nicht-inhibitorischen Verhältnis von 1:2 im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht, jedoch zeigte sich, dass die stärkste Erhöhung dieser Zellen im Vergleich zu allen anderen Gruppen beim Verhältnis 1:0,1 zu finden war. Neben der Infiltration von myeloiden Zellen wurde auch die Infiltration von T-Zellen in den Tumor überprüft. Trotz der verringerten Tumorgroße beim Verhältnis von 1:0,1 war jedoch weder der Prozentsatz an T-Zellen insgesamt (Abbildung 10, F), noch der CD4-exprimierenden T-Zellen (Abbildung 10, G) oder CD8-exprimierenden T-Zellen (Abbildung 10, H) in dieser und auch allen anderen Gruppen verändert.

Zusammenfassend konnte hiermit gezeigt werden, dass MSCs in einem Verhältnis von 1:0,1 das Wachstum von B16-Melanomen hemmen. Dieser Effekt ging mit einer ansteigenden Anzahl an MSCs immer weiter verloren, wobei das Tumorzell:MSC-Verhältnis von 1:2 keine Inhibition des Tumorwachstums mehr aufwies. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit stets zu den 1.000.000 Tumorzellen 100.000 MSC-Zellen injiziert. Darüber hinaus konnten keine Unterschiede bei der Infiltration der meisten myeloiden Immunzellenpopulationen oder T-Zellen nachgewiesen werden. Als einzige Ausnahme hierzu zeigten die kleinsten B16-MSCTumore einen höheren Prozentsatz von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

3.2.3. Nachweisbarkeit der MSCs *in vivo*

MSCs sind für ihre kurze Überlebensdauer, selbst nach einer Transplantation in syngenen Modellen, bekannt (Preda et al., 2021). Aus diesem Grund sollte überprüft werden, inwiefern die MSCs im Tumor nach der Injektion nachweisbar sind. 100.000 MSCs wurden deshalb mit Tag-it Violet fluoreszenzmarkiert und zusammen mit B16-Tumorzellen subkutan injiziert. Die

Tumorentnahme geschah nach drei Tagen, woraufhin sie verdaut und durchflusszytometrisch untersucht wurden (Abbildung 11).

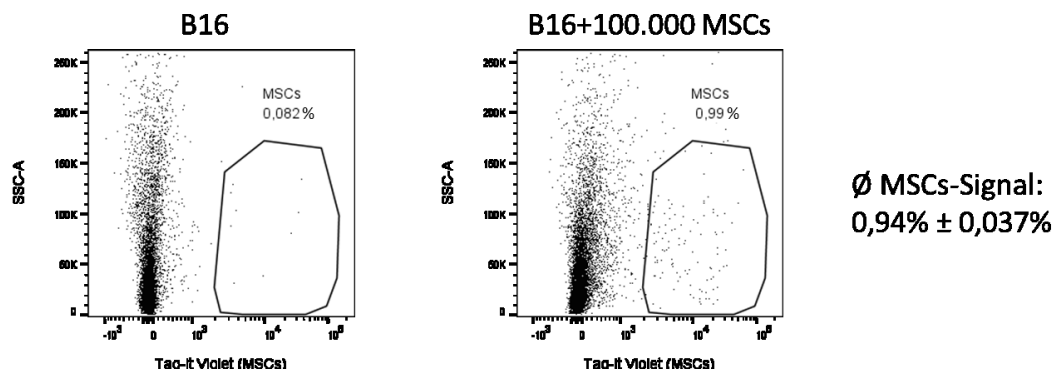


Abbildung 11: Tag-it Violet markierte MSCs in B16-Melanomen 3 Tage nach Injektion.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 Tag-it Violet-markierten MSCs in die Flanke von immunkompetenten CD1nu-Mäusen injiziert. Anschließend wurden die Tumore nach drei Tagen entnommen und nach fluoreszierenden MSCs untersucht. Durchschnittliches MSC-Signal: $0,94\% \pm 0,037\%$, $n = 5$.

Die injizierten MSCs waren drei Tage nach der Injektion noch im Tumor nachweisbar, wenn auch zu einer geringen Zahl ($0,94\% \pm 0,037\%$ aller lebender Zellen). MSCs nisten sich nachweislich zu einer sehr geringen Menge im Tumor ein ($<0,5\%$), können jedoch trotz ihrer geringen Anzahl scheinbar das Wachstum von Tumoren beeinflussen (Waterman et al., 2012a). Somit konnte nachgewiesen werden, dass die MSCs während der frühen Phase der Tumorformation noch im Tumor nachweisbar sind.

3.2.4. Übertragbarkeit der Inhibition des Tumorwachstums auf T-Zell-defiziente CD1nu-Tiere

Stromazellen nehmen meist über Modulation von T-Zellen auf das Tumorwachstum Einfluss (François et al., 2019; Hutton et al., 2021). Um die Rolle von T-Zellen bei der Tumordinhibition zu evaluieren, wurden deshalb athymische Nackmäuse genutzt, die keinen Thymus besitzen und deshalb keine reifen T-Zellen bilden können (Pelleitier und Montplaisir, 1975). 10^6 B16-Tumorzellen wurden zusammen mit 100.000 MSCs in die Flanke von athymischen, T-Zell-defizienten Mäusen injiziert (Abbildung 12).

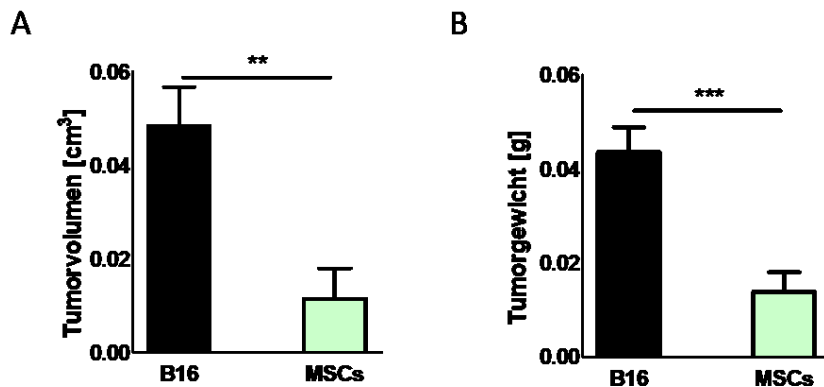


Abbildung 12: Tumorvolumen und -gewicht bei unterschiedlichen Verhältnissen von Tumorzellen zu MSCs in athymischen Tieren

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 MSCs in die Flanke von athymischen CD1nu-Mäusen injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: $0,048\text{cm}^3 \pm 0,0083\text{cm}^3$, MSCs: $0,011\text{cm}^3 \pm 0,0065\text{cm}^3$), (n=8/8). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: $0,044\text{g} \pm 0,0053\text{g}$, MSCs: $0,014\text{g} \pm 0,0041\text{g}$), (n=8/8). **p<0,01, ***p<0,001.

In T-Zell-defizienten Tieren zeigte sich, dass die MSCs auch in diesem Modell in der Lage sind, das Tumorwachstum zu unterdrücken. So waren sowohl das Tumolvolumen (Abbildung 12, A) als auch das Tumorgewicht (Abbildung 12, B) beim Einsatz von 100.000 MSCs signifikant verringert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass MSCs in der Lage sind, das Tumorwachstum in athymischen Tieren zu unterdrücken. Auch in den erwähnten Vorarbeiten führte die Injektion von MDA-Brustkrebszellen in athymischen Tieren mit MSCs zu einer Unterdrückung des Tumorwachstums (Rossnagl et al., 2018). T-Zellen scheinen für die Hemmung des Wachstums also keine Rolle zu spielen. Zwar war die unterdrückende Wirkung von MSCs in dem dort angewandten Intratibial-Modell, anders als in diesem Modell, bei einem Verhältnis von 1:2 feststellbar, jedoch bedeutete dieses Verhältnis eine Injektion von 50.000 Tumorzellen mit 100.000 MSCs, was der gleichen absoluten Zellzahl entspricht, die in diesem Modell zu einer Unterdrückung führte (Rossnagl et al., 2018).

3.2.5. Die Rolle des genetischen Hintergrunds bei der Tumorinhibition

Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, inwiefern der genetische Hintergrund der Versuchstiere die Wirkung von MSCs auf das Tumorwachstum beeinflusst, da die athymischen Tiere, die verwendet wurden, einen genetischen Hintergrund zu 50% aus der C57BL/6- und zu

50% aus der CD1-Linie besitzen. Aus diesem Grund wurden 100.000 MSCs zusammen mit 1.000.000 B16-Melanomzellen subkutan in immunkompetente CD1nu-Tiere, deren genetischer Hintergrund ebenfalls zu 50% aus der C57BL/6- und zu 50% aus der CD1-Linie besteht, injiziert (Abbildung 13).

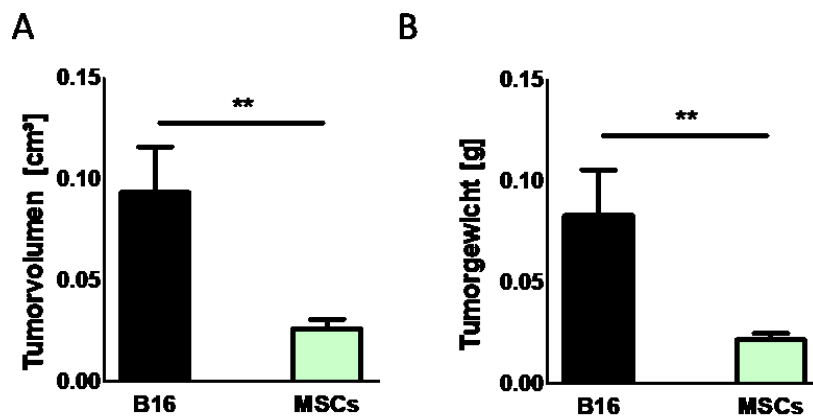


Abbildung 13: Tumolvolumen und -gewicht bei der Injektion von MSCs in immunkompetente CD1nu-Tiere.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 MSCs in die Flanke von immunkompetenten CD1nu-Tieren injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: $0,094\text{cm}^3 \pm 0,022\text{cm}^3$, MSCs: $0,026\text{cm}^3 \pm 0,0046\text{cm}^3$), (n=9/15). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: $0,083\text{g} \pm 0,023\text{g}$, MSCs: $0,022\text{g} \pm 0,003\text{g}$), (n=9/15). **p<0,01.

Die Durchführung des Experiments in immunkompetenten CD1nu-Tieren zeigte, dass die MSCs auch hier in der Lage sind, das Tumolvolumen (Abbildung 13, A) und -gewicht (Abbildung 13, B) zu reduzieren. Dementsprechend scheint der beobachtete Effekt nicht vom genetischen Hintergrund der Versuchstiere beeinflusst zu werden.

3.2.6. Die Unterdrückung des Tumorwachstums ist spezifisch für MSCs

Es blieb noch zu klären, ob die beobachteten Effekte in diesem Modell spezifisch für die Injektion von MSCs sind, oder ob die Injektion jeder Zellart unspezifisch zur Inhibition des Tumorwachstums führen würde. Aus diesem Grund wurde eine andere Art von Stromazellen, Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs), im Verhältnis 1:0,1 mit B16-Tumorzellen injiziert. Als eine weitere Kontrolle dienten CD45⁺-Zellen aus dem Knochenmark. Dies wurde durchgeführt, um sicherzugehen, dass der Effekt nicht von den 1% der CD45⁺-Zellen, die bei der Depletion in den MSCs zurückbleiben, ausgeübt wird.

CAFs

Gewonnen wurden diese Zellen mittels Zellsortierung aus überschüssigem Material von intratibialen MDA-MB-231-Tumoren, die von Caren Zöller im Rahmen ihrer Dissertation injiziert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Zur Gewinnung der CAFs wurden zum einen murine Immunzellen mittels des CD45-Markers gefärbt, wobei sich zum anderen die humane Herkunft der Tumorzellen zunutze gemacht wurde und diese mit einem Antikörper gegen humanes β 2-Mikroglobulin gefärbt wurden. Die Zellen, die negativ für beide Marker waren, bildeten somit das Tumorstroma und wurden als CAFs isoliert (Abbildung 14).

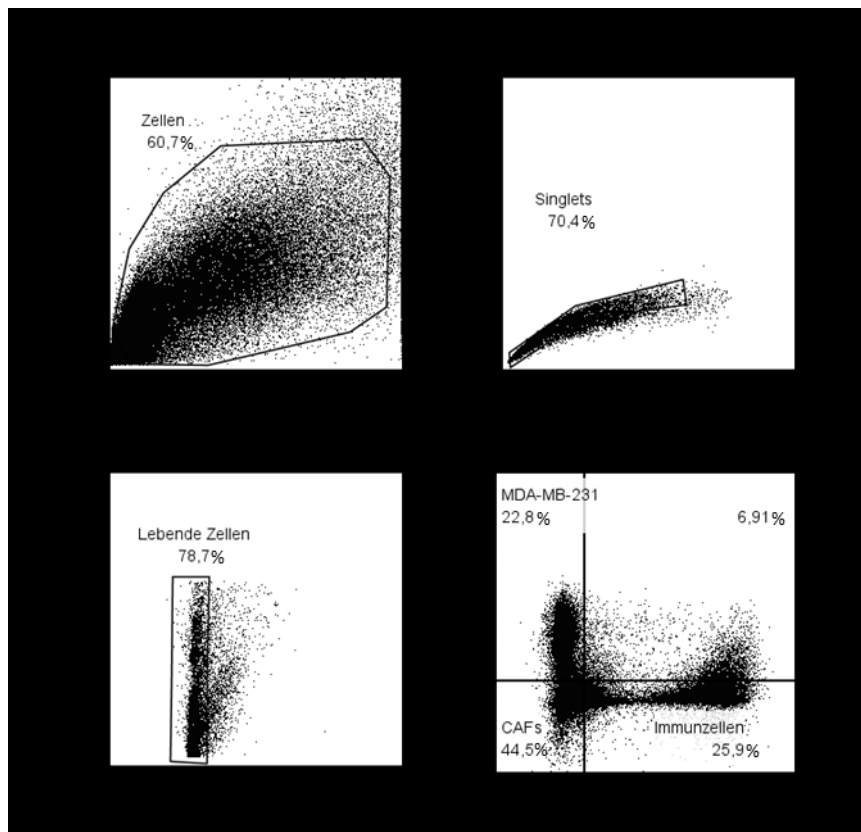


Abbildung 14: Beispielhafte Darstellung einer Sortierung zur Gewinnung von CAFs aus MDA-MB-231-Tumoren.

Murine Immunzellen wurden mit Antikörpern gegen den CD45-Marker gefärbt, wohingegen humane MDA-MB-231-Zellen mit einem Antikörper gegen humanes β 2-Mikroglobulin gefärbt wurden. Zellen, die negativ für beide Marker waren, wurden als CAFs sortiert und genutzt.

100.000 solcher Zellen wurden anschließend mit 1.000.000 B16-Zellen subkutan in die Flanke von Mäusen injiziert, die entstandenen Tumore am Versuchsende entnommen und das Tumolvolumen und -gewicht bestimmt (Abbildung 15).

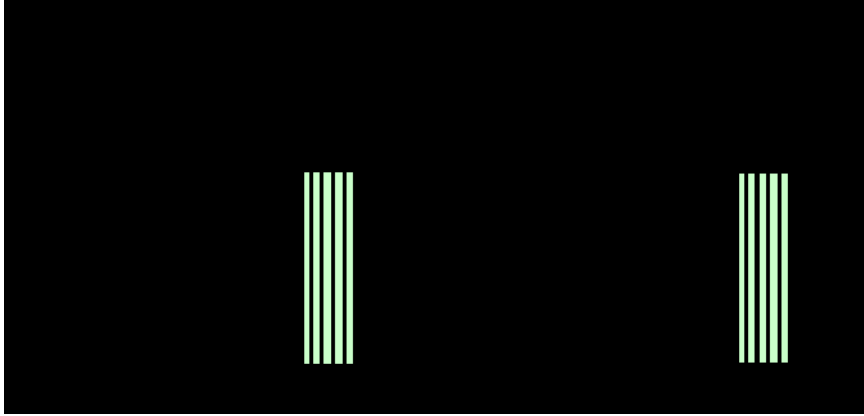


Abbildung 15: Tumorvolumen und -gewicht bei der Injektion von Tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs).

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 CAFs in die Flanke von behaarten CD1nu-Mäusen injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: $0,078\text{cm}^3 \pm 0,039\text{cm}^3$, CAFs: $0,13\text{cm}^3 \pm 0,04\text{cm}^3$), (n=8/9). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: $0,057\text{g} \pm 0,014\text{g}$, CAFs: $0,087\text{g} \pm 0,03\text{g}$), (n=8/9).

Die Injektion der CAFs führte weder zu einer Verringerung des Tumorvolumens (Abbildung 15, A), noch des Tumorgewichts (Abbildung 15, B), was auch im intratibialen MDA-Modell ersichtlich war (Rossnagl et al., 2018). Dementsprechend kann gefolgert werden, dass Fibroblasten im Allgemeinen das Tumorwachstum nicht inhibieren.

CD45⁺-Zellen aus dem Knochenmark

Die CD45⁺-Zellen wurden ebenfalls aus dem Knochenmark gewonnen. Hiermit sollte überprüft werden, ob die Verunreinigung der MSCs bei der Isolation mit etwa 1% (Abbildung 7) für den beobachteten Effekt verantwortlich sein könnte.

Für den Versuch wurden 100.000 CD45⁺-Zellen mit 1.000.000 B16-Zellen vermischt und subkutan in die Flanke von Mäusen injiziert. Am Ende des Versuchszeitraums wurden die Tumore entnommen und deren Volumen und Gewicht bestimmt (Abbildung 16).

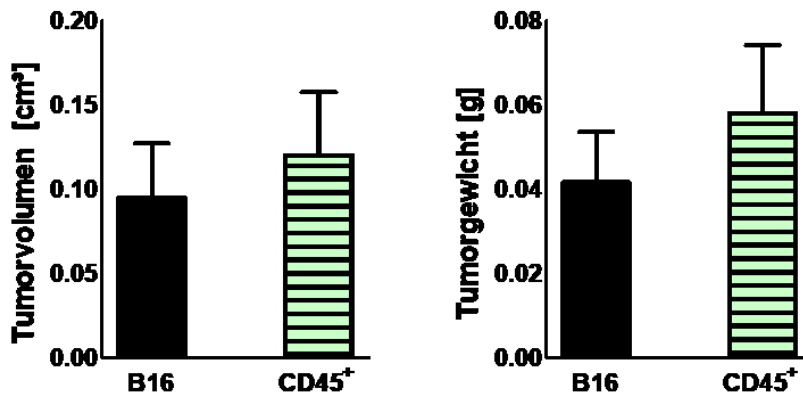


Abbildung 16: Tumorvolumen und -gewicht bei der Injektion von CD45⁺-Zellen aus dem Knochenmark.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 CD45⁺-Zellen in die Flanke von behaarten CD1nu-Mäusen injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: 0,095cm³ ± 0,032cm³, CD45⁺: 0,12cm³ ± 0,037cm³) (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: 0,042g ± 0,012g, CD45⁺: 0,058g ± 0,016g), (n=5/10).

Auch die Verwendung von CD45⁺-Zellen aus dem Knochenmark führte zu keiner Veränderung des Tumorvolumens (Abbildung 16, A) und des Tumorgewichts (Abbildung 16, B).

Dementsprechend kann aus den Versuchen gefolgert werden, dass MSCs, anders als CAFs oder CD45⁺-Zellen aus dem Knochenmark, spezifisch das Tumorwachstum bei einem Verhältnis von einer Million Tumorzellen zu 100.000 MSCs inhibieren.

3.2.7. Übertragbarkeit der Inhibition des Tumorwachstums auf ein murines, orthotopes Brustkrebsmodell

Die Auswirkung von MSCs auf das Tumorwachstum im orthotopen Brustkrebsmodell

Die Übertragbarkeit auf andere Tumormodelle stellt eine wichtige Frage bei der Rolle von MSCs beim Tumorwachstum dar. Hierzu wurde ein Modell des orthotopen Wachstums von Brustkrebs gewählt. EO771-Zellen, eine murine Mammakarzinom-Zelllinie, wurden zusammen mit 100.000 MSCs in die Brustdrüse von C57BL/6-Mäusen injiziert und die Tumore nach 14 Tagen entnommen (Abbildung 17).

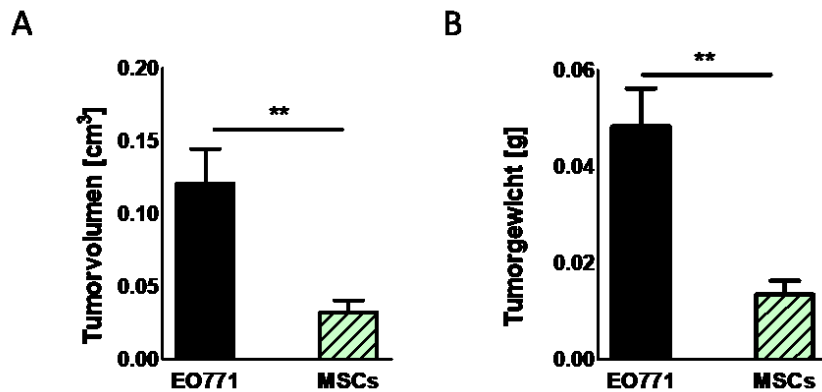


Abbildung 17: Tumorvolumen und -gewicht im orthotopen EO771-Modell in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 EO771-Brustkrebszellen wurden zusammen mit 100.000 MSCs in die Brustdrüse von C57BL/6-Mäusen injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (EO771: 0,12cm³ ± 0,024cm³, MSCs: 0,032cm³ ± 0,0083cm³), (n=10/8). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (EO771: 0,048g ± 0,0079g, MSCs: 0,013g ± 0,0029g), (n=10/8). **p<0,01.

Das EO771-Brustkrebsmodell bestätigte die zuvor erhaltenen Ergebnisse des B16-Melanommodells und zeigte ein vermindertes Tumorstadium in Form von Tumorstadium (Abbildung 17, A) und Tumorgewicht (Abbildung 17, B) bei der Verwendung des Tumorzell-MSC-Verhältnisses von 1:0,1.

Aufgrund der bisher gewonnenen Erkenntnisse kann festgehalten werden, dass MSCs dazu in der Lage sind das Tumorstadium in einem Verhältnis von 1:0,1 zu inhibieren, wobei die Anwesenheit von T-Zellen keine Rolle spielt. Dieser Effekt ist spezifisch für MSCs und konnte sowohl im Melanom- auch auch im orthotopen Brustkrebsmodell beobachtet werden.

3.3. Die Ermittlung der Rolle von Fibronektin aus und auf MSCs in konditionellen Knockout-Modellen

3.3.1. Der Einfluss von Fibronektin aus MSCs auf das Tumorstadium

Die ECM stellt einen wichtigen Faktor im Tumorkontext dar (Abschnitt 1.4.3. Die extrazelluläre Matrix). Da Stromazellen eine der Hauptquellen für Fibronektin darstellen (Henke et al., 2020; Winkler et al., 2020; Xiong und Xu, 2016), wird im Folgenden die Auswirkung von Fibronektin aus mesenchymalen Stromazellen und dessen Abwesenheit im Zusammenhang mit dem Tumorstadium untersucht.

Es wurden konditionelle Knockout-Mäuse (cKO) generiert, in denen das Fibronectin-Gen mittels des Cre/loxP-Systems aus verschiedenen Subpopulationen von MSCs deletiert wurde. Hierzu dienten loxP-Stellen um das Fibronectin-Gen in Verbindung mit einer Cre-Rekombinase unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren. Zellen, in denen der entsprechende Promotor aktiv ist, exprimieren Promotor-abhängig die Cre-Rekombinase, die daraufhin das geflochte Gen deletiert.

3.3.1.1. Der Anteil verschiedener Subpopulationen in den isolierten MSCs

Im ersten Schritt sollte gezeigt werden, in welchem Ausmaß die hier genutzten Promotoren in den isolierten MSCs aktiv sind. Hierbei handelte es sich um die Col-, Vav-, Osx und Mx-Promotoren. Der Col-Promotor ist dabei in differenzierten Osteoblasten (Dacquin et al., 2002), der Vav-Promotor in Endothelzellen (Ueda et al., 2019), und der Osx-Promotor in Präosteoblasten (Rodda und McMahon, 2006) aktiv. Der Mx-Promotor ist nach der Injektion von Poly(I:C) in mehreren Populationen des Knochenmarks aktiv, wie beispielsweise in hämatopoetischen Zellen, MSCs, osteoblastischen Zellen und in einigen adipogenen Zellen (Kühn et al., 1995; Park et al., 2012). Trotz der Aktivität in mehreren Geweben ist der Mx-Promotor jedoch ebenfalls in Zellen osteogener Abstammung aktiv (Panaroni et al., 2014; Park et al., 2012). Der Col-Promotor dient als Kontrolle, da sich differenzierte Osteoblasten nicht im Knochenmarksstroma befinden und demnach die Ausschaltung von Fibronectin mittels des Col-Promotors in mesenchymalen Stromazellen keine Auswirkungen haben sollte.

Zur Beantwortung dieser Frage, wie aktiv die besagten Promotoren in Stromazellen des Knochenmarks sind, wurden Tiere mit Promotor-abhängiger Cre-Rekombinase mit Tieren verpaart, welche das Reporterprotein tdTomato exprimieren. Sobald der Promotor in einer Zelle aktiv ist, deletiert die exprimierte Cre-Rekombinase ein Stop-Codon im tdTomato-Reporter-gen, woraufhin die Zelle das Reporterprotein exprimiert und somit Fluoreszenz-markiert wird. Somit konnte mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden, wie groß der Anteil der Zellen unter den MSCs ist, die den Promotor exprimieren. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 18 aufgeführt.

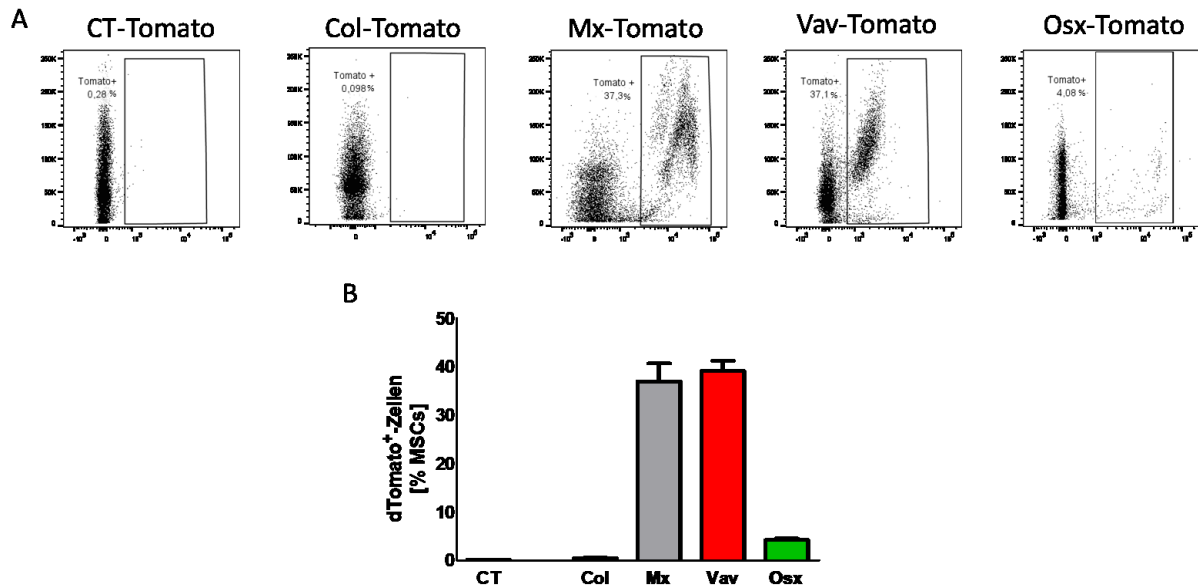


Abbildung 18: Tomato-Expression in MSCs mit verschiedenen Promotoren.

(A) Repräsentative Darstellung des Tomato-Signals in Kontroll-MSCs, sowie MSCs mit dem Col-, Mx-, Vav- und Osx-Promotor. (B) Quantifizierung der dTomato-positiven Zellen innerhalb der isolierten MSCs (CT: 0,1% ± 0,047%, Col: 0,41% ± 0,18%, Mx: 37,0% ± 3,67%, Vav: 39,13% ± 2,13%, Osx: 4,2% ± 0,35%), (n=5/4/3/4/4).

Die Untersuchung der MSCs mittels Durchflusszytometrie ergab, dass, wie erwartet, MSCs in Abwesenheit einer Cre-Rekombinase bzw. MSCs aus Col-Tomato-Tieren das Reporterprotein nicht exprimierten. Die Promotoren Mx, Vav und Osx waren in den isolierten Stromazellen aktiv. Die Mx- und Vav-Promotoren waren dabei in etwa 40% aller Zellen aktiv. Beide Promotoren umfassen damit eine relativ große Population an Stromazellen. Der Osx-Promotor wies nur eine Expression in etwa 4% aller isolierten Stromazellen auf und macht damit nur einen sehr kleinen Teil aller MSCs aus.

3.3.1.2. Quantifizierung von Fibronektin und dessen Isoformen in verschiedenen Fibronektin-Knockout-MSCs

Als nächstes wurde die Ausschaltung von Fibronektin in den unterschiedlichen Fibronektin-cKO-Tieren mittels ELISA nachgewiesen. Hierzu wurde das Knochenmark der jeweiligen Tiere isoliert und die MSCs mittels magnetischer Beads gewonnen. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden in FCS-freiem α -MEM Medium ausgesät, um einen Einfluss der Fibronektinproduktion aufgrund der Zytokine und Wachstumsfaktoren im FCS auszuschließen. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und die Zellen in

Proteinlysepuffer aufgenommen. Das produzierte Gesamt-Fibronectin (tFN) und die EDA-, EDB- und onkofötale-Isoform (oFN) wurden quantifiziert.

Gesamt-Fibronectin (tFN)

Zunächst wurde der Gesamtgehalt an Fibronectin aus den konditionierten Medien und dem Proteinlysat bestimmt (Abbildung 19).

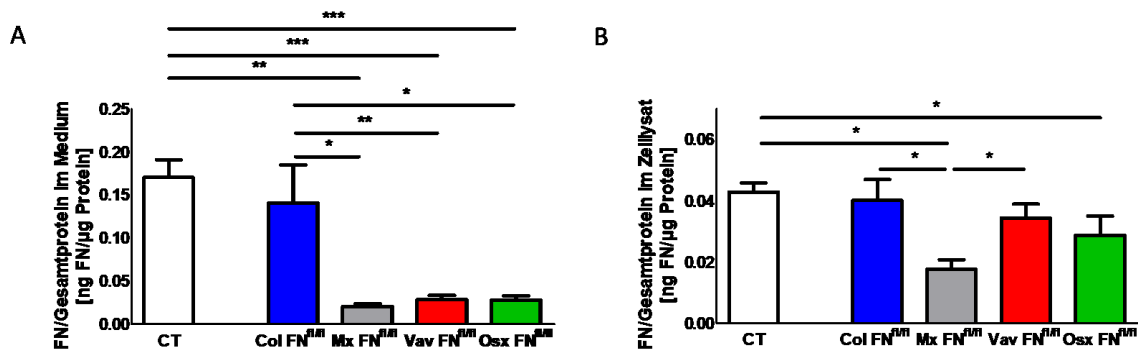


Abbildung 19: Quantifizierung der Menge an Gesamt-Fibronectin von Fibronectin-cKO-MSCs in konditionierten Medien und Zellysat.

Quantifizierte Menge an Fibronectin in konditionierten Medien von Fibronectin-cKO-MSCs normalisiert anhand des Gesamtproteingehalts bestimmt mittels BCA-Assay. (A) Fibronectingehalt in konditionierten Medien (CT: 0,17ng/µg ± 0,021ng/µg, Col FN^{fl/fl}: 0,14ng/µg ± 0,044ng/µg, Mx FN^{fl/fl}: 0,02ng/µg ± 0,0033ng/µg, Vav FN^{fl/fl}: 0,028ng/µg ± 0,0052ng/µg, Osx FN^{fl/fl}: 0,028ng/µg ± 0,0053ng/µg), (n=41/9/7/14/11) (B) Fibronectingehalt im Zelllysat (CT: 0,043ng/µg ± 0,003ng/µg, Col FN^{fl/fl}: 0,04ng/µg ± 0,0068ng/µg, Mx FN^{fl/fl}: 0,018ng/µg ± 0,0031ng/µg, Vav FN^{fl/fl}: 0,025ng/µg ± 0,0046ng/µg, Osx FN^{fl/fl}: 0,029ng/µg ± 0,0062ng/µg) (n=41/9/7/14/11). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

In den konditionierten Medien (Abbildung 19, A) wurde eine signifikant verringerte Fibronectinmenge mit den cKO-MSCs aus Mx-, Vav- und Osx-Tieren festgestellt. Wie erwartet, war keine Reduktion der Fibronectinmenge aus MSCs von Col-Tieren erkennbar, da der Col-Promotor nicht in Stromazellen des Knochenmarks aktiv ist. Dementsprechend war auch im Zelllysat keine Reduktion der Menge an Fibronectin zwischen Col- und CT-Mäusen erkennbar (Abbildung 19, B). Überraschenderweise war die Menge an Fibronectin von Vav-Tieren im Zelllysat im Vergleich zu Kontroll-MSCs nicht reduziert. Dem gegenüber zeigten Mx- und Osx-MSCs signifikant weniger Fibronectin im Lysat als Kontrollzellen und Mx-Zellen weniger Fibronectin als Col- und Vav-MSCs enthielten.

Die Ausschaltung der Fibronectinproduktion konnte dementsprechend sowohl in Mx-, als auch in Osx-MSCs in den konditionierten Medien und im Lysat gezeigt werden, wohingegen auch Vav-MSCs weniger lösliches Fibronectin in ihre Umgebung abgaben. Unerwarteterweise zeigte sich in Verbindung mit Abbildung 18, dass Osx- MSCs, obwohl sie nur einen sehr geringen Teil des Knochenmarksstromas einnehmen, die Produktion von Fibronectin stark beeinflussen (Abbildung 19).

EDA-Fibronectin

Da die Isoformen von Fibronectin in vielen biologischen Prozessen und damit auch in der Tumorentwicklung eine wichtige Rolle spielen (Abschnitt 1.5.2. Spleißisoformen von Fibronectin), sollten diese auch per ELISA quantifiziert und etwaige Unterschiede festgestellt werden. Im Folgenden ist der Gehalt an EDA-Fibronectin im Medium und dem Proteinlysate aufgeführt (Abbildung 20).

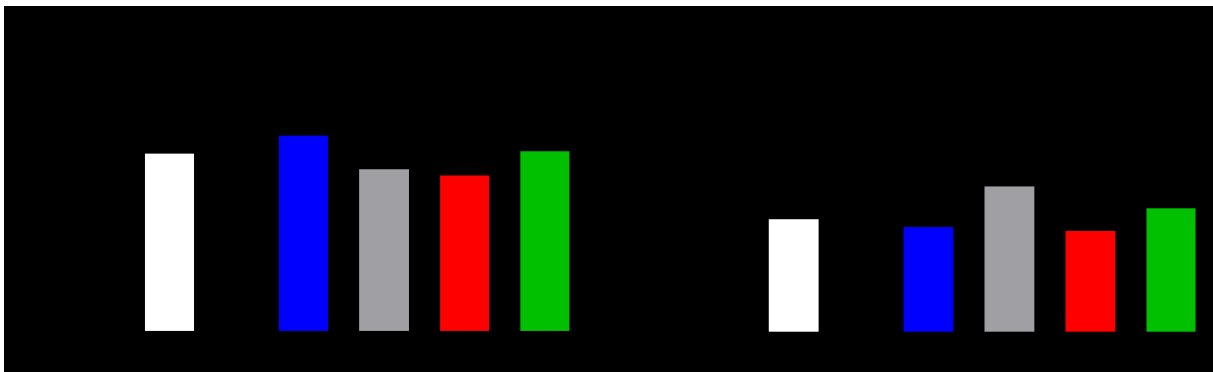


Abbildung 20: Quantifizierung der Menge an EDA-Fibronectin von Fibronectin-cKO-MSCs in konditionierten Medien und Zellysat.

Quantifizierte Menge an EDA-Fibronectin in konditionierten Medien und Zellysaten von Fibronectin-cKO-MSCs normalisiert anhand des Gesamtproteingehalts bestimmt mittels BCA-Assay. (A) EDA-Gehalt in konditionierten Medien (CT: 0,62pg/μg ± 0,03pg/μg, Col FN^{fl/fl}: 0,69pg/μg ± 0,068pg/μg, Mx FN^{fl/fl}: 0,57pg/μg ± 0,068pg/μg, Vav FN^{fl/fl}: 0,55pg/μg ± 0,06pg/μg, Osx FN^{fl/fl}: 0,63pg/μg ± 0,047pg/μg), (n=41/9/7/14/11). (B) EDA-Gehalt im Zelllysate (CT: 0,75pg/μg ± 0,03pg/μg, Col FN^{fl/fl}: 0,7pg/μg ± 0,07pg/μg, Mx FN^{fl/fl}: 0,96pg/μg ± 0,088pg/μg, Vav FN^{fl/fl}: 0,67pg/μg ± 0,072pg/μg, Osx FN^{fl/fl}: 0,82pg/μg ± 0,055pg/μg), (n=41/9/7/14/11). *p<0,05.

Während sich im Medium keine Unterschiede in der Menge an EDA-Fibronectin zwischen den verschiedenen FN-cKO-MSCs ergaben (Abbildung 20, A), zeigte sich im Lysat, dass die Menge an EDA-Fibronectin in Mx-FN-cKO-MSCs im Vergleich zu CT-, Col- und Vav-FN-cKO-MSCs

erhöht war (Abbildung 20, B). Zu MSCs aus Osx-Mäusen war jedoch kein statistisch relevanter Unterschied ersichtlich. Dementsprechend produzieren Mx-FN-cKO-MSCs insgesamt weniger Fibronectin (Abbildung 19), haben aber einen höheren Anteil an EDA-Fibronectin, als Kontroll-MSCs.

EDB-Fibronectin

Auch die EDB-Isoform wurde auf dieselbe Art und Weise im Medium und dem Proteinlysate quantifiziert (Abbildung 21).

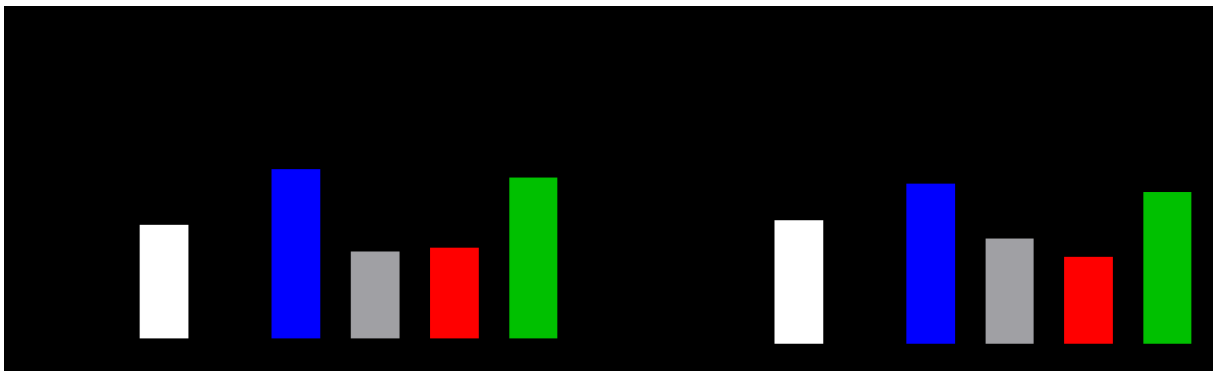


Abbildung 21: Quantifizierung der Menge an EDB-Fibronectin von Fibronectin-cKO-MSCs in konditionierten Medien und Zellysat.

Quantifizierte Menge an EDB-Fibronectin in konditionierten Medien und Zellysaten von Fibronectin-cKO-MSCs normalisiert anhand des Gesamtproteingehalts bestimmt mittels BCA-Assay. (A) EDB-Gehalt in konditionierten Medien (CT: 0,03pg/μg ± 0,002pg/μg, Col FN^{fl/fl}: 0,046pg/μg ± 0,0073pg/μg, Mx FN^{fl/fl}: 0,024pg/μg ± 0,0022pg/μg, Vav FN^{fl/fl}: 0,025pg/μg ± 0,0045pg/μg, Osx FN^{fl/fl}: 0,043pg/μg ± 0,004pg/μg), (n=41/9/7/14/11). (B) EDB-Gehalt im Zelllysate (CT: 0,084pg/μg ± 0,0041pg/μg, Col FN^{fl/fl}: 0,11pg/μg ± 0,01pg/μg, Mx FN^{fl/fl}: 0,072pg/μg ± 0,0059pg/μg, Vav FN^{fl/fl}: 0,059pg/μg ± 0,0089pg/μg, Osx FN^{fl/fl}: 0,1pg/μg ± 0,0092pg/μg), (n=41/9/7/14/11). *p<0,05, **p<0,01.

Bezüglich der Expression von EDB-Fibronectin zeigte sich sowohl im untersuchten Medium, als auch im Zellysat der unterschiedlichen Fibronectin-Knockout-MSCs, dass der Gehalt an EDB sowohl in Col-MSCs, als auch in Osx-MSCs im Vergleich zu CT-, Vav und Mx-MSCs erhöht war. Dies ist besonders überraschend gegenüber der Tatsache, dass der Col-Promotor in MSCs nicht aktiv ist (Abbildung 18) und dass auch die Produktion an Gesamt-Fibronectin keine Unterschiede zu der Kontrollgruppe zeigte. Dennoch konnte hier die Erkenntnis gewonnen werden, dass die Ausschaltung des Fibronectin-Gens in Osx-MSCs zwar trotz ihres geringen

Anteils zur Verminderung von Fibronectin führt, die EDB-Isoform jedoch in einer größeren Menge vorliegt, als in Kontroll-MSCs.

Onkofötales Fibronectin (oFN)

Letztendlich wurde auch oFN per ELISA quantifiziert. Der Gehalt dieser Form von Fibronectin im Medium und dem Proteinlysate ist unten aufgeführt (Abbildung 22).

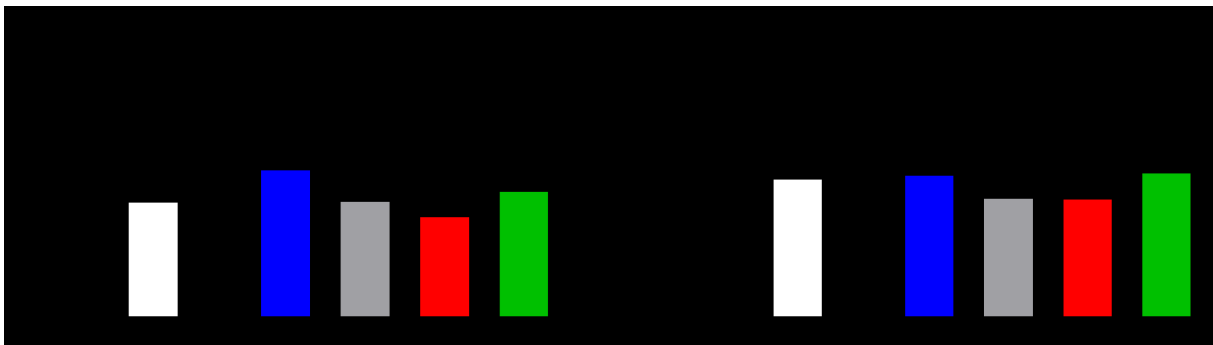


Abbildung 22: Quantifizierung der Menge an onkofötalem Fibronectin von Fibronectin-cKO-MSCs in konditionierten Medien und Zellysate.

Quantifizierte Menge an onkofötalem Fibronectin in konditionierten Medien und Zellysaten von Fibronectin-cKO-MSCs normalisiert anhand des Gesamtproteingehalts bestimmt mittels BCA-Assay. (A) oFN-Gehalt in konditionierten Medien (CT: $0,041\text{pg}/\mu\text{g} \pm 0,0029\text{pg}/\mu\text{g}$, Col FN^{fl/fl}: $0,052\text{pg}/\mu\text{g} \pm 0,0067\text{pg}/\mu\text{g}$, Mx FN^{fl/fl}: $0,041\text{pg}/\mu\text{g} \pm 0,0058\text{pg}/\mu\text{g}$, Vav FN^{fl/fl}: $0,036\text{pg}/\mu\text{g} \pm 0,0044\text{pg}/\mu\text{g}$, Osx FN^{fl/fl}: $0,045\text{pg}/\mu\text{g} \pm 0,0043\text{pg}/\mu\text{g}$), (n=41/10/7/14/11). (B) oFN-Gehalt im Zellysate (CT: $0,092\text{pg}/\mu\text{g} \pm 0,0048\text{pg}/\mu\text{g}$, Col FN^{fl/fl}: $0,094\text{pg}/\mu\text{g} \pm 0,0095\text{pg}/\mu\text{g}$, Mx FN^{fl/fl}: $0,079\text{pg}/\mu\text{g} \pm 0,01\text{pg}/\mu\text{g}$, Vav FN^{fl/fl}: $0,079\text{pg}/\mu\text{g} \pm 0,0089\text{pg}/\mu\text{g}$, Osx FN^{fl/fl}: $0,096\text{pg}/\mu\text{g} \pm 0,011\text{pg}/\mu\text{g}$), (n=41/9/7/14/11). *p<0,05.

Es zeigte sich eine verringerte Expression dieser Form von Fibronectin in Vav-FN-cKO-MSCs im Vergleich zu MSCs aus Col-FN-cKO-Tieren (Abbildung 22, A). Keine weiteren Unterschiede konnten festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich in Mx-, Vav- und Osx-MSCs eine Ausschaltung der Fibronectin-Produktion nachweisen ließ (Abbildung 19). Zusammen mit der Expression von Tomato (Abbildung 18) lässt dies schlussfolgern, dass die Osx-Population für eine große Menge an Fibronectin verantwortlich ist, obwohl sie nur etwa 4% aller Zellen unter den aus dem Knochenmark ausgespülten MSCs ausmacht. Darüber hinaus zeigte sich, dass Mx-FN-cKO-MSCs mehr EDA-Fibronectin in ihrem Proteinlysate aufwiesen, als in den übrigen Gruppen (mit der Ausnahme der Osx-Gruppe) (Abbildung 20). Im Gegensatz dazu ließ sich in Col-, sowie

Osx-FN-cKO-MSCs eine größere Menge an EDB-Fibronectin im Medium und Lysat nachweisen, als in den übrigen Gruppen (Abbildung 21), obwohl keine Aktivität des Col-Promotors in MSCs nachweisbar ist (Abbildung 18). Dies bedeutet, dass zwei Gruppen, die eine Ausschaltung der Gesamt-Fibronectinmenge zeigen, gleichzeitig eine erhöhte Menge einer Isoform von Fibronectin aufweisen. Dies ist in Form von EDA-FN bei Mx-MSCs im Zelllysat und EDB-FN bei Osx-MSCs sowohl im Überstand als auch im Zelllysat der Fall.

3.3.1.3. Die Auswirkung des Knockouts von Fibronectin in verschiedenen MSC-Subpopulationen

Die Auswirkung der FN-cKO-MSCs auf das Tumorwachstum

Nun sollte das Fehlen von Fibronectin in den verschiedenen Subpopulationen und dessen Auswirkung auf das Tumorwachstum untersucht werden. Hierzu wurden MSCs, aus den verschiedenen konditionellen Knockout-Mäusen isoliert und 100.000 solcher Zellen subkutan mit 1.000.000 B16-Melanomzellen injiziert. Erneut wurden die Tumore am Versuchsende entnommen und ihr Volumen und Gewicht bestimmt (Abbildung 23).

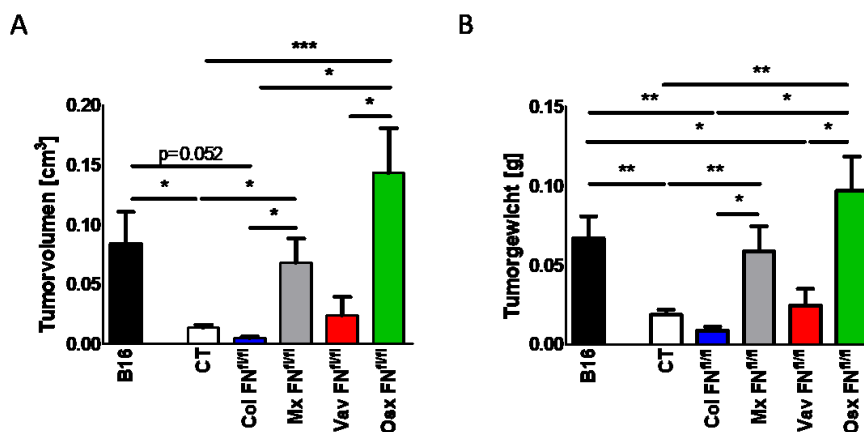


Abbildung 23: Tumorvolumen und -gewicht bei der Injektion von Fibronectin-cKO-MSCs in immunkompetenten CD1nu-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 MSCs in die Flanke von immunkompetenten CD1nu-Mäusen injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: 0,084cm³ ± 0,027cm³, CT: 0,014cm³ ± 0,0025cm³, Col FN^{fl/fl}: 0,005cm³ ± 0,0011cm³, Mx FN^{fl/fl}: 0,068cm³ ± 0,02cm³, Vav FN^{fl/fl}: 0,024cm³ ± 0,016cm³, Osx FN^{fl/fl}: 0,14cm³ ± 0,038cm³), (n=16/16/8/11/10/13). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: 0,067g ± 0,014g, CT: 0,019g ± 0,0033g, Col FN^{fl/fl}: 0,0088g ± 0,0024g, Mx FN^{fl/fl}: 0,059g ± 0,016g, Vav FN^{fl/fl}: 0,025g ± 0,01g, Osx FN^{fl/fl}: 0,097g ± 0,022g), (n=16/16/8/11/10/13). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die Auswertung des Volumens und des Gewichts der Tumore ergab, dass MSCs mit wildtypischer Fibronectin-Produktion, Col-FN-cKO-MSCs oder Vav-FN-cKO-MSCs das Tumorstadium verringern (Abbildung 23). Damit scheint das Fibronectin aus der Vav-Subpopulation keinen Einfluss auf die Tumorstadium zu haben. Überraschenderweise waren bei der Nutzung von MSCs aus Mx-FN-cKO-Tieren, in denen Fibronectin in einem großen Teil des Knochenmarks nicht mehr exprimiert wird, weder das Tumorstadium, noch das Gewicht signifikant unterdrückt (Abbildung 23). Da sowohl das Tumorstadium, als auch das –gewicht mit MSCs dieses Genotyps signifikant zu Kontroll-MSCs und Col-FN-cKO-MSCs erhöht war, deuten diese Ergebnisse an, dass das von MSCs produzierte Fibronectin für ihre tumorunterdrückenden Eigenschaften notwendig ist. Ähnlich wie die Injektion von Mx-FN-cKO-MSCs führte auch die Injektion von MSCs aus Osx-FN-cKO Tieren dazu, dass weder das Tumorstadium, noch dessen Gewicht, von diesen Stromazellen in Vergleich zu B16-Tumoren weiter verringert wurde (Abbildung 23). Da der Mx-Promotor in Zellen osteogener Abstammung aktiv ist (Panaroni et al., 2014; Park et al., 2012), beinhalten Mx-MSCs also vermutlich die Osx-Population, was die Ähnlichkeit der Resultate bei der Nutzung dieser Zellen erklärt.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass das Fibronectin der Mx- und der Osx-Subpopulation in MSCs notwendig ist, das Tumorstadium effizient zu unterdrücken. Dies würde bedeuten, dass das Fibronectin, welches von Stromazellen produziert wird, dazu führt, das Tumorstadium einzudämmen. Dies steht im Kontrast zu dem Fibronectin, welches von Tumorzellen produziert wird und das Tumorstadium fördert, wie bereits gezeigt werden konnte (Ghura et al., 2021).

Die Auswirkung der FN-cKO-MSCs auf die infiltrierenden Immunzellen

Die Immunzellinfiltration in den Tumor wurde auch in diesen Tumoren durchflusszytometrisch analysiert, insbesondere, da Fibronectin selbst auch immunmodulatorische Eigenschaften aufweist (Hwang et al., 2015; Kelsh et al., 2014; Okamura et al., 2001; Sofat et al., 2012). Da die zuvor erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass T-Zellen keine Rolle bei der Modulation des Tumorstadiums durch MSCs spielen (Abschnitt 1.2.1.Übertragbarkeit der Inhibition des Tumorstadiums auf T-Zell-defiziente CD1nu-Tiere), jedoch Zellen des myeloiden

Immunsystems verändert waren (Abbildung 10), wurde in den folgenden Versuchen der Fokus auf die Analyse von myeloiden Immunzellen gelegt (Abbildung 24).

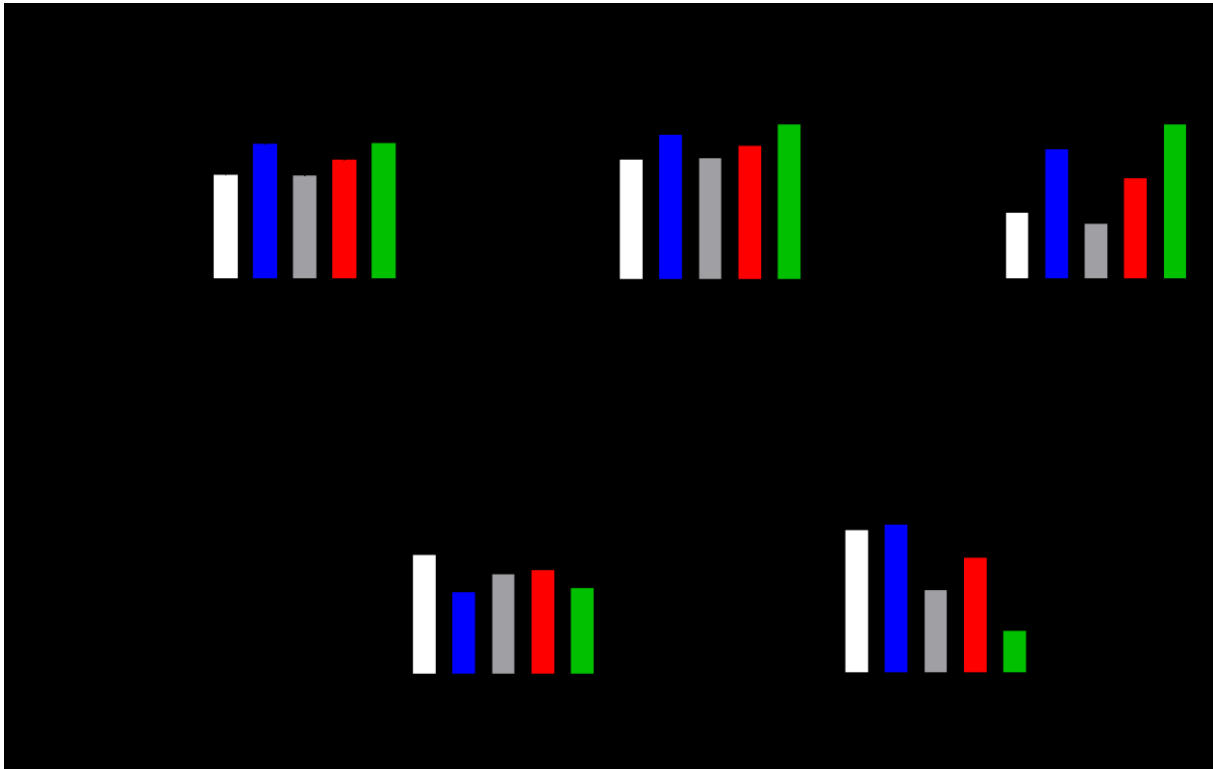


Abbildung 24: Immunzellinfiltration bei der Injektion von Fibronektin-cKO-MSCs in immunkompetenten CD1nu-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 MSCs in die Flanke von immunkompetenten CD1nu-Mäusen injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie bestimmt. (A) CD45⁺-Zellen (B16: 31% ± 2,77%, CT: 26,28% ± 1,98%, Col FN^{fl/fl}: 33,95% ± 5,93%, Mx FN^{fl/fl}: 26,06% ± 3,68%, Vav FN^{fl/fl}: 30,02% ± 4,82%, Osx FN^{fl/fl}: 34,21% ± 3,38%), (n=13/14/6/8/6/12). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 22,19% ± 2,26%, CT: 18,14% ± 1,59%, Col FN^{fl/fl}: 21,83% ± 3,67%, Mx FN^{fl/fl}: 18,34% ± 2,59%, Vav FN^{fl/fl}: 20,27% ± 3,37%, Osx FN^{fl/fl}: 23,38% ± 2,26%), (n=13/14/6/8/6/8/12). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 16,63% ± 2,94%, CT: 10,1% ± 1,84%, Col FN^{fl/fl}: 19,37% ± 4,2%, Mx FN^{fl/fl}: 8,4% ± 2,22%, Vav FN^{fl/fl}: 15,11% ± 4,31%, Osx FN^{fl/fl}: 22,94% ± 2,53%), (n=13/14/6/8/6/8/12). (D) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16: 7,19% ± 0,69%, CT: 9,07% ± 1,95%, Col FN^{fl/fl}: 6,27% ± 1,77%, Mx FN^{fl/fl}: 7,61% ± 1,62%, Vav FN^{fl/fl}: 7,95% ± 1,81%, Osx FN^{fl/fl}: 6,6% ± 1,27%), (n=13/14/6/8/6/8/12). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 0,83% ± 0,22%, CT: 3,58% ± 1,05%, Col FN^{fl/fl}: 3,71% ± 0,68%, Mx FN^{fl/fl}: 2,1% ± 0,76%, Vav FN^{fl/fl}: 2,9% ± 1,2%, Osx FN^{fl/fl}: 1,09% ± 0,29%), (n=12/14/6/8/6/12). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die durchflusszytometrische Analyse der Tumore ergab keine signifikante Erhöhung der infiltrierenden Immunzellen im Allgemeinen oder von CD45⁺CD11b⁺-Zellen (Abbildung 24, A-B). Auch CD45⁺Ly6C⁺-Zellen waren in allen Gruppen unverändert (Abbildung 24, D). CD45⁺F4/80⁺-Zellen infiltrierten die Tumore mit Osx-FN-cKO-MSCs in einem höheren prozentualen Anteil, als die CT-, Mx- und Vav-Gruppen (Abbildung 24, C). Wie zuvor, wurde eine Erhöhung von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen in der Gruppe mit Kontroll-MSCs festgestellt (Abbildung 24, E). Darüber hinaus war die Anzahl dieser Zellen auch in allen anderen Gruppen, die das Tumorwachstum inhibierten, also der Col- und Vav-Gruppe, erhöht. Tumore mit CT- und Col-

FN-cKO-MSCs hatten außerdem im Vergleich zur Osx-FN-cKO-MSC-Gruppe signifikant mehr dieser Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, zusammengenommen mit den Erkenntnissen der vorangegangenen Experimente, dass das Fibronektin der Mx- und Osx-Subpopulation in den isolierten MSCs für die Unterdrückung des Tumorwachstums verantwortlich ist. Dieser Effekt scheint weder von einer Erhöhung der Immunzellen, noch der Myeloidzellen im Allgemeinen abzuhängen, jedoch von einer Erhöhung der CD45⁺Ly6G⁺-Zellen.

3.3.2. Der Einfluss der Integrin β 1-Ausschaltung auf MSCs auf das Tumorwachstum

Wie bereits beschrieben (Abschnitt 1.5. Fibronektin), hat Fibronektin Bindestellen für viele Integrine, wie α 4 β 1, α 4 β 7, α 9 β 1 oder α v β 3. Die am besten beschriebene Interaktion zwischen Integrienen und Fibronektin stellt jedoch die Bindung des Integrins α 5 β 1 dar (Dalton und Lemmon, 2021; Pankov und Yamada, 2002).

Aus diesem Grund stellt die Ausschaltung von Integrienen, wie dem Integrin β 1, eine geeignete Methode dar, um zu überprüfen, wie Zellen darauf reagieren, wenn sie Fibronektin nicht mehr wahrnehmen. Da aus den Ergebnissen in Abschnitt 3.3.1.3. Die Auswirkung des Knockouts von Fibronektin in verschiedenen MSC-Subpopulationen deutlich wird, dass Fibronektin der Osx-Population die Unterdrückung des Tumorwachstums auslöst, stellt die Verwendung von konditionellen Knockout-Modellen eine Möglichkeit dar herauszufinden, auf welche Population innerhalb der isolierten MSCs dieses Fibronektin wirkt. Dementsprechend wurden MSCs aus Tieren mit den entsprechenden Genotypen gewonnen und eine mögliche Veränderung im Tumorwachstum überprüft.

3.3.2.1. *Quantifizierung der Integrin β 1-Ausschaltung in verschiedenen Integrin β 1-Knockout-MSCs*

Zunächst sollte die Ausschaltung des Integrins β 1 in den MSCs der jeweiligen konditionellen-Knockout-Tiere bestätigt werden. Hierzu wurden die isolierten MSCs mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Integrin β 1 gefärbt. Anschließend wurden die Zellen

durchflusszytometrisch untersucht und die Expression dieses Integrins quantifiziert (Abbildung 25).

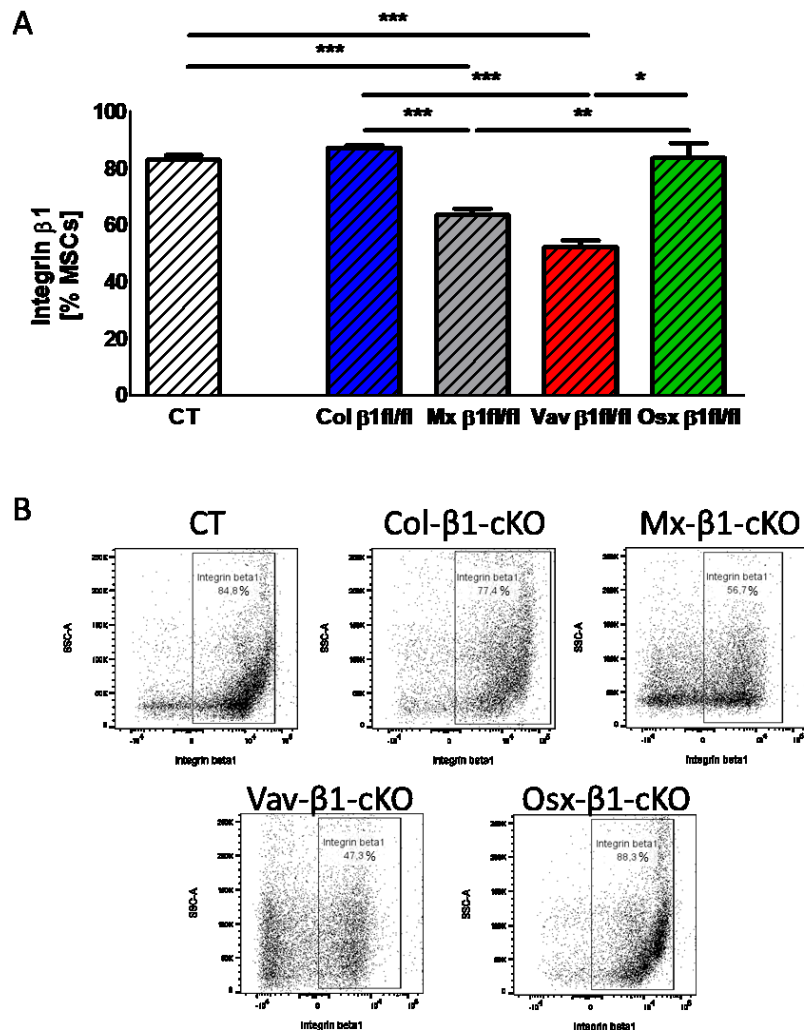


Abbildung 25: Quantifizierung der Expression an Integrin $\beta 1$ von Integrin- $\beta 1$ -cKO-MSCs mittels Durchflusszytometrie.

(A) Quantifizierung der Expression von Integrin $\beta 1$ (CT: 83,19% \pm 1,40%, Col $\beta 1^{fl/fl}$: 87,25% \pm 0,75%, Mx $\beta 1^{fl/fl}$: 63,5% \pm 2,28%, Vav $\beta 1^{fl/fl}$: 52,3% \pm 2,2%, Osx $\beta 1^{fl/fl}$: 83,6% \pm 5,28%), (n=13/10/7/2/3). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. (B) Repräsentative Darstellung der Ausschaltung des Integrins $\beta 1$ auf MSCs der unterschiedlichen cKO-Tiere.

Die Analyse der Expression von Integrin $\beta 1$ ergab, dass keine Verringerung in Col-Integrin $\beta 1$ -cKO-Tieren ersichtlich war, da dieser Promotor nicht in Stromazellen des Knochenmarks exprimiert wird (Abbildung 18). Dem gegenüber zeigten Mx-Integrin $\beta 1$ -cKO- und Vav-Integrin $\beta 1$ -cKO-MSCs eine Ausschaltung dieses Integrins auf den Zellen im Vergleich zu Kontroll-MSCs. Bei Osx-Tieren war keine Ausschaltung zu erkennen, was jedoch nicht verwunderlich ist, da die Osx-Population nur eine sehr kleine Zellpopulation ausmacht (Abbildung 18).

3.3.2.2. Die Auswirkung des Knockouts von Integrin $\beta 1$ in verschiedenen MSC-Subpopulationen

Die Auswirkung der Integrin $\beta 1$ -cKO-MSCs auf das Tumorwachstum

Im nächsten Schritt sollte getestet werden, auf welche MSC-Population das Osx-Fibronektin wirkt. Deshalb wurden MSCs aus Kontroll-Tieren, sowie den Knockouts für Col-, Mx-, Vav- und Osx-Integrin $\beta 1$, isoliert und in die Flanke von immunkompetenten CD1nu-Tieren injiziert. Am Versuchsende wurden das Tumolvolumen und -gewicht bestimmt (Abbildung 26).

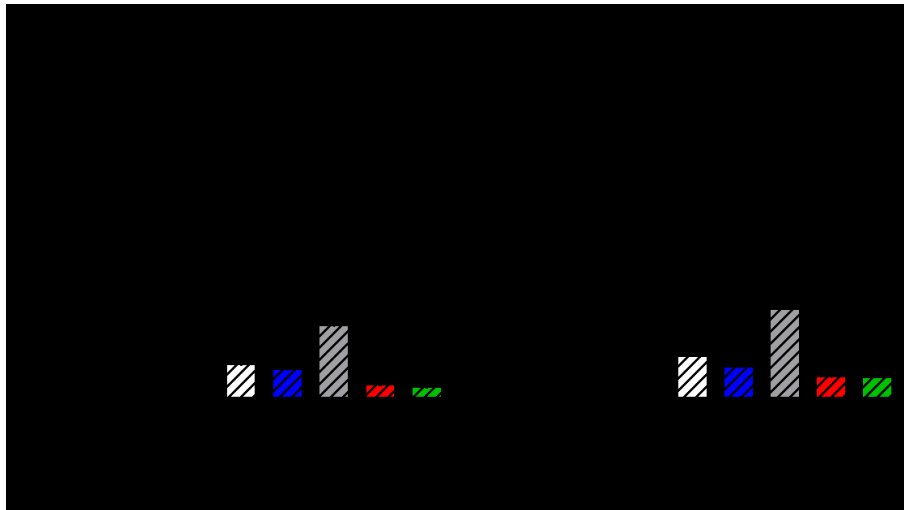


Abbildung 26: Tumorvolumen und -gewicht bei der Injektion von Integrin- $\beta 1$ -cKO-MSCs in immunkompetenten CD1nu-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 MSCs in die Flanke von immunkompetenten CD1nu-Mäusen injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: $0,1\text{cm}^3 \pm 0,026\text{cm}^3$, CT: $0,021\text{cm}^3 \pm 0,0044\text{cm}^3$, Col $\beta 1^{\text{fl/fl}}$: $0,018\text{cm}^3 \pm 0,0043\text{cm}^3$, Mx $\beta 1^{\text{fl/fl}}$: $0,045\text{cm}^3 \pm 0,012\text{cm}^3$, Vav $\beta 1^{\text{fl/fl}}$: $0,0084\text{cm}^3 \pm 0,0029\text{cm}^3$, Osx $\beta 1^{\text{fl/fl}}$: $0,0071\text{cm}^3 \pm 0,0018\text{cm}^3$), (n=17/16/9/15/12/11). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: $0,11\text{g} \pm 0,019\text{g}$, CT: $0,027\text{g} \pm 0,0045\text{g}$, Col $\beta 1^{\text{fl/fl}}$: $0,02\text{g} \pm 0,0026\text{g}$, Mx $\beta 1^{\text{fl/fl}}$: $0,056\text{g} \pm 0,012\text{g}$, Vav $\beta 1^{\text{fl/fl}}$: $0,014\text{g} \pm 0,0027\text{g}$, Osx $\beta 1^{\text{fl/fl}}$: $0,013\text{g} \pm 0,0022\text{g}$), (n=17/16/9/15/12/11). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Sowohl das Tumolvolumen (Abbildung 26, A) als auch das Tumorgewicht (Abbildung 26, B) waren bei der CT-, Col- und Vav-Integrin $\beta 1$ -cKO-Gruppe im Vergleich zu B16-Tumoren ohne MSCs signifikant reduziert. Dies war auch bei der Injektion von Osx-Integrin $\beta 1$ -cKO-MSCs der Fall. Die Ausschaltung des Integrins $\beta 1$ mittels des Mx-Promotors führte dazu, dass die resultierenden Tumore zwar ein höheres Gewicht hatten als alle anderen Gruppen mit MSC-Injektion, jedoch waren die Mx-Integrin $\beta 1$ -cKO-MSC-Tumore dennoch kleiner als B16-Tumore ohne MSCs (Abbildung 26, B).

Zusammengefasst spielt $\beta 1$ -Expression in den untersuchten Populationen keine wichtige Funktion bei der Unterdrückung des Wachstums durch MSCs.

Die Auswirkung der Integrin $\beta 1$ -cKO-MSCs auf die infiltrierenden Immunzellen

Auch in diesem Tumormodell wurden die isolierten Tumore durchflusszytometrisch auf die Tumor-infiltrierenden Immunzellen untersucht (Abbildung 27).

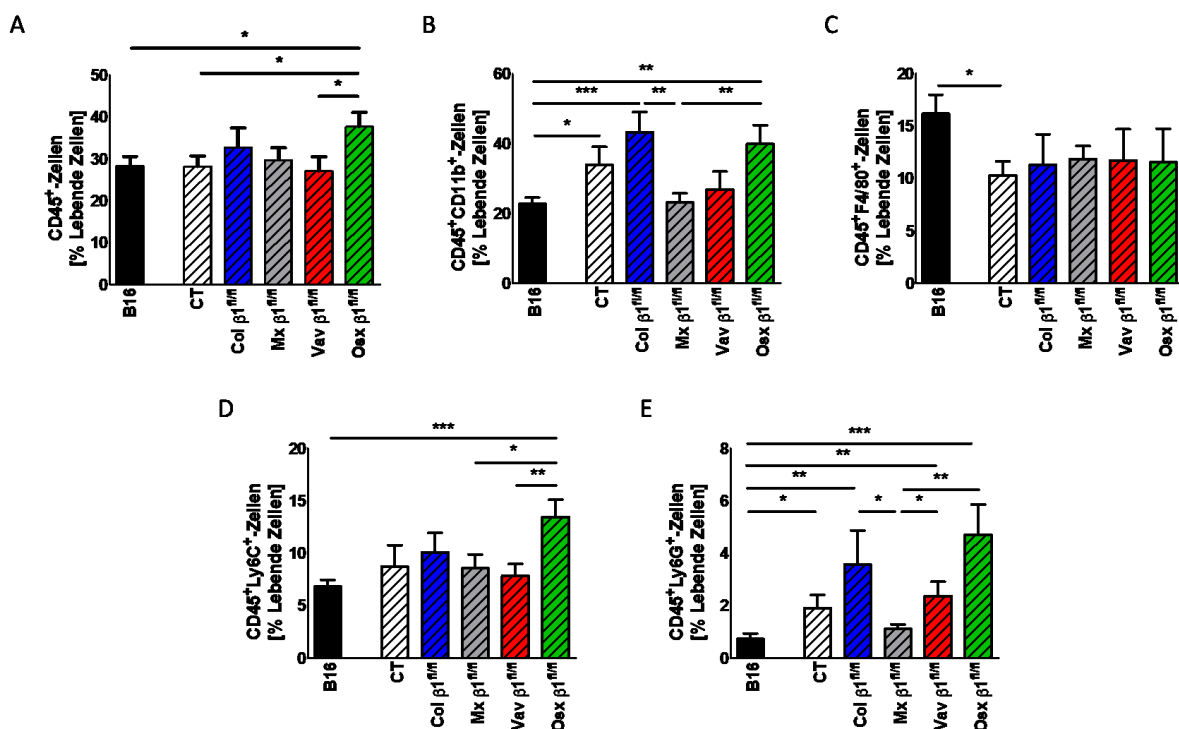


Abbildung 27: Immunzellinfiltration bei der Injektion von Integrin $\beta 1$ -cKO-MSCs in immunkompetenten CD1nu-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 MSCs in die Flanke von immunkompetenten CD1nu-Mäusen injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie ausgewertet. (A) CD45⁺-Zellen (B16: 28,19% ± 2,38%, CT: 28,14% ± 2,53%, Col $\beta 1^{fl/fl}$: 32,71% ± 4,62%, Mx $\beta 1^{fl/fl}$: 29,75% ± 2,89%, Vav $\beta 1^{fl/fl}$: 27,06% ± 3,47%, Oes $\beta 1^{fl/fl}$: 37,68% ± 3,43%), (n=17/16/9/15/12/11). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 22,7% ± 1,83%, CT: 33,89% ± 5,18%, Col $\beta 1^{fl/fl}$: 43,24% ± 5,79%, Mx $\beta 1^{fl/fl}$: 23,13% ± 2,57%, Vav $\beta 1^{fl/fl}$: 26,84% ± 5,12%, Oes $\beta 1^{fl/fl}$: 39,87% ± 5,4%), (n=17/16/9/15/12/11). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 16,19% ± 1,82%, CT: 10,3% ± 1,35%, Col $\beta 1^{fl/fl}$: 11,3% ± 2,92%, Mx $\beta 1^{fl/fl}$: 11,88% ± 1,23%, Vav $\beta 1^{fl/fl}$: 11,71% ± 3%, Oes $\beta 1^{fl/fl}$: 11,55% ± 3,21%), (n=17/16/9/15/12/11). (D) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16: 6,82% ± 0,63%, CT: 8,72% ± 2,05%, Col $\beta 1^{fl/fl}$: 10,1% ± 1,86%, Mx $\beta 1^{fl/fl}$: 8,57% ± 1,32%, Vav $\beta 1^{fl/fl}$: 7,84% ± 1,16%, Oes $\beta 1^{fl/fl}$: 13,48% ± 1,63%), (n=17/16/9/15/12/11). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 0,73% ± 0,21%, CT: 1,91% ± 0,5%, Col $\beta 1^{fl/fl}$: 3,57% ± 1,3%, Mx $\beta 1^{fl/fl}$: 1,11% ± 0,18%, Vav $\beta 1^{fl/fl}$: 2,37% ± 0,55%, Oes $\beta 1^{fl/fl}$: 4,71% ± 1,15%), (n=17/16/9/15/12/11). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die Auswertung der infiltrierenden CD45⁺- (Abbildung 27, A) und CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (Abbildung 27, D) ergab einen signifikanten Anstieg in der Osx Integrin β 1-cKO-MSC-Gruppe im Vergleich zu mehreren anderen Gruppen. Im Gegensatz dazu konnte ein erhöhter Prozentsatz von CD45⁺CD11b⁺-Zellen in den CT-, Col- und Osx- Integrin β 1-cKO-Gruppen im Vergleich zur B16-Kontrolle ohne MSCs gezeigt werden, bei denen das Wachstum verringert war, mit Ausnahme der Vav Integrin β 1-cKO-MSC-Gruppe (Abbildung 27, B). Col- und Osx- Integrin β 1-cKO-MSC-Tumore zeigten auch einen höheren Anteil von CD45⁺CD11b⁺-Zellen als Mx-Tumore (Abbildung 27, B). CD45⁺F4/80⁺-Zellen waren lediglich in der Gruppe mit Kontroll-MSCs reduziert (Abbildung 27, C). Die Analyse von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen zeigte, dass alle Gruppen, die eine Reduktion des Wachstums auslösten, eine erhöhte Anzahl dieser Immunzellen aufwiesen (Abbildung 27, E). Dies stimmt somit mit den zuvor erzielten Ergebnissen überein (Abbildung 10 und Abbildung 24).

Die Tatsache, dass das Tumorwachstum bei der Verwendung von Osx- Integrin β 1-cKO-MSCs weiterhin reduziert ist, zeigt, dass das Fibronectin aus Osx-MSCs zwar für die Unterdrückung des Tumorwachstums verantwortlich ist, jedoch auch, dass es nicht in einer autokrinen Art und Weise auf diese Population selbst wirkt. Zwar steigt das Tumorwachstum mit Mx-Integrin β 1-cKO-MSCs im Vergleich zu den anderen MSC-Gruppen an, jedoch ist das Tumorwachstum immer noch reduziert im Vergleich zur B16-Kontrolle. Dies lässt vermuten, dass das Fibronectin der Osx-Subpopulation entweder noch auf eine andere Subpopulation oder einen anderen Rezeptor wirken könnte. Die Reduktion des Tumorwachstums ging erneut in allen Gruppen mit einer Erhöhung von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen einher.

3.3.3. Die Charakterisierung der inhibitorischen MSC-Subpopulation

3.3.3.1. *Die Charakterisierung der isolierten MSCs anhand von exprimierten Markern*

Nachdem das Fibronectin der Osx-exprimierenden Population der MSCs als notwendig für die Unterdrückung des Tumorwachstums bestimmt wurde, sollte die entsprechende Population mittels Markern bestimmt werden. Hierzu wurden erneut Tiere genutzt, die den Reporter Tomato unter der Kontrolle des Osx-Promotors exprimieren. Dazu wurde das Knochenmark aus den Mäusen isoliert und mit den entsprechenden Antikörpern gegen verschiedene

Marker, die MSCs charakterisieren können, gefärbt. Hierzu gehörten Sca1 (Holmes und Stanford, 2007), CD146 (MCAM, englisch für „melanoma cell adhesion molecule“) (Bikorimana et al., 2022; Crisan et al., 2008; Shi und Gronthos, 2003), CD31 (PECAM-1, englisch für „platelet and endothelial cell adhesion molecule 1“) (Lertkiatmongkol et al., 2016), CD44 (Zhu et al., 2006), CD105 (Endoglin) (Hutton et al., 2021), Fibroblasten-Aktivierungsprotein (FAP) (Hutton et al., 2021; Kidd et al., 2012; Xing et al., 2010), CD90 (Hutton et al., 2021), Podoplanin (PDPN), (Ward et al., 2019), Leptin Rezeptor (LepR) (Zhou et al., 2014), sowie CD140a (PDGFR α , englisch für „platelet-derived growth factor receptor α “) und CD140b (PDGFR β , englisch für „platelet-derived growth factor receptor β “) (Tan et al., 2015). Das Knochenmark wurde daraufhin durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse dieser Auswertung ist in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Prozentualer Anteil der untersuchten Marker auf der Osx-Tomato⁻ und der Osx-Tomato⁺-Population in MSCs des Knochenmarks.

Stromazellen des Knochenmarks wurden isoliert und die Expression verschiedener Marker charakterisiert. (n = 4).

	CD31⁻	CD31⁺	CD44⁻	CD44⁺	CD90⁻	CD90⁺
Osx⁻	22,2 ± 2,9	74,8 ± 3,4	72,7 ± 9	27,1 ± 9	95,00 ± 1,8	4 ± 1,5
Osx⁺	34,2 ± 5,3	63,7 ± 5,5	69,3 ± 7,5	30,2 ± 7,4	93,8 ± 2,4	4,9 ± 2
	CD105⁻	CD105⁺	CD140a⁻	CD140a⁺	CD140b⁻	CD140b⁺
Osx⁻	92,2 ± 1,2	7,1 ± 1	93,6 ± 3,9	6 ± 3,7	97,9 ± 0,6	1,6 ± 0,4
Osx⁺	78,9 ± 2,2	20,4 ± 2,1	93,3 ± 3,9	6,4 ± 3,8	86,2 ± 2,9	12,3 ± 2,4
	CD146⁻	CD146⁺	LepR⁻	LepR⁺	FAP⁻	FAP⁺
Osx⁻	98,2 ± 1	1,6 ± 1	99,7 ± 0,1	0,3 ± 0,1	95,3 ± 2	4,3 ± 1,7
Osx⁺	95,8 ± 0,6	3,1 ± 0,6	90,1 ± 3,3	8,4 ± 2,9	78,7 ± 4,9	19 ± 4,5
	PDPN⁻	PDPN⁺	Sca1⁻	Sca1⁺		
Osx⁻	95,3 ± 2	4,3 ± 1,7	93,3 ± 1,7	6,3 ± 1,5		
Osx⁺	94,2 ± 1,3	5,4 ± 1,2	87,8 ± 2,8	12,7 ± 2,8		

Keiner der Marker war ausschließlich auf der Osx⁻- oder Osx⁺-Population exprimiert (Tabelle 8). Ein Großteil der Osx⁺-Zellen exprimierte CD31. CD44 war auf etwa einem Drittel der Zellen exprimiert und sowohl CD105 als auch FAP waren auf ca. 20% der Zellen zu finden. Während der CD140b und der Sca1-Marker noch auf über 10% aller Zellen exprimiert war, waren alle übrigen Marker (CD90, CD140a, CD146, LepR und PDPN) auf weniger als einem Zehntel der

Osx⁺-Zellen repräsentiert. Eine repräsentative Darstellung der Expression der entsprechenden Marker auf der Osx-Tomato-Population ist in Abbildung 28 gezeigt.

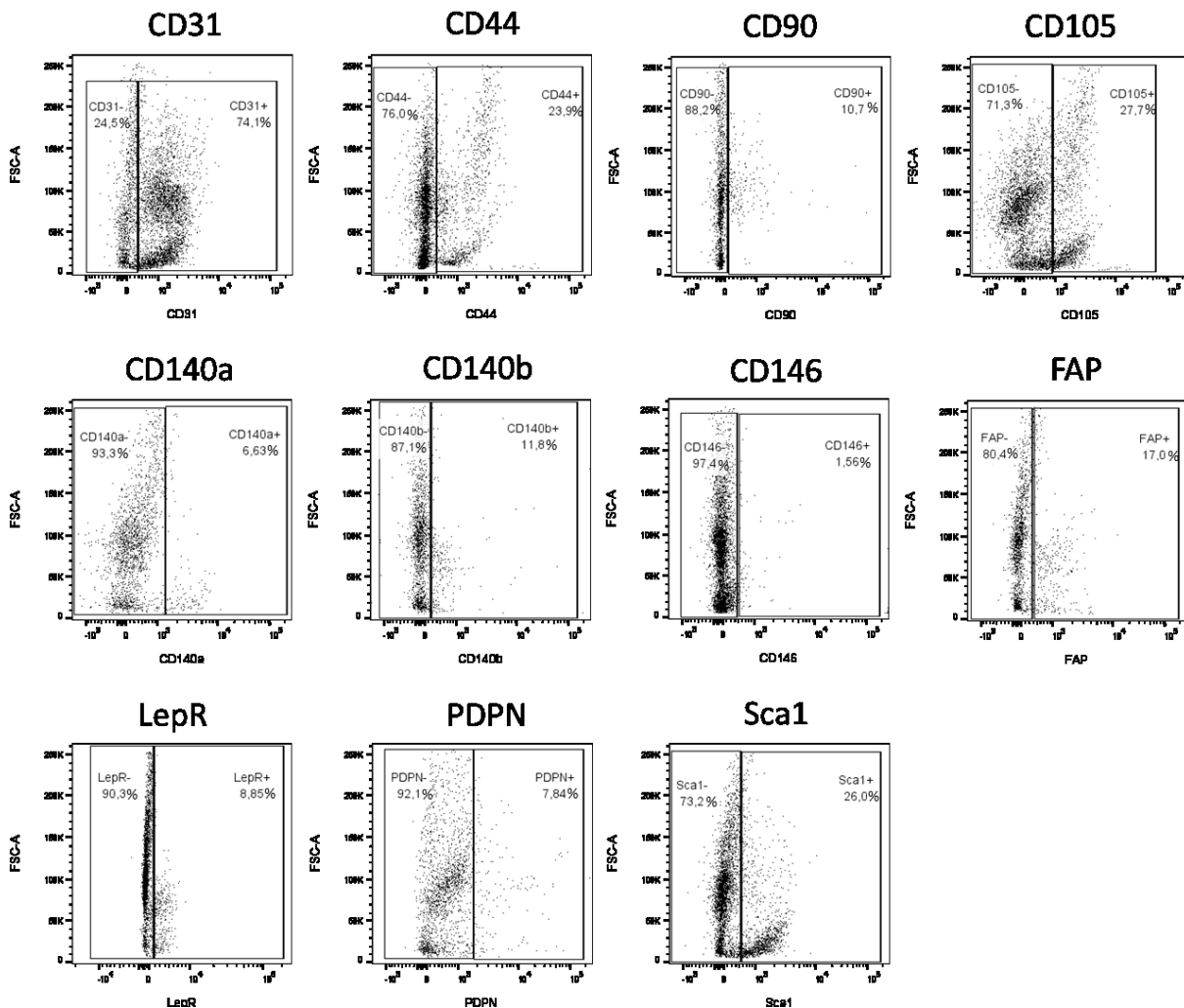


Abbildung 28: Repräsentative Darstellung der Expression der untersuchten Marker auf Osx-Tomato-MSCs.

MSCs wurden aus Osx-dTomato-Tieren isoliert und mit Antikörpern gegen die Marker CD31, CD44, CD90, CD105, CD140a, CD140b, CD146, FAP, LepR, PDPN und Sca1 gefärbt. Die MSCs wurden daraufhin im Durchflusszytometer auf die Expression der genannten Marker überprüft. (n = 4).

3.3.3.2. Die Wirkung bestimmter MSC-Subpopulationen auf das Tumorwachstum

Ziel war anhand der Oberflächenmarker eine MSC-Population zu sortieren, die für die Unterdrückung des Tumorwachstums zuständig ist. Aus diesem Grund wurden MSCs mittels fluoreszierender Antikörper in verschiedene Subpopulationen sortiert und subkutan mit B16-Zellen injiziert.

3.3.3.2.1. CD146

Der Einfluss der CD146⁻- und CD146⁺-MSC-Subpopulationen auf das Tumorwachstum

Als erstes sollte unsere Methode der Zellsortierung überprüft werden. Die Zellsortierung kann Zellen nämlich beeinflussen, indem stressbedingt die MAPK p38 aktiviert wird (Andrä et al., 2020) und kann beispielsweise das Verhalten von MSCs in Bezug auf ihre Überlebens- und Proliferationsfähigkeit oder ihr Verhalten in der Chemotaxis, bzw. Migration verändern (Li et al., 2013). Deshalb wurden als Kontrolle CD146⁻ und CD146⁺-Zellen sortiert, da dieser Marker von allen untersuchten Markern am wenigsten auf der Osx-Population exprimiert war (Tabelle 8).

CD146 wird vom Endothel, Immunzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen exprimiert (Elshal et al., 2007; Pickl et al., 1997; Wang et al., 2020), kann jedoch auch auf MSCs vorhanden sein (Bikorimana et al., 2022; Crisan et al., 2008; Shi und Gronthos, 2003). CD146⁻- und CD146⁺-Zellen wurden sortiert und mit B16-Zellen subkutan injiziert, woraufhin zunächst das Tumolvolumen und das Tumorgewicht bestimmt wurden (Abbildung 29).

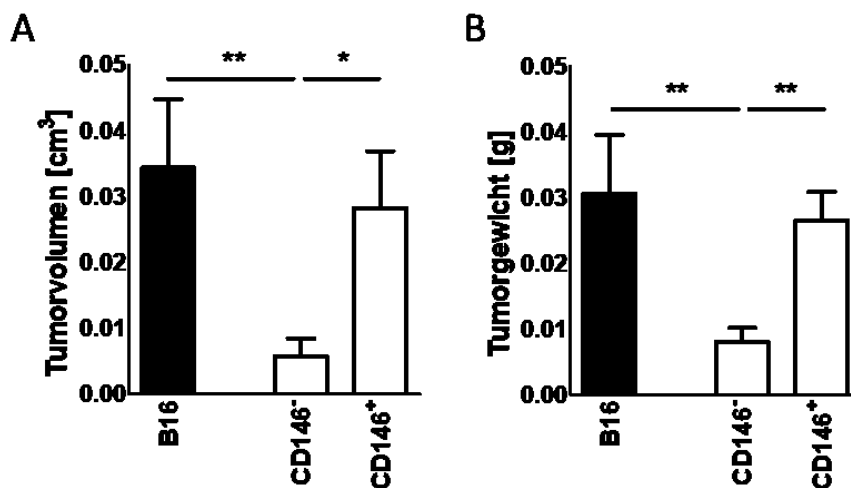


Abbildung 29: Tumolvolumen und -gewicht bei der Injektion der CD146-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: 0,034cm³ ± 0,01cm³, CD146⁻: 0,0058cm³ ± 0,0027cm³, CD146⁺: 0,028cm³ ± 0,0086cm³), (n=4/10/9). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: 0,031g ± 0,009g, CD146⁻: 0,008g ± 0,0021g, CD146⁺: 0,026g ± 0,0044g), (n=4/10/9). *p<0,05, **p<0,01.

Die Injektion von CD146⁻-MSCs, die den größten Teil der Osx-Subpopulation beschrieb, führte zu einer Verringerung des Tumorwachstums in Form von Tumolvolumen (Abbildung 29, A) und Tumorgewicht (Abbildung 29, B), während dies bei der Injektion von CD146⁺-Zellen ausblieb. Damit hemmt die CD146⁻-Population, wie erwartet, das Tumorwachstum. Die Sortierung scheint also das inhibitorische Potential der MSCs nicht zu beeinflussen.

Der Einfluss der CD146⁻- und CD146⁺-MSC-Subpopulationen auf die infiltrierenden Immunzellen

Um die Infiltration von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen zu überprüfen, wurde auch in dieser Versuchsreihe die Immunzellzusammenstellung in den Tumoren durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 30).

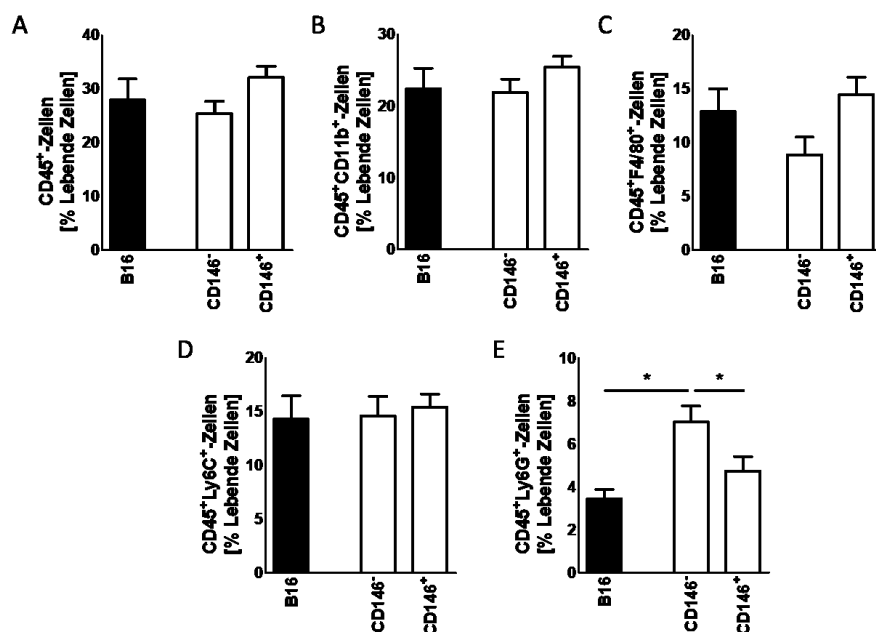


Abbildung 30: Immunzellinfiltration bei der Injektion der CD146-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie bestimmt. (A) CD45⁺-Zellen (B16: 27,95% ± 3,94%, CD146⁻: 25,42% ± 2,3%, CD146⁺: 32,14% ± 2,08%), (n=4/10/9). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 22,45% ± 2,86%, CD146⁻: 21,93% ± 1,85%, CD146⁺: 25,47% ± 1,52%), (n=4/10/9). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 12,92% ± 2,12%, CD146⁻: 8,89% ± 1,63%, CD146⁺: 14,49% ± 1,62%), (n=4/10/9). (D) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16: 14,33% ± 2,16%, CD146⁻: 14,62% ± 1,82%, CD146⁺: 15,43% ± 1,23%), (n=4/10/9). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 3,44% ± 0,44%, CD146⁻: 7,02% ± 0,75%, CD146⁺: 4,74% ± 0,68%), (n=4/10/9). *p<0,05.

Wie bereits zuvor konnten keine Unterschiede zwischen der Infiltration von CD45⁻, CD45⁺CD11b⁻, CD45⁺F4/80⁻ oder CD45⁺Ly6C⁺-Zellen ermittelt werden (Abbildung 30, A-D). Dem gegenüber war die Infiltration von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen bei der Injektion von CD146⁻-MSCs, die auch das Wachstum inhibierten, im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht (Abbildung 30, E). Daraus kann gefolgert werden, dass auch die Infiltration von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen spezifisch von der injizierten MSC-Subpopulation abhängt.

3.3.3.2.2. Sca1

Der Einfluss der Sca1⁻- und Sca1⁺-MSC-Subpopulationen auf das Tumorwachstum

Aufgrund der Tatsache, dass die Injektion von Sca1⁺-Stromazellen aus dem Knochenmark in Vorarbeiten das Wachstum von MDA-Brustkrebstumoren in der Tibia inhibierte, wurden auch Sca1⁻ und Sca1⁺-Zellen untersucht (Rossnagl et al., 2018). Sca1 stellt einen Marker für Stammzellen in verschiedenen Geweben dar, wie auch im Knochen (Holmes und Stanford, 2007). Zunächst wurde wieder das Tumolvolumen und -gewicht zum Versuchsende von Sca1⁻- und Sca1⁺-MSCs bestimmt (Abbildung 31).

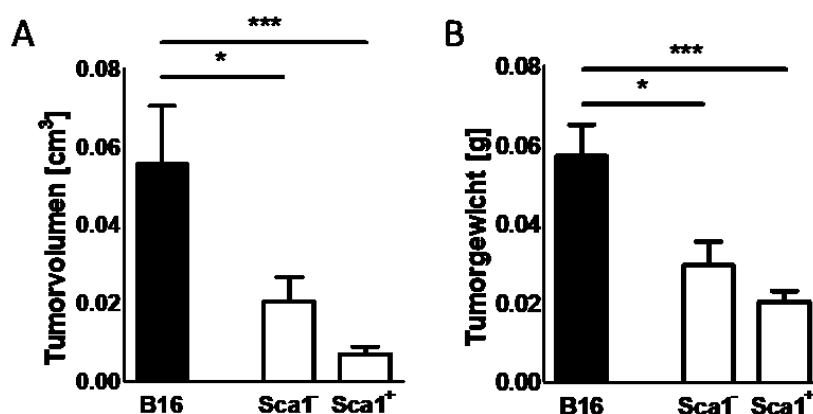


Abbildung 31: Tumolvolumen und -gewicht bei der Injektion der Sca1-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: 0,056cm³ ± 0,015cm³, Sca1⁻: 0,02cm³ ± 0,0063cm³, Sca1⁺: 0,0071cm³ ± 0,0019cm³), (n=5/11/10). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: 0,057g ± 0,008g, Sca1⁻: 0,0296g ± 0,0059g, Sca1⁺: 0,0204g ± 0,0027g), (n=5/11/10). *p<0,05, ***p<0,001.

Die Auswertung des Tumorzvolumens (Abbildung 30, A) und des Tumorgewichts (Abbildung 30, B) ergaben, dass sowohl Zellen, die den Sca1-Marker nicht exprimierten, als auch Zellen, die diesen Marker exprimierten dazu in der Lage sind, das Tumorzvolumen zu verringern. Zwischen diesen beiden MSC-Subpopulationen konnten außerdem keine statistisch relevanten Unterschiede festgestellt werden.

Der Einfluss der Sca1⁻- und Sca1⁺-MSC-Subpopulationen auf die infiltrierenden Immunzellen

Die infiltrierenden myeloiden Immunzellen in den Tumoren wurden durchflusszytometrisch untersucht. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung sind in Abbildung 32 wiedergegeben.

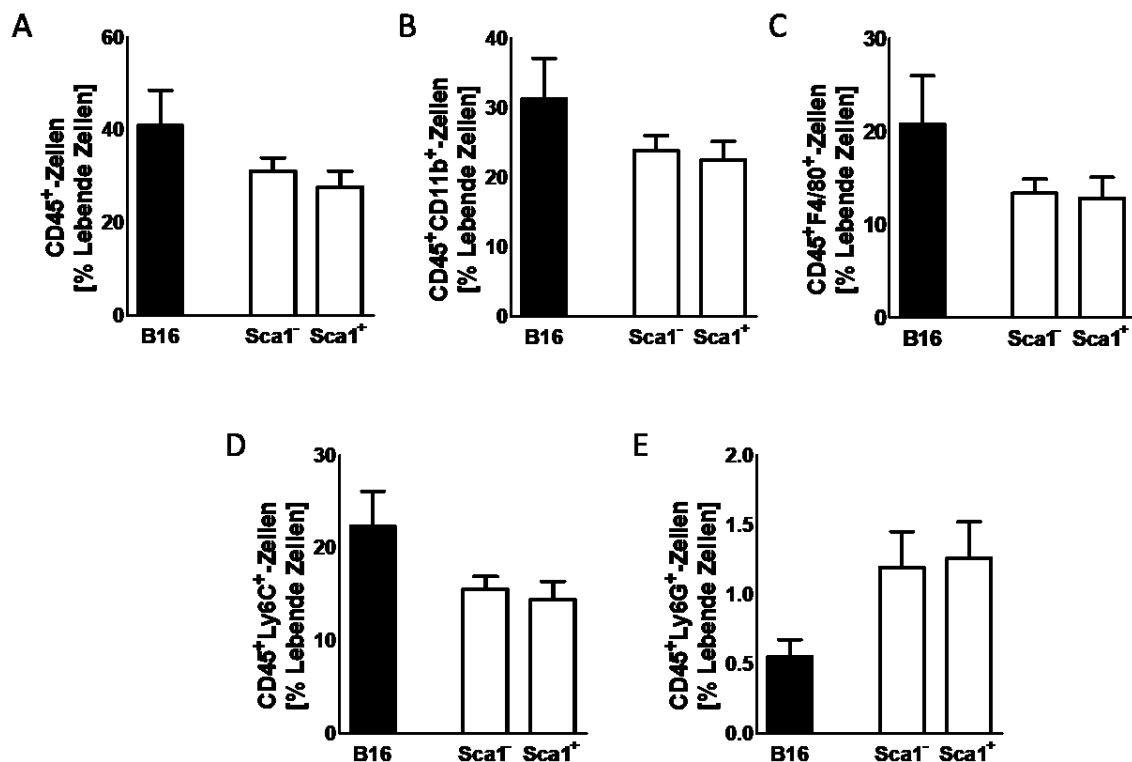


Abbildung 32: Immunzellinfiltration bei der Injektion der Sca1-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie bestimmt (A) CD45⁺-Zellen (B16: 40,96% ± 7,61%, Sca1⁻: 31,16% ± 2,87%, Sca1⁺: 27,67% ± 3,48%), (n=5/11/10). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 31,32% ± 5,81%, Sca1⁻: 23,9% ± 2,1%, Sca1⁺: 22,55% ± 2,63%), (n=5/11/10). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 20,78% ± 5,22%, Sca1⁻: 13,35% ± 1,51%, Sca1⁺: 12,79% ± 2,28%), (n=5/11/10). (D) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16: 22,4% ± 3,71%, Sca1⁻: 15,53% ± 1,42%, Sca1⁺: 14,44% ± 1,96%), (n=5/11/10). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 0,55% ± 0,13%, Sca1⁻: 1,2% ± 0,26%, Sca1⁺: 1,26% ± 0,26%), (n=5/11/10).

Die Auswertung der Immunzellzusammenstellung in den Tumoren mit Sca1⁻- und Sca1⁺-MSCs ergab keine Unterschiede zwischen der Infiltration der verschiedenen getesteten Populationen, wobei CD45⁺Ly6G⁺-Zellen dennoch im Vergleich zur B16-Kontrolle einen nicht-signifikanten Anstieg zeigten (Abbildung 32, A-E).

Damit konnten zwar die Ergebnisse der Vorarbeiten reproduziert werden, dass Sca1-exprimierende Stromazellen das Tumorstadium unterdrücken können (Rosnagl et al., 2018), jedoch haben auch Sca1⁻-Zellen das Potential dazu.

3.3.3.2.3. CD31

Der CD31-Marker ist auf dem größten Anteil der Osx-Population exprimiert (Tabelle 8) und wurde deshalb zur Untersuchung ausgewählt. CD31 wird auf verschiedenen Zellarten exprimiert, wie beispielsweise auf hämatopoetischen Stammzellen (Baumann et al., 2004), Granulozyten, Monozyten oder Blutplättchen (Lertkiatmongkol et al., 2016). Meist wird dieser Marker jedoch für die Identifikation von Zellen endothelialen Ursprungs genutzt, die einen Teil des Stromas des Knochenmarks ausmachen (Lertkiatmongkol et al., 2016).

Der Einfluss der CD31⁻- und CD31⁺-MSC-Subpopulationen auf das Tumorstadium

Es wurden entweder sortierte CD31⁻- oder CD31⁺-MSCs mit B16-Melanomzellen injiziert. Am Versuchsende wurden das Tumorstadium und -gewicht bestimmt (Abbildung 33).

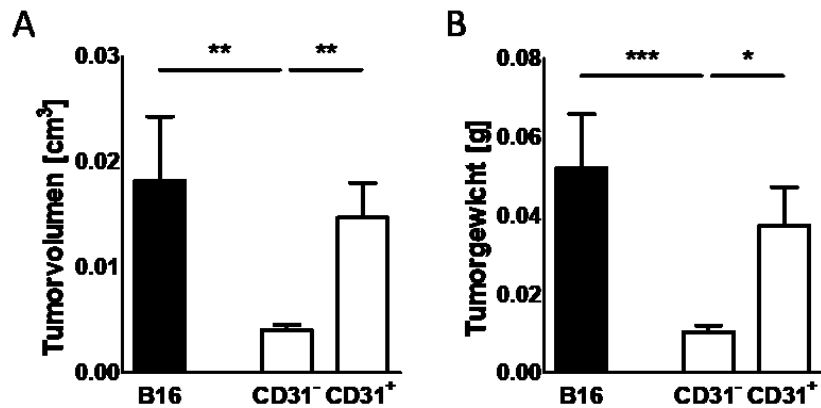


Abbildung 33: Tumorzellen und -gewicht bei der Injektion der CD31-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: 0,018cm³ ± 0,0061cm³, CD31⁻: 0,0041cm³ ± 0,00049cm³, CD31⁺: 0,015cm³ ± 0,0033cm³), (n=4/10/9). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: 0,052g ± 0,014g, CD31⁻: 0,01g ± 0,0017g, CD31⁺: 0,037g ± 0,0097g), (n=4/10/9). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Das Tumorwachstum von der CD31⁻-MSC-Subpopulation wurde inhibiert, was bei der CD31-exprimierenden-Population ausblieb (Abbildung 33). Dementsprechend ergibt sich, dass die CD31⁻-Population für die Inhibition des Tumors verantwortlich ist.

Der Einfluss der CD31⁻- und CD31⁺-MSC-Subpopulationen auf die infiltrierenden Immunzellen

Die Immunzellinfiltration in den Tumor wurde auch an dieser Stelle untersucht (Abbildung 34).

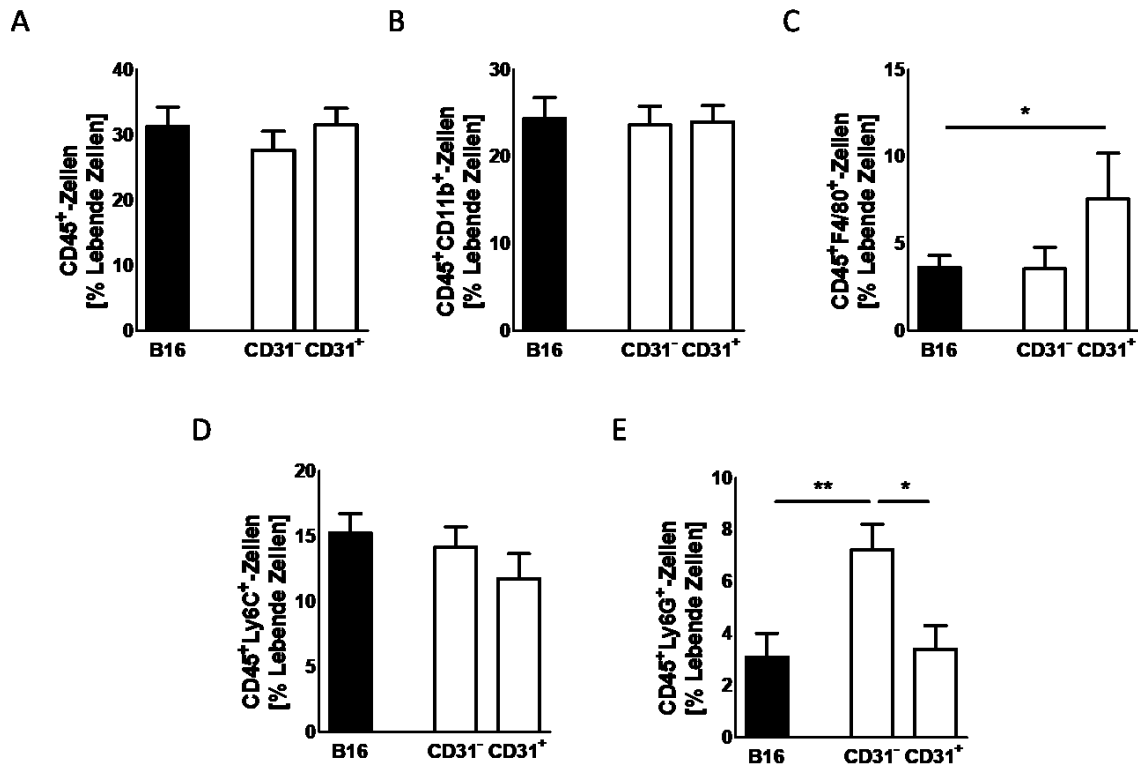


Abbildung 34: Immunzellinfiltration bei der Injektion der CD31-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie bestimmt (A) CD45⁺-Zellen (B16: 31,45% ± 6,87%, CD31⁻: 28,68% ± 3,22%, CD31⁺: 32,74% ± 2,49%), (n=4/10/9). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 25,43% ± 5,35%, CD31⁻: 24,85% ± 2,19%, CD31⁺: 24,94% ± 1,8%), (n=4/10/9). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 2,33% ± 1,89%, CD31⁻: 5,96% ± 2,17%, CD31⁺: 8,37% ± 2,8%), (n=4/10/9). (D) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16: 13,93% ± 2,17%, CD31⁻: 14,79% ± 2,12%, CD31⁺: 11,93% ± 2,12%), (n=4/10/9). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 2,3% ± 1,019%, CD31⁻: 8,96% ± 1,11%, CD31⁺: 4,4% ± 1,12%), (n=4/10/9). *p<0,05, **p<0,01.

Keine Unterschiede bezüglich der Infiltration von CD45⁺-, CD45⁺CD11b⁺- oder CD45⁺Ly6C⁺-Zellen konnten festgestellt werden (Abbildung 34, A, B, D). Es konnte jedoch eine Erhöhung der Einwanderung von CD45⁺F4/80⁺-Zellen bei CD31⁺-MSC-Tumoren, die das Wachstum nicht unterdrücken, gezeigt werden (Abbildung 34, C). Erneut konnte der Anstieg der CD45⁺Ly6G⁺-Zellen bei der Injektion von CD31⁻-MSCs, die das Tumorstadium hemmen, gezeigt werden (Abbildung 34, E).

Damit konnte gezeigt werden, dass sich die Tumor-inhibierende Population der MSCs in der CD31⁻-Subpopulation befindet.

3.3.3.2.4. CD44

Der Einfluss der CD44⁻ und CD44⁺-MSC-Subpopulationen auf das Tumorwachstum

CD44 ist, wie CD31, auf hämatopoetischen Stammzellen (Cao et al., 2016) und Endothelzellen (Xu et al., 1994) zu finden. Jedoch wird CD44 auch von Stromazellen exprimiert (Zhu et al., 2006). CD44 wird der Hyaluronsäurerezeptor genannt, kann jedoch auch Fibronectin binden (Wirth et al., 2020). Da CD44 zum einen den zweithäufigsten Marker auf der Osx-Population darstellt (Tabelle 8) und da zum anderen überprüft werden sollte, ob das Wachstum bei Zellen endothelialen Ursprungs ausbleibt, wurden auch CD44⁻ und CD44⁺-MSCs sortiert, injiziert und die entstehenden Tumore am Versuchsende gemessen (Abbildung 35).

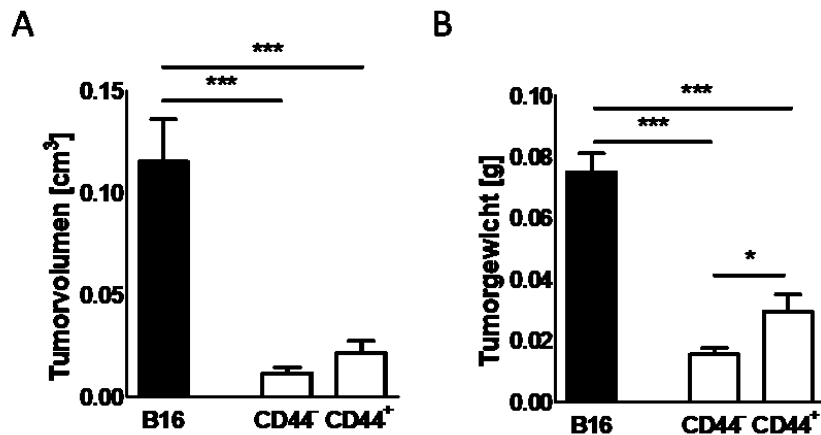


Abbildung 35: Tumolvolumen und -gewicht bei der Injektion der CD44-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: 0,12cm³ ± 0,021cm³, CD44⁻: 0,012cm³ ± 0,0029cm³, CD44⁺: 0,021cm³ ± 0,0061cm³), (n=6/9/9). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: 0,075g ± 0,0062g, CD44⁻: 0,016g ± 0,0021g, CD44⁺: 0,03g ± 0,0055g), (n=6/9/9). *p<0,05, ***p<0,001.

Sowohl MSCs, die CD44 exprimieren, als auch MSCs, die CD44 nicht exprimieren unterdrücken das Tumorwachstum. Die CD44⁻-Population zeigte nur beim Gewicht eine stärkere Inhibition (Abbildung 35).

Der Einfluss der CD44⁻ und CD44⁺-MSC-Subpopulationen auf die infiltrierenden Immunzellen

Auch bei der Nutzung dieser Stromazellen wurde die Immunzellinfiltration evaluiert (Abbildung 36).

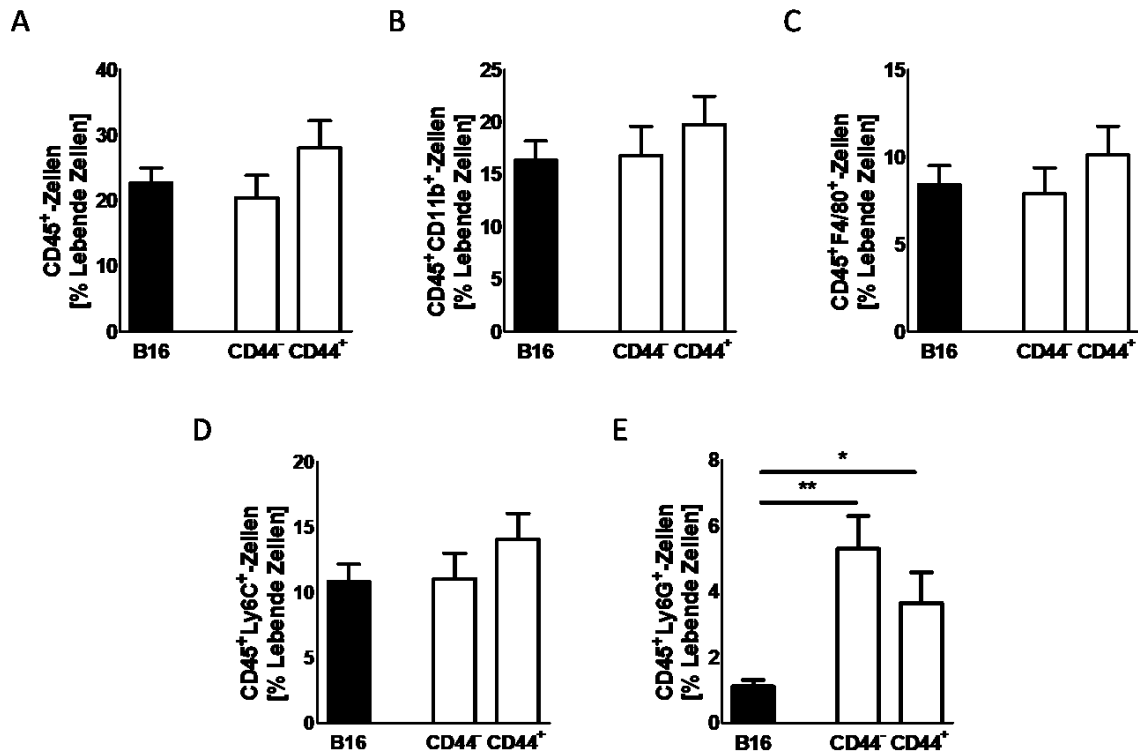


Abbildung 36: Immunzellinfiltration bei der Injektion der CD44-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie bestimmt (A) CD45⁺-Zellen (B16: 22,73% ± 2,25%, CD44⁻: 20,43% ± 3,43%, CD44⁺: 28,03% ± 4,16%), (n=6/9/9). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 16,35% ± 1,85%, CD44⁻: 16,83% ± 2,77%, CD44⁺: 19,74% ± 2,72%), (n=6/9/9). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 8,42% ± 1,089%, CD44⁻: 7,89% ± 1,49%, CD44⁺: 10,12% ± 1,64%), (n=6/9/9). (D) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16: 10,85% ± 1,34%, CD44⁻: 11,07% ± 1,95%, CD44⁺: 14,07% ± 1,99%), (n=6/9/9). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 1,11% ± 0,21%, CD44⁻: 5,3% ± 0,99%, CD44⁺: 3,66% ± 0,92%), (n=6/9/9). *p<0,05, **p<0,01.

Wie bereits in den zuvor gezeigten Versuchen, lag auch hier ein höherer Anteil an CD45⁺Ly6G⁺-Zellen in beiden Populationen, die das Tumorstadium hemmen, vor (Abbildung 36, E). Keine Änderungen fanden sich bei den anderen Populationen (Abbildung 36, A-D).

Durch die hier erzielten Ergebnisse ergibt sich, dass der Teil der MSCs, der das Tumorstadium hemmt, CD31⁻ ist. Auch die verstärkte Einwanderung von CD45⁺Ly6G⁺-Immunzellen konnte in allen Gruppen gezeigt werden, die das Tumorstadium hemmt. Die

inhibitorische MSC-Population scheint jedoch durch die Sortierung in Sca1⁻- und Sca1⁺-, bzw. CD44⁻- und CD44⁺-Zellen nur aufgeteilt zu werden, weshalb eine inhibierende Wirkung von all diesen Populationen ausgeht.

3.3.3.2.5. CD31⁻CD44

Der Einfluss der CD31⁻CD44⁻- und CD31⁻CD44⁺-MSC-Subpopulationen auf das Tumorstadium

Die CD31⁻-MSC-Population sollte genauer charakterisiert werden. Möglicherweise könnte so eine Kombination aus Markern für eine Population ermittelt werden, die für die Tumorunterdrückung verantwortlich ist. Da CD44⁻-Zellen ein vielversprechenderes Ergebnis, als CD44⁺-Zellen abgaben, wurde zunächst die CD31⁻-MSC-Subpopulation in CD44⁻- und CD44⁺-Zellen aufgeteilt. Deshalb wurden CD31⁻CD44⁻- und CD31⁻CD44⁺-Zellen sortiert und injiziert. Es wurde erneut das Tumorstadium und -gewicht bestimmt (Abbildung 37).

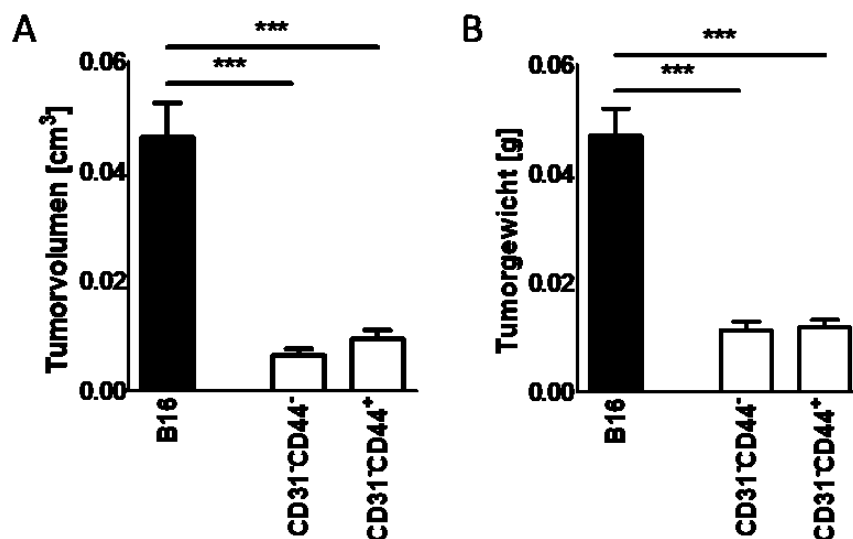


Abbildung 37: Tumorstadium und -gewicht bei der Injektion der CD31⁻CD44-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: 0,046cm³ ± 0,0062cm³, CD31⁻CD44⁻: 0,0064cm³ ± 0,0012cm³, CD31⁻CD44⁺: 0,0094cm³ ± 0,0017%), (n=6/13/10). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: 0,047g ± 0,005g, CD31⁻CD44⁻: 0,011g ± 0,0016g, CD31⁻CD44⁺: 0,012g ± 0,0014g), (n=6/13/10). ***p<0,001.

Es ergab sich ein ähnliches Bild wie bei der Injektion von CD44⁻- und CD44⁺-Zellen, da sowohl CD31⁻CD44⁻-MSCs, als auch CD31⁻CD44⁺-MSCs das Tumorwachstum hemmten (Abbildung 37). Es konnten keine Unterschiede zwischen den Populationen festgestellt werden, wodurch die Entfernung der CD31⁺-Zellen aus der CD44⁺-Population beide Populationen gleich effizient bei der Suppression des Tumors macht.

Der Einfluss der CD31⁻CD44⁻- und CD31⁻CD44⁺-MSC-Subpopulationen auf die infiltrierenden Immunzellen

Die entnommenen Tumore wurden auch durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 38).

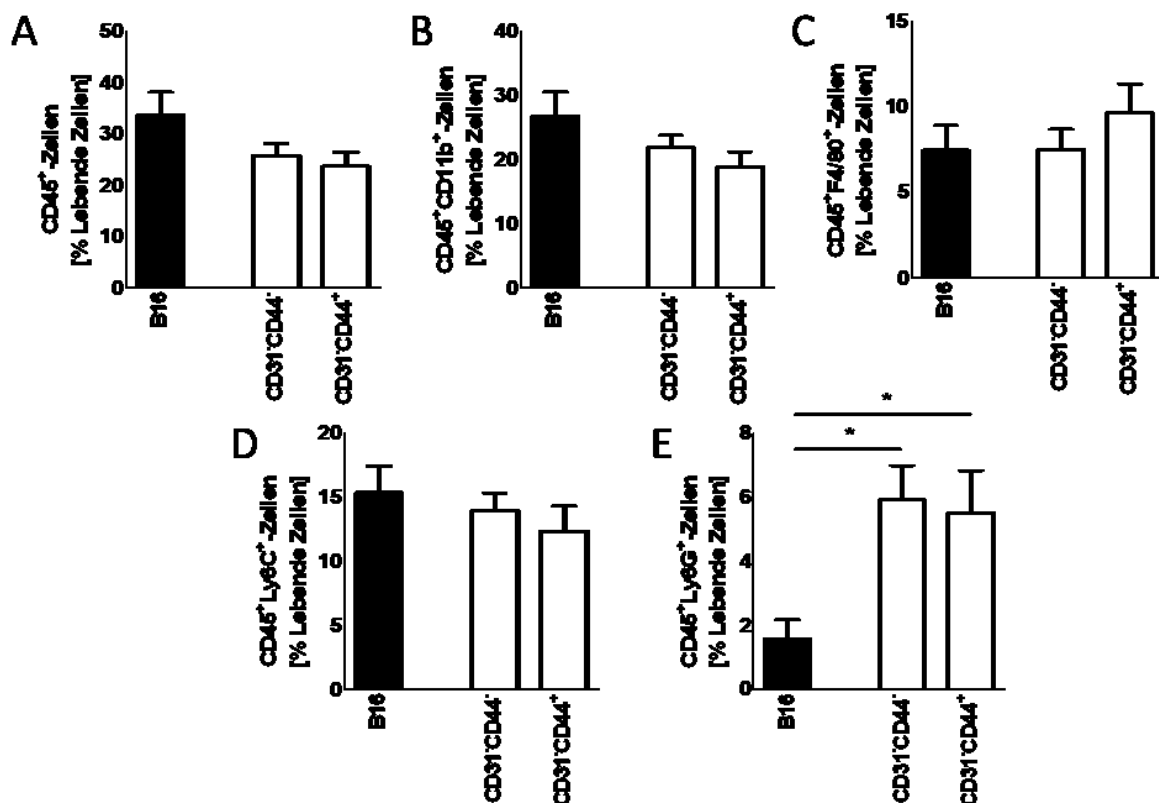


Abbildung 38: Immunzellinfiltration bei der Injektion der CD31⁻CD44⁻- und CD31⁻CD44⁺-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie bestimmt. (A) CD45⁺-Zellen (B16: 33,82% ± 4,36%, CD31⁻CD44⁻: 25,86% ± 2,37%, CD31⁻CD44⁺: 23,74% ± 2,73%), (n=6/13/10). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 26,82% ± 3,81%, CD31⁻CD44⁻: 21,91% ± 1,91%, CD31⁻CD44⁺: 18,96% ± 2,3%), (n=6/13/10). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 7,48% ± 1,45%, CD31⁻CD44⁻: 7,52% ± 1,18%, CD31⁻CD44⁺: 9,68% ± 1,69%), (n=6/13/10). (D) CD45⁺Ly6C⁻-Zellen (B16: 15,38% ± 2,06%, CD31⁻CD44⁻: 13,94% ± 1,4%, CD31⁻CD44⁺: 12,38% ± 1,94%), (n=6/13/10). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 1,58% ± 0,6%, CD31⁻CD44⁻: 5,93% ± 1,06%, CD31⁻CD44⁺: 5,52% ± 1,32%), (n=6/13/10). *p<0,05.

Wie bei der Injektion von CD44⁻ und CD44⁺-Zellen gab es keine Unterschiede bei der Infiltration von CD45⁻, CD45⁺CD11b⁻, CD45⁺Ly6C⁻ oder CD45⁺F4/80⁺-Zellen (Abbildung 38, A-D). Sowohl in CD31⁻CD44⁻, als auch in CD31⁻CD44⁺-Tumoren gab es einen höheren Prozentsatz von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (Abbildung 38, E).

3.3.3.2.6. CD31⁻CD105

Der Einfluss der CD31⁻CD105⁻ und CD31⁻CD105⁺-MSC-Subpopulationen auf das Tumorwachstum

CD105, auch Endoglin genannt, wird auf Endothelzellen (Rossi et al., 2019), aber auch auf Stromazellen exprimiert (Hutton et al., 2021; Pham et al., 2019). Er wurde auch von einem Teil der Osx-MSC exprimiert (Tabelle 8). Der Abwesenheit dieses Markers konnte bereits eine Rolle bei der Unterdrückung des Tumorwachstums zugesprochen werden (Hutton et al., 2021). Dementsprechend wurden CD31⁻CD105⁻ und CD31⁻CD105⁺-Zellen zusammen mit B16-Melanomzellen injiziert und das Tumorwachstum evaluiert (Abbildung 39).

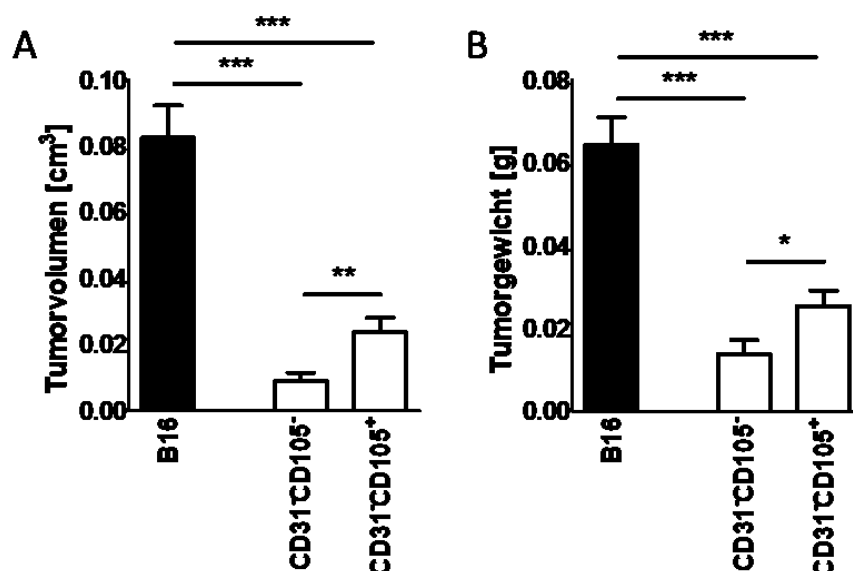


Abbildung 39: Tumolvolumen und -gewicht bei der Injektion der CD31⁻CD105-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: 0,083cm³ ± 0,0098cm³, CD31⁻CD105⁻: 0,0089cm³ ± 0,0025cm³, CD31⁻CD105⁺: 0,024cm³ ± 0,0044cm³), (n=6/12/12). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: 0,064g ± 0,0066g, CD31⁻CD105⁻: 0,014g ± 0,0035g, CD31⁻CD105⁺: 0,025g ± 0,0037g), (n=6/12/12). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Sowohl die CD31⁻CD105⁻, als auch die CD31⁻CD105⁺-MSC-Subpopulation verminderte das Tumolvolumen (Abbildung 39, A) und Tumorgewicht (Abbildung 39, B). Hierbei waren CD31⁻CD105⁻-MSCs effizienter als CD31⁻CD105⁺-MSCs.

Der Einfluss der CD31⁻CD105⁻- und CD31⁻CD105⁺-MSC-Subpopulationen auf die infiltrierenden Immunzellen

Die entstandenen Tumore wurden erneut per Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 40).

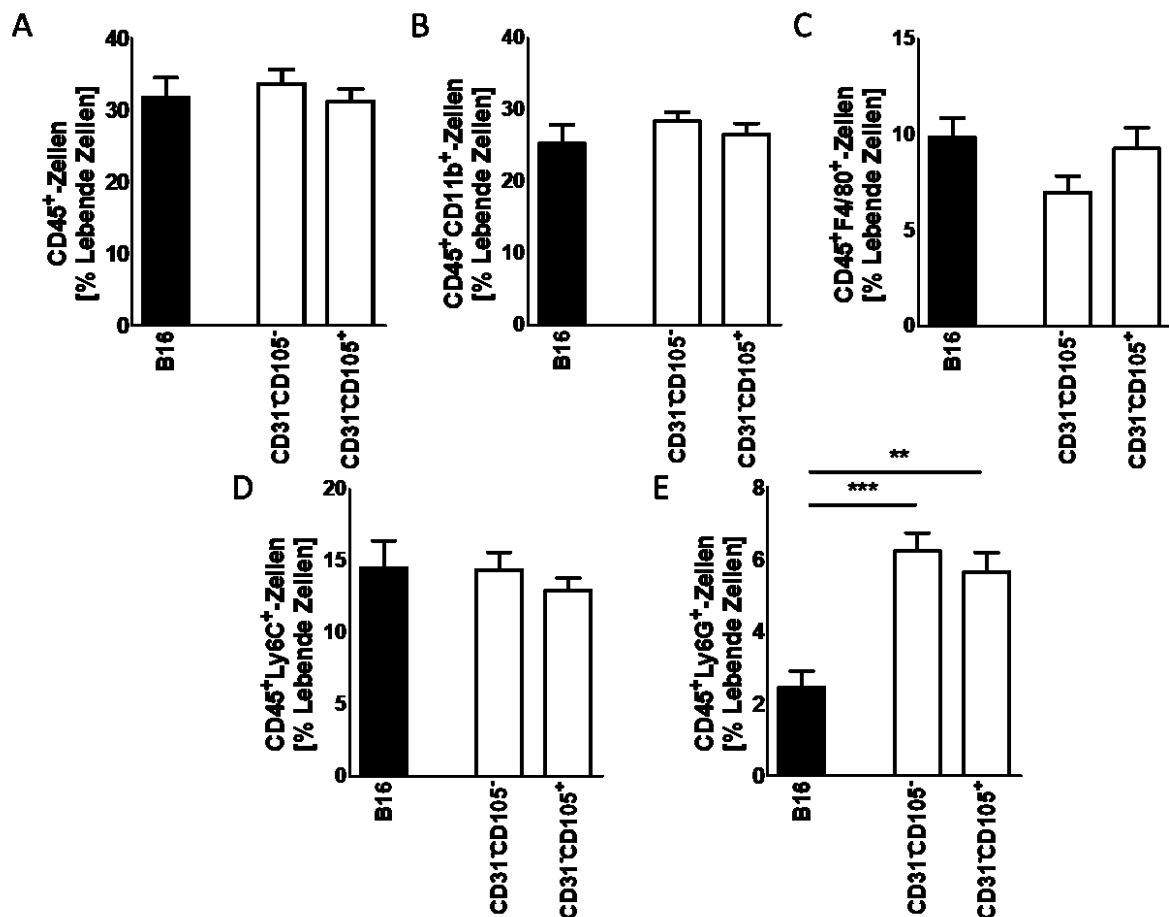


Abbildung 40: Immunzellinfiltration bei der Injektion der CD31⁻CD105⁻-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie bestimmt. (A) CD45⁺-Zellen (B16: 31,73% ± 2,74%, CD31⁻CD105⁻: 33,63% ± 1,99%, CD31⁻CD105⁺: 31,18% ± 1,77%), (n=6/12/12). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 25,28% ± 2,61%, CD31⁻CD105⁻: 28,38% ± 1,26%, CD31⁻CD105⁺: 26,58% ± 1,5%), (n=6/12/12). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 9,85% ± 1,01%, CD31⁻CD105⁻: 6,98% ± 0,85%, CD31⁻CD105⁺: 9,27% ± 1,09%), (n=6/12/12). (D) CD45⁺Ly6C⁺ (B16: 14,51% ± 1,9%, CD31⁻CD105⁻: 14,35% ± 1,24%, CD31⁻CD105⁺: 12,94% ± 0,87%), (n=6/12/12). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 2,46% ± 0,45%, CD31⁻CD105⁻: 6,24% ± 0,5%, CD31⁻CD105⁺: 5,65% ± 0,55%), (n=6/12/12). **p<0,01, ***p<0,001.

Die Auswertung der Immunzellzusammenstellung in den Tumoren mit den CD31⁻CD105⁻-CD31⁻CD105⁺-MSC-Subpopulationen ergab erneut, dass nur der Anteil der einwandernden CD45⁺Ly6G⁺-Zellen in beiden tumorunterdrückenden MSC-Gruppen erhöht war (Abbildung 40, E), wohingegen sonst keine Unterschiede vorlagen (Abbildung 40, A-D).

3.3.3.2.7. CD31⁻FAP

Der Einfluss der CD31⁻FAP⁻- und CD31⁻FAP⁺-MSC-Subpopulationen auf das Tumorwachstum

Auch der FAP-Marker war auf einem nennenswerten Teil der Osx-Population vertreten (Tabelle 8). FAP stellt einen wichtigen Marker bei der Identifikation von Stromazellen dar (Hutton et al., 2021; Kidd et al., 2012; Xing et al., 2010). Es wurden sowohl CD31⁻FAP⁻, als auch CD31⁻FAP⁺-MSCs mit Tumorzellen injiziert und das Tumorwachstum bestimmt (Abbildung 41).

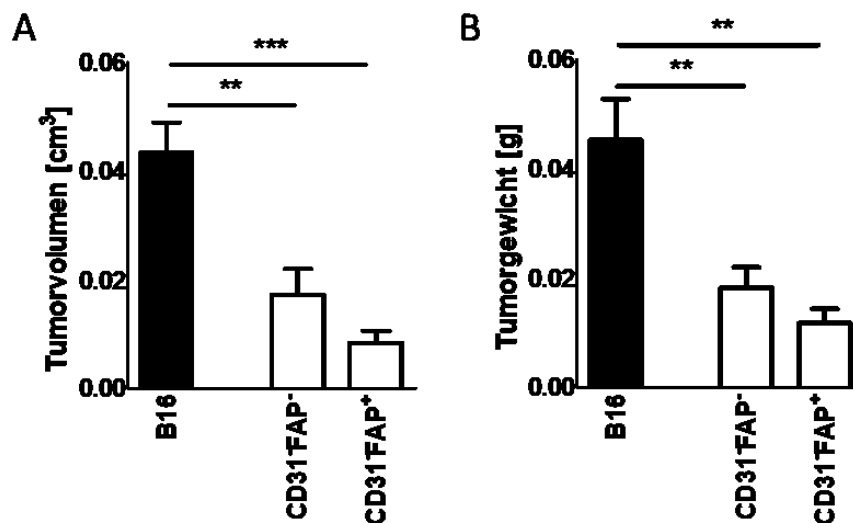


Abbildung 41: Tumorumfassen und -gewicht bei der Injektion der CD31-FAP-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert. (A) Umfassen der Tumore am Versuchsende (B16: 0,043cm³ ± 0,0055cm³, CD31⁻FAP⁻: 0,017cm³ ± 0,0047cm³, CD31⁻FAP⁺: 0,0084cm³ ± 0,0022cm³), (n=6/11/6). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: 0,045g ± 0,0075g, CD31⁻FAP⁻: 0,018g ± 0,0037g, CD31⁻FAP⁺: 0,012g ± 0,0026g), (n=6/11/6). **p<0,01, ***p<0,001.

Sowohl CD31⁻FAP⁻, als auch CD31⁺FAP⁺-MSCs reduzierten das Tumolvolumen (Abbildung 41, A) und Tumorgewicht (Abbildung 41, B) im Vergleich zur Kontrolle. Keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, die MSCs erhalten haben, war feststellbar.

Der Einfluss der CD31⁻FAP⁻- und CD31⁺FAP⁺-MSC-Subpopulationen auf die infiltrierenden Immunzellen

Erneut wurden die entstandenen Tumore mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 42).

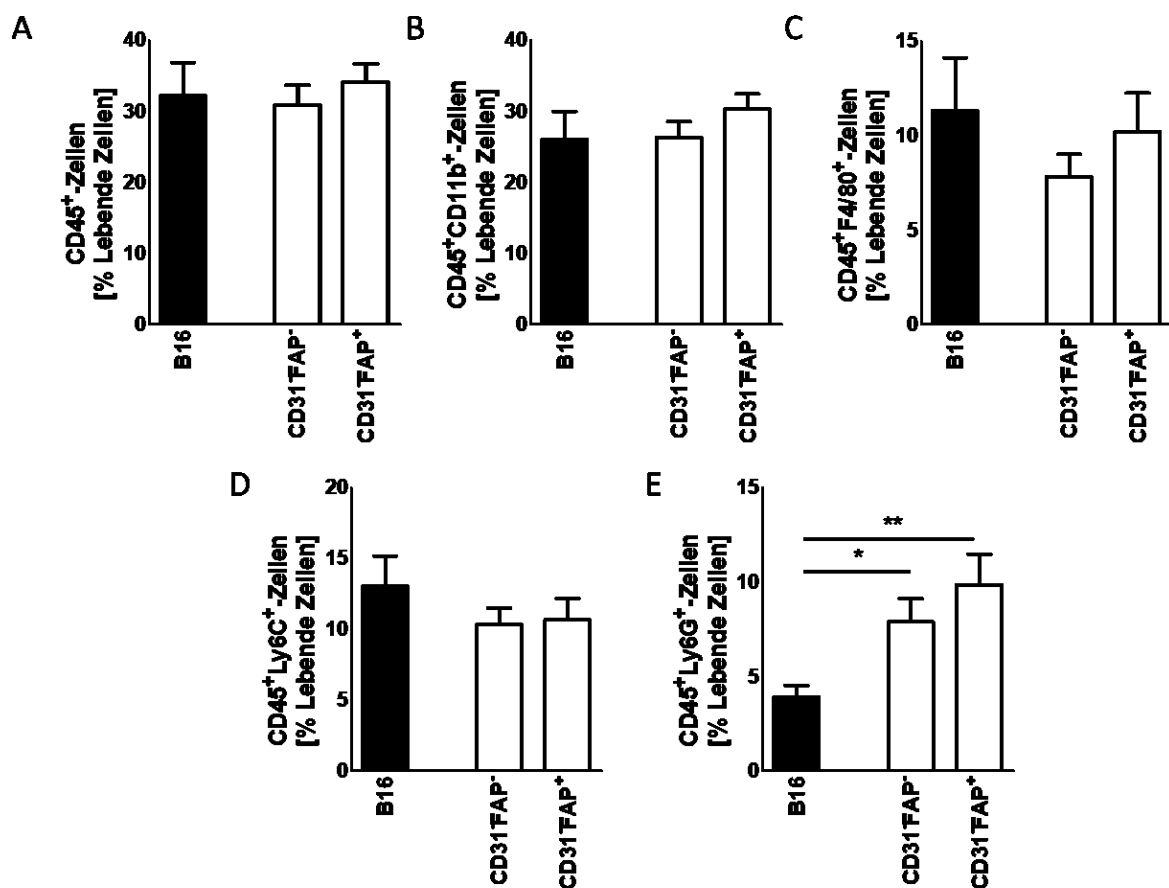


Abbildung 42: Immunzellinfiltration bei der Injektion der CD31-FAP-sortierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 sortierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie bestimmt. (A) CD45⁺-Zellen (B16: 32,22% ± 4,63%, CD31⁻FAP⁻: 30,85% ± 2,8%, CD31⁺FAP⁺: 34,1% ± 2,55%), (n=6/11/6). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 26,04% ± 3,94%, CD31⁻FAP⁻: 26,35% ± 2,21%, CD31⁺FAP⁺: 30,33% ± 2,11%), (n=6/11/6). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 11,31% ± 2,81%, CD31⁻FAP⁻: 7,82% ± 1,2%, CD31⁺FAP⁺: 10,21% ± 2,05%), (n=6/11/6). (D) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16: 13,07% ± 2,1%, CD31⁻FAP⁻: 10,32% ± 1,19%, CD31⁺FAP⁺: 10,68% ± 1,51%), (n=6/11/6). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 3,91% ± 0,63%, CD31⁻FAP⁻: 7,9% ± 1,23%, CD31⁺FAP⁺: 9,87% ± 1,61%), (n=6/11/6). *p<0,05, **p<0,01.

Erneut war ausschließlich der Anteil der einwandernden CD45⁺Ly6G⁺-Zellen in beiden tumorunterdrückenden MSC-Gruppen erhöht (Abbildung 42, E), wohingegen keine Änderungen der anderen untersuchten Populationen sichtbar waren (Abbildung 42, A-D).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Osx-Subpopulation in der CD31⁻-Population befindet. Das Fibronectin des CD31⁺-Anteils innerhalb der Osx-Population scheint hingegen keine inhibitorischen Eigenschaften zu haben. Die Reduktion des Tumorwachstums geht mit einer erhöhten Infiltration von CD45⁺Ly6G⁺-Immunzellen in allen untersuchten Modellen einher.

3.4. Der Effekt der Stimulation von MSCs mit Fibronectin

3.4.1. Die Stimulation von MSCs mit Fibronectin

Vorarbeiten haben gezeigt, dass zirkulierendes Fibronectin das Tumorwachstum begünstigt (von Au et al., 2013). Die bis zu diesem Punkt erzielten Ergebnisse zeigen jedoch, dass Fibronectin aus den MSCs das Tumorwachstum reduziert (Abbildung 23). Dementsprechend stellt sich die Frage, wie MSCs auf die externe Zugabe von Fibronectin reagieren.

3.4.1.1. *Die Auswirkung der Stimulation von MSCs mit Fibronectin auf das Tumorwachstum*

Auswirkungen der pFN-Stimulation von MSCs auf das Tumorwachstum

Um zu überprüfen, inwiefern die Zugabe von Fibronectin das Tumorwachstum beeinflusst, wurden MSCs für 24 Stunden in der Abwesenheit von FCS mit Plasmafibronectin (pFN) stimuliert. Anschließend wurden B16-Melanomzellen zusammen mit den entsprechenden MSCs in einem Verhältnis von 1:0,1 vermischt und subkutan injiziert. Am Versuchsende wurden das Tumolvolumen und -gewicht bestimmt (Abbildung 43).



Abbildung 43: Tumorvolumen und -gewicht bei der Injektion der Fibronektin-stimulierten MSCs mit B16-Tumorzellen in immunkompetenten CD1nu-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 stimulierten MSCs in die Flanke von immunkompetenten CD1nu-Tieren injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: $0,039\text{cm}^3 \pm 0,008\text{cm}^3$, CT: $0,018\text{cm}^3 \pm 0,0036\text{cm}^3$, pFN: $0,0064\text{cm}^3 \pm 0,0012\text{cm}^3$), (n=6/7/9). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: $0,033\text{g} \pm 0,0063\text{g}$, CT: $0,018\text{g} \pm 0,0026\text{g}$, pFN: $0,0077\text{g} \pm 0,0016\text{g}$), (n=6/7/9). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die unstimulierten MSCs zeigen, wie bereits zuvor festgestellt, eine inhibierende Wirkung auf das Tumorvolumen (Abbildung 43, A) und -gewicht (Abbildung 43, B). Bei der Stimulation mit pFN konnte überraschenderweise nicht nur eine Unterdrückung des Tumorwachstums gegenüber von B16-Tumoren ohne MSCs festgestellt werden, sondern eine zusätzlich verstärkte Reduktion des Tumorvolumens und Tumorgewichts gegenüber Kontroll-MSCs (Abbildung 43).

Somit kann die zusätzliche Stimulation von MSCs mit Plasmafibronektin ihr Potential das Tumorwachstum zu inhibieren noch weiter verstärken, was die Rolle von Fibronektin bei der Modulation von MSCs hervorhebt.

Auswirkungen der pFN-Stimulation von MSCs auf die infiltrierenden Immunzellen

Da zuvor festgestellt wurde, dass die Inhibition durch MSCs mit einer verstärkten Infiltration von Ly6G-exprimierenden Zellen einhergeht, wurden auch diese Tumore durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 44).



Abbildung 44: Immunzellinfiltration bei der Injektion von Fibronektin-stimulierten MSCs mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 stimulierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie ausgewertet (A) CD45⁺-Zellen (B16: 29,18% ± 4,1%, CT: 30,36% ± 5,29%, pFN: 18,07% ± 1,7%), (n=6/7/9). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 22,95% ± 3,45%, CT: 24,26% ± 4,37%, pFN: 15,1% ± 1,62%), (n=6/7/9). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 10,49% ± 1,32%, CT: 5,14% ± 0,63%, pFN: 3,32% ± 1,05%), (n=6/7/9). (D) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16: 3,35% ± 0,57%, CT: 4,12% ± 0,32%, pFN: 3,02% ± 0,48%), (n=6/7/9). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 0,78% ± 0,24%, CT: 1,22% ± 0,19%, pFN: 5,95% ± 1,39%), (n=6/7/9). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Sowohl CD45⁺-, CD45⁺CD11b⁺-, als auch CD45⁺F4/80⁺-Zellen lagen in Tumoren zu einem geringeren Anteil vor, die MSCs erhielten, die mit pFN stimuliert wurden (Abbildung 44, A-C), wobei CT-MSC-Tumore auch weniger F4/80⁺-Zellen enthielten als Tumore ohne MSCs. Es gab jedoch keine Unterschiede bei der Infiltration von CD45⁺Ly6C⁺-Zellen unter allen Gruppen (Abbildung 44, D). Der Anteil an CD45⁺Ly6G⁺-Zellen war in den kleinsten Tumoren - die Tumore mit pFN-stimulierten MSCs - verglichen mit den beiden anderen Gruppen am höchsten (Abbildung 44, E).

Dies spricht dafür, dass nicht nur die endogene Bildung von Fibronektin in der Lage ist MSCs zu beeinflussen, sondern auch, dass Fibronektin von externen Quellen MSCs modulieren kann. Der Anstieg von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen in den kleinsten Tumoren war auch hier ersichtlich.

3.4.1.2. Die Behandlung von MSCs mit einem $\alpha 5\beta 1$ -bindenden-Peptid und dem CS1-Peptid und deren Auswirkung auf das Tumorwachstum

Es sollte untersucht werden, welcher Teil Fibronektins für die Unterdrückung des Tumorwachstums verantwortlich ist. Fibronektin bindet über die RGD-Sequenz an das Integrin $\alpha 5\beta 1$ (Dalton und Lemmon, 2021; Nagae et al., 2012; Pankov und Yamada, 2002). Dies sollte mittels der Zugabe eines $\alpha 5\beta 1$ -bindenden-Peptids überprüft werden. Als Kontrolle wurde das CS1-Peptid genutzt, welches ein Teil von Fibronektin ist und mit dem Integrin $\alpha 4\beta 1$ und nicht mit dem Integrin $\alpha 5\beta 1$ interagiert (Guan und Hynes, 1990; Mould et al., 1990; Ruegg et al., 1992; Wayner et al., 1989).

Isolierte MSCs wurden für 24 Stunden entweder mit dem $\alpha 5\beta 1$ -bindenden-Peptid, dem CS1-Kontrollpeptid oder einem Scrambled (Scr, englisch für „verwürfeln“)-Peptid stimuliert. Die erhaltenen Tumore wurden daraufhin wieder am Versuchsende bezüglich des Volumens und des Gewichts untersucht (Abbildung 45).

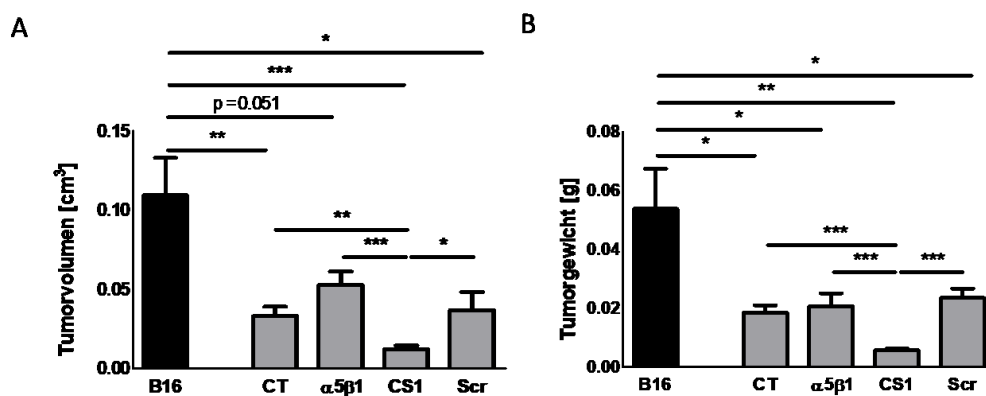


Abbildung 45: Tumorumfang und -gewicht bei der Injektion von stimulierten MSCs mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 stimulierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert. (A) Umfang der Tumore am Versuchsende (B16: $0,11\text{cm}^3 \pm 0,024\text{cm}^3$, CT: $0,033\text{cm}^3 \pm 0,0059\text{cm}^3$, $\alpha 5\beta 1$: $0,053\text{cm}^3 \pm 0,0085\text{cm}^3$, CS1: $0,012\text{cm}^3 \pm 0,0023\text{cm}^3$, Scr: $0,037\text{cm}^3 \pm 0,011\text{cm}^3$), (n=14/15/11/15/13). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16: $0,054\text{g} \pm 0,014\text{g}$, CT: $0,019\text{g} \pm 0,0025\text{g}$, $\alpha 5\beta 1$: $0,021\text{g} \pm 0,0044\text{g}$, CS1: $0,0057\text{g} \pm 0,00058\text{g}$, Scr: $0,023\text{g} \pm 0,0031\text{g}$), (n=14/15/11/15/13). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die Evaluation des Tumorumfangs (Abbildung 45, A) und des Tumorgewichts (Abbildung 45, B) ergab, dass unabhängig von der Stimulation alle Gruppen mit einer Injektion von MSCs ein geringeres Tumorwachstum aufwiesen. Überraschend war jedoch, dass das Kontroll-Peptid

CS1 nicht nur das Tumorwachstum im Vergleich zur B16-Kontrolle inhibierte, sondern auch, dass diese Tumore nochmals kleiner waren, als die der MSC-Gruppen.

Dies weist darauf hin, dass die Interaktion mit dem CS1-Peptid die Verringerung der Tumorgröße im Vergleich zu unstimulierten MSCs verstärkt, wohingegen die Interaktion mit dem $\alpha 5\beta 1$ -bindenden-Peptid keine Rolle spielt. Daher könnte es sich bei diesem Peptid um den Teil von Fibronectin handeln, der die MSCs dazu bringt, das Tumorwachstum zu hemmen.

Die Auswirkung der CS1-Stimulation von MSCs auf die infiltrierenden Immunzellen

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, inwiefern die Infiltration der Immunzellen in den Tumoren verändert ist, in denen CS1-stimulierte MSCs mit B16-Zellen injiziert wurden. Hierfür wurden Tumore mit Scr- und CS1-stimulierten MSCs untersucht, da das Integrin $\alpha 5\beta 1$ -bindende Peptid keinen Effekt zeigte. Hierfür wurden die Tumore erneut durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 46).

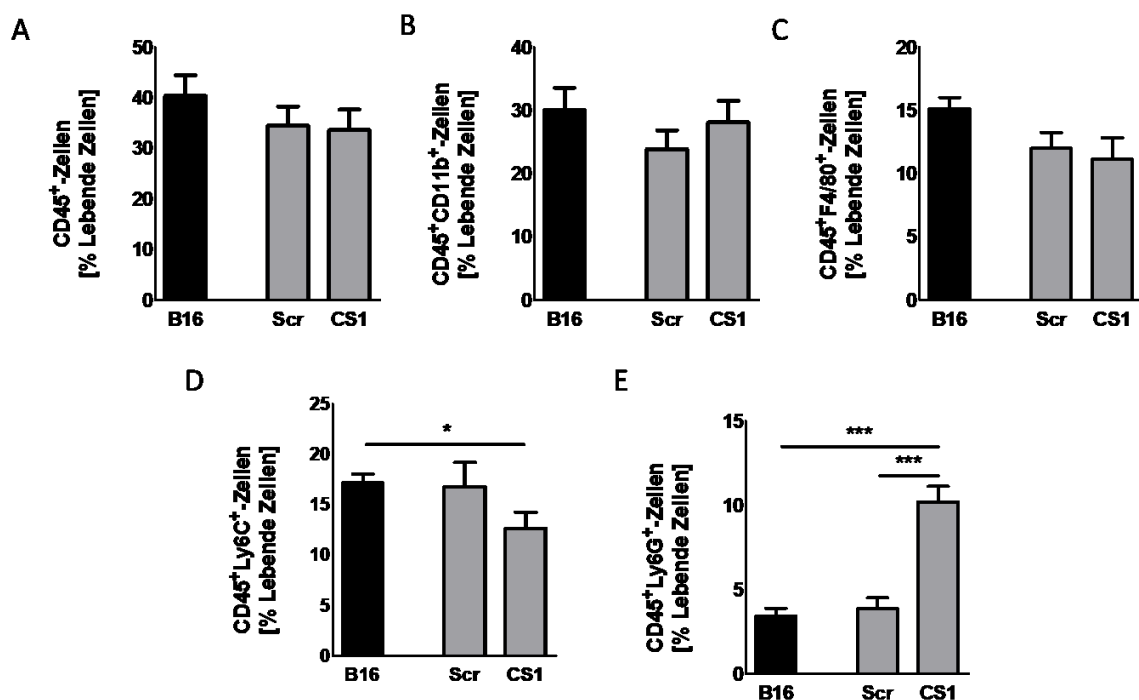


Abbildung 46: Immunzellinfiltration bei der Injektion von stimulierten MSCs mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tiere.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 stimulierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tiere injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie ausgewertet (A) CD45⁺-Zellen (B16: 36,26% ± 2,94%, Scr: 30,32% ± 2,32%, CS1: 28,02% ± 2,66%), (n=11/13/13). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 27,36% ± 2,75%, Scr: 21,45% ± 2,03%, CS1: 24,28% ± 2,37%), (n=11/13/13). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 14,97% ± 0,92%, Scr: 11,94% ± 1,28%, CS1: 11,07% ± 1,68%), (n=11/13/13). (D) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16: 16,75% ± 0,83%, Scr: 16,29% ± 2,11%, CS1: 12,34% ± 1,58%), (n=11/13/13). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 3,14% ± 0,39%, Scr: 3,69% ± 0,58%, CS1: 9,77% ± 0,94%), (n=11/13/13). *p<0,05, ***p<0,001.

Es konnten keine Veränderungen bei der Infiltration von CD45⁺-, CD45⁺CD11b⁺- und CD45⁺F4/80⁺-Zellen festgestellt werden (Abbildung 46, A-C). Der Anteil der CD45⁺Ly6C⁺-Zellen war in den Tumoren mit CS1-stimulierten MSCs im Vergleich zur B16-Kontrolle reduziert (Abbildung 46, D). Im Gegensatz dazu waren CD45⁺Ly6G⁺-Zellen in den kleinsten Tumoren mit CS1-stimulierten MSCs erhöht im Vergleich zur B16- und Scr-Gruppe (Abbildung 46, E). Dies entspricht den Beobachtungen bei der Stimulation mit Plasmafibronektin (Abschnitt 44, E).

Hierdurch lässt sich folgern, dass die CS1-Region in Fibronektin vermutlich der Teil dieses Moleküls ist, der die MSCs dazu moduliert, mehr CD45⁺Ly6G⁺-Zellen in den Tumor einwandern zu lassen und das Tumorstadium effektiver zu hemmen, als Gruppen mit Kontroll-MSCs.

3.4.1.3. Evaluation der Wirkung des CS1-Peptids auf die Apoptose und die Proliferation von MSCs und Tumorzellen

Die Wirkung des CS1-Peptids auf die Proliferation von MSCs

Um sicherzustellen, dass der beobachtete Effekt nicht nur auf eine Verbesserung des Überlebens oder eine Steigerung der Proliferation der MSCs zurückzuführen ist, wurden die Apoptose und die Proliferation der MSCs nach der Stimulation mit dem CS1-Peptid untersucht. Hierfür wurde zunächst eine Färbung gegen den Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt um mögliche Veränderungen der Proliferation durchflusszytometrisch zu untersuchen (Abbildung 47).

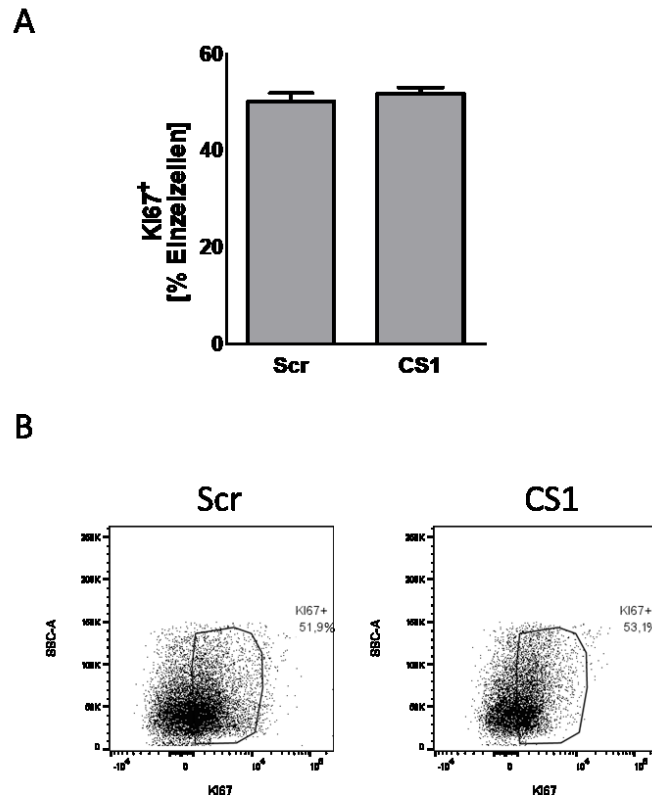


Abbildung 47: Proliferation in MSCs nach der Stimulation mit dem Scr- und dem CS1-Peptid.

MSCs wurden für 24 Stunden mit 20 µg/ml des Scr-, bzw. des CS1-Peptids stimuliert und ihr proliferativer Zustand mittels Ki67-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. (A) Anteil der Ki67⁺-MSCs nach der Stimulation. (Scr: 50,25% ± 1,68%, CS1: 51,78% ± 1,31%), (n=13/13). (B) Repräsentative Punktdiagramme der Bestimmung der Proliferation stimulierter MSCs.

Keine Unterschiede bezüglich der Proliferation von Scr- und CS1-stimulierten MSCs konnten festgestellt werden (Abbildung 47).

Die Wirkung des CS1-Peptids auf die Proliferation von Tumorzellen

Die MSCs wurden zwar dreimal nach der Stimulation, bzw. vor der Injektion der Tumorzellen gewaschen, jedoch sollte sichergestellt werden, dass die Inhibition des Tumorwachstums nicht durch Spuren des CS1-Peptids ausgelöst werden kann. Tatsächlich konnte für dieses Peptid im Zusammenhang mit B16-Zellen bei der Ko-Injektion eine Verringerung der Metastasierung festgestellt werden (Saiki et al., 1990). Daher wurde der Einfluss des CS1-Peptids auf die Proliferation von Tumorzellen untersucht (Abbildung 48).

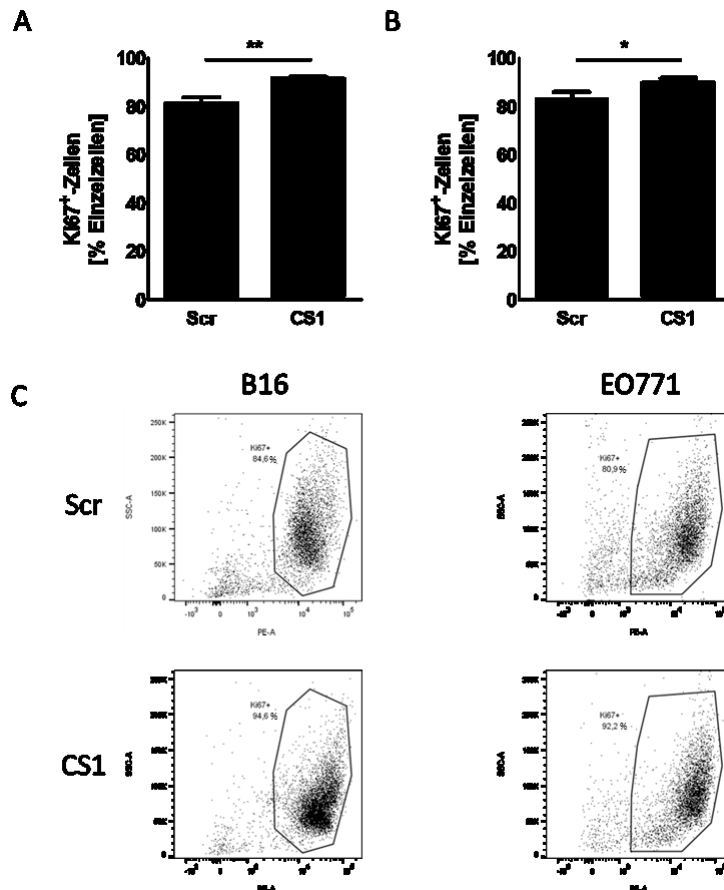


Abbildung 48: Proliferation in genutzten Tumorzellen nach der Stimulation mit dem Scr- und dem CS1-Peptid.

Die verschiedenen Tumorzellen wurden für 24 Stunden mit 20 µg/ml des Scr-, bzw. des CS1-Peptids stimuliert und ihr proliferativer Zustand mittels Ki67-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. (A) Anteil der Ki67⁺-B16-Zellen nach der Stimulation. (Scr: 81,33% ± 2,53%, CS1: 91,68% ± 0,8%), (n=8/8). (B) Anteil der Ki67⁺-EO771-Zellen nach der Stimulation. (Scr: 83,18% ± 2,85%, CS1: 89,84% ± 1,97%), (n=8/8). (C) Repräsentative Punktdiagramme der Bestimmung der Proliferation der behandelten Tumorzellen. *p<0,05, **p<0,01.

Die Auswertung der Proliferation der Tumorzellen nach der Stimulation mit dem CS1-Peptid ergab, dass sowohl B16-, als auch EO771-Zellen stärker proliferierten, als mit dem Scr-Peptid (Abbildung 48). Somit inhibierte CS1 die Vermehrung der Tumorzellen nicht, sondern förderte sie sogar.

Die Wirkung des CS1-Peptids auf die Proliferation von MSCs

Nachdem festgestellt wurde, dass MSCs keine Veränderungen in der Proliferation durch das CS1-Peptid aufweisen, wurde auch die Apoptose der stimulierten MSCs mittels AnnexinV-PI-Färbung bestimmt (Abbildung 49).

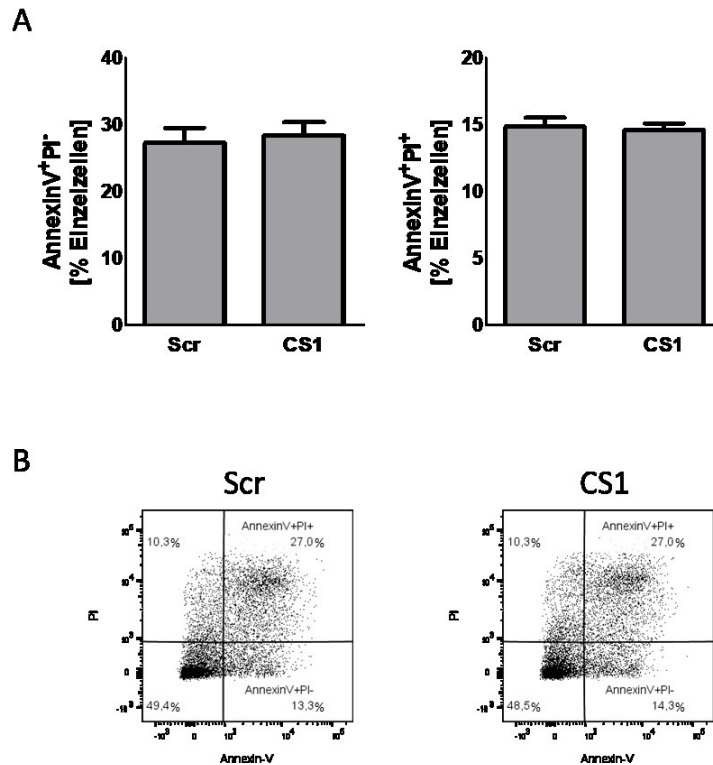


Abbildung 49: Apoptose in MSCs nach der Stimulation mit dem Scr- und dem CS1-Peptid.

MSCs wurden für 24 Stunden mit 20 µg/ml des Scr-, bzw. des CS1-Peptids stimuliert und ihr apoptotischer Zustand mittels AnnexinV-PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. (A) Anteil der MSCs in der frühen (AnnexinV⁺PI⁻) und der späten Apoptose (AnnexinV⁺PI⁺) nach der Stimulation. (AnnexinV⁺PI⁻: Scr: 27,28% ± 2,2%, CS1: 28,39% ± 1,95%; AnnexinV⁺PI⁺: Scr: 14,86% ± 0,66%, CS1: 14,61% ± 0,48%), (n=15/15). (B) Repräsentative Punktdiagramme der Bestimmung der Apoptose stimulierter MSCs.

Die Evaluation der Apoptose in MSCs nach der Stimulation ergab keine Unterschiede zwischen dem Scr- und dem CS1 Peptid (Abbildung 49).

Dementsprechend kann gefolgert werden, dass die beobachtete Verstärkung der Inhibition des Tumorwachstums weder durch eine verstärkte Proliferation, noch durch eine Verringerung der Apoptose der MSCs durch die Behandlung mit dem CS1-Peptid ausgelöst wird.

Die Wirkung des CS1-Peptids auf die Apoptose von Tumorzellen

Obwohl das CS1-Peptid die Proliferation von Tumorzellen verbessern konnte, könnten Spuren dieses Moleküls das Tumorwachstum auch direkt beeinflussen, indem es die Apoptose in Tumorzellen auslöst. Deshalb wurde auch die Apoptose von Tumorzellen durch die Behandlung mit dem CS1-Peptid durch eine AnnexinV-PI-Färbung bestimmt (Abbildung 50).

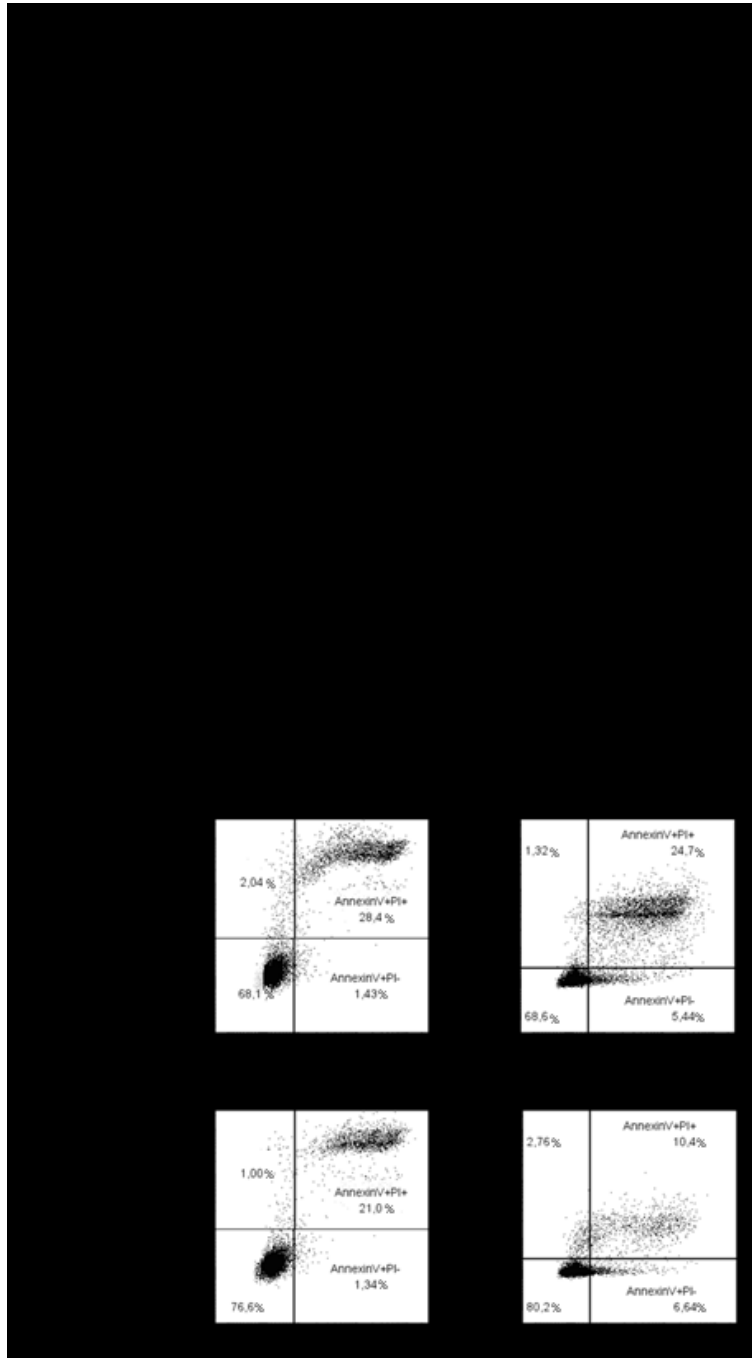


Abbildung 50: Apoptose in genutzten Tumorzellen nach der Stimulation mit dem Scr- und dem CS1-Peptid.

Die verschiedenen Tumorzellen wurden für 24 Stunden mit 20 µg/ml des Scr-, bzw. des CS1-Peptids stimuliert und ihr apoptotischer Zustand mittels AnnexinV-PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. (A) Anteil der B16-Zellen in der frühen (AnnexinV+PI-) und der späten Apoptose (AnnexinV+PI+) nach der Stimulation. (AnnexinV+PI-: Scr: 1,75% ± 0,063%, CS1: 1,53% ± 0,045%; AnnexinV+PI+: Scr: 28,16% ± 1,5%, CS1: 24,06% ± 0,73%), (n=20/20/20/20). (B) Anteil der EO771-Zellen in der frühen (AnnexinV+PI-) und der späten Apoptose (AnnexinV+PI+) nach der Stimulation. (AnnexinV+PI-: Scr: 5,15% ± 0,25%, CS1: 4,83% ± 0,5%; AnnexinV+PI+: Scr: 25,31% ± 1,43%, CS1: 13,26% ± 1,57%), (n=8/8/8/8). (C) Repräsentative Punktdiagramme der Bestimmung der Apoptose der behandelten Tumorzellen. *p<0,05, **p<0,01.

Die Stimulation von B16-Zellen mit dem CS1-Peptid verringerte die frühe und insbesondere die späte Apoptose von B16-Zellen und verbesserte damit ihr Überleben (Abbildung 50, A, C). Im Gegensatz dazu zeigten EO771-Zellen zwar keine Veränderungen in der frühen Apoptose, jedoch war die späte Apoptose bei der Behandlung mit dem CS1 Peptid verringert (Abbildung 50, B, C).

Zusammenfassend konnte hierdurch gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem CS1-Peptid die Proliferation von B16- und EO771-Zellen verstärkt und zeitgleich den Zelltod der untersuchten Tumorzellarten inhibiert. Da die Behandlung der MSCs mit dem CS1-Peptid jedoch eine Inhibition des Tumorwachstums zu Folge hatte, kann ausgeschlossen werden, dass eine mögliche Überführung des Peptids für die Verringerung des Tumorwachstums verantwortlich ist.

3.4.1.4. Die Wirkung der CS1-Stimulation von MSCs auf die Immunzellinfiltration im Melanom in athymischen Tieren

Die bisher erzielten Ergebnisse bezüglich des CS1-Peptids sollten als nächstes in athymischen Tieren ohne funktionelle T-Zellen bestätigt werden.

Die Auswirkung der CS1-Stimulation von MSCs auf das Tumorwachstum in athymischen Tieren

MSCs wurden erneut für 24 Stunden mit dem CS1-, bzw. Scr-Peptid, stimuliert und zusammen mit B16-Zellen vermischt. Daraufhin wurde die Zellmischung subkutan in die Flanke der athymischen Tiere injiziert und das Tumorwachstum am Versuchsende bestimmt (Abbildung 51).

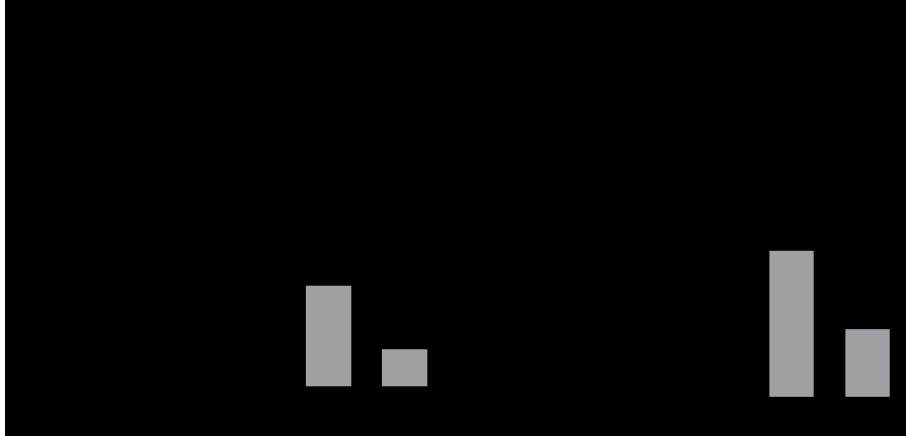


Abbildung 51: Tumorvolumen und -gewicht bei der Injektion der stimulierten MSC-Subpopulationen mit B16-Tumorzellen in athymischen CD1nu-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 MSCs in die Flanke von athymischen CD1nu-Tieren injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16: $0,073\text{cm}^3 \pm 0,015\text{cm}^3$, Scr: $0,032\text{cm}^3 \pm 0,0061\text{cm}^3$, CS1: $0,013\text{cm}^3 \pm 0,003\text{cm}^3$), (n=12/10/11). (B) (B16: $0,064\text{g} \pm 0,0086\text{g}$, Scr: $0,038\text{g} \pm 0,0073\text{g}$, CS1: $0,018\text{g} \pm 0,0049\text{g}$), (n=12/10/11). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Ergebnisse in athymischen Tieren bestätigten die zuvor erzielten Resultate. So konnte auch hier gezeigt werden, dass das Tumolvolumen (Abbildung 51, A) und das Tumorgewicht (Abbildung 51, B) im Vergleich zur B16-Kontrolle reduziert waren, wenn mit dem Scr-Peptid behandelte MSCs injiziert wurden. Diese Reduktion wurde nochmals verstärkt, wenn MSCs mit dem CS1-Peptid stimuliert wurden.

Die Auswirkung der CS1-Stimulation von MSCs auf die infiltrierenden Immunzellen in athymischen Tieren

Die Infiltration von Immunzellen wurde im Zuge der erfolgreichen Bestätigung des unterdrückten Wachstums auch in den hier erhaltenen Tumoren überprüft (Abbildung 52).

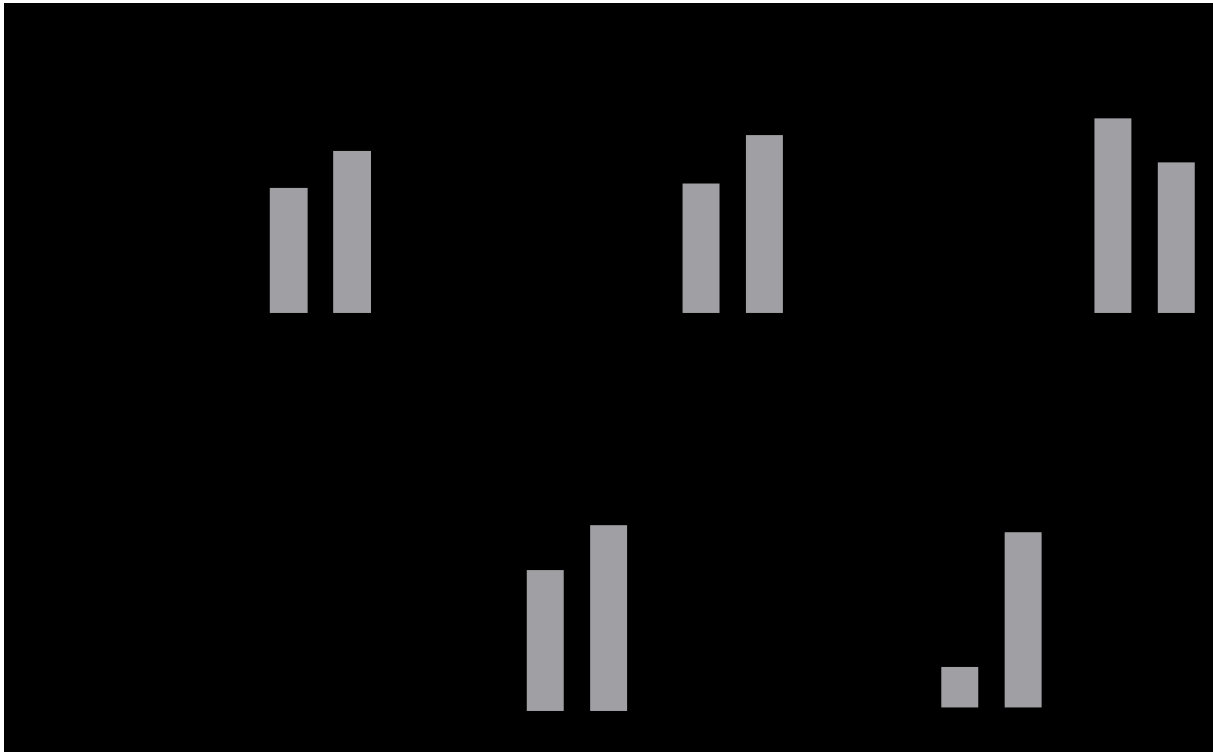


Abbildung 52: Immunzellinfiltration bei der Injektion von stimulierten MSCs mit B16-Tumorzellen in athymischen CD1nu-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 MSCs in die Flanke von athymischen CD1nu-Tieren injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie ausgewertet. (A) CD45⁺-Zellen (B16: 9,04% ± 1,36%, Scr: 9,93% ± 1,56%, CS1: 12,76% ± 2,03%), (n=12/10/11). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zelle (B16: 7,28% ± 1,46%, Scr: 7,64% ± 1,84%, CS1: 10,45% ± 2,25%), (n=12/10/11). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 5,58% ± 1,05%, Scr: 6,07% ± 1,03%, CS1: 4,74% ± 0,63%), (n=12/10/11). (D) CD45⁺Ly6C⁺ (B16: 3,26% ± 1,06%, Scr: 4,46% ± 1,28%, CS1: 5,85% ± 1,58%), (n=12/10/11). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 0,77% ± 0,17%, Scr: 0,84% ± 0,087%, CS1: 3,41% ± 0,93%), (n=12/10/11) *p<0,05, **p<0,01.

Die Auswertung ergab keine Unterschiede der Infiltration zwischen CD45⁺-, CD45⁺CD11b⁺-, CD45⁺F4/80⁺- und CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (Abbildung 52, A-D). Es konnte jedoch erneut gezeigt werden, dass der Anteil an CD45⁺Ly6G⁺-Zellen in den Tumoren, in denen CS1-stimulierte MSCs eingesetzt wurden, erhöht waren (Abbildung 52, E).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Tumorwachstum im Melanommodell in immunkompetenten C57Bl/6- und athymischen CD1nu-Mäusen beim Einsatz von MSCs inhibiert war, die mit einem Kontroll-Peptid stimuliert wurden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Nutzung des CS1-Peptids die Fähigkeit von MSCs zur Tumorunterdrückung noch weiter steigern konnte. Desweiteren zeigte sich erneut, dass die Anzahl an CD45⁺Ly6G⁺-Immunzellen erhöht war.

3.4.1.5. Die Folge der Depletion von Ly6G⁺-Zellen während des Tumorwachstums

Die erhöhte Infiltration von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen konnte bisher in beinahe allen Tumormodellen gezeigt werden, wenn das Tumorwachstum durch die MSCs inhibiert wurde (Abbildungen 10, 24, 27, 30, 33, 36, 38, 40, 42, 44, 46 und 52). Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass diese Immunzellen für die Tumurinhibition verantwortlich sein könnten.

MSCs sind für ihre immunmodulatorischen Eigenschaften bekannt und können das myeloide Immunsystem modulieren (François et al., 2019; Ohlsson et al., 2003; Waterman et al., 2012a). Deshalb sollte überprüft werden, ob MSCs die myeloiden Zellen modulieren und damit das Tumorwachstum beeinflussen. Hierzu sollten die Ly6G⁺-Zellen depletiert und das Wachstum untersucht werden. Die Versuchstiere wurden vor und nach der Tumordinjektion entweder mit einer Isotyp-Kontrolle oder einem anti-Maus Ly6G-Antikörper behandelt (Abbildung 53).

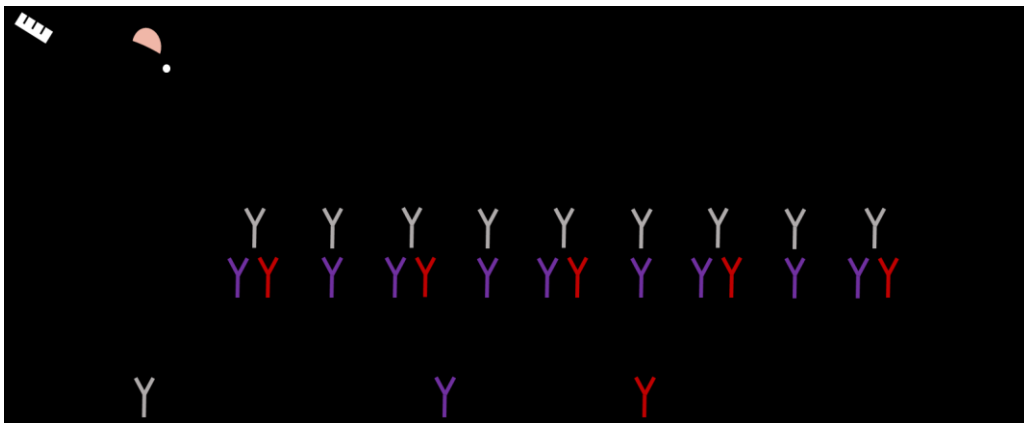


Abbildung 53: Versuchsablauf der Depletion Ly6G-exprimierender Zellen im B16-Modell mit C57BL/6-Tieren.

Die Versuchstiere wurden entweder mit einem Isotyp-Kontroll-Antikörper oder einem anti-Maus Ly6G-Antikörper behandelt. Die Injektion fand dabei täglich, beginnend 2 Tage vor der Tumordinjektion, statt und umfasste 50 µg des entsprechenden Antikörpers in 50 µl PBS. Um die Effektivität der Depletion zu erhöhen, wurde jeden 2. Tag zwei Stunden vor der anti-Maus Ly6G-Antikörper-Injektion, beginnend ab dem 1. Tag der Antikörper-Injektion, 50 µg eines anti-Ratte κ-Leichte-Kette-Antikörpers injiziert (Boivin et al., 2020). Am dritten Tag wurden dann neben den Antikörpern auch B16 Zellen zusammen mit MSCs, die jeweils mit dem Scr- oder dem CS1-Peptid stimuliert wurden, in die Flanke der Versuchstiere injiziert. Während des Tumorwachstums wurden weiterhin täglich depletierende- oder Kontroll-Antikörper injiziert. Der siebte Tag nach Tumordinjektion stellte das Versuchsende dar.

Bestätigung der Depletion von Ly6G⁺-Zellen im Blut

Am Versuchsende wurde das Blut der jeweiligen Versuchstiere aus dem Herzen entnommen und in mit EDTA beschichtete Reaktionsgefäße gegeben. Das so erhaltene Blut diente dazu,

die Depletion der Ly6G-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch zu bestätigen. Die Zellen wurden hierzu fixiert und permeabilisiert, um sowohl extra- als auch intrazellulär vorliegende Ly6G-Moleküle für die durchflusszytometrische Färbung zugänglich zu machen, um auszuschließen, dass die jeweiligen Zellen durch die während des Versuchszeitraums injizierten Antikörper maskiert und somit nicht detektierbar wären (Boivin et al., 2020). Anschließend wurden die Blutzellen mit Antikörpern gegen Ly6G gefärbt, erneut gewaschen und die vorliegenden Ly6G-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 54).

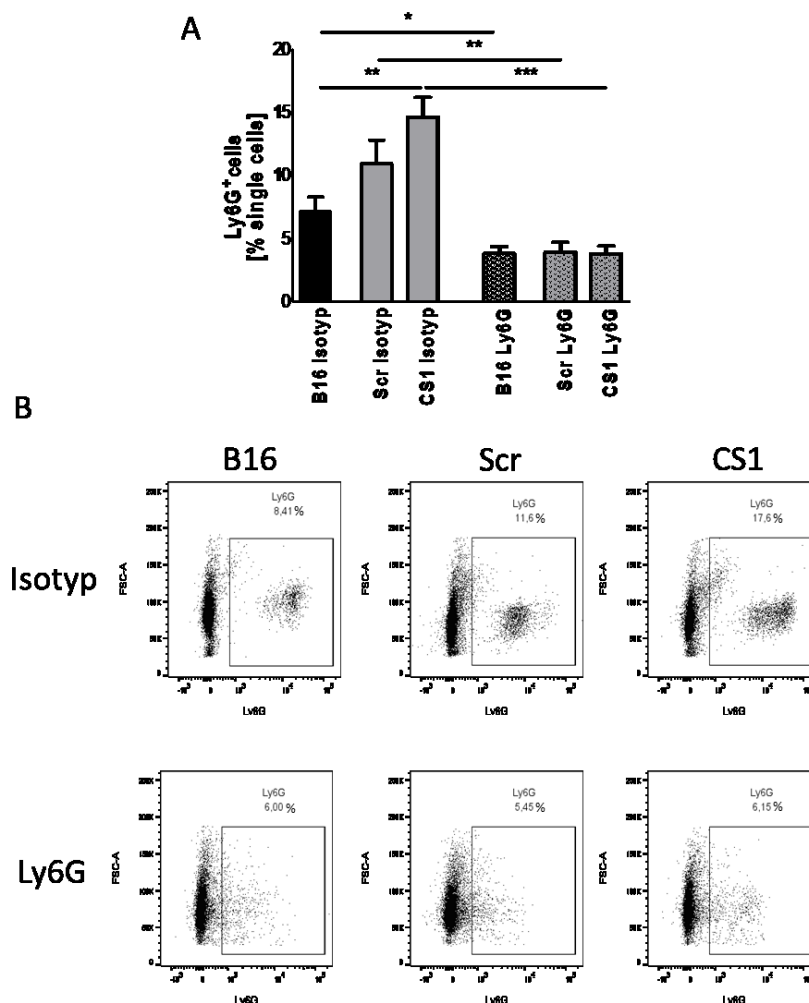


Abbildung 54: Bestätigung der Ly6G-Depletion im Blut der Versuchstiere.

Das Blut der Versuchstiere, die entweder mit dem Isotyp-Kontrollen- oder den anti-Maus Ly6G/anti-Ratte κ -Leichte-Kette-Antikörpern behandelt wurden, wurde am Versuchsende aus dem Herzen entnommen. Die Erythrozyten wurden lysiert und die zurückbleibenden Immunzellen fixiert und permeabilisiert, um auch intrazelluläre Ly6G-Moleküle zugänglich zu machen. Der Anteil an Ly6G-exprimierenden Zellen wurde anschließend durchflusszytometrisch analysiert. (A) Quantifizierung der Ly6G-exprimierenden Zellen im Blut der jeweiligen Tiere. (Ly6G+-Zellen): (B16 Isotyp: 7,14% \pm 1,17%, Scr Isotyp: 10,97% \pm 1,84%, CS1 Isotyp: 14,64% \pm 1,56%, B16 Ly6G: 3,85% \pm 0,53%, Scr Ly6G: 3,94% \pm 0,79%, CS1 Ly6G: 3,8% \pm 0,62%), (n=10/12/12/10/12/12). (B) Repräsentative Darstellung der Ly6G+-Zellen im Blut von Tieren, die mit dem Isotyp-Kontroll-Antikörper behandelt wurden und von Tieren, in denen Ly6G-exprimierende Zellen depletiert wurden. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die Auswertung der Ly6G⁺-Zellen bestätigte die Depletion der Ly6G-exprimierenden Zellen im Blut mit einer verringerten Anzahl in den Tieren, die die depletierenden Antikörper erhalten hatten, im Vergleich zu den Tieren, die nur Isotyp-Kontroll-Antikörper verabreicht bekamen (Abbildung 54).

Die Auswirkung der CS1-Stimulation von MSCs auf das Tumorwachstum bei der Depletion von Ly6G-exprimierenden Zellen mittels Antikörper-Injektion

Am Versuchsende wurden neben dem Blut auch die jeweiligen Tumore entnommen und daraufhin das Tumolvolumen und das Tumorgewicht bestimmt (Abbildung 55).

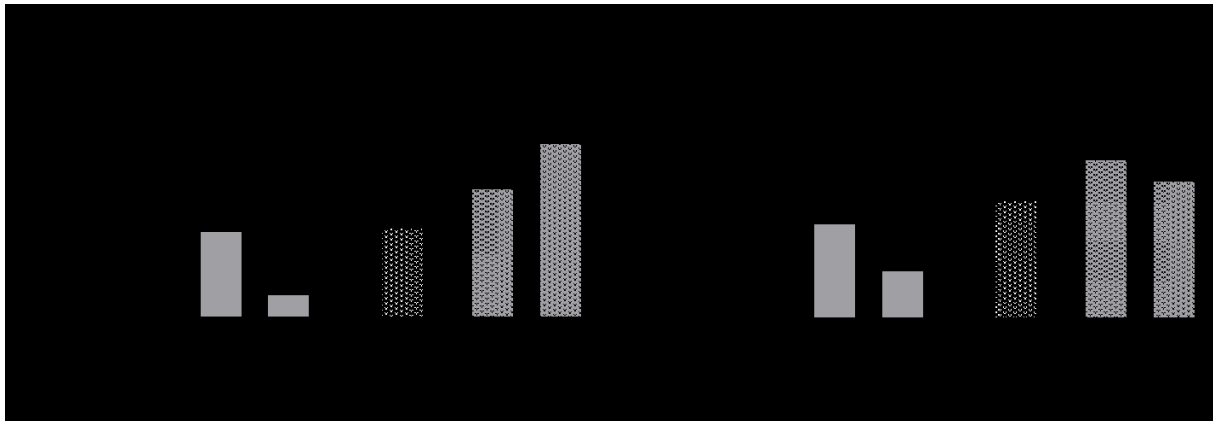


Abbildung 55: Tumolvolumen und -gewicht bei der Injektion von stimulierten MSCs mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tiere bei der Depletion von Ly6G⁺-Zellen.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 stimulierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert, die entweder Kontroll- oder Ly6G⁺-depletierenden Antikörper erhalten haben. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende (B16 Isotyp: 0,069cm³ ± 0,0085cm³, Scr Isotyp: 0,034cm³ ± 0,0077cm³, CS1 Isotyp: 0,0098cm³ ± 0,0039cm³, B16 Ly6G: 0,036cm³ ± 0,0077cm³, Scr Ly6G: 0,051cm³ ± 0,012cm³, CS1 Ly6G: 0,069cm³ ± 0,015cm³), (n=10/12/11/10/12/12). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende (B16 Isotyp: 0,064g ± 0,0072g, Scr Isotyp: 0,031g ± 0,0053g, CS1 Isotyp: 0,016g ± 0,0031g, B16 Ly6G: 0,038g ± 0,0052g, Scr Ly6G: 0,051g ± 0,0078g, CS1 Ly6G: 0,044g ± 0,0044g), (n=10/12/11/10/12/12). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Das Volumen (Abbildung 55, A) und das Gewicht (Abbildungen 55, B) in den Isotyp-Antikörper-Gruppen, die Scr-Peptid-behandelte MSCs erhalten hatten, waren, wie bereits zuvor, im Vergleich zur Kontrolle reduziert, während diese Reduktion durch die Behandlung mit dem CS1-Peptid noch weiter verstärkt wurde. Der Isotyp-Kontroll-Antikörper hatte also, wie erwartet, keinen Einfluss auf das Tumorwachstum. Auf der anderen Seite blieb die Inhibition

des Volumens und des Gewichts in den Gruppen vollständig aus, in denen Immunzellen mittels des Ly6G-Antikörpers depletiert wurden. Dies gilt sowohl für Scr-, als auch für CS1-MSCs. Interessanterweise verminderte sich die Größe der B16-Kontrollgruppe, wenn Ly6G-exprimierende Zellen in diesen Tieren depletiert wurden.

Die Auswirkung der CS1-Stimulation von MSCs auf die Infiltration von Immunzellen bei der Depletion von Ly6G-exprimierenden Zellen mittels Antikörper-Injektion

Auch die infiltrierenden Immunzellen in den Tieren, die entweder Isotyp-Kontroll- oder Ly6G-/anti-Ratte κ -Leichte Kette-Antikörper erhalten haben, wurden evaluiert (Abbildung 56).

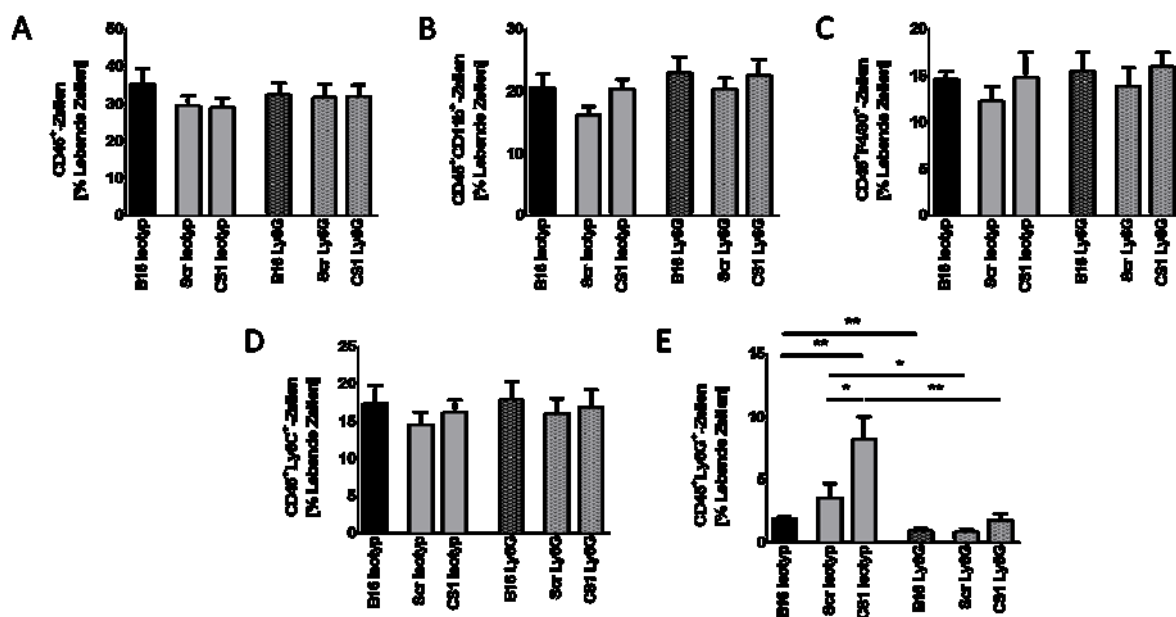


Abbildung 56: Immunzellinfiltration bei der Injektion von stimulierten MSCs mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tiere bei der Depletion von Ly6G⁺-Zellen.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 stimulierten MSCs in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert, die entweder eine Antikörper-Injektion in Form einer Isotyp-Kontrolle oder eines Ly6G⁺-depletierenden Antikörpers erhalten haben und deren Tumore durchflusszytometrisch analysiert wurden. (A) CD45⁺-Zellen (B16 Isotyp: 35,23% ± 4,16%, Scr Isotyp: 29,44% ± 2,82%, CS1 Isotyp: 28,93% ± 2,54%, B16 Ly6G: 32,31% ± 3,29%, Scr Ly6G: 31,58% ± 3,71%, CS1 Ly6G: 31,80% ± 3,21%), (n=10/12/11/10/12/12). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16 Isotyp: 20,48% ± 2,31%, Scr Isotyp: 16,13% ± 1,4%, CS1 Isotyp: 20,37% ± 1,59%, B16 Ly6G: 22,91% ± 2,58%, Scr Ly6G: 20,28% ± 1,86%, CS1 Ly6G: 22,45% ± 2,68%), (n=10/12/11/10/12/12). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16 Isotyp: 14,59% ± 0,93%, Scr Isotyp: 12,25% ± 1,63%, CS1 Isotyp: 14,8% ± 2,75%, B16 Ly6G: 15,47% ± 2,04%, Scr Ly6G: 13,88% ± 2,0%, CS1 Ly6G: 15,95% ± 1,57%), (n=10/12/11/10/12/12). (D) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16 Isotyp: 17,31% ± 2,48%, Scr Isotyp: 14,55% ± 1,62%, CS1 Isotyp: 16,17% ± 1,72%, B16 Ly6G: 17,85% ± 2,45%, Scr Ly6G: 16,02% ± 2,05%, CS1 Ly6G: 16,87% ± 2,36%), (n=10/12/11/10/12/12). (E) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16 Isotyp: 2,11% ± 0,29%, Scr Isotyp: 3,52% ± 1,19%, CS1 Isotyp: 8,22% ± 1,82%, B16 Ly6G: 1,23% ± 0,83%, Scr Ly6G: 1,32% ± 0,53%, CS1 Ly6G: 1,74% ± 0,54%), (n=9/12/11/9/11/12). *p<0,05, **p<0,01.

Es konnten keine Veränderungen zwischen den Gruppen bezüglich der Infiltration von CD45⁺, CD45⁺CD11b⁺, CD45⁺F4/80⁺- oder CD45⁺Ly6C⁺-Zellen festgestellt werden (Abbildung 56, A-D). Bei der Verwendung des Isotyp-Kontrollen-Antikörpers konnte jedoch, wie bereits in vorherigen Versuchen, der Anstieg der CD45⁺Ly6G⁺-Zellen in der CS1-stimulierten-MS-Gruppe im Vergleich zur B16-Gruppe und zur Scr-MS-Gruppe festgestellt werden (Abbildung 56, E). Dieser Anstieg blieb jedoch bei der Verwendung des gegen Ly6G-gerichteten Antikörpers aus.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Ly6G⁺-Zellen in normalen B16-Tumoren ohne MSCs eine Tumor-fördernde Funktion aufzuweisen scheinen, da ohne ihre Anwesenheit das Tumorwachstum reduziert wird. Auf der anderen Seite ist die Anwesenheit von Ly6G-exprimierenden Zellen essentiell bei der Funktion von MSCs, das Tumorwachstum zu inhibieren. Bei der Abwesenheit dieser Zellen bleibt die Unterdrückung des Wachstums unabhängig von der Behandlung der MSCs vollständig aus. Dementsprechend werden diese Zellen durch MSCs und deren Kontakt zur CS1-Region, bzw. Fibronectin moduliert, um der Tumorprogression entgegenzuwirken.

3.4.2. Die Wirkung der CS1-Stimulation auf MSCs

Nachdem die Wirkung des CS1-Peptids bei der MSC-vermittelten Tumoringhibition durch Neutrophile gezeigt werden konnte, stellt sich die Frage, wie dieses Peptid die MSCs moduliert. Hierzu wurden zum einen die mRNA-Expression, sowie die aktivierten Signalwege in MSCs nach CS1-Behandlung untersucht.

3.4.2.1. Veränderung der Zytokin- und Chemokinexpression in MSCs nach der Behandlung mit dem CS1-Peptid

Fibronectin ist in der Lage, inflammatorische Prozesse auszulösen (Hwang et al., 2015; Krock et al., 2017). Da die Behandlung der MSCs mit dem CS1-Peptid aus Fibronectin zu einer Modulation des Immunsystems in Form von Neutrophilen führte, wurde deshalb die mRNA-Expression mehrerer Zytokine und Chemokine in MSCs 24 Stunden nach der Behandlung mit dem CS1-Peptid untersucht (Abbildung 57).

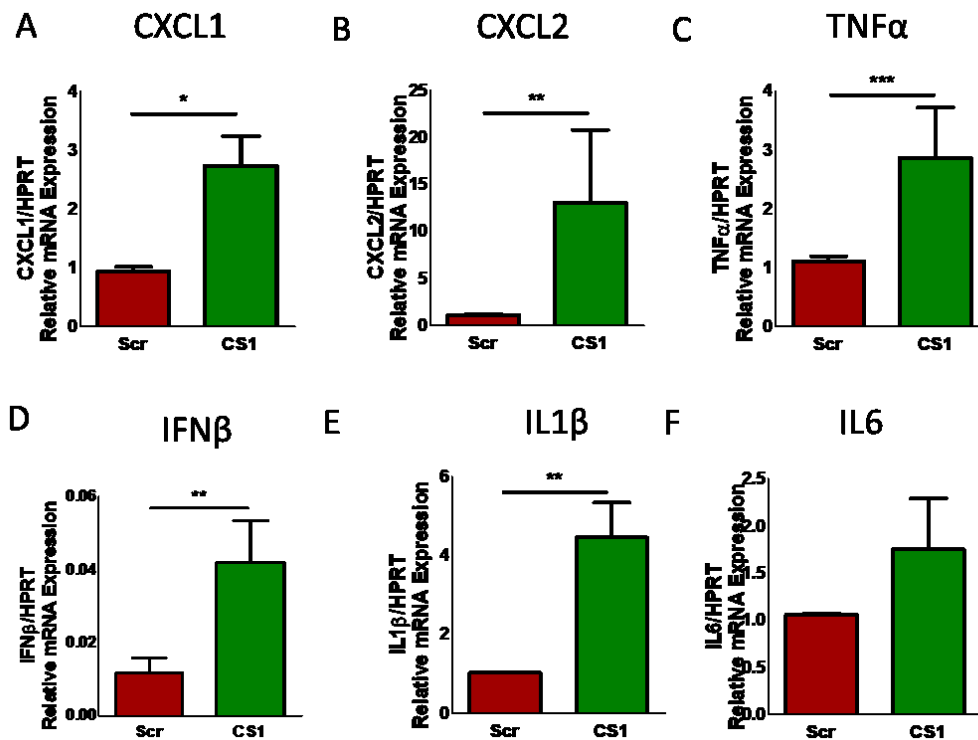


Abbildung 57: mRNA-Expression verschiedener Zytokine und Chemokine nach der Behandlung der MSCs mit dem CS1-Peptid.

MSCs wurden für 24 Stunden in der Abwesenheit von FCS mit dem Scr- oder dem CS1-Peptid stimuliert, woraufhin ihre RNA isoliert und daraus cDNA synthetisiert wurde. Anschließend wurden qPCRs für die Zytokine und Chemokine CXCL1, CXCL2, TNFα, IFNβ, IL1β und IL6 durchgeführt. Die relative Expression der entsprechenden mRNAs wurden gegen HPRT quantifiziert. (A) Expression von CXCL1 nach der Stimulation mit dem CS1-Peptid (Scr: 0,94 ± 0,074, CS1: 2,73 ± 0,5), (n=14/17). (B) Expression von CXCL2 nach der Stimulation mit dem CS1-Peptid (Scr: 1,13 ± 0,079, CS1: 13,06 ± 7,73), (n=10/9) (C) Expression von TNFα nach der Stimulation mit dem CS1-Peptid (Scr: 1,11 ± 0,084, CS1: 2,87 ± 0,85), (n=15/13). (D) Expression von IFNβ nach der Stimulation mit dem CS1-Peptid (Scr: 0,012 ± 0,0043, CS1: 0,042 ± 0,012), (n=17/22). (E) Expression von IL1β nach der Stimulation mit dem CS1-Peptid (Scr: 1,03 ± 0,0096, CS1: 4,45 ± 0,88), (n=11/14). (F) Expression von IL6 nach der Stimulation mit dem CS1-Peptid (Scr: 1,25 ± 0,13, CS1: 3,82 ± 1,69), (n=22/24). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die Behandlung mit dem CS1-Peptid steigerte die Expression von CXCL1, CXCL2, TNFα, IFNβ, IL1β und IL6 in MSCs. Somit konnte gezeigt werden, dass das CS1-Peptid in MSCs die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen heraufreguliert.

3.4.2.2. Aktivierte Signalwege durch die CS1-Stimulation

Das CS1-Peptid kann an die Integrine α4β1 und α4β7 binden (Guan und Hynes, 1990; Mould et al., 1990; Rugg et al., 1992; Wayner et al., 1989). Aus diesem Grund sollten Signalwege in MSCs untersucht werden, die mit der Aktivierung des Integrinsignalwegs in Zusammenhang stehen. Hierzu wurde die Phosphorylierung der Kinasen FAK, ERK, AKT und JNK untersucht,

die durch die Bindung von Molekülen der extrazellulären Matrix an Integrine aktiviert werden (Ellert-Miklaszewska et al., 2020). Hierfür wurden MSCs zunächst für 24 Stunden in Anwesenheit von 10% FCS ausgesät, bevor das Medium mit einem ohne FCS über Nacht ersetzt wurde. Anschließend wurden die MSCs mit 20 µg/ml, bzw. 7,3 µM des CS1-Peptids behandelt. Aufgrund der Tatsache, dass pFN ebenfalls die Fähigkeit von MSCs verbessern konnte, das Tumorwachstum zu unterdrücken (Abbildung 43), wurde die Wirkung von pFN auf MSCs als Kontrolle untersucht; jedoch war es technisch nicht möglich, die MSCs mit einer Konzentration von 7,3 µM an pFN zu stimulieren. Aus diesem Grund wurden 0,73 µM pFN und 0,73 µM CS1 zu den MSCs gegeben. Der zeitliche Ablauf der Phosphorylierung von FAK zu den Zeitpunkten 15, 30, 60, 120 und 180 Minuten ist in Abbildung 58 dargestellt.

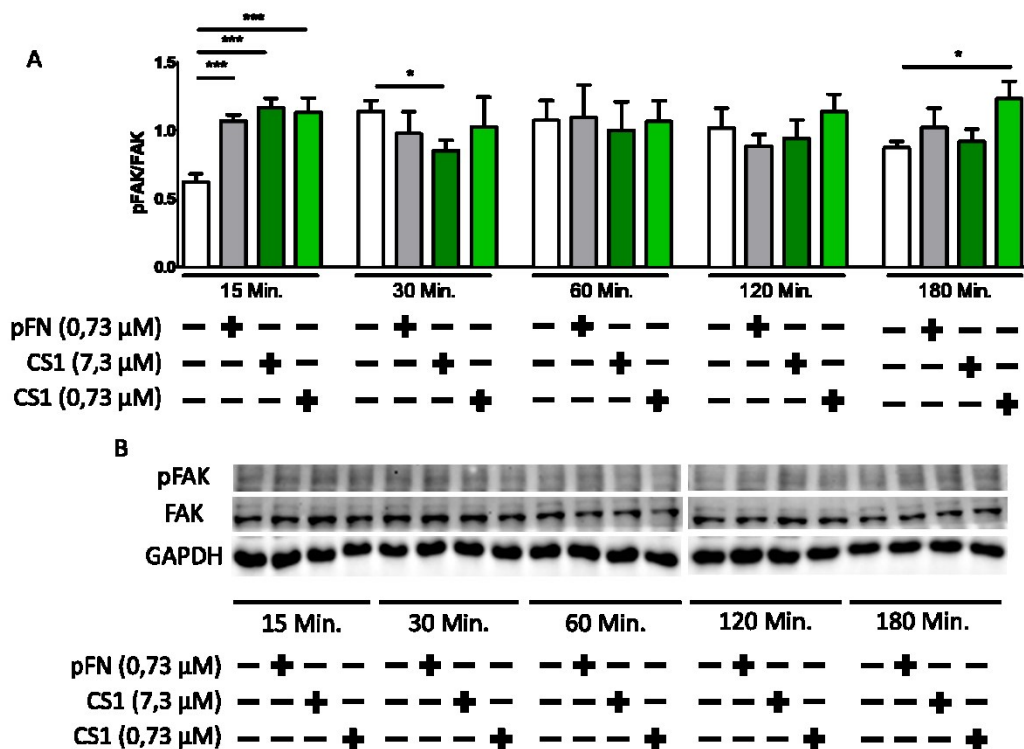


Abbildung 58: Phosphorylierung von FAK in MSCs durch pFN und verschiedenen Konzentrationen des CS1-Peptids über einen Zeitverlauf von 15 bis 180 Minuten.

MSCs wurden für 15, 30, 60, 120 und 180 Minuten in der Abwesenheit von FCS mit pFN oder verschiedenen Konzentrationen des CS1-Peptids stimuliert, woraufhin sie in Proteinlysepuffer aufgenommen wurden die Phosphorylierung verschiedener Proteine mittels Western Blot evaluiert wurden. (A) Auswertung der Densitometrie der Phosphorylierung von pFAK in Relation zu FAK. (15 Min.: CT: $0,62 \pm 0,059$, pFN (0,73 µM): $1,07 \pm 0,046$, CS1 (7,3 µM): $1,17 \pm 0,067$, CS1 (0,73 µM): $1,13 \pm 0,11$, 30 Min.: CT: $1,14 \pm 0,08$, pFN (0,73 µM): $0,98 \pm 0,16$, CS1 (7,3 µM): $0,85 \pm 0,077$, CS1 (0,73 µM): $1,03 \pm 0,22$, 60 Min.: CT: $1,08 \pm 0,15$, pFN (0,73 µM): $1,1 \pm 0,24$, CS1 (7,3 µM): $1,0 \pm 0,21$, CS1 (0,73 µM): $1,07 \pm 0,15$, 120 Min.: CT: $1,02 \pm 0,15$, pFN (0,73 µM): $0,89 \pm 0,085$, CS1 (7,3 µM): $0,94 \pm 0,14$, CS1 (0,73 µM): $1,14 \pm 0,13$, 180 Min.: CT: $0,87 \pm 0,048$, pFN (0,73 µM): $1,02 \pm 0,14$, CS1 (7,3 µM): $0,92 \pm 0,089$, CS1 (0,73 µM): $1,23 \pm 0,13$), (n=4/4/4/4/5/5/5/5/5/5/5/5/5/5/4/4/4/4). (B) Repräsentative Darstellung der Phosphorylierung von FAK durch die eingesetzten Moleküle. *p<0,05, ***p<0,001.

FAK zeigte eine frühe Reaktion auf die eingesetzten Peptide nach 15 Minuten, wobei alle Behandlungen zu einer erhöhten Phosphorylierung von FAK führten (Abbildung 58). Danach konnte jedoch keine einheitliche Erhöhung der Phosphorylierung von FAK festgestellt werden.

Im nächsten Schritt wurde die Phosphorylierung von AKT unter den gleichen Bedingungen und Zeitpunkten ermittelt (Abbildung 59).

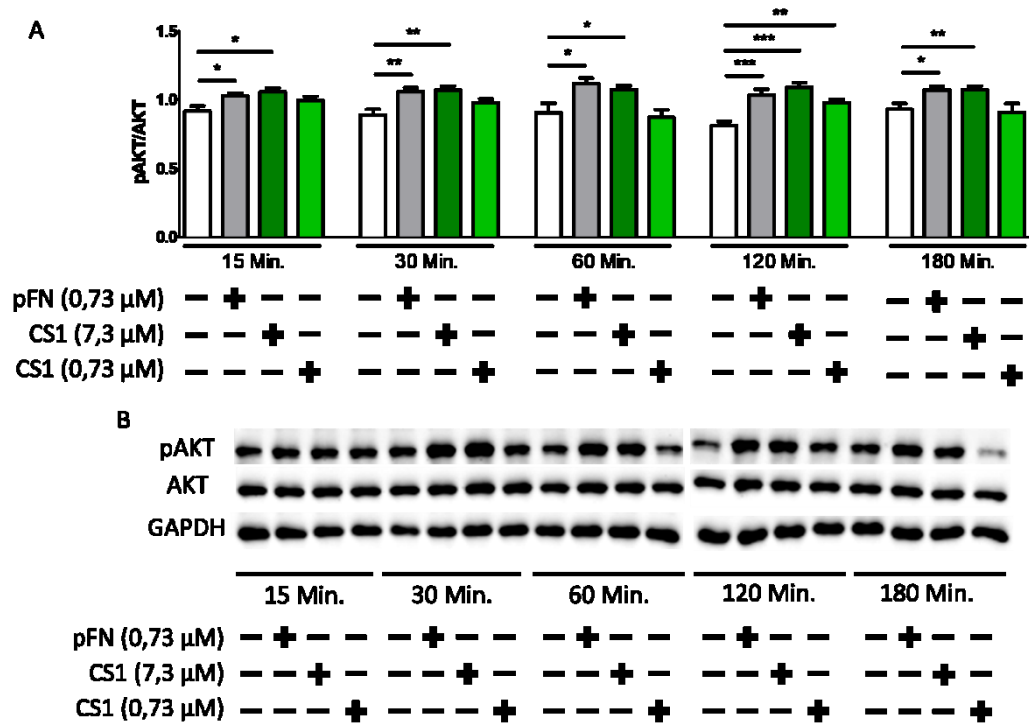


Abbildung 59: Phosphorylierung von AKT in MSCs durch pFN und verschiedene Konzentrationen des CS1-Peptids über einen Zeitverlauf von 15 bis 180 Minuten.

MSCs wurden für 15, 30, 60, 120 und 180 Minuten in der Abwesenheit von FCS mit pFN oder verschiedenen Konzentrationen des CS1-Peptids stimuliert, woraufhin sie in Proteinlysepuffer aufgenommen wurden die Phosphorylierung verschiedener Proteine mittels Western Blot evaluiert wurden. (A) Auswertung der Densitometrie der Phosphorylierung von pAKT in Relation zu AKT. (15 Min.: CT: $0,92 \pm 0,041$, pFN (0,73 μM): $1,03 \pm 0,02$, CS1 (7,3 μM): $1,06 \pm 0,028$, CS1 (0,73 μM): $0,99 \pm 0,03$, 30 Min.: CT: $0,89 \pm 0,041$, pFN (0,73 μM): $1,06 \pm 0,027$, CS1 (7,3 μM): $1,07 \pm 0,033$, CS1 (0,73 μM): $0,98 \pm 0,029$, 60 Min.: CT: $0,9 \pm 0,07$, pFN (0,73 μM): $1,12 \pm 0,04$, CS1 (7,3 μM): $1,07 \pm 0,033$, CS1 (0,73 μM): $0,87 \pm 0,056$, 120 Min.: CT: $0,81 \pm 0,033$, pFN (0,73 μM): $1,03 \pm 0,046$, CS1 (7,3 μM): $1,09 \pm 0,035$, CS1 (0,73 μM): $0,98 \pm 0,028$, 180 Min.: CT: $0,93 \pm 0,041$, pFN (0,73 μM): $1,07 \pm 0,028$, CS1 (7,3 μM): $1,07 \pm 0,025$, CS1 (0,73 μM): $0,91 \pm 0,062$), (n=10/10). (B) Repräsentative Darstellung der Phosphorylierung von AKT durch die eingesetzten Moleküle. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die erste signifikante Erhöhung von AKT konnte bereits nach 15 Minuten durch pFN und das CS1-Peptid bei einer Konzentration von 7,3 μM ermittelt werden, die sich in allen weiteren Zeitpunkten widerspiegelte (Abbildung 59). Nach 120 Minuten konnte jedoch für alle drei eingesetzten Peptide eine Erhöhung festgestellt werden.

Da der Transkriptionsfaktor NFκB die Induktion der bei der qPCR hochregulierten Gene (Abbildung 57) CXCL1 (Burke et al., 2014; Yano und Ogura, 2018), CXCL2 (Burke et al., 2014; Yano und Ogura, 2018), TNFα (Park et al., 2015; Sun et al., 2017), IL1β (Sun et al., 2017), IL6 (Libermann und Baltimore, 1990) und IFNβ (Agelopoulos et al., 2021; Thanos und Maniatis, 1992) auslöst oder daran beteiligt ist, wurde ebenfalls die Phosphorylierung von NFκB (p65) und IκBα im Western Blot überprüft. In Abbildung 62 sind die Ergebnisse der Western Blots für IκBα gezeigt.

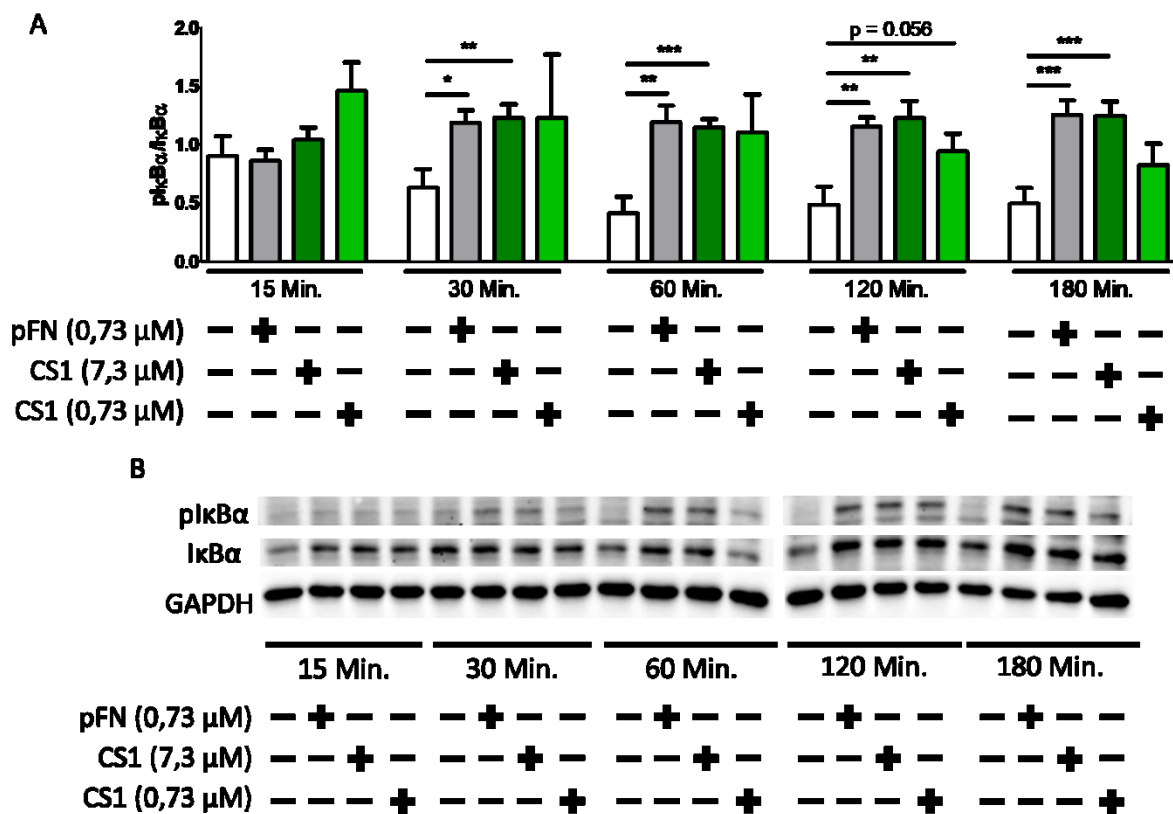


Abbildung 62: Phosphorylierung von IκBα in MSCs durch pFN und verschiedenen Konzentrationen des CS1-Peptids über einen Zeitverlauf von 15 bis 180 Minuten.

MSCs wurden für 15, 30, 60, 120 und 180 Minuten in der Abwesenheit von FCS mit pFN oder verschiedenen Konzentrationen des CS1-Peptids stimuliert, woraufhin sie in Proteinlysepuffer aufgenommen wurden die Phosphorylierung verschiedener Proteine mittels Western Blot evaluiert wurden. (A) Auswertung der Densitometrie der Phosphorylierung von pIκBα in Relation zu IκBα. (15 Min.: CT: 0,9 ± 0,17, pFN (0,73 μM): 0,86 ± 0,095, CS1 (7,3 μM): 1,04 ± 0,11, CS1 (0,73 μM): 1,46 ± 0,24, 30 Min.: CT: 0,63 ± 0,16, pFN (0,73 μM): 1,19 ± 0,11, CS1 (7,3 μM): 1,23 ± 0,12, CS1 (0,73 μM): 1,23 ± 0,54, (60 Min.: CT: 0,41 ± 0,14, pFN (0,73 μM): 1,19 ± 0,14, CS1 (7,3 μM): 1,15 ± 0,073, CS1 (0,73 μM): 1,1 ± 0,33, 120 Min.: CT: 0,49 ± 0,16, pFN (0,73 μM): 1,15 ± 0,079, CS1 (7,3 μM): 1,23 ± 0,15, CS1 (0,73 μM): 0,94 ± 0,15, 180 Min.: CT: 0,5 ± 0,13, pFN (0,73 μM): 1,25 ± 0,12, CS1 (7,3 μM): 1,25 ± 0,12, CS1 (0,73 μM): 0,82 ± 0,19, (n=9/9/9/9/9/9/9/9/9/9/8/8/8/8/9/9/9/9)). (B) Repräsentative Darstellung der Phosphorylierung von IκBα durch die eingesetzten Moleküle. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

IκBα wurde bereits nach 30 Minuten durch pFN und das CS1-Peptid bei einer Konzentration von 7,3 μM verstärkt phosphoryliert, was bis zu einem Zeitraum von drei Stunden zu

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Behandlung von MSCs mit dem CS1-Peptid zur Phosphorylierung von NFκB führte, sollte die Translokation dieses Transkriptionsfaktors in den Zellkern von MSCs gezeigt werden. Hierzu wurden MSCs mit dem CS1-Peptid behandelt und die Zellen in eine Zytoplasma- und eine Nukleus-Fraktion getrennt. Die im Zellkern vorhandene Menge an NFκB wurde im Anschluss in der Zellkern-Fraktion im Vergleich zum Haushaltsgen Histon H3 quantifiziert (Abbildung 64).

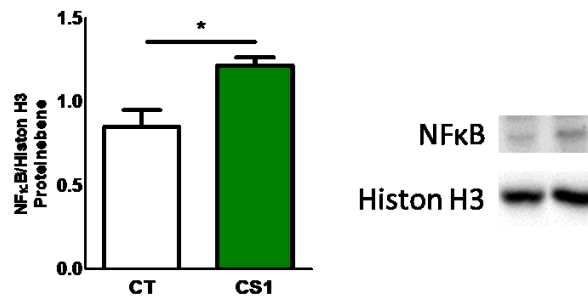


Abbildung 64: Die Translokation von NFκB in den Zellkern von MSCs nach der Behandlung mit dem CS1-Peptid. 7,3 μM CS1.

MSCs wurden für 120 Minuten in der Abwesenheit von FCS mit dem CS1-Peptid in einer Konzentration von 7,3 μM stimuliert, woraufhin sie in eine Zytoplasma- und eine Nukleus-Fraktion aufgeteilt wurden. Die Nukleus-Fraktion wurde mittels Western Blot evaluiert. Auswertung der Densitometrie der Phosphorylierung von NFκB in Relation zu Histon H3 mit repräsentativer Darstellung der untersuchten Moleküle. (CT: 0,85 ± 0,097, CS1: 1,22 ± 0,047), (n=4/4). *p<0.05.

Die Behandlung von MSCs mit dem CS1-Peptid führte zu einer verstärkten Translokation von NFκB in den Zellkern (Abbildung 64), was die Aktivierung des NFκB-Signalwegs durch dieses Peptid bestätigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung von MSCs mit pFN und dem CS1-Peptid die Phosphorylierung von FAK, AKT, ERK, JNK, IκBα und NFκB zu unterschiedlichen Zeitpunkten verstärkt. Außer FAK zeigten alle untersuchten Proteine bei 120 Minuten einen Anstieg der Phosphorylierung, wobei die niedrige Konzentration des CS1-Peptids bei JNK zumindest einen Trend zu diesem Zeitpunkt zeigte. Auch die Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB in den Zellkern von MSCs als Reaktion auf die Behandlung mit dem CS1-Peptid konnte in diesem Zusammenhang bestätigt werden.

3.4.2.3. Die Inhibition von TLR4 unterbindet die CS1-vermittelte Translokation von NFκB

Fibronectin kann die Aktivierung des NFκB-Signalwegs sowohl über die Bindung an Integrine (Kettritz et al., 2004; Orr et al., 2005; Qwarnström et al., 1994), als auch an Toll-like Rezeptoren

auslösen (Kelsh et al., 2014; Okamura et al., 2001; Zheng et al., 2011). Dabei werden sowohl über Integrine als auch über TLRs die gleichen Signalkaskaden in Form von I κ B (Hayden und Ghosh, 2008; Kettritz et al., 2004), FAK (Ellert-Miklaszewska et al., 2020; Zeisel et al., 2005), AKT (Bai et al., 2009; Ellert-Miklaszewska et al., 2020), ERK (Ellert-Miklaszewska et al., 2020; Küper et al., 2012) und JNK (Ellert-Miklaszewska et al., 2020; Küper et al., 2012) aktiviert. Aus diesem Grund sollte der Rezeptor ermittelt werden, durch den das CS1-Peptid den NF κ B-Signalweg in MSCs aktiviert. Ein bekannter Rezeptor für CS1 stellt das Integrin α 4 β 1 dar (Guan und Hynes, 1990; Mould et al., 1990; Ruegg et al., 1992; Wayner et al., 1989), wohingegen berichtet wurde, dass Fibronektin an TLR2 (Ambesi et al., 2022; Hwang et al., 2015), TLR4 (Kelsh et al., 2014; Okamura et al., 2001; Sofat et al., 2012) und TLR5 (Ambesi et al., 2022) binden kann. Zunächst wurde die Expression der genannten Rezeptoren in MSCs durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 65).

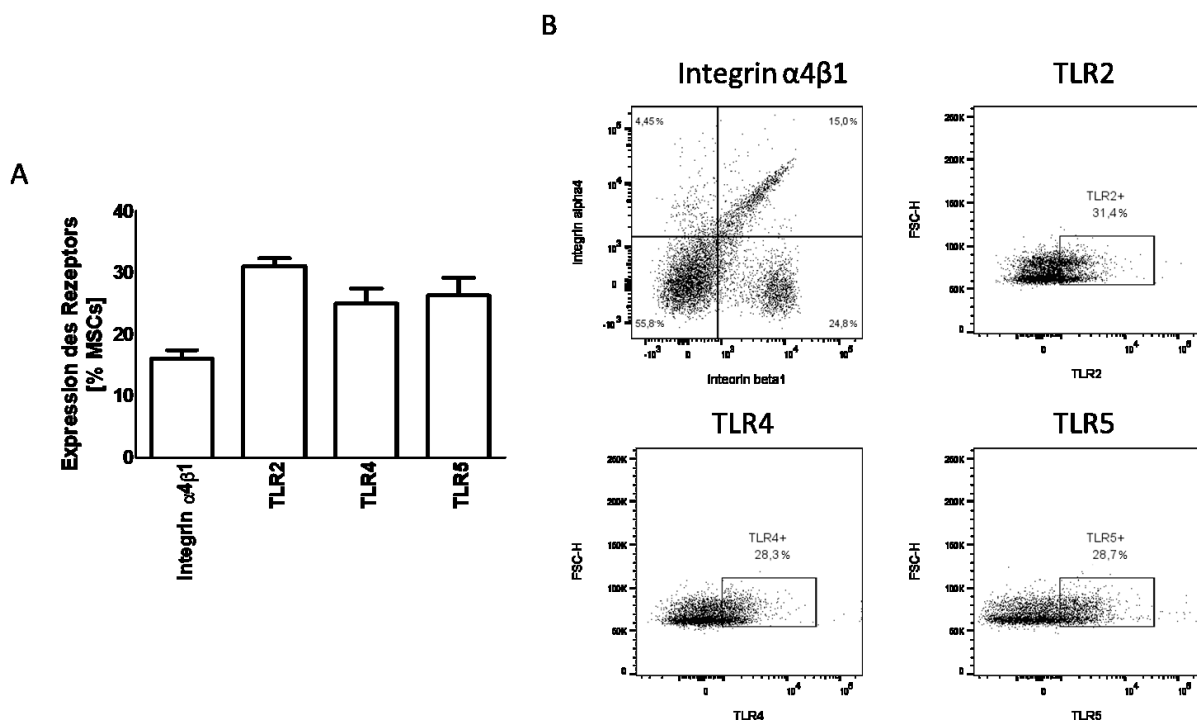


Abbildung 65: Expression von Integrin α 4 β 1, TLR2, TLR4 und TLR5 auf MSCs.

MSCs wurden isoliert und die Expression von Integrin α 4 β 1, TLR2, TLR4 und TLR5 durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Anteil der jeweiligen Rezeptoren auf den isolierten MSCs. (Integrin α 4 β 1: 16,05% \pm 1,38%, TLR2: 31,1% \pm 1,22%, TLR4: 24,98% \pm 2,44%, TLR5: 26,28% \pm 2,9%), (n=4/4/4/4). (B) Repräsentative Darstellung der Expression der jeweiligen Marker.

Die durchflusszytometrische Analyse der MSCs zeigte, dass jeder der genannten Rezeptoren auf einem Teil der isolierten Stromazellen exprimiert wird (Abbildung 65). Somit könnte jeder

Rezeptor für die Aktivierung der zuvor untersuchten Signalkaskaden verantwortlich sein (Abschnitt 3.4.2.2. Aktivierte Signalwege durch die CS1-Stimulation).

Aufgrund dieser Expression wurden die MSCs in Anwesenheit von mehreren Inhibitoren mit dem CS1-Peptid stimuliert: BIO5192 inhibiert die Integrine $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$, TLR2-IN-C29 inhibiert TLR2, TLR4-IN-C34 und TAK-242 inhibieren TLR4 und TH-1020 ist ein Inhibitor für TLR5. Die MSCs wurden eine Stunde vor der zweistündigen CS1-Zugabe mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt. Um die bestmögliche Aussage über die Aktivierung des NF κ B-Signalwegs zu erhalten, wurden MSCs nach Stimulation zu Zytoplasma- und Zellkern-Extrakten fraktioniert, um die tatsächlich im Nukleus vorhandene Menge an NF κ B zu bestimmen. Bei der Inhibition von TLR5 mit 30 μ M TH-1020 müsste jedoch eine DMSO-Verdünnung von 1:167 angewendet werden, bei der allerdings in der Kontroll-Gruppe die Translokation von NF κ B in den Zellkern unterbunden wurde (Daten nicht gezeigt). Dies hat vermutlich mit der anti-inflammatorischen Wirkung von DMSO zu tun (Elisia et al., 2016; Essani et al., 1997). Aus diesem Grund wurde für diese Versuchsgruppe eine zehnfach geringere Konzentration des Inhibitors und des CS1-Peptids gewählt. Die Kern-Extrakte wurden im Western Blot aufgetragen und das vorhandene NF κ B-Signal anhand des Haushaltsgens Histon H3 quantifiziert (Abbildung 66).

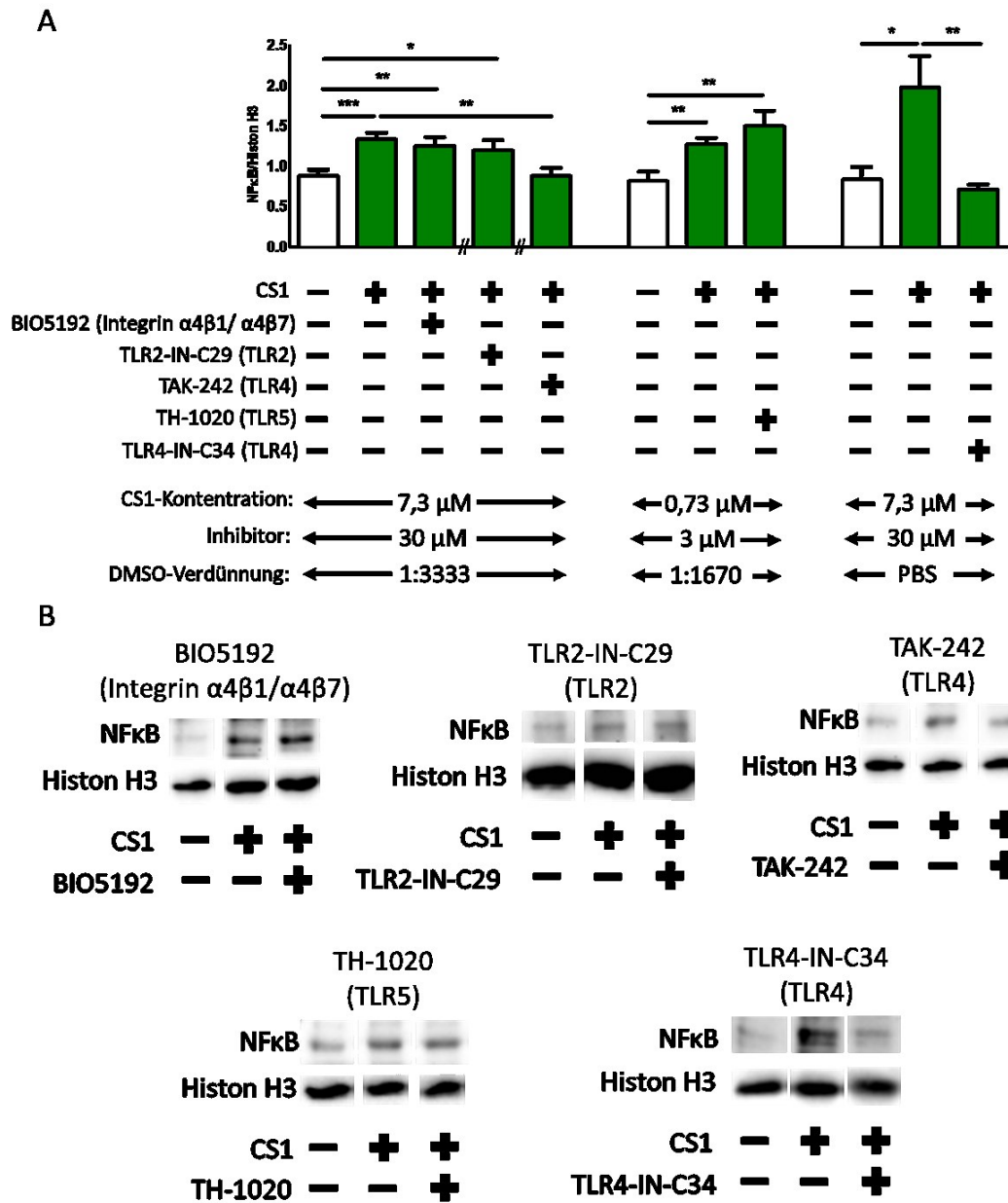


Abbildung 66: Pharmakologische Inhibition von Integrin $\alpha 4\beta 1$, TLR2, TLR4 und TLR5 und deren Auswirkung auf die Translokation von NF κ B in den Zellkern von MSCs.

Zu MSCs wurde eine Stunde vor der Zugabe des Peptids einer der Inhibitoren für Integrin $\alpha 4\beta 1$, TLR2, TLR4 und TLR5 hinzugefügt, bevor diese für zwei Stunden mit dem CS-Peptid behandelt wurden. Anschließend wurden sie in eine Zytoplasma- und eine Zellkernfraktion aufgeteilt und die Translokation von NF κ B in den Zellkern bestimmt. (CT DMSO 1:3333: $0,88 \pm 0,078$, CS1 DMSO 1:3333: $1,33 \pm 0,086$, CS1 BIO5192: $1,25 \pm 0,11$, CS1 TLR2-IN-C29: $1,2 \pm 0,13$, CS1 TAK-242: $0,88 \pm 0,098$, CT DMSO 1:1670: $0,82 \pm 0,12$, CS1 DMSO 1:1670: $1,28 \pm 0,077$, CS1 TH-1020: $1,5 \pm 0,19$, CT: $0,84 \pm 0,16$, CS1: $1,98 \pm 0,39$, CS1 TLR4-IN-C34: $0,71 \pm 0,063$), (n=23/23/21/11/14/8/8/8/9/9/10). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die Behandlung mit dem CS1-Peptid führte zu einer gesteigerten Translokation von NF κ B in den Zellkern (Abbildung 66). Dabei fiel auf, dass die Inhibition des Integrins $\alpha 4\beta 1/\alpha 4\beta 7$ überraschenderweise keinen Einfluss auf die Translokation hatte, was ebenfalls für TLR2 und

TLR5 gezeigt werden konnte. Einzig die Inhibition von TLR4 mit beiden Inhibitoren, TLR4-IN-C34 und TAK-242, senkte die Translokation von NFκB zurück auf die Höhe der Kontrolle. Somit ist TLR4 der verantwortliche Rezeptor, dessen Aktivierung die Translokation von NFκB in den Zellkern von MSCs bedingt.

3.4.2.4. Die Inhibition von TLR4 unterbindet die CS1-vermittelte Expression von Zytokinen und Chemokinen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Inhibition von TLR4 die Translokation von NFκB in den Zellkern durch die CS1-Stimulation hemmt, muss nun noch der Zusammenhang zwischen der Translokation von NFκB und der Expression von Zytokinen und Chemokinen durch das CS1-Peptid untersucht werden. Hierzu wurden MSCs eine Stunde vor der CS1-Zugabe mit dem TLR4-Inhibitor TLR4-IN-C34 behandelt und mit dem CS1-Peptid kultiviert. Dieser Inhibitor wurde gewählt, da er auch in PBS löslich war und DMSO anti-inflammatorisch wirkt und den NFκB-Signalweg inhibieren kann (Elisia et al., 2016; Essani et al., 1997). Anschließend wurde die Expression der zuvor untersuchten Gene mittels qPCR evaluiert (Abbildung 67).

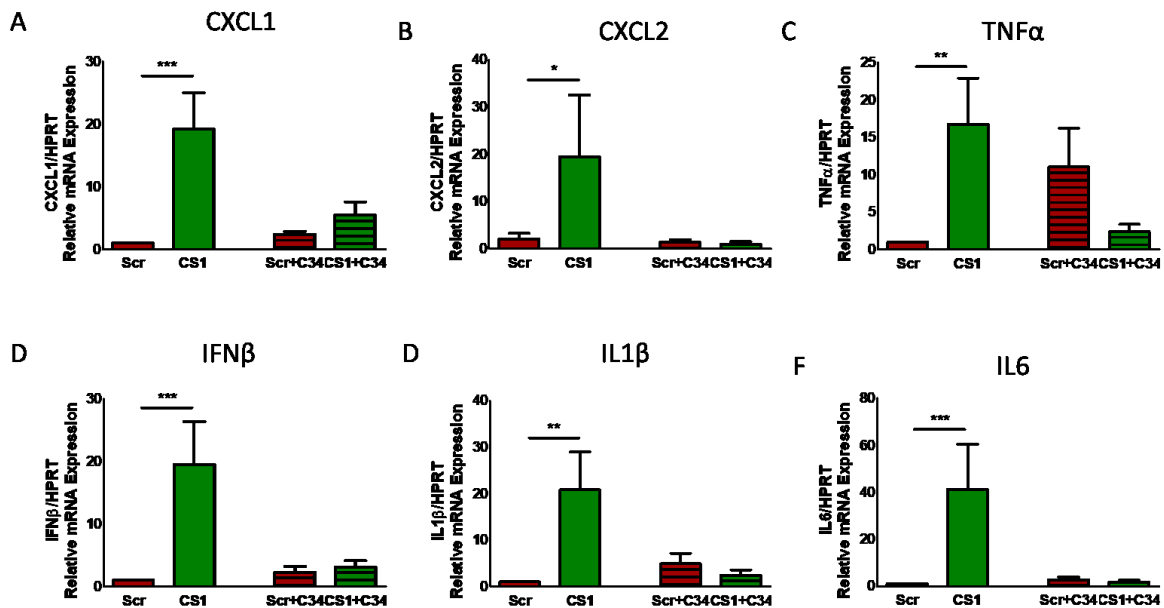


Abbildung 67: mRNA-Expression verschiedener Zytokine und Chemokine nach der Behandlung der MSCs mit dem CS1-Peptid.

MSCs wurden für eine Stunde mit dem TLR4-Inhibitor TLR4-IN-C34 behandelt und anschließend 24 Stunden in der Abwesenheit von FCS mit dem Scr- oder dem CS1-Peptid stimuliert, woraufhin die RNA isoliert und cDNA synthetisiert wurde. Anschließend wurden qPCRs für CXCL1, CXCL2, TNF α , IFN β , IL1 β und IL6 durchgeführt. Die relative Expression der entsprechenden mRNAs wurden gegen HPRT quantifiziert. (A) Expression von CXCL1 nach der Inhibition von TLR4 und der folgenden Stimulation mit dem CS1-Peptid (Scr: $1,04 \pm 0,011$, CS1: $19,16 \pm 5,85$, Scr+C34: $2,36 \pm 0,47$, CS1+C34: $5,43 \pm 2,13$), (n=15/11/11/13). (B) Expression von CXCL2 nach der Inhibition von TLR4 und der folgenden Stimulation mit dem CS1-Peptid (Scr: $2,11 \pm 1,16$, CS1: $19,48 \pm 13,07$, Scr+C34: $1,41 \pm 0,59$, CS1+C34: $1,01 \pm 0,52$), (n=16/11/14/14). (C) Expression von TNF α nach der Inhibition von TLR4 und der folgenden Stimulation mit dem CS1-Peptid (Scr: $1,01 \pm 0,0081$, CS1: $16,75 \pm 6,18$, Scr+C34: $11,05 \pm 5,16$, CS1+C34: $2,38 \pm 0,97$), (n=11/11/10/10). (D) Expression von IFN β nach der Inhibition von TLR4 und der folgenden Stimulation mit dem CS1-Peptid (Scr: $1,04 \pm 0,0072$, CS1: $19,52 \pm 6,86$, Scr+C34: $2,27 \pm 0,93$, CS1+C34: $3,123 \pm 0,998$), (n=14/11/11/13). (E) Expression von IL1 β nach der Inhibition von TLR4 und der folgenden Stimulation mit dem CS1-Peptid (Scr: $1,01 \pm 0,002$, CS1: $20,78 \pm 8,15$, Scr+C34: $4,93 \pm 2,23$, CS1+C34: $2,44 \pm 1,14$), (n=11/12/9/10). (F) Expression von IL6 nach der Inhibition von TLR4 und der folgenden Stimulation mit dem CS1-Peptid (Scr: $1,02 \pm 0,0074$, CS1: $41,14 \pm 19,34$, Scr+C34: $2,74 \pm 1,15$, CS1+C34: $1,85 \pm 0,68$), (n=13/12/9/13). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die Inhibition von MSCs mit dem TLR4-Inhibitor TLR4-IN-C34 führte zu einer Normalisierung der Expression aller untersuchten Zytokine und Chemokine, CXCL1, CXCL2, TNF α , IFN β , IL1 β und IL6 (Abbildung 67). Somit kann gefolgert werden, dass die Inhibition der Translokation von NF κ B in den Zellkern von MSCs auch zu einer Inhibition der Expression der durch das CS1-Peptid heraufregulierten Entzündungsfaktoren führt. Somit ist NF κ B der für die Expression dieser Moleküle verantwortliche Transkriptionsfaktor in MSCs nach CS1 Behandlung.

3.4.3. Die Modulation von Neutrophilen durch MSCs

In Zusammenhang mit der Relevanz von Neutrophilen bei der Inhibition des Tumorwachstums (Abschnitt 3.4.1.5. Die Folge der Depletion von Ly6G⁺-Zellen während des Tumorwachstums)

erfüllen CXCL1 und CXCL2 die Funktion einer chemotaktischen Anziehung von Neutrophilen (Fridlender et al., 2009; Means et al., 2003; Romieu-Mourez et al., 2009; Vieira et al., 2009), während TNF α , IL1 β und IL6 zu ihrer Aktivierung beitragen (Daniels et al., 1994; El-Benna et al., 2016; Elbim et al., 1994; Mollapour et al., 2001) und IFN β Neutrophile in den N1-Phänotyp polarisiert (Andzinski et al., 2016). Aus diesem Grund sollte bestimmt werden, ob MSCs Neutrophile verstärkt chemotaktisch in den Tumor anziehen oder ob sie auch ihre Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen verstärken.

3.4.3.1. Chemotaktische Anziehung von Neutrophilen durch MSCs

Die Fähigkeit zur Chemoattraktion von Neutrophilen durch MSCs wurde in einem Transwell-System untersucht. Hierfür wurden zunächst Neutrophile aus dem Knochenmark isoliert. Zur Isolation wurde ein Dichtegradient aus geschichteten Histopaque-1119- und Histopaque-1077-Phasen genutzt. Nach der Zentrifugation befinden sich Neutrophile am Übergangspunkt dieser beiden Schichten. Die Reinheit und der Anteil der lebenden Zellen dieser Isolation sind in Abbildung 68 aufgeführt.

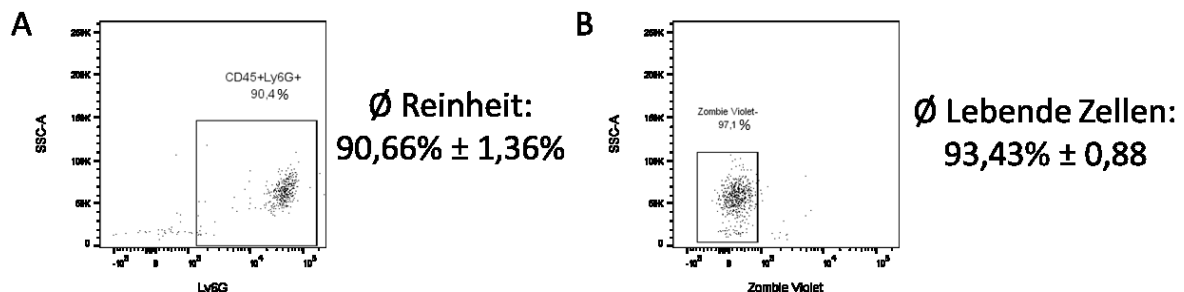


Abbildung 68: Reinheit und Überlebens-Rate der mittels Histopaque-Gradienten isolierten Neutrophile.

(A) Reinheit der isolierten Neutrophile (90,66% ± 1,36%; n = 8) (B) Lebende Zellen unter den isolierten Neutrophilen (93,43% ± 0,88%; n = 8)

Die gewonnenen Neutrophile wurden im Anschluss mittels CFSE Fluoreszenz-markiert. Für die chemotaktische Anziehung von Neutrophilen wurden konditionierte Medien von stimulierten MSCs gewonnen und dieses Mediums zusammen mit frischem FCS-haltigem Medium in das Loch der jeweiligen Lochplatte pipettiert. Anschließend wurde der Transwell-Einsatz in das Loch eingesetzt und mit Neutrophilen gefüllt. Als Kontrolle wurde, auf die gleiche Art und Weise wie bei MSCs gewonnene konditionierte Medien von murinen NIH3T3-Fibroblasten

verwendet. Über 23 Stunden hinweg wurde daraufhin der Anstieg des Fluoreszenzsignals durch den Übergang der Neutrophile vom Transwell-Einsatz in das Loch der Lochplatte, welches die konditionierten Medien enthielt, gemessen (Abbildung 69).

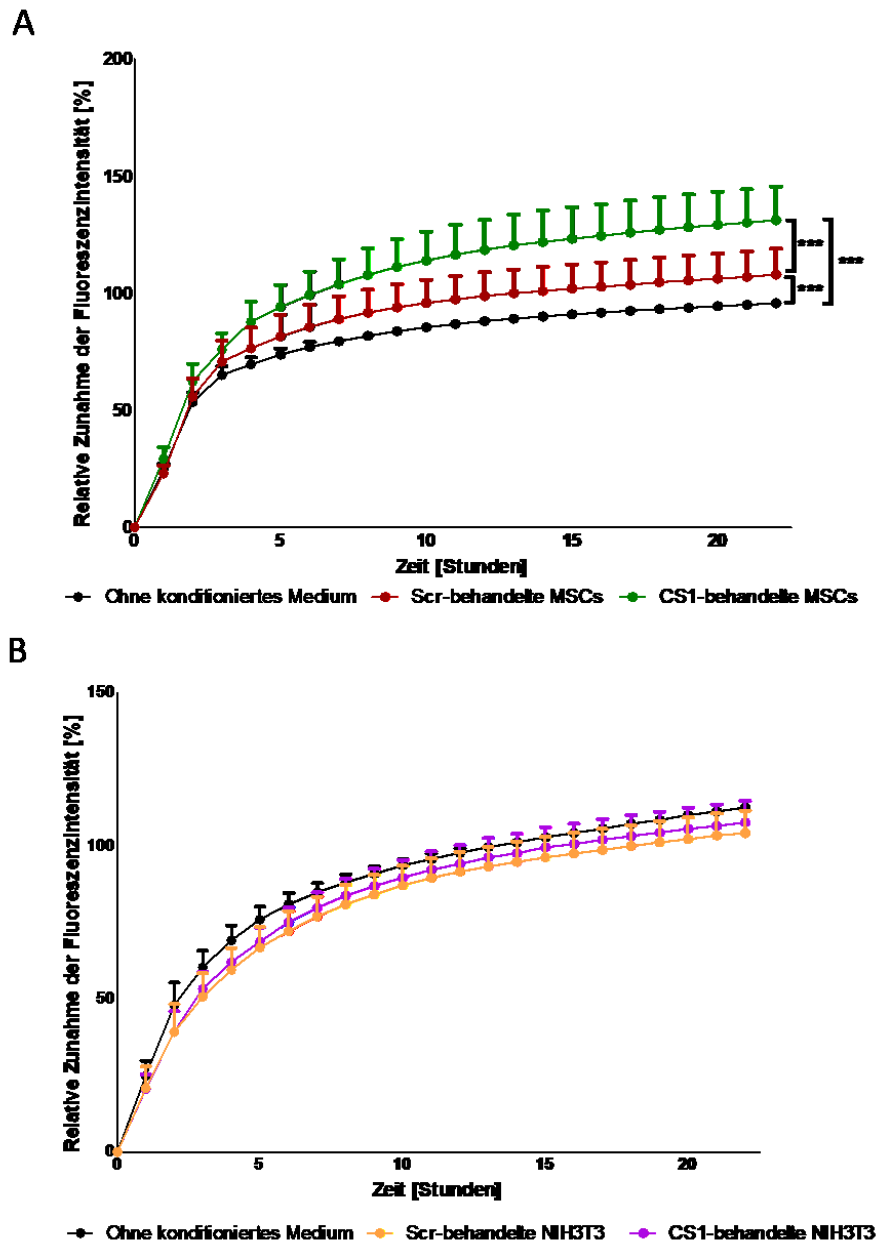


Abbildung 69: Chemotaktische Anziehung von Neutrophilen durch die von MSCs und NIH3T3-konditionierte Medien.

Neutrophile wurden mit CFSE Fluoreszenz-markiert. 450µl konditionierter Medien von stimulierten MSCs/NIH3T3-Zellen wurde in das Loch der Lochplatte zusammen mit 300µl α -MEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin gefüllt. Anschließend wurde der Transwell-Einsatz in das Loch eingesetzt und mit 300µl α -MEM ohne FCS oder Penicillin/Streptomycin mit 10.000 Neutrophilen gefüllt. Über 23 Stunden hinweg wurde daraufhin der Anstieg des Fluoreszenzsignals durch den Übergang der Neutrophile vom Transwell-Einsatz in das Loch der Lochplatte gemessen. (A) Chemotaktische Anziehung der Neutrophilen bei der Nutzung von konditionierten Medien von stimulierten MSCs. (n = 11/11/11), ***p<0,001. (B) Chemotaktische Anziehung der Neutrophilen bei der Nutzung von konditionierten Medien von NIH3T3-Zellen (n = 5/5/5).

Sowohl das konditionierte Medium von Scr-stimulierten, als auch CS1-stimulierten MSCs war in der Lage signifikant mehr Neutrophile anzuziehen, als unkonditioniertes Medium (Abbildung 69, A). Zusätzlich erhöhte die CS1-Stimulation die Anziehung von Neutrophilen nochmal signifikant im Vergleich zu Scr-stimulierten MSCs, wodurch deutlich wird, dass MSCs zwar Neutrophile anziehen, dieser Effekt jedoch durch die Stimulation mit CS1 verstärkt wird. NIH3T3-Zellen zogen jedoch keine Neutrophile an, weder nach der Behandlung mit dem Scr-Peptid, noch nach der Behandlung mit dem CS1-Peptid (Abbildung 69, B).

Somit stellt sich heraus, dass MSCs in der Lage sind, Neutrophile chemotaktisch anzuziehen und dass dieser Effekt durch die Behandlung mit dem CS1-Peptid weiter verstärkt wird. Dieser Effekt scheint spezifisch für diese Zellen zu sein, da NIH3T3-Zellen keine chemotaktische Anziehung von Neutrophilen aufweisen.

3.4.3.2. Einfluss der MSCs auf die Zytotoxizität von Neutrophilen gegen Tumorzellen

Neutrophile sind in der Lage, Krebszellen abzutöten (Godleski et al., 1970). Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob die Behandlung der MSCs nicht nur die Fähigkeit zur Attraktion dieser Zellen erhöht, sondern auch deren Fähigkeit Tumorzellen abzutöten, steigert. Hierzu wurden EO771-Zellen, die eine Luziferase exprimieren, in einer schwarzen 96-Lochplatte ausgesät. Neutrophile wurden aus Mäusen gewonnen und zusammen mit konditionierten Medien aus MSCs, die mit dem CS1- oder dem Scr-Peptid behandelt wurden, auf die Tumorzellen gegeben. Die Verhältnisse von den Tumorzellen zu den Neutrophilen betrug dabei 1:2, 1:5 und 1:10. Nach 24 Stunden wurde die Luziferase-Aktivität der noch lebenden Zellen gemessen.

EO771-Zellen

Nach 24 Stunden der Ko-Kultivierung dieser Zellen wurde das Medium von den EO771-Zellen abgenommen, die Zellen mit DPBS gewaschen und eine Luziferin-Lösung zu den Zellen gegeben (150 µg/ml). Nach einer 5-minütigen Wartezeit wurde das abgegebene Chemilumineszenz-Signal der noch lebenden Tumorzellen gemessen (Abbildung 70). Die

Abnahme des Signals wurde dabei prozentual zu EO771-Zellen ohne die Zugabe von Neutrophilen errechnet.

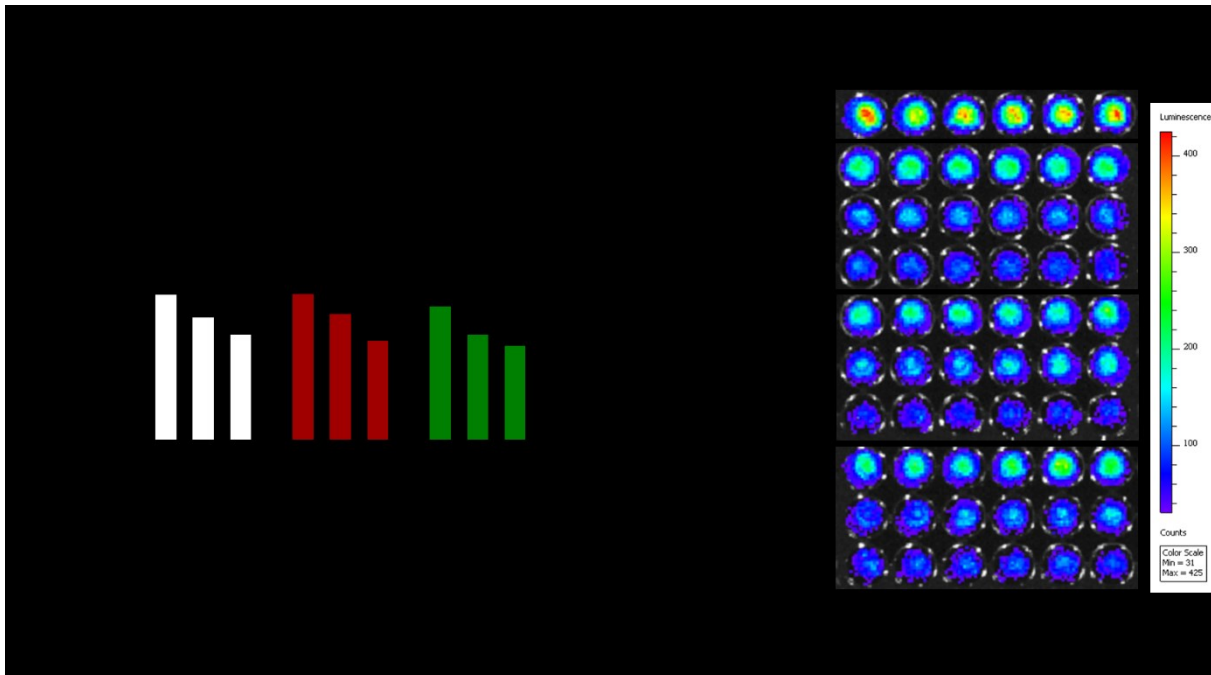


Abbildung 70: Zytotoxizität von Neutrophilen gegenüber EO771-Zellen in den von MSCs-konditionierte Medien.

EO771-Zellen mit einem Luziferase-Konstrukt wurden in einer schwarzen 96-Lochplatte ausgesät. Neutrophile wurden zusammen mit konditionierten Medien aus MSCs, die mit dem CS1- oder dem Scr-Peptid behandelt wurden auf die Tumorzellen gegeben (EO771-Zellen:Neutrophile = 1:2, 1:5, 1:10). Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und Luziferin (150 µg/ml) hinzugegeben. Nach einer fünfminütigen Wartezeit wurde das abgegebene Chemilumineszenz-Signal der noch lebenden Tumorzellen gemessen. (A) Prozentuale Abnahme des Chemilumineszenzsignals gegenüber der EO771-Kontrolle ohne Neutrophile. (EO771: 100,0 ± 0,0, Neutrophile 1:2: 84,12% ± 3,47%, Neutrophile 1:5: 71,01% ± 6,35%, Neutrophile 1:10: 61,2% ± 5,71%, Scr Medium+Neutrophile 1:2: 84,58% ± 4,62%, Scr Medium+Neutrophile 1:5: 73,15% ± 4,56%, Scr Medium+Neutrophile 1:10: 57,61% ± 5,61%, CS1 Medium+Neutrophile 1:2: 77,58% ± 2,8%, CS1 Medium+Neutrophile 1:5: 61,28% ± 4,28%, CS1 Medium+Neutrophile 1:10: 54,92% ± 4,18%, (n=18/18/18/18/18/18/18/18/18/18)). (B) Repräsentative Darstellung des Chemilumineszenzsignals unter den unterschiedlichen Bedingungen. *p<0,05, ***p<0,001.

Alle Gruppen, in denen Neutrophile hinzugefügt wurden, zeigten ein verringertes Chemilumineszenzsignal (Abbildung 70). Ebenso konnte unter allen Bedingungen eine Abnahme des Chemilumineszenzsignals mit ansteigender Konzentration an Neutrophilen beobachtet werden, was für eine höhere Anzahl von abgetöteten Tumorzellen spricht (Abbildung 70). Es gab zwar Unterschiede in der Abtötung von Tumorzellen mit Neutrophilen, die in Medien von CS1-stimulierten MSCs hinzugegeben wurden, es war jedoch keine generell höhere Abnahme ersichtlich. Dies spricht nicht für eine allgemeine Steigerung der Zytotoxizität der Neutrophile durch die CS1-Behandlung der MSCs.

MDA-MB-231

Die Tatsache, dass die Zytotoxizität von Neutrophilen durch die konditionierten MSC-Medien nicht verändert wird, sollte im Zusammenhang mit einer anderen Tumorzelllinie bestätigt werden. Aus diesem Grund wurden MDA-MB-231-Zellen zusammen mit Neutrophilen in den konditionierten MSC-Medien in den beschriebenen Verhältnissen ko-kultiviert. Nach 24 Stunden wurde auch hier die Luziferase-Aktivität gemessen (Abbildung 71).

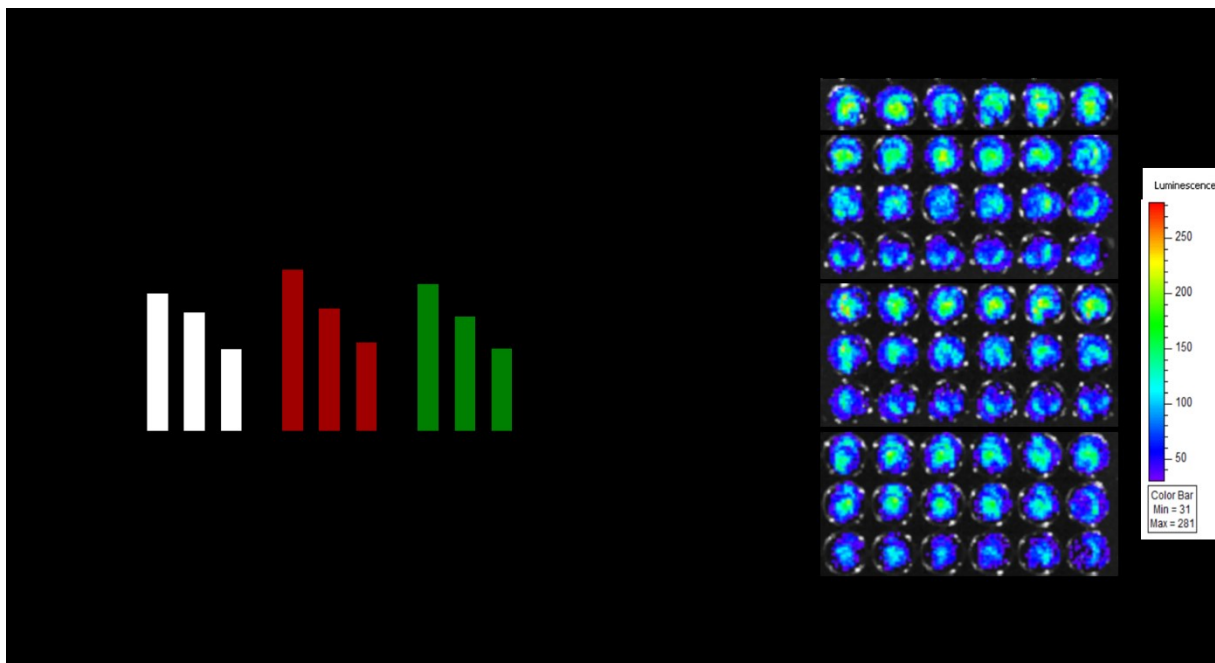


Abbildung 71: Zytotoxizität von Neutrophilen gegenüber MDA-MB-231-Zellen in den von MSCs-konditionierte Medien.

MDA-MB-231-Zellen mit einem Luziferase-Konstrukt wurden in einer schwarzen 96-Lochplatte ausgesät. Neutrophile wurden zusammen mit konditionierten Medien aus MSCs, die mit dem CS1- oder dem Scr-Peptid behandelt wurden auf die Tumorzellen gegeben (MDA-MB-231-Zellen:Neutrophile = 1:1, 1:2, 1:5, 1:10). Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Zellen gewaschen und Luziferin (150 µg/ml) hinzugegeben. Nach einer fünfminütigen Wartezeit wurde das abgegebene Chemilumineszenz-Signal der noch lebenden Tumorzellen gemessen. (A) Prozentuale Abnahme des Lumineszenzsignals gegenüber der MDA-MB-231-Kontrolle ohne Neutrophile. (MDA: 100,0 ± 0,0, Neutrophile 1:2: 81,32% ± 2,43%, Neutrophile 1:5: 70,37% ± 2,43%, Neutrophile 1:10: 48,89% ± 1,25%, Scr Medium+Neutrophile 1:2: 95,24% ± 2,93%, Scr Medium+Neutrophile 1:5: 72,62% ± 1,75%, Scr Medium+Neutrophile 1:10: 52,78% ± 1,64%, CS1 Medium+Neutrophile 1:2: 86,71% ± 2,39%, CS1 Medium+Neutrophile 1:5: 67,93% ± 2,8%, CS1 Medium+Neutrophile 1:10: 49,35% ± 1,46%), (n=12/12/12/12/12/12/12/12/12/12). (B) Repräsentative Darstellung des Chemilumineszenzsignals unter den unterschiedlichen Bedingungen. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Erneut lag mit einer steigenden Anzahl an Neutrophilen in allen Gruppen eine verstärkte Reduktion des Luziferase-Signals vor (Abbildung 71). Ebenso konnte unter allen Bedingungen, außer mit Scr-stimuliertem Medium mit Neutrophilen in einem Verhältnis von 1:2, eine Abnahme des Chemilumineszenzsignals mit ansteigender Konzentration an Neutrophilen

festgestellt werden (Abbildung 71). Es konnte eine größere Abtötung von MDA-MB-231-Zellen in allen CS1-stimulierten-Gruppen im Vergleich zu allen Scr-behandelten Gruppen beobachtet werden. Allerdings waren Neutrophile, die in CS1-stimulierten-MS-C-Medium in einem Verhältnis von 1:2 auf die Tumorzellen gegeben wurden, weniger zytotoxisch, als Neutrophile ohne konditionierte Medien, wobei keine Unterschiede zwischen den Verhältnissen 1:5 und 1:10 in diesen Gruppen ermittelt werden konnten. Dementsprechend kann auch in diesem Model festgehalten werden, dass die Stimulation von MSCs mit CS1 wahrscheinlich nicht zu einer allgemeinen Verstärkung der Fähigkeit von Neutrophilen Tumorzellen abzutöten führt.

Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass MSCs zwar eine höhere Anzahl an Neutrophilen anziehen, wenn sie mit dem CS1-Peptid stimuliert wurden (Abbildung 69, A), jedoch scheinen diese Immunzellen hierdurch nicht zu einer stärkeren Zytotoxizität gegen Tumorzellen angeregt zu werden. Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass MSCs Neutrophile zwar in großer Anzahl anziehen, um das Tumorwachstum zu inhibieren, diese jedoch nicht polarisieren.

3.4.4. Die Auswirkung der Inhibition von TLR4 von MSCs auf das Tumorwachstum

Die Auswirkung der TLR4-Inhibition von stimulierten MSCs auf das Tumorwachstum

Nachdem als Rezeptor für das CS1-Peptid TLR4 identifiziert wurde (Abschnitt 3.4.2.3. Die Inhibition von TLR4 unterbindet die CS1-vermittelte Translokation von NFκB) sollte ermittelt werden, ob dessen Inhibition einen Einfluss auf die Wirkung des CS1-Peptids auf die MSC-vermittelte Tumoringhibition hat. Hierzu wurde der TLR4-IN-C34-Inhibitor in einer Konzentration von 30 μM eine Stunde vor der Peptid-Stimulation zu den MSCs gegeben, woraufhin sie für 24 Stunden mit dem Scr- oder dem CS1-Peptid behandelt wurden. Diese Zellen wurden mit den Tumorzellen vermischt und subkutan injiziert. Nach sieben Tagen wurde das Tumorwachstum evaluiert (Abbildung 72).

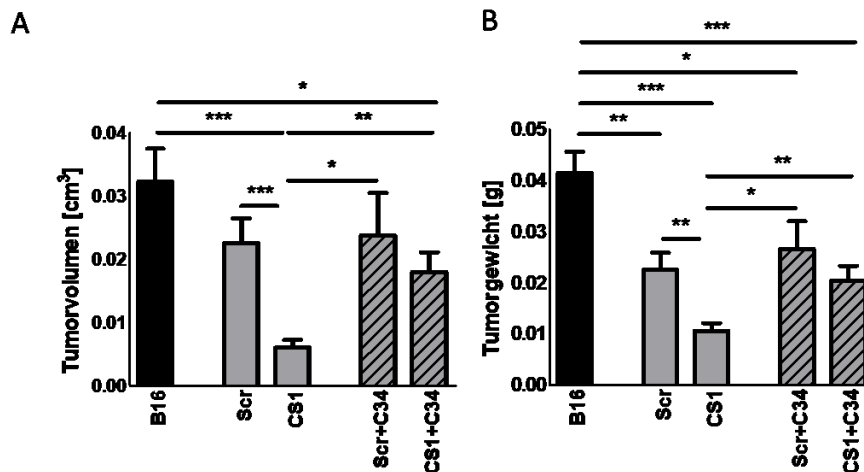


Abbildung 72: Tumorzellen und -gewicht bei der Injektion von CS1-stimulierten MSCs mit und ohne TLR4-Inhibitor mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tiere.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 stimulierten MSCs, die zuvor mit und ohne den TLR4-IN-C34-Inhibitor (30 µM) kultiviert wurden, in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert. (A) Volumen der Tumore am Versuchsende. (B16: 0,032cm³ ± 0,0052cm³, Scr: 0,023cm³ ± 0,0039cm³, CS1: 0,0061cm³ ± 0,0012cm³, Scr+C34: 0,024cm³ ± 0,0067cm³, CS1+C34: 0,018cm³ ± 0,0031cm³), (n=12/12/11/12/12). (B) Gewicht der Tumore am Versuchsende. (B16: 0,041g ± 0,0041g, Scr: 0,023g ± 0,0033g, CS1: 0,011g ± 0,0015g, Scr+C34: 0,027g ± 0,0054g, CS1+C34: 0,02g ± 0,0029g), (n=12/12/11/12/12). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Die Vorbehandlung der MSCs mit dem TLR4-Inhibitor führte zu einer Vergrößerung des Tumorzellvolumens (Abbildung 72, A) und des Tumorgewichts (Abbildung 72, B) im Vergleich zu CS1-behandelten MSCs ohne den Inhibitor auf das Level von MSCs, die mit dem Scr-Peptid behandelt wurden. Allerdings sind die resultierenden Tumore immer noch kleiner, als bei der B16-Kontrolle ohne MSCs. Des Weiteren führte die Inhibition von TLR4 zu keinerlei Veränderungen im Wachstum von Tumoren, bei denen MSCs mit dem Scr-Peptid behandelt wurden, wodurch Tumore mit MSCs mit diesem Peptid, mit und ohne den TLR4-Inhibitor, kleiner ausfallen, als die B16-Kontrolle.

Die Auswirkung der TLR4-Inhibition von stimulierten MSCs auf die infiltrierenden Immunzellen

Wenn die Behandlung von MSCs mit dem CS1-Peptid und die damit verbundene TLR4-abhängige Translokation von NFκB in den Zellkern (Abbildung 66) und die verstärkte Expression von Zytokinen und Chemokinen (Abbildung 67) für die verstärkte chemotaktische Anziehung von Neutrophilen (Abbildung 69) und der damit verbundenen Inhibition des

Tumorstwachstums (Abbildung 55) verantwortlich ist, müsste die Inhibition von TLR4 die Modulation von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen in den Tumor beeinflussen. Um diese Frage zu beantworten, wurden auch in diesem Modell die entnommenen Tumore durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 73).

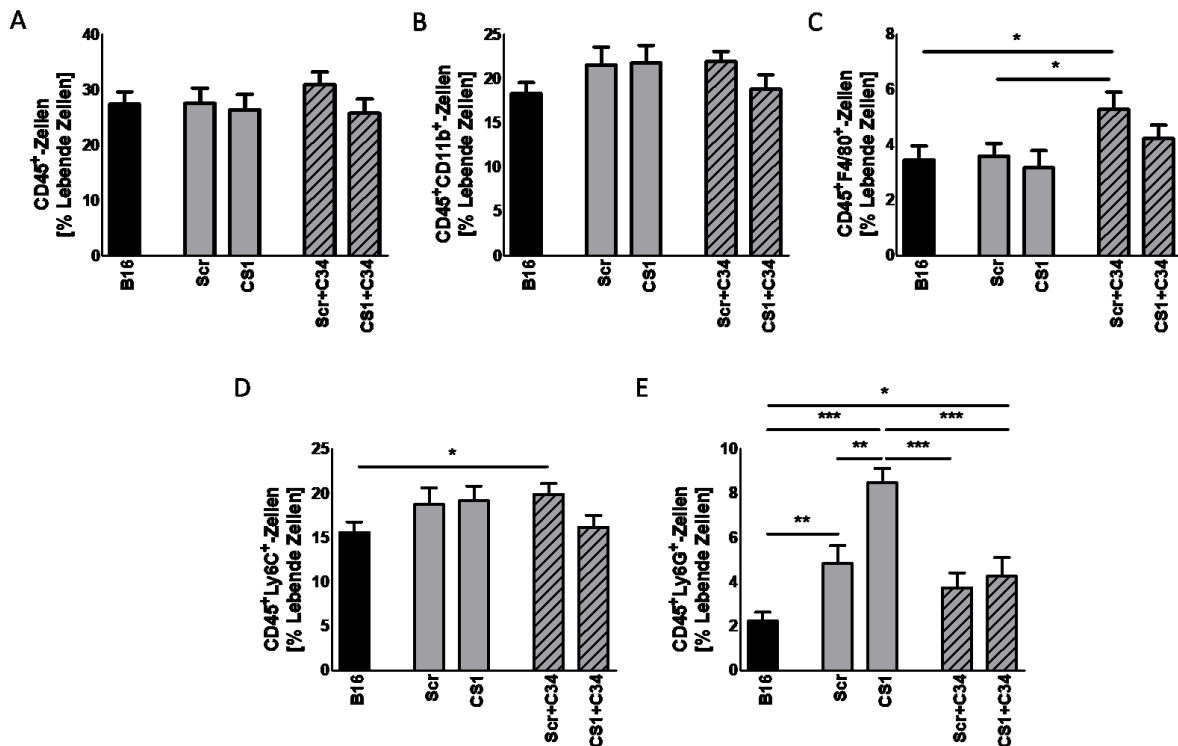


Abbildung 73: Immunzellinfiltration bei der Injektion von stimulierten MSCs mit und ohne TLR4-Inhibitor mit B16-Tumorzellen in C57BL/6-Tieren.

1.000.000 B16-Melanomzellen wurden zusammen mit 100.000 stimulierten MSCs, die zuvor mit und ohne den TLR4-IN-C34-Inhibitor (30 µM) kultiviert wurden, in die Flanke von C57BL/6-Tieren injiziert und die infiltrierenden Immunzellen per Durchflusszytometrie ausgewertet. (A) CD45⁺-Zellen (B16: 27,46% ± 2,17%, Scr: 27,55% ± 2,72%, CS1: 26,34% ± 2,8%, Scr+C34: 30,96% ± 2,22%, CS1+C34: 25,74% ± 2,59%), (n=12/12/12/12/12). (B) CD45⁺CD11b⁺-Zellen (B16: 18,33% ± 1,23%, Scr: 21,53% ± 2,05%, CS1: 21,78% ± 1,99%, Scr+C34: 21,93% ± 1,15%, CS1+C34: 18,8% ± 1,64%), (n=12/12/12/12/12). (C) CD45⁺F4/80⁺-Zellen (B16: 3,46% ± 0,5%, Scr: 3,59% ± 0,47%, CS1: 3,18% ± 0,62%, Scr+C34: 5,29% ± 0,62%, CS1+C34: 4,24% ± 0,47%), (n=12/12/12/12/12). (D) CD45⁺Ly6C⁺-Zellen (B16: 15,6% ± 1,17%, Scr: 18,73% ± 1,9%, CS1: 19,16% ± 1,66%, Scr+C34: 19,89% ± 1,23%, CS1+C34: 16,16% ± 1,36%), (n=12/12/12/12/12). (E) CD45⁺Ly6G⁺-Zellen (B16: 2,23% ± 0,4%, Scr: 4,82% ± 0,82%, CS1: 8,46% ± 0,66%, Scr+C34: 3,73% ± 0,68%, CS1+C34: 4,25% ± 0,85%), (n=12/12/12/12/12). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Es gab keine Unterschiede bei der Infiltration von CD45⁺- und CD45⁺CD11b⁺-Zellen (Abbildung 73, A-B), wohingegen die Anzahl von CD45⁺F4/80⁺- und CD45⁺Ly6C⁺-Zellen in Tumoren mit Scr-behandelten MSCs mit dem TLR4-Inhibitor im Vergleich zur Kontrolle und MSCs nur mit dem Scr-Peptid allein, bzw. nur zur B16-Kontrolle erhöht waren (Abbildung 73, C-D). Von besonderem Interesse war die Infiltration von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen, die in Tumoren mit Scr- und CS1-stimulierten MSCs erhöht waren, wohingegen, wie in den Versuchen zuvor, die Infiltration

bei CS1-MSC-Tumoren stärker war, als bei Scr-MSC-Tumoren (Abbildung 73, E). Hierbei zeigte sich auch, dass die Inhibition von TLR4 die Anzahl von CD45⁺Ly6G⁺-Zellen bei CS1-behandelten MSCs wieder auf den Prozentsatz von Scr-MSC-Tumoren senkte und damit eine geringere Zahl dieser Immunzellen aufweist, als Tumore mit CS1-stimulierten MSCs. Damit stellte sich die TLR4-Inhibition nicht nur als effizient genug heraus, die verstärkende wachstumsinhibierende Wirkung von CS1 zu negieren, sondern auch die damit verbundene verstärkte Infiltration von Neutrophilen zu senken.

Hiermit zeigen die hier erzielten Versuche, dass das CS1-Peptid in Fibronectin in MSCs die TLR4-abhängige Translokation von NFκB in den Zellkern veranlasst, wodurch die Expression von Zytokinen und Chemokinen verstärkt wird und somit Neutrophile chemotaktisch anzieht. Hierdurch wird die Hemmung des Tumorwachstums durch MSCs vermittelt und die Inhibition von Toll-like Rezeptor 4 verhindert die soeben beschriebenen Prozesse. Somit ist ein Mechanismus aufgedeckt worden, wodurch MSCs mit Hilfe der extrazellulären Matrix in der Lage sind, das Immunsystem und damit das Tumorwachstum zu modulieren.

4. DISKUSSION

Diese Arbeit befasste sich mit der Frage, inwiefern mesenchymale Stromazellen das Tumorwachstum modulieren und ob das produzierte Fibronectin dieser Zellen diese Modulation beeinflusst. Um den inhibierenden Effekt der MSCs auf das Tumorwachstum zu untersuchen, wurden konditionelle Knockout-Modelle für Fibronectin genutzt, um dessen Produktion in verschiedenen Subpopulationen auszuschalten. Zusätzlich wurde die Wirkung von Fibronectin auf MSCs über Integrine, die Hauptrezeptoren von Fibronectin, untersucht. Nachdem die verantwortliche Population der Tumoringhibition in Form der Osx-Subpopulation identifiziert war, wurde diese über die Bestimmung ihrer Oberflächenmarker näher charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Population von Interesse negativ für den CD31-Marker war. Anschließend konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Plasmafibronectin die Fähigkeit von MSCs das Tumorwachstum zu supprimieren verstärkt. Ein Bestandteil von Fibronectin, das CS1-Peptid, vermittelte diesen Effekt. Die Inhibition wurde über die Modulation der Anzahl von Neutrophilen vermittelt, die von MSCs chemotaktisch angezogen wurden. Der zugrundeliegende Mechanismus wurde untersucht und TLR4 als Rezeptor für CS1 identifiziert. Die Aktivierung von TLR4 löste die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen aus. Die Inhibition von TLR4 verhinderte die Translokation von NFκB in den Zellkern, verminderte die Zytokin- und Chemokinproduktion und negierte die zusätzliche Tumoringhibition von MSCs *in vivo*, wenn MSCs neben CS1 zusätzlich mit einem TLR4-Inhibitor vorbehandelt wurden.

4.1. Die Modulation des Tumorwachstums durch MSCs

Die Frage inwiefern Stromazellen das Tumorwachstum fördern oder inhibieren, wird in der Forschung seit langem untersucht, da sowohl pro-tumorigene, als auch anti-tumorigene Eigenschaften dieser Zellen beschrieben wurden, die sogar gleichzeitig stattfinden können. So wurde gezeigt, dass Stromazellen je nachdem, ob direkter Zell-Zell-Kontakt besteht oder nicht, das Tumorwachstum entweder erhöhen oder verringern können. Lösliche Faktoren verstärkten hierbei das Wachstum, während direkter Zellkontakt die Tumorprogression hemmte (Bajetto et al., 2017). Diese Modulation des Tumorwachstums in beide Richtungen kann durch zwei verschiedene Stromazellsubpopulationen verursacht werden, die zeitgleich

auf den Tumor einwirken, wie es bei mesenchymalen und inflammatorischen CAFs gezeigt werden konnte. Hyaluronsäuresynthase 2, bzw. Hyaluronsäure von mesenchymalen CAFs und der hepatische Wachstumsfaktor aus inflammatorischen CAFs förderte die Metastasierung von Pankreas- und Darmkarzinomen, wohingegen die simultane Produktion von Kollagen I aus mesenchymalen CAFs die Tumorprogression inhibierte (Bhattacharjee et al., 2021). Auch die Herkunft von Stromazellen kann bei der Tumorprogression eine Rolle spielen. MSCs aus dem Blut der Nabelschnur unterdrückten das Tumorwachstum, indem die Apoptose in Tumorzellen durch TRAIL ausgelöst wurde, wohingegen MSCs aus dem Fettgewebe im gleichen experimentellen Aufbau das Tumorwachstum durch die Expression von angiogenen Faktoren und CXCL12 förderten (Akimoto et al., 2013), was ebenfalls das Vorliegen von unterschiedlichen Stromazellpopulationen in verschiedenen Geweben nahelegt.

4.1.1. Die Förderung des Tumorwachstums durch MSCs

Es existieren Situationen, in denen MSCs das Tumorwachstum nicht inhibieren, sondern fördern (Aggarwal und Pittenger, 2005; Djouad et al., 2003; Engela et al., 2013b, 2013a; Montesinos et al., 2013; Nasef et al., 2007). Die Anzahl der injizierten MSCs in dieser Arbeit beeinflusste ihr Verhalten bei der Unterdrückung des Tumorwachstums. Mit ansteigender MSCs-Zahl verlor sich der inhibierende Effekt, wobei die Injektion von 2.000.000 MSCs in Tumoren resultierte, deren Größe sich nicht von den Kontrollen unterschied (Abbildung 9). Ein unterstützender Effekt auf das Tumorwachstum konnte somit nicht festgestellt werden. Eine Vielzahl von Stromazellen, wie auch MSCs, können während der Tumorprogression zu CAFs werden und ihre tumorhemmende Wirkung verlieren (Bochet et al., 2013; Jung et al., 2013; Karnoub et al., 2007; Ning et al., 2018; Sugimoto et al., 2006; Xing et al., 2010). Da Stromazellpopulationen sehr heterogen sind (Hutton et al., 2021; Lambrechts et al., 2018), wäre es möglich, dass ab einer gewissen Schwelle weniger anti-tumorigene und mehr pro-tumorigene oder nicht-inhibitorische Stromazellen injiziert werden, sodass das Tumorwachstum nicht mehr unterdrückt wird. Wie bereits beschrieben, kann eine Stromazellsubpopulation das Tumorwachstum fördern, während eine andere das Tumorwachstum hemmt. Hier stimulierte Hyaluronsäuresynthase 2, bzw. Hyaluronsäure von mesenchymalen CAFs und der hepatische Wachstumsfaktor aus inflammatorischen CAFs die

Tumorprogression, wohingegen Kollagen I aus mesenchymalen CAFs die Tumorentwicklung hemmt (Bhattacharjee et al., 2021). Hierdurch wäre es also möglich, dass der Einfluss einer nicht-inhibitorischen Subpopulation den Einfluss der inhibitorischen Population verdeckt. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die gemeinsame Injektion einer CD105⁻-Stromazellsubpopulation, die das Tumorwachstum unterdrückt, zusammen mit der nicht-inhibitorischen CD105⁺-Population zwar weiterhin die Größe der entstehenden Tumore reduziert, aber weniger effizient war, als die Injektion der inhibitorischen Population allein (Hutton et al., 2021). Somit beeinflusst die Präsenz von nicht-inhibitorischen Stromazellen das Verhalten von inhibitorischen Stromazellen. Die Präsenz von Stromazellen, die das Tumorwachstum nicht unterdrücken, konnte in dieser Arbeit in Form von CD146⁺- und CD31⁺-Zellen ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 29 und Abbildung 33).

Zwar ist Fibronectin notwendig für die Inhibition des Tumorwachstums durch MSCs (Abbildung 23), jedoch wäre es möglich, dass die höhere Anzahl an MSCs so viel Fibronectin produzieren, dass die hier festgestellten anti-tumorigenen Eigenschaften durch die pro-tumorigenen Eigenschaften dieses Proteins überlagert werden. Fibronectin konnte immerhin schon häufig als Förderer des Tumorwachstums identifiziert werden (von Au et al., 2013; Ghura et al., 2021; Rosnagl et al., 2016). Tatsächlich führte die Behandlung der Tumorzellen mit dem CS1-Peptid, einem Bestandteil von Fibronectin, welches die Inhibition des Tumorwachstums durch MSCs vermittelt (Abbildung 45 und Abbildung 51), zu einer geringeren Apoptose und höheren Proliferation von Tumorzellen (Abbildung 48 und Abbildung 50). Somit wäre eine Unterstützung des Wachstums durch Fibronectin wahrscheinlich, wobei der inhibitorische Effekt durch MSCs überlagert werden könnte. Die Unterstützung des Überlebens und der Proliferation von Tumorzellen durch CS1 könnte ebenfalls durch TLR4 vermittelt werden, welcher hier als Rezeptor für CS1 identifiziert wurde. Die Stimulation von TLR4 auf Tumorzellen ist mehrfach mit vielerlei Überlebensvorteilen für Tumorzellen assoziiert worden (Ran et al., 2019).

Eine weitere Möglichkeit, weswegen eine große Anzahl von MSCs das Tumorwachstum fördern könnte, stellt die Anwesenheit toter MSCs oder deren Trümmer dar (Abbildung 8 A-B), deren Anzahl bei der Injektion von 100.000, 1.000.000 oder 2.000.000 lebender MSCs passiv zunimmt. Die Apoptose von MSCs kann einen zentralen Bestandteil der Immunsuppression einnehmen, da apoptotische MSCs aus dem Fettgewebe besser als

gesunde MSCs in der Lage sind, Ratten vor einer Blinddarm-Ligation und Punktion-induzierten Sepsis zu schützen (Chang et al., 2012; Sung et al., 2013). Die Zugabe von Melatonin scheint diesen Effekt noch weiter zu verstärken, was zusätzlich in einem Modell eines Ischämie-Reperfusionsschadens der Lunge nachgewiesen werden konnte (Chen et al., 2014; Yip et al., 2013). Die Apoptose von MSCs ist dabei ein Prozess, der aktiv phagozytierende, myeloide Zellen zu einem anti-inflammatorischen Phänotyp modulieren kann (Galleu et al., 2017). Selbst Plasmamembranpartikel von fragmentierten MSCs haben eine anti-inflammatorische Wirkung. Solche Partikel führen zur selektiven Apoptose von pro-inflammatorischen CD14⁺CD16⁺-Monozyten, indem sie an diese Zellen binden (Gonçalves et al., 2017). Da die Vermeidung der Abtötung durch das Immunsystem zu den grundlegenden Eigenschaften von Krebserkrankungen zählt (Hanahan, 2022), stellt seine Suppression einen möglichen Weg für die Unterstützung des Tumorwachstums durch MSCs dar.

4.1.2. Die inhibierende Wirkung von MSCs auf das Tumorwachstum

Tumorinhibierende Mechanismen von MSCs konnten in vielen Modellen nachgewiesen werden und umfassen beispielsweise den Einfluss auf den Krebszellstoffwechsel, die Bildung von Exosomen, die Inhibition der Angiogenese oder die Modulation des Immunsystems (Abd-Allah et al., 2014; François et al., 2019; Gu et al., 2021; Ho et al., 2013; Lu et al., 2019, 2008b; Ma et al., 2012; Ohlsson et al., 2003; Otsu et al., 2009). Auch in Vorarbeiten der Gruppe konnte gezeigt werden, dass MSCs in der Lage sind, das Tumorwachstum von Brustkrebstumoren in einem Modell der intratibialen Injektion zu reduzieren. Hierbei wurden Stromazellen, die den Oberflächenmarker Sca1 exprimierten, zusammen mit MDA-MB-231-Zellen im Verhältnis 2:1 (Stromazellen:Tumorzellen) injiziert (Rossnagl et al., 2018). Reife T-Zellen waren in diesem Modell nicht vorhanden, wodurch deutlich wird, dass reife T-Zellen nicht für die Unterdrückung des Wachstums vonnöten sind, wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abbildung 12 und Abbildung 51). Trotzdem lässt sich nicht ausschließen, dass die Anwesenheit von T-Zellen im intratibialen Modell eine Rolle spielen würde, wenn sie im Modell vorhanden wären.

Der dort verwendete Sca1-Marker (Rossnagl et al., 2018) wird häufig für die Isolation von hämatopoetischen Stammzellen verwendet, wird jedoch auch auf Stammzellen vieler anderer

Gewebe exprimiert, wie im Knochen, dem vaskulären Endothelium oder in der Brustdrüse (Holmes und Stanford, 2007). Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen ebenfalls einen inhibierenden Effekt bei der Ko-Injektion von MSCs, der jedoch nur bei einem geringen Verhältnis von MSCs zu Melanomzellen erzielt werden konnte (Abbildung 9). Zwar war die unterdrückende Wirkung von MSCs in dem dort angewandten intratibialen Modell, anders als in diesem Modell, bei einem Verhältnis von 1:2 feststellbar, jedoch bedeutete dieses Verhältnis eine Injektion von 50.000 Tumorzellen mit 100.000 MSCs, was der gleichen absoluten Zellzahl entspricht, die in diesem Modell zu einer Unterdrückung führte. Die Modulation des Tumorwachstums durch eine geringe Menge an MSCs ist denkbar, weil MSCs auch in einer geringen Zahl in einem Tumor immunmodulatorische Effekte ausüben und das Wachstum somit beeinflussen können (Waterman et al., 2012a). Bestärkt wird diese Annahme dadurch, dass gezeigt werden konnte, dass die Injektion von 100.000 MSCs zusammen mit 1.000.000 4T1-Brustkrebszellen in die rechte Flanke das Tumorwachstum steigerte, wohingegen die Injektion von 100.000 MSCs in die gegenüberliegende Tumor-freie Flanke das Tumorwachstum hemmen konnte, indem die Expression von pro-inflammatorischen Molekülen im Tumor hochreguliert wurde (Zheng et al., 2016b). Injizierte MSCs wandern jedoch nur in kleiner Anzahl in den Tumor ein (Waterman et al., 2012a). Neben der Tatsache, dass dies zeigt, dass unterschiedliche Injektionsrouten die Wirkung von MSCs auf das Tumorwachstum beeinflussen können, weist dies also darauf hin, dass sehr wenige MSCs für die Inhibition des Tumorwachstums ausreichend sein können.

Stromazellen, speziell in der frühen Tumorbildung, bzw. bevor sie von Tumorzellen moduliert wurden, inhibieren das Wachstum von Melanomen. Nur bei nicht-malignen Stromazellen war zu beobachten, dass sie die Proliferation von immortalisierten Epithelzellen der Prostata hemmen können, wohingegen dieser Effekt bei CAFs nicht gezeigt werden konnte. Zusätzlich ziehen CAFs chemotaktisch Endothelzellen an, was die Blutgefäßbildung im Tumor fördert (Paland et al., 2009). Dass CAFs im Gegensatz zu MSCs das Tumorwachstum nicht hemmen, konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Abbildung 15). Die Inhibition von Tumorzellen durch nicht-maligne Fibroblasten verschwindet jedoch nachweislich bei zunehmender Tumorprogression oder verändert sich sogar zu einem Tumor-unterstützenden Effekt, wie die Zunahme der Proliferation von metastatischen PC3-Zellen durch normale Fibroblasten zeigen konnte (Lu et al., 1992; Paland et al., 2009). Da die MSCs in dieser Studie direkt mit den Tumorzellen injiziert wurden und die Wachstumsdauer in den untersuchten

Modellen 7 bis 14 Tage beträgt, bestätigen diese Modelle die inhibitorischen Fähigkeiten von Stromazellen in der frühen Tumorprogression, während CAFs, die bereits mit Tumorzellen in Kontakt kamen, diese Fähigkeit verloren haben (Abbildung 9 und Abbildung 15).

Bei der Inhibition von Tumorzellen durch nicht-maligne Fibroblasten spielt die Sekretion von Zytokinen, wie IL1 α , IL1 β , IL6 oder TNF α eine Rolle (Lu et al., 1992; Maestroni et al., 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MSCs nach der Stimulation mit dem CS1-Peptid die Expression einiger solcher Zytokine hochfahren, wie beispielsweise TNF α , IL1 β oder IL6 (Abbildung 57 und Abbildung 67). Der inhibierende Effekt auf das Wachstum konnte in diesem Kontext nicht nur im Melanommodell gezeigt werden, sondern auch auf ein orthotopes Brustkrebsmodell übertragen werden (Abbildung 9 und Abbildung 17). Eine solche Inhibition von Krebs durch MSCs während der frühen Wachstumsphase ist bereits bekannt, wobei dort die Apoptose direkt in den Brustkrebszellen ausgelöst wurde (Sun et al., 2009). Die Inhibition von Krebszellen durch Zytokine aus Stromazellen konnte auch im Zusammenhang mit Prostatakrebszellen beobachtet werden (Degeorges et al., 1996).

Während die hier beschriebenen Effekte der Tumoringhibition auf der direkten Interaktion von Krebszellen mit Stromazellen oder auf direkten Effekten ihrer löslichen Faktoren basieren, scheinen solche Interaktionen nicht an der Hemmung des Tumors in dieser Arbeit beteiligt zu sein. Die Depletion von Ly6G-exprimierenden Zellen führte dazu, dass das Wachstum der Tumore nicht mehr inhibiert wurde (Abbildung 55), was eine direkte Beeinflussung der Tumorzellen durch MSCs unwahrscheinlich macht. Auf die Modulation des Immunsystems durch Stromazellen zur Inhibition des Tumorwachstums wird in einem späteren Abschnitt genauer eingegangen.

4.2. Fibronektin als entscheidender Faktor zur Inhibition des Tumorwachstums

4.2.1. Das Fibronektin der Mx- und Osx-Subpopulationen

Bezüglich Fibronektin im Kontext von Krebs konnte durch Vorarbeiten der Gruppe ein fördernder Effekt dieses Moleküls auf das Wachstum von Tumoren festgestellt werden (von Au et al., 2013; Ghura et al., 2021; Rosnagl et al., 2016). Auch metastasenfördernde Effekte wurden beschrieben (Malik et al., 2010). Es liegen jedoch auch Ergebnisse vor, die zeigen, dass

Fibronektin unter bestimmten Umständen die Tumorprogression inhibieren kann (Jia et al., 2012; Kamal et al., 2021; Shinde et al., 2018). Bereits in anderen Studien konnten anti-tumorigene Eigenschaften von Fibronektin beschrieben werden, die sich aber hauptsächlich auf die Inhibition der Metastasierung bezogen (Jia et al., 2012; Saiki et al., 1990; Shinde et al., 2018). Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass die Injektion des FNIII1c-Fragments nicht nur die Tumormetastasierung *in vivo* verminderte (Pasqualini et al., 1996; Yi und Ruoslahti, 2001), sondern auch direkt das Tumorwachstum hemmte, indem es die Angiogenese in den gebildeten Tumoren reduzierte (Yi und Ruoslahti, 2001). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fibronektin aus der Mx- und der Osx-Population in MSCs das Tumorwachstum unterdrücken kann, da die Deletion von Fibronektin unter diesen Promotoren die wachstumsinhibierenden Eigenschaften der MSCs unterbindet (Abbildung 23). Obwohl der Mx-Promotor in verschiedenen Zellarten aktiv ist, konnte ein Teil seiner Aktivität in Zellen osteogener Abstammung festgestellt werden (Panaroni et al., 2014; Park et al., 2012). Dies legt nahe, dass die Mx-MSC-Population die Osx-MSC-Population beinhaltet. Dies würde erklären warum die Injektion beider FN-cKO-MSCs zu einem größeren Tumor, bzw. zu einem Verlust der Inhibition des Tumorwachstums führt.

Ein möglicher Grund, weswegen sich gegensätzliche experimentelle Effekte bei Fibronektin zeigen, könnte die Quelle für dieses Protein der extrazellulären Matrix sein. Tenascin-C, ein anderes Molekül der extrazellulären Matrix, wird bei Tumorerkrankungen vermehrt exprimiert und fördert das Wachstum von Tumoren, indem es die Polarisierung von pro-tumorigenen Makrophagen fördert, wenn es von Tumorzellen produziert wird (Deligne et al., 2020; Nong et al., 2015). Wird dieses Protein hingegen von gesunden Körperzellen produziert, polarisieren sich Makrophagen in den anti-tumorigenen Phänotyp, was die Rolle dieses Proteins aus gesunden Körperzellen bei der Polarisierung in anti-tumorigene Myeloidzellen hervorhebt (Deligne et al., 2020). Ähnlich wie Tenascin-C scheint also auch Fibronektin aus Stromazellen in der Lage zu sein, das Immunsystem zu modulieren (Abbildung 24). Fibronektin aus gesunden Stromazellen könnte somit andere Wirkungen auf das Tumorwachstum aufweisen, als es aus anderen Quellen für dieses Molekül der Fall wäre. Krebszellen exprimieren nachweislich andere Formen von Fibronektin, als es nicht-maligne Zellen tun. Beispielsweise konnte eine erhöhte Expression von oFN oder EDA- und EDB-Fibronektin in Tumoren nachgewiesen werden (Amin et al., 2021; Mandel et al., 1992; Wagner et al., 2021). Auch in dieser Arbeit zeigte sich, dass die erhöhte Anwesenheit der EDA- und EDB-Isoformen

von Fibronectin das Tumorwachstum beeinflussen kann. Die EDA- und EDB-Isoformen wurden schon häufiger mit einer tumorfördernden Wirkung in Verbindung gebracht, auch wenn der genaue Mechanismus nicht eindeutig geklärt ist. Beide Isoformen sind in Tumoren häufig vermehrt exprimiert (Eigentler et al., 2011; Femel et al., 2014; Huijbers et al., 2012; Johannsen et al., 2010; Martín-Otal et al., 2022; Wagner et al., 2021). Dies ist sowohl in Primärtumoren, als auch in Metastasen der Fall (Frey et al., 2011). Die Quelle für die EDA-Isoform sind dabei nicht nur Tumorzellen, sondern auch Stromazellen (Matsumoto et al., 1999). Bei der Quantifizierung von Fibronectin in FN-cKO-Tieren zeigte sich, dass ein Großteil der Fibronectinproduktion ausbleibt, wenn die Cre-Rekombinase unter dem *Osx* oder dem *Mx*-Promotor exprimiert wird (Abbildung 19). Wie bereits erwähnt, bleibt daraufhin die Inhibition des Tumorwachstums aus (Abbildung 23). Auf der anderen Seite konnte auch in den *Vav*-FN-cKO-MSCs eine deutliche Reduktion von Fibronectin nachgewiesen werden, jedoch führte die Ko-Injektion dieser Zellen weiterhin zu einem inhibierten Tumorwachstum (Abbildung 10 und Abbildung 23). Im Unterschied zu *Vav*-FN-cKO-MSCs ist jedoch der Anteil an EDA-Fibronectin im Proteinlysate von *Mx*-FN-cKO-MSCs erhöht (Abbildung 20 B). In Vorarbeiten aus unserer Gruppe konnte für EDA-Fibronectin aus Osteoblasten gezeigt werden, dass es immunmodulatorische Eigenschaften besitzt und bei der Generierung von anti-inflammatorischen MDSCs eine Rolle spielt (Rosnagl et al., 2016). EDA-Fibronectin aus nicht-malignen Zellen hat somit das Potential das Tumorwachstum zu fördern. EDA-Fibronectin ist ein wichtiger Faktor bei der Induktion von Myofibroblasten, da der Einsatz eines Antikörpers gegen diese Isoform die Expression von α SMA in Fibroblasten minderte (Serini et al., 1998). Da Myofibroblasten eine wichtige Quelle für CAFs darstellen (Liu et al., 2019), kann EDA-Fibronectin somit auch die Polarisierung von CAFs begünstigen. Es konnte auch gezeigt werden, dass EDA-Fibronectin aus CAFs in der Lage ist, die Proliferation, Migration und Invasion von Brustkrebszellen zu erhöhen (Kwon et al., 2020), was auch im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche Wirkung dieser Isoform auf Tumorzellen darstellen könnte.

Neben EDA-Fibronectin war auch eine andere Isoform, EDB-Fibronectin, in *Osx*-FN-cKO-MSCs trotz der Ausschaltung von Fibronectin verhältnismäßig erhöht, was mit einem Ausbleiben der Inhibition des Tumorwachstums einherging (Abbildung 21 und Abbildung 23). Die Expression von EDB-Fibronectin ist während der Tumorprogression häufig hochreguliert. Eine erhöhte Expression von EDB konnte für Brust- und Darmkrebszellen gezeigt werden (Matsumoto et al., 1999; Midulla et al., 2000). Die Produktion von EDB-Fibronectin ist auch in transformierten

Endothelzellen erhöht (Midulla et al., 2000). Möglicherweise ist EDB-Fibronectin also in der Lage, Stromazellen im TME zu modulieren. Bestärkt wird diese Annahme dadurch, dass EDB-Fibronectin nicht nur die Proliferation von Endothelzellen anregen (Khan et al., 2005), sondern auch die Proliferation von Fibroblasten verstärken kann, wenn diese beispielsweise durch TGF β induziert wurden (Cui et al., 2020; Fukuda et al., 2002). Da TGF β von Tumorzellen exprimiert wird und es die Transition von nicht-malignen Stromazellen zu CAFs auslöst (Yoon et al., 2021), könnte EDB-Fibronectin in diesem Kontext zur Veränderung von Fibroblasten in einen pro-tumoralen Phänotyp führen. Eine Erhöhung von EDB-Fibronectin war jedoch auch in MSCs aus Col-FN-cKO-Tieren ersichtlich, während die Gesamtmenge an Fibronectin unverändert war (Abbildung 19 und Abbildung 21). Da in diesen Tieren dennoch eine Hemmung des Tumorwachstums ersichtlich war (Abbildung 23), spricht dies dafür, dass eine erhöhte Expression von EDB-Fibronectin im Verhältnis zu Gesamtfibronectin notwendig ist, um die Inhibition des Tumorwachstums zu unterbinden, wie es bei Osx-FN-cKO-MSCs der Fall ist (Abbildung 19, Abbildung 21 und Abbildung 23). Unter Umständen ist also die höhere Menge an Gesamtfibronectin, die mit einer höheren Menge an CS1 einhergeht, in Col-FN-cKO-MSCs dazu in der Lage, die tumorfördernden Eigenschaften von EDB-Fibronectin auszugleichen. Dies setzt allerdings voraus, dass EDB-Fibronectin im hier vorliegenden Modell tumorfördernd ist.

Es stellt sich jedoch die Frage, weswegen der Gehalt an EDB-Fibronectin in Col-FN-cKO-Tieren überhaupt erhöht war, wenn dieser Promotor zwar in differenzierenden Osteoblasten, jedoch nicht in Stromazellen des Knochenmarks aktiv ist. Osteoblasten stellen eine wichtige Quelle für zelluläres Fibronectin im Knochenmark dar (Bentmann et al., 2010; Rosnagl et al., 2016). Auch Stromazellen des Knochenmarks sind eine wichtige Quelle für Moleküle der extrazellulären Matrix und sind durch die Produktion dieser ECM am Erhalt ihrer Nische im Knochen beteiligt (Novoselefskaya et al., 2020). Hierdurch besteht die Möglichkeit, dass MSCs durch ihre Produktion von Fibronectin das Fehlen von Fibronectin aus Osteoblasten kompensieren könnten und hierdurch die Expression von bestimmten Isoformen von Fibronectin hochregulieren. Die Kompensation des Verlusts eines bestimmten Proteins der extrazellulären Matrix durch ein anderes stellt einen bekannten Mechanismus von Zellen dar. So führt der Verlust der $\alpha 5$ Kette von Laminin 511 zu einer Kompensation durch Laminin 411 und Laminin 111 (Mahoney et al., 2008) oder der Verlust der $\alpha 3/4(IV)$ -Kollagen-Ketten zur Produktion von $\alpha 5\alpha 6(IV)$ -Kollagen (Kang et al., 2006). Der Ausgleich des Verlusts der

Fibronektinproduktion eines bestimmten Zelltyps durch eine andere Zellart ist ebenfalls möglich. Astrozyten der Retina können beispielsweise den Verlust von Fibronektin aus Endothelzellen oder Perizyten ausgleichen (Stenzel et al., 2011).

4.2.2. Die Identifikation der inhibitorischen Osx-Subpopulation anhand von Oberflächenmarkern

Die Charakterisierung von Stromazellen innerhalb von Tumoren kristallisierte sich in den letzten Jahren als ein bedeutender Teil der Krebsforschung heraus (Biffi et al., 2019; Elyada et al., 2019; Hutton et al., 2021). Obwohl die Osx-Subpopulation nur einen sehr kleinen Teil der MSC-Subpopulation darstellt (Abbildung 18), produziert sie einen großen Teil des Fibronektins innerhalb der isolierten Stromazellen (Abbildung 19). Hiermit weist die Osx-Subpopulation eine Eigenschaft sogenannter mesenchymaler CAFs auf, die für ihre Produktion von Matrixproteinen bekannt sind (Biffi et al., 2019; Elyada et al., 2019; Hutton et al., 2021). Da das gebildete Fibronektin, bzw. die enthaltende CS1-Region, die Expression von Zytokinen auslöst, hat die gesuchte Population zusätzlich Eigenschaften von inflammatorischen CAFs (Biffi et al., 2019; Elyada et al., 2019; Hutton et al., 2021).

Es war überraschend, dass die Osx-positiven MSCs, eine so kleine Population an Stromazellen, eine so ausschlaggebende Wirkung auf die Inhibition des Tumorwachstums vermittelt (Abbildung 9 und Abbildung 23). Deswegen wurde die Zusammensetzung verschiedener Oberflächenmarker dieser Population charakterisiert (Tabelle 8). Jeder der in dieser Arbeit untersuchten Marker, CD31 (He et al., 2013; Rossnagl et al., 2018), CD44 (Anderson et al., 2013; Cheng et al., 2012; Li et al., 2012; Ma et al., 2012), CD146 (Bikorimana et al., 2022; Crisan et al., 2008; Shi und Gronthos, 2003), Sca1 (Cheng et al., 2012; Li et al., 2012; Ma et al., 2012; Rossnagl et al., 2018), CD105 (Anderson et al., 2013; Bajetto et al., 2017; Cheng et al., 2012; Hutton et al., 2021) und FAP (Bae et al., 2008; Chung et al., 2014) kann von MSCs exprimiert werden und kann zur Beschreibung dieser Zellen dienen. Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass CD31 auf MSCs häufig als Negativmarker verwendet wird (Anderson et al., 2013; Cheng et al., 2012; Hutton et al., 2021; Ma et al., 2012).

CD146 stellt einen Marker in Endothel, Perizyten und glatten Muskelzellen dar (Wang et al., 2020). Da der Anteil an CD146⁺-MSCs sowohl in der Osx⁺, als auch in der Osx⁻ sehr klein war,

sollten CD146⁻-Zellen als gute Kontrolle dafür dienen, ob die Zellsortierung die Reaktion der MSCs beim Tumorwachstum beeinflusst, da Zellen durch Sortierungen moduliert werden können (Andrä et al., 2020; Li et al., 2013). Da dieser Marker jedoch auch von MSCs exprimiert werden kann (Bikorimana et al., 2022; Crisan et al., 2008; Shi und Gronthos, 2003) wurden auch CD146⁺-Zellen zusammen mit Tumorzellen injiziert. In anderen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass der Knockdown von CD146 in CAFs sowohl ihre Aktivierung steigert, als auch die Migration und Invasion von Tumorzellen fördert (Zheng et al., 2016a). In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Injektion von CD146⁻-Zellen das Wachstum effizient unterdrücken konnte, wohingegen die CD146⁺-Population keine Unterdrückung aufwies (Abbildung 29). Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den CD146⁺-Zellen tatsächlich um Perizyten oder eine nicht-inhibitorische MSC-Subpopulation handeln könnte. Die erhöhte Expression von CD146 in Tumoren geht mit einer schlechten Prognose einher (Zabouo et al., 2009) und wird mit vielen Mechanismen in Zusammenhang gebracht, die die Blutgefäßbildung fördern und damit das Tumorwachstum unterstützen können (Joshkon et al., 2020). Die Expression von CD146 auf MSCs ist darüber hinaus an anderer Stelle mit einer immunsupprimierenden Subpopulation assoziiert worden (Bikorimana et al., 2022). Das Ausbleiben der Inhibition des Wachstums bei der Nutzung der CD146⁺-Population ist unter diesen Gesichtspunkten nachvollziehbar.

Zu den exprimierten Markern der Osx-Subpopulation zählte auch Sca1. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Sca1⁺-Stromazellen das Tumorwachstum inhibieren (Rosnagl et al., 2018), was auch schon an anderer Stelle bestätigt werden konnte (Ma et al., 2012). Die Sortierung von Stromazellen in Sca1⁻- und Sca1⁺-Zellen bestätigte zwar die inhibierenden Eigenschaften der Sca1⁺-Subpopulation auf das Tumorwachstum, jedoch konnte dies ebenfalls bei der Sca1⁻-Population festgestellt werden. Hierbei gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Populationen (Abbildung 31). Dementsprechend beschreibt der Sca1-Marker zwar eine MSC-Population, die das Tumorwachstum unterdrückt, jedoch haben die Sca1⁻- und Sca1⁺-Populationen das gleiche Potential.

CD31 wird auf mehr als die Hälfte der Osx-Population exprimiert (63,7 ± 5,5%). Tatsächlich konnten für die CD31⁺-Population keine wachstumsinhibierenden Eigenschaften festgestellt werden (Abbildung 33), weswegen es sich bei CD31⁺-Stromazellen vermutlich entweder um Endothelzellen (Lertkiatmongkol et al., 2016) oder um MSCs handelt, die zwar das Tumorzellhoming beeinflussen, wie im Zusammenhang mit Sca1 in Vorarbeiten gezeigt

werden konnte (Rosnagl et al., 2018), jedoch nicht das Wachstum. Endothelzellen werden durch ihre Fähigkeit Gefäße zu bilden meist mit tumorfördernden Eigenschaften in Verbindung gebracht (Hashizume et al., 2000; Ou et al., 2010; Paland et al., 2009). Die CD31⁻-Population unterdrückte das Wachstum jedoch effizient (Abbildung 33). Tumordinhibierende Eigenschaften für Stromazellen, die, neben anderen Markern, negativ für den CD31-Marker sind, konnten auch schon an anderen Stellen in der Literatur gezeigt werden (Hutton et al., 2021; Ma et al., 2012; Pacioni et al., 2017; Qiao et al., 2008b), was die Vermutung, dass diese Population einen relevanten, wachstumshemmenden Teil der Stromazellen ist, unterstützt.

Während CD31 meist als Negativmarker genutzt wird, wird dem CD44 häufig als Positivmarker für MSCs verwendet (Anderson et al., 2013; Cheng et al., 2012; Li et al., 2012; Ma et al., 2012), bei denen eine Inhibition des Tumorwachstums nachweisbar war (Wu et al., 2020b). Deren inhibierende Funktion beim Tumorwachstum konnte zwar auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden, war jedoch schwächer, als die von CD44⁻-MSCs (Abbildung 35) oder genauso stark, wie die von CD31⁻CD44⁻-MSCs (Abbildung 37). Beide Populationen inhibierten das Tumorwachstum. Dies zeigt, dass CD44 nicht unbedingt als Marker für die Identifikation von tumordinhibierenden MSCs dienen kann. Tatsächlich kamen auch schon Zweifel bezüglich der Identifikation von MSCs mittels CD44 auf, da durch die Kultur von MSCs auf Plastik die Expression dieses Markers hochreguliert wird (Hall et al., 2013b). Darüber hinaus kann die hohe Expression von CD44 in Tumoren nicht einheitlich einer positiven oder negativen Rolle beim Tumorwachstum zugesprochen werden (Naor et al., 2008), weswegen die Expression dieses Moleküls und seine Rolle in der Tumorprogression diskutabel ist.

Die tumordinhibierende MSC-Population befindet sich unter den CD31⁻-Zellen. Deswegen wurden diese Zellen mithilfe der weiteren Marker unterteilt. CD44, CD105 und FAP waren, wie CD31, ebenfalls zu einem hohen Anteil in der Osx-Population exprimiert (Tabelle 8). Die Wirkung von CD31⁻CD44^{+/-}-Zellen unterschied sich jedoch nicht von der, die durch die Verwendung von CD44^{+/-}-Zellen erzielt wurde. Die Nutzung von CD105, das auf Endothelzellen (Rossi et al., 2019) und Stromazellen exprimiert ist (Hutton et al., 2021; Pham et al., 2019) und FAP, das ebenfalls von Stromazellen exprimiert wird (Hutton et al., 2021; Kidd et al., 2012; Xing et al., 2010), auf CD31⁻-Zellen führte ebenfalls zu keiner eindeutigen Identifizierung einer tumor-hemmenden und nicht-tumor-hemmenden Population innerhalb der CD31⁻-Zellen (Abbildung 39 und Abbildung 41). In dieser Arbeit wurde jedoch für beide Populationen

gezeigt, dass sie das Tumorwachstum inhibieren, auch wenn die CD105⁻-Population effizienter war, als die CD105⁺-Population (Abbildung 39). Bezüglich CD105^{+/-}-Stromazellen liegen jedoch unterschiedliche Berichte vor, da auf der einen Seite gezeigt werden konnte, dass CD105-exprimierende MSCs das Tumorwachstum hemmen können (de Menezes et al., 2020; Wu et al., 2020b) und dass CD105⁻-Stromazellen stärkeres Potential dazu haben, das Immunsystem zu inhibieren als CD105⁺-Zellen (Anderson et al., 2013; Pham et al., 2019). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass die CD105⁻-Stromazellpopulation das Tumorwachstum inhibieren konnte, indem sie das Immunsystem modulierte, wohingegen die CD105⁺-Population diese Fähigkeiten nicht aufwies (Hutton et al., 2021). Dies steht im direkten Kontrast zu den zuvor erwähnten Studien. Möglicherweise gibt es unterschiedliche Auffassungen dieser Zellen in der Literatur, da hier ähnliche Probleme mit der Expression von CD105 in Stromazellen vorliegen könnten, wie es auch bereits bei CD44 der Fall war: Stromazellen aus dem Fettgewebe regulierten ihre Expression von CD105 hoch, wenn sie in Kultur ausgesät wurden und veränderten damit ihre Markerzusammenstellung in Kultur (Yoshimura et al., 2006). Eine weitere Möglichkeit ist die Art der Interaktion der MSCs mit den Tumorzellen, da gezeigt werden konnte, dass (unter anderem) CD105-exprimierende MSCs der Nabelschnur das Tumorwachstum von Gliomzellen entweder fördern oder hemmen können, je nachdem, ob die direkter Zellkontakt besteht oder nur lösliche Faktoren die Tumorzellen erreichen (Bajetto et al., 2017).

FAP, das ebenfalls einen Stromazellmarker darstellt (Bae et al., 2008; Chung et al., 2014; Hutton et al., 2021; Kidd et al., 2012; Xing et al., 2010) wird bei der Identifikation von CAFs genutzt (Elyada et al., 2019; Hutton et al., 2021; Primac et al., 2019; Tommelein et al., 2015). Die Expression von FAP in Tumoren korreliert in verschiedenen Tumorarten mit einer schlechteren Prognose und Überlebensfähigkeit, wie beispielsweise in Renalzellkarzinomen (López et al., 2016), Darmkrebs (Chen et al., 2017) oder Magenkrebs (Wen et al., 2017) festgestellt wurde. MSCs, die mit Laktat aktiviert wurden, fahren ihre Expression von FAP hoch und unterstützen so das Wachstum von Magenkrebszellen (Tao et al., 2023). Im Kontext dieser Arbeit zeigten jedoch sowohl CD31⁻FAP⁻, als auch CD31⁻FAP⁺-MSCs eine inhibierende Wirkung auf das Tumorwachstum, wobei es keinen Unterschied zwischen den Populationen gab (Abbildung 41). Da FAP jedoch auch auf MSCs exprimiert wird, welche nicht mit Tumorzellen in Kontakt kamen (Bae et al., 2008; Chung et al., 2014), zeigt dies, dass FAP nicht zwangsweise nur im Tumorkontext von Stromazellen exprimiert wird und dass die Möglichkeit offen bleibt,

dass MSCs mit diesem Marker das Tumorwachstum hemmen können, wie es in dieser Arbeit demonstriert wurde. Immerhin konnte wurde nachgewiesen, dass die Wirkung von Stromazellen, die mit Tumorzellen in Kontakt kamen, sich von der von nicht-malignen Stromazellen unterscheidet (Lu et al., 1992; Paland et al., 2009).

Schlussendlich konnte der Teil der Osx-Population, der für die Hemmung der Tumorprogression verantwortlich ist, als CD31⁻ identifiziert werden. Eine weitere Definition dieser Population anhand von Markern konnte leider nicht erzielt werden, obwohl es möglich war mehrere Stromazellpopulationen zu charakterisieren, die tumorinhibierende Eigenschaften aufweisen.

4.3. CS1 als Mediator der Tumoringhibition durch Neutrophile

4.3.1. Die Wirkung von CS1 bei der Tumoringhibition

Die Stimulation von MSCs mit Fibronectin erhöhte ihr Potential, das Tumorwachstum zu verringern (Abbildung 43). Bei der Behandlung der MSCs mit einem Integrin $\alpha 5\beta 1$ -bindenden Peptid diente das CS1-Peptid als Kontrolle und zeigte überraschenderweise, dass es sich bei diesem Teil von Fibronectin um eine Region handelt, die das Tumorwachstum inhibieren kann. Der entscheidende Teil in Fibronectin, der die Hemmung des Tumorwachstums auslöst, ist somit die CS1-Region (Abbildung 45). Dieser Effekt ist dabei unabhängig von der Anwesenheit reifer T-Zellen (Abbildung 51). Die Behandlung von MSCs mit CS1 löst die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen aus (Abbildung 57 und Abbildung 67), wodurch insbesondere die Chemotaxis von Neutrophilen aktiviert wurde (Abbildung 69). In dieser Arbeit konnte ebenfalls bestätigt werden, dass CS1 die Phosphorylierung verschiedener Kinasen und NF κ B sowie die Translokation von NF κ B in den Zellkern verursacht (Abbildungen 58-64) und dass diese durch die Verwendung zweier verschiedener TLR4-Inhibitoren ausbleibt (Abbildung 66). Die Induktion der für Neutrophile chemotaktischen Chemokine CXCL1 und CXCL2 durch Fibronectin über den NF κ B-Signalweg wurde bereits in der Literatur beschrieben (Yano und Ogura, 2018).

Fibronectin beinhaltet verschiedene TLR-Agonisten-Bereiche, wie EDA-Fibronectin (Okamura et al., 2001), FNIII1c (You et al., 2010), FNIII13-14 (Sofat et al., 2012), sowie potentiell noch

andere Fibronectin-Fragmente (Abschnitt 1.5.3.3. Fibronectin-Fragmente als TLR-Agonisten). Für CS1 konnten bereits einige Funktionen bei der Inflammation festgestellt werden. CS1 führt mittels des Integrins $\alpha 4\beta 1$ zur Aktivierung und damit zur Proliferation von humanen $CD4^+$ T-Zellen, wenn zugleich die Stimulation von CD3 stattfindet (Lehnert et al., 1998; Nojima et al., 1990). Die Fähigkeit die Proliferation von T-Zellen zu erhöhen, konnte auch bei der Nutzung des rekombinanten Fibronectinfragments CH-296 beobachtet werden, welches die CS1-Region enthält (Ishikawa et al., 2014). Die Stimulation der MSCs mit dem CS1-Peptid hatte jedoch keinen Effekt auf T-Zellen, da die Inhibition des Tumorwachstums auch in Abwesenheit funktionaler T-Zellen reproduzierbar war (Abbildung 51). Die Behandlung der mesenchymalen Stromazellen löste allerdings die erhöhte Expression von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen aus (Abbildung 57 und Abbildung 67). Tatsächlich konnte bereits an anderer Stelle gezeigt werden, dass CS1 zur Expression von pro-inflammatorischen Molekülen führt. So führt löst die Behandlung der T-Zelllinie Jurkat mit CS1 die Expression von Matrix-spaltenden Metalloproteasen MMP2 und MMP9 aus (Yakubenko et al., 2000). CS1 kann auch unabhängig von Integrin $\alpha 4\beta 1$ inflammatorische Reaktionen verursachen. RA-SNC77-Zellen, die aus Patienten mit rheumatoider Arthritis gewonnen wurden, produzieren eine große Menge an CS1-haltigem Fibronectin. Die Ko-Kultur dieser Zellen mit lymphoiden Zelllinien erhöhte die Menge der pro-inflammatorischen Zytokine IL6 und IL8 im Kulturmedium. Während die Verwendung von inhibitorischen Antikörpern gegen Integrin $\alpha 4$ und Integrin $\beta 1$ die Adhäsion und Transmigration von B-Zell-artigen MC/car-Zellen inhibierte, konnte der Integrin $\alpha 4$ -Antikörper die Expression von IL6 und IL8 nicht beeinflussen. Somit wird die Expression dieser Zytokine durch einen Integrin $\alpha 4\beta 1/\alpha 4\beta 7$ -unabhängigen Weg ausgelöst (Takeuchi et al., 2002). Die Inhibition von TLR4 löste in diesem Zusammenhang ein Ausbleiben der erhöhten Expression der pro-inflammatorischen Zytokine und Chemokine durch CS1 aus (Abbildung 67). Somit ist auch hier ein $\alpha 4\beta 1$ -unabhängiger Weg involviert.

4.3.2. Die ECM als TLR-Agonist bei der Hemmung der Tumorprogression

CS1 verstärkte die Inhibition des Tumorwachstums (Abbildung 45 und Abbildung 51) durch seine Interaktion mit TLR4 (Abbildung 72). Während EDA-Fibronectin in verschiedenen Instanzen tumorfördernde Eigenschaften innehaben kann (Abschnitt 4.2.1. Das Fibronectin der

Mx- und Osx-Subpopulationen), kann es als TLR-Agonist auch zur Inhibition des Tumorwachstums beitragen. Das EDA-Modul konnte als Fusionsprotein mit Ovalbumin, einem Hühnereiweiß, genutzt werden, um durch dendritische Zellen die Entstehung von zytotoxischen T-Zellen zu vermitteln. Hierbei fand die Bindung von EDA an TLR4 auf dendritischen Zellen statt, die das Ovalbumin daraufhin T-Zellen präsentierten und deren Aggressivität gegenüber Ovalbumin-exprimierenden Tumorzellen erhöhten (Julier et al., 2015; Lasarte et al., 2007). Die einmalige Injektion von freigelegtem FNIII11-EDA-Fibronektin, zusammen mit FNIII9-10, führte in einem *in vivo*-Modell in Mäusen dazu, dass das Wachstum von Thymuskarzinomen inhibiert und das Überleben der Versuchstiere verlängert wurde, auch ohne Ovalbumin mit EDA zu fusionieren (Julier et al., 2015). Auf eine ähnliche Art und Weise erhöhte ein Fusionsprotein aus dem EDA-Modul und dem E7-Protein des humanen Papillomavirus die Aggressivität von Immunzellen gegen die Tumorzellen, indem es an TLR4 von Zellen des myeloiden Systems bindet und dabei die Reifung von dendritischen Zellen vorantreibt (Mansilla et al., 2012).

TLR4 kann auch andere Matrixmoleküle, wie Tenascin-C, wahrnehmen und somit zur Polarisierung von Immunzellen führen. Die Ausschaltung von Tenascin-C aus Stroma- und Immunzellen führt zu einer verstärkten Polarisierung zu M2-Makrophagen, wohingegen dessen Anwesenheit zu einem höheren Anteil an M1-Makrophagen führt (Deligne et al., 2020). Wird CD47 aus Tumorzellen deletiert, steigert sich die Abtötung der Tumorzellen durch Makrophagen und resultiert in einem verringerten Tumorwachstum. Dieser Effekt wurde auch hier durch Tenascin-C ausgelöst, welches über die Interaktion mit TLR4 zu einer verstärkten Bildung des pro-inflammatorischen TNF α in humanen Makrophagen führt (Ma et al., 2019a).

EMILIN2 bewirkt die Tumorunterdrückung durch die Polarisierung von Makrophagen in den M1-Phänotyp, da hierdurch der TLR4/MyD88/NKkB-Signalweg stimuliert wurde. Das Fehlen dieses Moleküls hingegen führt zur verstärkten Bildung von M2-Makrophagen (Andreuzzi et al., 2022).

Die Inhibition von TLR4 in Verbindung mit der Stimulation mit dem CS1-Peptid führte zu einer Wiederherstellung des Tumorwachstums auf die Größe von Tumoren, in welchen unstimulierte, bzw. mit einem Scr-Peptid stimulierte MSCs vorhanden waren (Abbildung 72). Während die genannten Beispiele der Interaktionen der ECM mit TLR4 bei der Tumoringhibition sich auf die Polarisierung von Makrophagen konzentrieren, stellten sich in dieser Arbeit

Neutrophile als Mediatoren der Tumoringhibition heraus (Abbildung 55), deren Infiltration in den Tumor mit der TLR4-Inhibition abnimmt (Abbildung 73).

4.3.3. Die TLR-Modulation auf MSCs verändert ihre immunmodulatorischen Fähigkeiten

Die bisher genannten Funktionen von CS1 bei der Inflammation und von Bestandteilen der ECM bei der TLR-vermittelten Tumoringhibition bezogen sich meist auf die direkte Modulation von Zellen des Immunsystems (Abschnitt 4.3.2. Die ECM als TLR-Agonist bei der Hemmung der Tumoringression). Stromazellen stellen jedoch wichtige Zellen bei der Wahrnehmung von PAMPs und DAMPs dar und gehören zu den Zellen, die auf einen Reiz mit der Anziehung von Immunzellen reagieren (Kim et al., 2011; Krombach et al., 2019; Otte et al., 2003; Owens et al., 2013). MSCs lassen sich hierdurch mittels der Stimulation von Toll-like Rezeptoren direkt zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp polarisieren (Shoshina et al., 2020; Waterman et al., 2010, 2012a). Aus diesem Grund reagieren Stromazellen bei der Aktivierung von TLRs mit der Expression vieler pro-inflammatorischer Chemokine und Zytokine, wie CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6, und CXCL10 oder auch IL6, IL8, IL12, TNF α , CCL5 und GM-CSF (Hwa Cho et al., 2006; Hwang et al., 2014; Krombach et al., 2019; Romieu-Mourez et al., 2009; Ryu et al., 2015; Shoshina et al., 2020; Waterman et al., 2010). Insbesondere CXCL1, CXCL2, MIF und IL8 sind in der Lage Neutrophile anzuziehen (Brandau et al., 2010; Means et al., 2003; Vieira et al., 2009). Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass TLR4-stimulierte MSCs Neutrophile chemotaktisch anziehen (Brandau et al., 2010; Romieu-Mourez et al., 2009). Da CXCL1 und CXCL2 bei der CS1-Stimulation von MSCs hochreguliert sind (Abbildung 57 und Abbildung 67), ist es nicht verwunderlich, dass die so stimulierten MSCs Neutrophile in einem Transwell-Assay anziehen (Abbildung 67).

Die Inhibition des Tumoringwachstums ging mit dem Anstieg von Ly6G-exprimierenden Zellen einher (Abbildungen 10, 24, 27, 30, 33, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 52, 56 und 73). Ly6G identifiziert in Mäusen unter den Granulozyten Neutrophile, die Teile des myeloiden Immunsystems bilden (Abschnitt 1.4.2.1.3. Die Identifikation von Neutrophilen anhand von Markern). Die Modulation von Myeloidzellen, wie Granulozyten, zur Inhibition des Tumoringwachstums konnte bereits bei der Transplantation von Darmkrebszellen zusammen mit MSCs in einer

Gelatinematrix beobachtet werden. Wenn MSCs zusammen mit den Darmkrebszellen transplantiert wurden, führte dies zu einem reduzierten Wachstum der Tumorzellen und bereits ab Tag 5 zu einer Erhöhung der Granulozyten und Monozyten. Ab Tag 7 konnten in entnommenen Gelatinematrizen keine lebenden Tumorzellen mehr nachgewiesen werden. Eine Beteiligung von T-Zellen konnte in diesem Zusammenhang nicht gezeigt werden, was darauf hinweist, dass die Abtötung der Tumorzellen vermutlich durch myeloide Immunzellen vonstatten ging (Ohlsson et al., 2003). Die Stimulation von TLR4 auf MSCs und die darauf folgende Polarisierung in pro-inflammatorische MSCs führte, neben einer direkten Unterdrückung des Tumorwachstums, zu einer Modulation von myeloiden Immunzellen in Form von Makrophagen und Mastzellen (Waterman et al., 2012a).

4.3.4. Die Rolle der Wahrnehmung von Fibronectin mittels des β 1-Integrins

TLR4 wurde als Rezeptor für die CS1-Region innerhalb des Fibronectinmoleküls identifiziert (Abbildung 66). Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung des β 1-Integrins auf der Mx-Population der MSCs zu einer Erhöhung des Tumorwachstums führte, wobei eine Verringerung der Tumorgroße zur Kontrolle oder zumindest ein Trend dahin festgestellt werden konnte (Abbildung 26). Möglicherweise hat das β 1-Integrin eine unterstützende Rolle bei der Wahrnehmung von CS1. Interessanterweise wird die Erkennung von EDA-Fibronectin und auch anderen TLR4-Agonisten in großem Maße von Integrin α 4 β 1 beeinflusst (Kelsh-Lasher et al., 2017). Eine kurze zweistündige Stimulation von humanen, dermalen Fibroblasten mit EDA-Fibronectin resultierte in der Expression von ICAM und pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL1 α und TNF α , wohingegen eine langfristige Stimulation über 24 Stunden zur Expression von Proteinen für die Bildung und den Umbau der extrazellulären Matrix und anti-inflammatorischer Zytokine führt. Beide Vorgänge wurden nicht nur durch die Inhibition von TLR4, sondern auch durch die Inhibition von Integrin α 4 gehemmt. Ebenso regulierten beide Moleküle die Expression von EDA-Fibronectin in Fibroblasten. Werden Fibroblasten zusammen mit EDA-Fibronectin anderen TLR-Agonisten ausgesetzt, wie FNIII1c, führt die Inhibition von Integrin α 4 zu einer verringerten pro-inflammatorischen Reaktion in Form der Bildung von TNF α . Dies macht deutlich, dass Integrin α 4 mit TLR4 kooperiert, um entzündliche Vorgänge nicht nur als Reaktion auf EDA-Fibronectin selbst, sondern auch auf andere TLR-Agonisten, zu vermitteln (Kelsh-Lasher et al., 2017). Im Zuge dessen konnte gezeigt werden,

dass die TLR2- und TLR4-Aktivierung durch PAMPs in Makrophagen von Fibronectin aufgrund seiner Bindung an Integrin $\beta 1$ verstärkt werden kann (Fei et al., 2018). Somit wäre es denkbar, dass das Integrin $\beta 1$ die Wahrnehmung von Fibronectin beeinflussen kann. Dies könnte erklären, warum Mx-Integrin $\beta 1$ -cKO-MSCs zumindest teilweise zu einem Anstieg der Tumorgröße führen. Allerdings konnten in dieser Arbeit keine Hinweise auf eine Beteiligung von Integrin $\beta 1$ festgestellt werden (Abbildung 66).

4.3.5. Neutrophile vermitteln die Inhibition des Tumorwachstums

Zu den Immunzellen, die effizient von MSCs moduliert werden können, gehören Neutrophile (Hall et al., 2013a; Raffaghello et al., 2008). MSCs steigern das Überleben dieser Immunzellen (Raffaghello et al., 2008), verbessern ihre Effektorfunktionen, wie die Fähigkeit zur Phagozytose von Bakterien (Hall et al., 2013a) oder ziehen sie chemotaktisch an (Brandau et al., 2010; Romieu-Mourez et al., 2009).

Sowohl tumorfördernde, als auch tumorinhibierende Funktionen der Neutrophile sind bekannt (Berry et al., 2017; McFarlane et al., 2021; Wu et al., 2020a). Dies führte zur Klassifizierung von Neutrophilen in den N1- und N2-Phänotyp (Fridlender et al., 2009; Ohms et al., 2020; Powell und Huttenlocher, 2016). Neutrophile stellten sich in dieser Arbeit als essentiell bei der Unterdrückung des Tumorwachstums heraus, da ihre Depletion per Antikörper die MSC-vermittelte Tumorunterdrückung ausbleiben ließ (Abbildung 55). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine äußerst geringe Anzahl an MSCs dazu in der Lage ist, das Verhalten von Neutrophilen zu modulieren (Raffaghello et al., 2008), weswegen die Beeinflussung von Neutrophilen bei der hier eingesetzten MSC-Anzahl von 100.000 Zellen plausibel ist.

Diese Immunzellen können das Tumorwachstum über mehrere verschiedene Wege hemmen oder Tumorzellen direkt zytotoxisch abtöten (Abschnitt 1.4.2.1.4. Neutrophile in der anti-Tumorimmunität). Die Abtötung von murinen und humanen Tumorzellen wurde in dieser Arbeit *in vitro* untersucht (Abbildung 70 und Abbildung 71). Hierbei gab es zwar vereinzelt eine stärkere Abtötung von Tumorzellen, wenn die Neutrophile zusammen mit dem Medium von CS1-stimulierten MSCs auf die Tumorzellen gegeben wurden, jedoch war dieser Effekt nicht einheitlich genug, um eine grundlegende Steigerung der Zytotoxizität von Neutrophilen durch

die MSCs festzustellen. Auch die biologische Relevanz ist fraglich, da sich die verstärkte Abtötung von Tumorzellen lediglich in einer Abnahme von 5-7% des Chemilumineszenzsignals spiegelte. Dies stellt eine aktive Polarisierung von Neutrophilen durch CS1-stimulierte MSCs in Frage. Aus diesem Grund scheint die Tumoringhibition auf der erhöhten Infiltration der Ly6G-exprimierenden Zellen zu basieren, was mehrfach beobachtet (Abbildungen 10, 24, 27, 30, 33, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 52, 56 und 73) und auch *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Abbildung 69).

MSCs können Neutrophile zur Inhibition des Tumorwachstums chemotaktisch anziehen (Ohlsson et al., 2003). In einem Modell, in dem MSCs die Proliferation von B16-Zellen mittels der Sekretion von Dickkopf-1 inhibierten, kam es ebenfalls zu einer verstärkten Infiltration von Granulozyten, wie beispielsweise Neutrophilen, deren Rolle jedoch leider nicht weiter charakterisiert wurde (de Menezes et al., 2020). Wie zuvor beschrieben, verstärkt die TLR-Stimulation von MSCs ihre chemotaktischen Fähigkeiten (Abschnitt 4.3.3. Die TLR-Modulation auf MSCs verändert ihre immunmodulatorischen Fähigkeiten). Im Zuge dessen ist EDA-Fibronektin über seine Bindung an TLR4 in der Lage, Neutrophile in einem murinen Modell chemotaktisch anzuziehen, wie es bei Mäusen gezeigt wurde, denen EDA-Fibronektin in Luft-Taschen unter der Haut injiziert wurde (Lefebvre et al., 2011). Die chemotaktische Anziehung von Neutrophilen ist auch von Endothelzellen bekannt, wenn DAMPs während der Radiotherapie aus sterbenden Tumorzellen freigesetzt werden. Diese aktivieren die Toll-like Rezeptoren auf Endothelzellen und führen zu einer erhöhten Expression chemotaktischer Moleküle, wie CCL2, CXCL1 und CXCL2, was in einer erhöhten Infiltration von Neutrophilen und Monozyten resultiert. Diese lösen daraufhin die anti-Tumorimmunität aus (Krombach et al., 2019).

Das Potential des Zusammenspiels zwischen der TLR-Stimulation des Tumorstromas und der Einwanderung von Neutrophilen wurde auch in Walker 256-Tumoren in Ratten deutlich. Die Tumore wurden zunächst von Neutrophilen infiltriert, was jedoch vermutlich durch TGF β , mit voranschreitender Progression der Tumore abnimmt. Nachdem in bereits etablierte Tumore der TLR4-Agonist LPS injiziert wurde, nahm die Menge an Neutrophilen und pro-inflammatorischen Zytokinen im Tumor zu, was von einem Rückgang des Tumors in 100% aller Versuchstiere begleitet wurde. Interessanterweise reagierten Walker 256-Tumorzellen nicht auf die LPS-Zugabe, obwohl diese TLR4 exprimierten, was nahelegt, dass LPS die Zellen des

Tumorstromas stimulierte und dazu veranlasst hat, anti-tumorigene Neutrophile in den Tumor einwandern zu lassen (Kuwabara et al., 2019).

Interessanterweise resultierte die Depletion von Neutrophilen in B16-Tumoren, die ohne MSCs injiziert wurden, in einer Abnahme der TumorgroÙe (Abbildung 55). Die zweischneidige Rolle von Neutrophilen während der Tumorprogression führte zur Klassifizierung von Neutrophilen in den anti-tumorigenen N1- und den pro-tumorigenen N2-Phänotyp (1.4.2.1.4.1. N1- und N2-Polarisierung von Neutrophilen). Die Verringerung des Tumorwachstums in B16-Tumoren ohne MSCs spricht dafür, dass die Tumorzellen selbst die einwandernden Neutrophilen in einen pro-tumorigenen Phänotyp polarisieren können, um ihr Wachstum zu stimulieren. Melanomzellen können nachgewiesenermaßen die Polarisierung von Neutrophilen in den N2-Phänotyp induzieren (Anselmi et al., 2022). Andererseits könnte es sich in diesen Tumoren auch um ebenfalls Ly6G-exprimierende MDSCs handeln, die das Tumorwachstum in B16-Tumoren fördern (Abschnitt 1.4.2.1.3. Die Identifikation von Neutrophilen anhand von Markern). Die Fähigkeit von MDSCs das Tumorwachstum zu fördern, konnte in früheren Arbeiten der Gruppe durch die Wirkung des osteoblastischen EDA-Fibronektins gezeigt werden (Rossnagl et al., 2016).

4.4. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte die Rolle von mesenchymalen Stromazellen bei der Tumorentwicklung charakterisiert werden. Die Injektion einer geringen Menge von Stromazellen im Vergleich zu Tumorzellen führte dabei zu einer Hemmung des Tumorwachstums, wohingegen eine zunehmende Anzahl an Stromazellen diesen Effekt immer weiter minimierte. Für die Inhibition des Tumorwachstums war das Fibronektin der Osx-exprimierenden Subpopulation notwendig. Die hierfür verantwortliche MSC-Subpopulation befindet sich innerhalb der CD31⁺-Zellen des Knochenmarks und führt zu einer verstärkten Infiltration von Neutrophilen in den Tumor. Diese sind dabei unabdinglich für die Verringerung des Tumorwachstums. Die verantwortliche Komponente des Fibronektins stellt die CS1-Region dar, welche durch ihre Bindung an TLR4 den NFκB-Signalweg aktiviert und die Expression von Chemokinen und Zytokinen in den CS1-stimulierten MSCs auslöst. Die Inhibition von TLR4 während der

Stimulation mit dem CS1-Peptid erhöhte die Größe der Tumore wieder auf das Level der Scr-
MSC-Tumore (Abbildung 74).

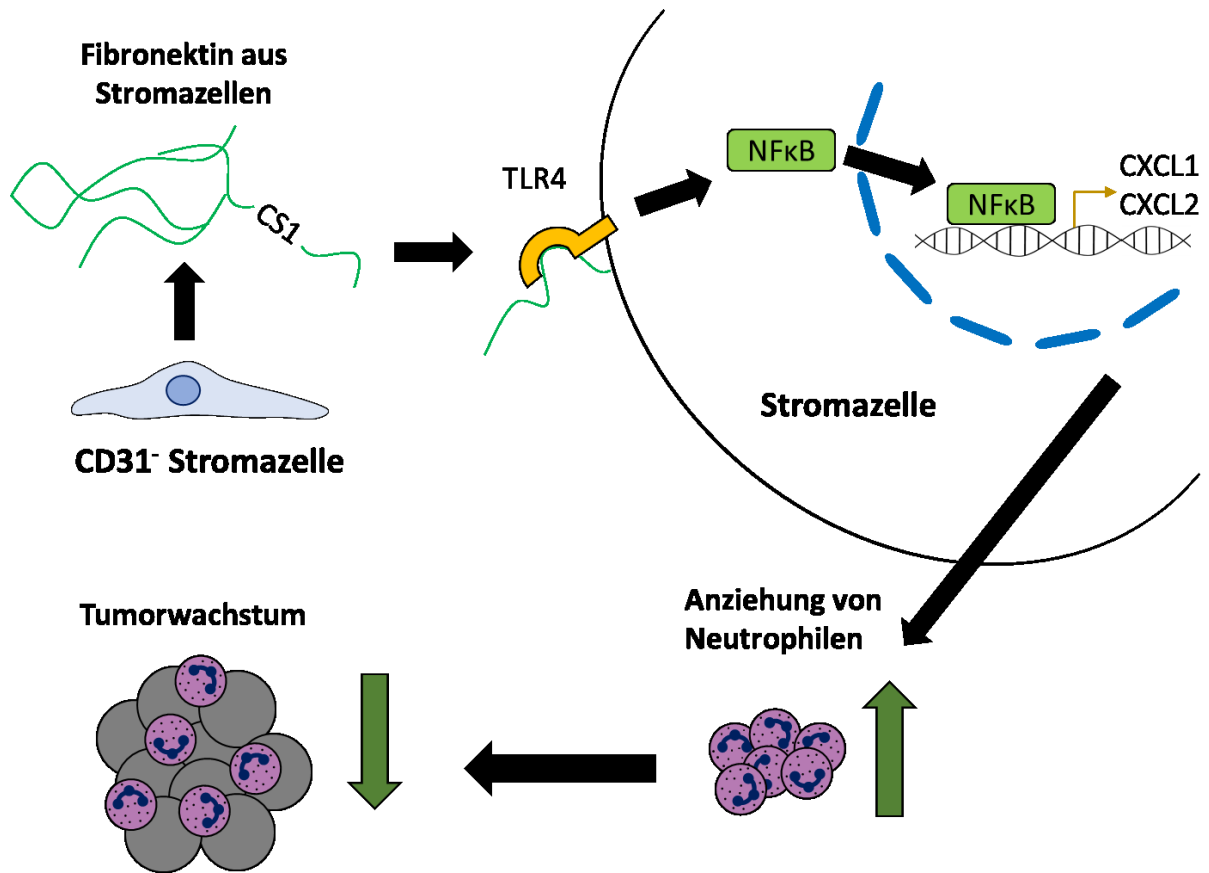


Abbildung 74: Grafische Zusammenfassung der gewonnenen Erkenntnisse.

Die CS1-Region des Fibronektins aus CD31⁻-Stromazellen bindet an TLR4 auf Stromazellen und veranlasst die Translokation von NFκB in den Zellkern, was die Expression von Zytokinen und Chemokinen induziert. Dies bewirkt die erhöhte Infiltration von Neutrophilen in den Tumor, die daraufhin das Tumorzellwachstum inhibieren.

Durch die hier gewonnenen Erkenntnisse ist es möglich, die Wirkung von Fibronektin auf die immunmodulatorischen Eigenschaften von MSCs im Kampf gegen Tumorzellen besser zu verstehen. Der Zusammenhang zwischen drei Faktoren mit ambivalenten Rollen bei der Tumorentwicklung - MSCs, Fibronektin und Neutrophile - die in einer Hemmung der Tumorprogression resultiert, könnte hierbei Aufschluss für weitere Therapieansätze der Krebsbekämpfung liefern.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Rolle von mesenchymalen Stromazellen (MSCs) im Kontext von Tumorerkrankungen ist Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung. Hierbei spielen viele Faktoren eine entscheidende Rolle, wie beispielsweise die untersuchte Stromazellsubpopulation, die Modulation des Immunsystems oder auch die Produktion von Molekülen der extrazellulären Matrix, für die Stromazellen eine der wichtigsten Quellen darstellen. In dieser Arbeit sollte die Rolle von MSCs beim Tumorwachstum bestimmt, die Beteiligung des produzierten Fibronektins untersucht und die verantwortliche Subpopulation identifiziert werden.

Es stellte sich heraus, dass MSCs in der Lage sind, das Tumorwachstum in einem Verhältnis von 1:0,1 (Tumorzellen:MSCs) zu inhibieren. Die Fähigkeit zur Unterdrückung des Tumorwachstums ist dabei unabhängig von der Anwesenheit von T-Zellen.

Bei der Deletion von Fibronektin in verschiedenen MSC-Subpopulationen mittels des Cre/loxP-Systems und den Col-, Mx-, Vav- und Osx-Promotoren stellte sich heraus, dass der Verlust von Fibronektin in der Mx- und Osx-Subpopulation die inhibierende Wirkung der MSCs aufhebt. Die Deletion eines der wichtigsten Rezeptoren für Fibronektin, des Integrins $\beta 1$, unter den gleichen Promotoren zeigte, dass die Osx-Population sich nicht selbst mit ihrem produzierten Fibronektin stimuliert, oder dass Integrin $\beta 1$ dabei keine Funktion ausübt. Bei der Charakterisierung der Osx-Subpopulation anhand von Zellsortierungen durch Oberflächenmarker zeigte sich, dass der wachstumshemmende Teil der Osx-exprimierenden Zellen negativ für die Expression des CD31-Markers ist.

Der Teil von Fibronektin, der MSCs zur Inhibition des Tumorwachstums anregt, ist die CS1-Region, welche mit TLR4 auf den MSCs interagiert und zur Aktivierung des NF κ B-Signalwegs führt. Es resultiert eine Expression verschiedener Chemokine und Zytokine. Hierdurch kommt es zu einer erhöhten Infiltration von Ly6G-exprimierenden Neutrophilen, die die Inhibition des Tumorwachstums vermitteln. Ihr Fehlen, erzielt durch die Injektion depletierender Antikörper, verhindert die MSC-vermittelte Verringerung der Tumorgroße.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass das Fibronektin-Molekül die MSCs dazu bringt das Tumorwachstum mittels der Modulation von Neutrophilen zu inhibieren. Für diesen Effekt sind hierbei die CD31-Zellen der Osx-exprimierenden Subpopulation verantwortlich.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abd-Allah, S.H., Shalaby, S.M., El-Shal, A.S., Elkader, E.A., Hussein, S., Emam, E., Mazen, N.F., El Kateb, M. und Atfy, M. (2014). Effect of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on hepatoma. *Cytotherapy* 16, 1197–1206. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.05.006>.

Afik, R., Zigmond, E., Vugman, M., Klepfish, M., Shimshoni, E., Pasmanik-Chor, M., Shenoy, A., Bassat, E., Halpern, Z., Geiger, T., et al. (2016). Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. *J. Exp. Med.* 213, 2315–2331. <https://doi.org/10.1084/JEM.20151193>.

Agarwal, R., Narayan, J., Bhattacharyya, A., Saraswat, M. und Tomar, A.K. (2017). Gene expression profiling, pathway analysis and subtype classification reveal molecular heterogeneity in hepatocellular carcinoma and suggest subtype specific therapeutic targets. *Cancer Genet.* 216–217, 37–51. <https://doi.org/10.1016/J.CANCERGEN.2017.06.002>.

Agelopoulos, M., Foutadakis, S. und Thanos, D. (2021). The Causes and Consequences of Spatial Organization of the Genome in Regulation of Gene Expression. *Front. Immunol.* 12, 2132. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.682397/BIBTEX>.

Aggarwal, S. und Pittenger, M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815–1822. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>.

Akimoto, K., Kimura, K., Nagano, M., Takano, S., To'A Salazar, G., Yamashita, T. und Ohneda, O. (2013). Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote, glioblastoma multiforme proliferation. *Stem Cells Dev.* 22, 1370–1386. <https://doi.org/10.1089/SCD.2012.0486/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE6.JPEG>.

Akram, M., Iqbal, M., Daniyal, M. und Khan, A.U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol. Res.* 2017 501 50, 1–23. <https://doi.org/10.1186/S40659-017-0140-9>.

Alegre, M.M., Knowles, M.H., Robison, R.A. und O'Neill, K.L. (2013). Mechanics behind Breast Cancer Prevention - Focus on Obesity, Exercise and Dietary Fat. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 14, 2207–2212. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.4.2207>.

Alsibai, K.D. und Meseure, D. (2018). Significance of Tumor Microenvironment Scoring and Immune Biomarkers in Patient Stratification and Cancer Outcomes. In *Histopathology - An Update*, (InTech), p.

Ambesi, A., Maddali, P. und McKeown-Longo, P.J. (2022). Fibronectin Functions as a Selective

Agonist for Distinct Toll-like Receptors in Triple-Negative Breast Cancer. *Cells* 11, 2074. <https://doi.org/10.3390/cells11132074>.

Amin, A., Mokhdomi, T.A., Bukhari, S., Wani, Z., Chikan, N.A., Shah, B.A., Koul, A.M., Majeed, U., Farooq, F., Qadri, A., et al. (2021). Lung cancer cell-derived EDA-containing fibronectin induces an inflammatory response from monocytes and promotes metastatic tumor microenvironment. *J. Cell. Biochem.* 122, 562–576. <https://doi.org/10.1002/JCB.29883>.

Anderson, P., Carrillo-Gálvez, A.B., García-Pérez, A., Cobo, M. und Martín, F. (2013). CD105 (Endoglin)-Negative Murine Mesenchymal Stromal Cells Define a New Multipotent Subpopulation with Distinct Differentiation and Immunomodulatory Capacities. *PLoS One* 8, e76979. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0076979>.

Andrä, I., Ulrich, H., Dürr, S., Soll, D., Henkel, L., Angerpointner, C., Ritter, J., Przibilla, S., Stadler, H., Effenberger, M., et al. (2020). An Evaluation of T-Cell Functionality After Flow Cytometry Sorting Revealed p38 MAPK Activation. *Cytom. Part A* 97, 171–183. .

Andreuzzi, E., Fejza, A., Capuano, A., Poletto, E., Pivetta, E., Doliana, R., Pellicani, R., Favero, A., Maiero, S., Fornasarig, M., et al. (2020). Deregulated expression of Elastin Microfibril Interfacer 2 (EMILIN2) in gastric cancer affects tumor growth and angiogenesis. *Matrix Biol. Plus* 6–7, 100029. <https://doi.org/10.1016/J.MBPLUS.2020.100029>.

Andreuzzi, E., Fejza, A., Polano, M., Poletto, E., Camicia, L., Carobolante, G., Tarticchio, G., Todaro, F., Di Carlo, E., Scarpa, M., et al. (2022). Colorectal cancer development is affected by the ECM molecule EMILIN-2 hinging on macrophage polarization via the TLR-4/MyD88 pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 41, 1–23. <https://doi.org/10.1186/S13046-022-02271-Y/FIGURES/11>.

Andzinski, L., Wu, C.F., Lienenklaus, S., Kröger, A., Weiss, S. und Jablonska, J. (2015). Delayed apoptosis of tumor associated neutrophils in the absence of endogenous IFN- β . *Int. J. Cancer* 136, 572–583. <https://doi.org/10.1002/IJC.28957>.

Andzinski, L., Kasnitz, N., Stahnke, S., Wu, C.F., Gereke, M., Von Köckritz-Blickwede, M., Schilling, B., Brandau, S., Weiss, S. und Jablonska, J. (2016). Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *Int. J. Cancer* 138, 1982–1993. <https://doi.org/10.1002/IJC.29945>.

Anselmi, M., Fontana, F., Marzagalli, M., Gagliano, N., Sommariva, M. und Limonta, P. (2022). Melanoma Stem Cells Educate Neutrophils to Support Cancer Progression. *Cancers (Basel)*. 14. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14143391/S1>.

Arbibe, L., Mira, J.P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P.J., Ulevitch,

R.J. und Knaus, U.G. (2000). Toll-like receptor 2-mediated NF- κ B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol.* 2000 16 1, 533–540. <https://doi.org/10.1038/82797>.

Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Baré, O., Auron, P.E., Stevenson, M.A. und Calderwood, S.K. (2002). Novel Signal Transduction Pathway Utilized by Extracellular HSP70: ROLE OF Toll-LIKE RECEPTOR (TLR) 2 AND TLR4 *. *J. Biol. Chem.* 277, 15028–15034. <https://doi.org/10.1074/JBC.M200497200>.

Astrof, S., Crowley, D., George, E.L., Fukuda, T., Sekiguchi, K., Hanahan, D. und Hynes, R.O. (2004). Direct Test of Potential Roles of EIIIA and EIIIB Alternatively Spliced Segments of Fibronectin in Physiological and Tumor Angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8662–8670. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.19.8662-8670.2004/ASSET/7D6AD4F5-F812-44B3-B7E5-D576B1EEDC6F/ASSETS/GRAPHIC/ZMB0190444430009.JPEG>.

Astrof, S., Crowley, D. und Hynes, R.O. (2007). Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin. *Dev. Biol.* 311, 11–24. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2007.07.005>.

von Au, A., Vasel, M., Kraft, S., Sens, C., Hackl, N., Marx, A., Stroebel, P., Hennenlotter, J., Todenhöfer, T., Stenzl, A., et al. (2013). Circulating Fibronectin Controls Tumor Growth. *Neoplasia* 15, 925. <https://doi.org/10.1593/NEO.13762>.

Bae, S., Park, C.W., Son, H.K., Ju, H.K., Paik, D., Jeon, C.J., Koh, G.Y., Kim, J. und Kim, H. (2008). Fibroblast activation protein α identifies mesenchymal stromal cells from human bone marrow. *Br. J. Haematol.* 142, 827–830. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2008.07241.X>.

Bai, D., Ueno, L. und Vogt, P.K. (2009). Akt-mediated regulation of NF κ B and the essentialness of NF κ B for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int. J. Cancer* 125, 2863. <https://doi.org/10.1002/IJC.24748>.

Bajetto, A., Pattarozzi, A., Corsaro, A., Barbieri, F., Daga, A., Bosio, A., Gatti, M., Pisaturo, V., Sirito, R. und Florio, T. (2017). Different effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on glioblastoma stem cells by direct cell interaction or via released soluble factors. *Front. Cell. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00312>.

Balkwill, F. und Coussens, L.M. (2004). Cancer: An inflammatory link. *Nature* 431, 405–406. <https://doi.org/10.1038/431405a>.

Banerjee, S., Lin, C.F.L., Skinner, K.A., Schiffhauer, L.M., Peacock, J., Hicks, D.G., Redmond, E.M., Morrow, D., Huston, A., Shayne, M., et al. (2011). Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Res.* 71, 318–327. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1778/656531/P/HEAT-SHOCK->

PROTEIN-27-DIFFERENTIATES-TOLEROGENIC.

Bao, W., Xia, H., Liang, Y., Ye, Y., Lu, Y., Xu, X., Duan, A., He, J., Chen, Z., Wu, Y., et al. (2016). Toll-like Receptor 9 Can be Activated by Endogenous Mitochondrial DNA to Induce Podocyte Apoptosis. *Sci. Reports* 2016 6:1 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep22579>.

Bar, J.K., Grelewski, P., Popiela, A., Noga, L. und Rabczyński, J. (2004). Type IV collagen and CD44v6 expression in benign, malignant primary and metastatic ovarian tumors: correlation with Ki-67 and p53 immunoreactivity. *Gynecol. Oncol.* 95, 23–31. <https://doi.org/10.1016/J.YGYNO.2004.06.046>.

Barlow, S., Brooke, G., Chatterjee, K., Price, G., Pelekanos, R., Rossetti, T., Doody, M., Venter, D., Pain, S., Gilshenan, K., et al. (2008). Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 17, 1095–1107. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0154>.

Barsky, S.H., Rao, C.N., Grotendorst, G.R. und Liotta, L.A. (1982). Increased content of Type V Collagen in desmoplasia of human breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 108, 276. .

Batten, P., Sarathchandra, P., Antoniwi, J.W., Tay, S.S., Lowdell, M.W., Taylor, P.M. und Yacoub, M.H. (2006). Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: Relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng.* 12, 2263–2273. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2263>.

Baumann, C.I., Bailey, A.S., Li, W., Ferkowicz, M.J., Yoder, M.C. und Fleming, W.H. (2004). PECAM-1 is expressed on hematopoietic stem cells throughout ontogeny and identifies a population of erythroid progenitors. *Blood* 104, 1010–1016. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2004-03-0989>.

Beier, U.H., Holtmeier, C., Weise, J.B. und Tibor, G. (2007). Fibronectin suppression in head and neck cancers, inflammatory tissues and the molecular mechanisms potentially involved. *Int. J. Oncol.* 30, 621–629. <https://doi.org/10.3892/IJO.30.3.621/HTML>.

Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., et al. (2003). Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration we have documented the existence of cycling ventricular myocytes in the normal and pathologic adult mam. *Cell* 114, 763–776. .

Bentmann, A., Kawelke, N., Moss, D., Zentgraf, H., Bala, Y., Berger, I., Gasser, J.A. und Nakchbandi, I.A. (2010). Circulating fibronectin affects bone matrix, whereas osteoblast fibronectin modulates osteoblast function. *J. Bone Miner. Res.* 25, 706–715. <https://doi.org/10.1359/JBMR.091011>.

Berg, J.M. van den, Heeringa, P., Claessen, N., Aten, J., Roos, D., Weening, J.J. und Kuijpers, T.W. (1997). Modulation of anti-GBM-glomerulonephritis in rats by fibronectin CS1-peptides. *Immunol. Lett.* 1–3, 208. .

Berry, R.S., Xiong, M.J., Greenbaum, A., Mortaji, P., Nofchissey, R.A., Schultz, F., Martinez, C., Luo, L., Morris, K.T. und Hanson, J.A. (2017). High levels of tumor-associated neutrophils are associated with improved overall survival in patients with stage II colorectal cancer. *PLoS One* 12, e0188799. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0188799>.

Bevona, C., Goggins, W., Quinn, T., Fullerton, J., Tsao, H. und Corona, R. (2003). Cutaneous Melanomas Associated with Nevi. *Arch. Dermatol.* 139, 1620–1624. <https://doi.org/10.1001/archderm.139.12.1620>.

Bhattacharjee, S., Hamberger, F., Ravichandra, A., Miller, M., Nair, A., Affo, S., Filliol, A., Chin, L.K., Savage, T.M., Yin, D., et al. (2021). Tumor restriction by type I collagen opposes tumor-promoting effects of cancer-associated fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 131. <https://doi.org/10.1172/JCI146987>.

Biffi, G., Oni, T.E., Spielman, B., Hao, Y., Elyada, E., Park, Y., Preall, J. und Tuveson, D.A. (2019). IL1-induced Jak/STAT signaling is antagonized by TGF β to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 9, 282–301. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0710/42870/AM/IL-1-INDUCED-JAK-STAT-SIGNALING-IS-ANTAGONIZED-BY>.

Bikorimana, J.P., Saad, W., Abusarah, J., Lahrichi, M., Talbot, S., Shammaa, R. und Rafei, M. (2022). CD146 Defines a Mesenchymal Stromal Cell Subpopulation with Enhanced Suppressive Properties. *Cells* 11, 2263. <https://doi.org/10.3390/CELLS11152263/S1>.

Biswas, A. und De, S. (2021). Drivers of dynamic intratumor heterogeneity and phenotypic plasticity. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 320, C750–C760. https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00575.2020/ASSET/IMAGES/LARGE/AJPCELL.00575.2020_F002.JPEG.

Biswas, A., French, T., Düsedau, H.P., Mueller, N., Riek-Burchardt, M., Dudeck, A., Bank, U., Schüler, T. und Dunay, I.R. (2017). Behavior of neutrophil granulocytes during *Toxoplasma gondii* infection in the central nervous system. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 259. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00259/BIBTEX>.

Black, I.B. und Woodbury, D. (2001). Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. *Blood Cells, Mol. Dis.* 27, 632–636. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2001.0423>.

Blaisdell, A., Crequer, A., Columbus, D., Daikoku, T., Mittal, K., Dey, S.K. und Erlebacher, A.

(2015). Neutrophils Oppose Uterine Epithelial Carcinogenesis via Debridement of Hypoxic Tumor Cells. *Cancer Cell* 28, 785–799. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2015.11.005>.

Blanco-Camarillo, C., Alemán, O.R. und Rosales, C. (2021). Low-Density Neutrophils in Healthy Individuals Display a Mature Primed Phenotype. *Front. Immunol.* 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.672520/FULL>.

Bochet, L., Lehuédé, C., Dauvillier, S., Wang, Y.Y., Dirat, B., Laurent, V., Dray, C., Guiet, R., Maridonneau-Parini, I., Gonidec, S. Le, et al. (2013). Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* 73, 5657–5668. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0530>.

de Boer, J., Williams, A., Skavdis, G., Harker, N., Coles, M., Tolaini, M., Norton, T., Williams, K., Roderick, K., Potocnik, A.J., et al. (2003). Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur. J. Immunol.* 33, 314–325. <https://doi.org/10.1002/IMMU.200310005>.

Boivin, G., Faget, J., Ancey, P.B., Gkasti, A., Mussard, J., Engblom, C., Pfirschke, C., Contat, C., Pascual, J., Vazquez, J., et al. (2020). Durable and controlled depletion of neutrophils in mice. *Nat. Commun.* 2020 111 11, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16596-9>.

Boix-Montesinos, P., Soriano-Teruel, P.M., Armiñán, A., Orzáez, M. und Vicent, M.J. (2021). The past, present und future of breast cancer models for nanomedicine development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 173, 306–330. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.03.018>.

Brandau, S., Jakob, M., Hemedá, H., Bruderek, K., Janeschik, S., Bootz, F. und Lang, S. (2010). Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J. Leukoc. Biol.* 88, 1005–1015. <https://doi.org/10.1189/JLB.0410207>.

Burke, S.J., Lu, D., Sparer, T.E., Masi, T., Goff, M.R., Karlstad, M.D. und Collier, J.J. (2014). NF- κ B and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 306, E131. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00347.2013>.

Cao, H., Heazlewood, S.Y., Williams, B., Cardozo, D., Nigro, J., Oteiza, A. und Nilsson, S.K. (2016). The role of CD44 in fetal and adult hematopoietic stem cell regulation. *Haematologica* 101, 26. <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2015.135921>.

Carnemolla, B., Balza, E., Siri, A., Zardi, L., Nicotra, M.R., Bigotti, A. und Natali, P.G. (1989). A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. *J. Cell Biol.* 108, 1139–1148. <https://doi.org/10.1083/JCB.108.3.1139>.

Cassatella, M.A., Mosna, F., Micheletti, A., Lisi, V., Tamassia, N., Cont, C., Calzetti, F., Pelletier, M., Pizzolo, G. und Krampera, M. (2011). Toll-Like Receptor-3-Activated Human Mesenchymal Stromal Cells Significantly Prolong the Survival and Function of Neutrophils. *Stem Cells* 29, 1001–1011. <https://doi.org/10.1002/STEM.651>.

Castaño, Z., San Juan, B.P., Spiegel, A., Pant, A., DeCristo, M.J., Laszewski, T., Ubellacker, J.M., Janssen, S.R., Dongre, A., Reinhardt, F., et al. (2018). IL-1 β inflammatory response driven by primary breast cancer prevents metastasis-initiating cell colonization. *Nat. Cell Biol.* 2018 209 20, 1084–1097. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0173-5>.

Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J.P., Boireau, W., Rouleau, A., Simon, B., Lanneau, D., et al. (2010). Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J. Clin. Invest.* 120, 457–471. <https://doi.org/10.1172/JCI40483>.

Chang, C. Lo, Leu, S., Sung, H.C., Zhen, Y.Y., Cho, C.L., Chen, A., Tsai, T.H., Chung, S.Y., Chai, H.T., Sun, C.K., et al. (2012). Impact of apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cells on attenuating organ damage and reducing mortality in Rat sepsis syndrome induced by cecal puncture and ligation. *J. Transl. Med.* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-244/FIGURES/9>.

Chang, C.Y., Tai, J.A., Li, S., Nishikawa, T., Kaneda, Y., Yang Chang, C., Tai, J.A., Li, S., Nishikawa, T. und Kaneda, Y. (2016). Virus-stimulated neutrophils in the tumor microenvironment enhance T cell-mediated anti-tumor immunity. *Oncotarget* 7, 42195–42207. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.9743>.

Chauhan, A.K., Iaconig, A., Baralle, F.E. und Muro, A.F. (2004). Alternative splicing of fibronectin: a mouse model demonstrates the identity of in vitro and in vivo systems and the processing autonomy of regulated exons in adult mice. *Gene* 324, 55–63. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2003.09.026>.

Chen, X. und Song, E. (2019). Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 99–115. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0004-1>.

Chen, H.H., Lin, K.C., Wallace, C.G., Chen, Y.T., Yang, C.C., Leu, S., Chen, Y.C., Sun, C.K., Tsai, T.H., Chen, Y.L., et al. (2014). Additional benefit of combined therapy with melatonin and apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cell against sepsis-induced kidney injury. *J. Pineal Res.* 57, 16–32. <https://doi.org/10.1111/JPI.12140>.

Chen, J., Qiao, Y., Chen, G., Chang, C., Dong, H., Tang, B., Cheng, X., Liu, X. und Hua, Z. (2021). Salmonella flagella confer anti-tumor immunological effect via activating Flagellin/TLR5 signalling within tumor microenvironment. *Acta Pharm. Sin. B* 11, 3165–3177.

<https://doi.org/10.1016/J.APSB.2021.04.019>.

Chen, L., Qiu, X., Wang, X. und He, J. (2017). FAP positive fibroblasts induce immune checkpoint blockade resistance in colorectal cancer via promoting immunosuppression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *487*, 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2017.03.039>.

Chen, L.B., Gallimore, P.H. und McDougall, J.K. (1976). Correlation between tumor induction and the large external transformation sensitive protein on the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *73*, 3570–3574. <https://doi.org/10.1073/PNAS.73.10.3570>.

Cheng, C.C., Lian, W.S., Hsiao, F.S.H., Liu, I.H., Lin, S.P., Lee, Y.H., Chang, C.C., Xiao, G.Y., Huang, H.Y., Cheng, C.F., et al. (2012). Isolation and Characterization of Novel Murine Epiphysis Derived Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One* *7*, e36085. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0036085>.

Cheng, Y., Li, H., Deng, Y., Tai, Y., Zeng, K., Zhang, Y., Liu, W., Zhang, Q. und Yang, Y. (2018). Cancer-associated fibroblasts induce PDL1+ neutrophils through the IL6-STAT3 pathway that foster immune suppression in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* *9*. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0458-4>.

Cho, C., Horzempa, C., Longo, C.M., Peters, D.M., Jones, D.M. und McKeown-Longo, P.J. (2020). Fibronectin in the tumor microenvironment activates a TLR4-dependent inflammatory response in lung cancer cells. *J. Cancer* *11*, 3099–3105. <https://doi.org/10.7150/JCA.39771>.

Chung, K.M., Hsu, S.C., Chu, Y.R., Lin, M.Y., Jiaang, W.T., Chen, R.H. und Chen, X. (2014). Fibroblast Activation Protein (FAP) Is Essential for the Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through RhoA Activation. *PLoS One* *9*. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0088772>.

Ciesielska, A., Matyjek, M. und Kwiatkowska, K. (2020). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* *2020* *784* *78*, 1233–1261. <https://doi.org/10.1007/S00018-020-03656-Y>.

Cloke, T., Munder, M., Bergin, P., Herath, S., Modolell, M., Taylor, G., Müller, I. und Kropf, P. (2013). Phenotypic Alteration of Neutrophils in the Blood of HIV Seropositive Patients. *PLoS One* *8*, 72034. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0072034>.

Comen, E., Wojnarowicz, P., Seshan, V.E., Shah, R., Coker, C., Norton, L. und Benezra, R. (2016). TNF is a key cytokine mediating neutrophil cytotoxic activity in breast cancer patients. *Npj Breast Cancer* *2016* *21* *2*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2016.9>.

Comito, G., Giannoni, E., Segura, C.P., Barcellos-De-Souza, P., Raspollini, M.R., Baroni, G.,

Lanciotti, M., Serni, S. und Chiarugi, P. (2014). Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene* 33, 2423–2431. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.191>.

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3, 301–313. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2008.07.003>.

Cui, C., Chakraborty, K., Tang, X.A., Zhou, G., Schoenfelt, K.Q., Becker, K.M., Hoffman, A., Chang, Y.F., Blank, A., Reardon, C.A., et al. (2021). Neutrophil elastase selectively kills cancer cells and attenuates tumorigenesis. *Cell* 184, 3163-3177.e21. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.04.016>.

Cui, J., Li, Z., Jin, C. und Jin, Z. (2020). Knockdown of fibronectin extra domain B suppresses TGF- β 1-mediated cell proliferation and collagen deposition in keloid fibroblasts via AKT/ERK signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 526, 1131–1137. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2020.04.021>.

Cypionka, H. (2010). *Grundlagen der Mikrobiologie* (Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag).

Dacquin, R., Starbuck, M., Schinke, T. und Karsenty, G. (2002). Mouse α 1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. *Dev. Dyn.* 224, 245–251. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10100>.

Dalton, C.J. und Lemmon, C.A. (2021). Fibronectin: Molecular Structure, Fibrillar Structure and Mechanochemical Signaling. *Cells* 10, 2443. <https://doi.org/10.3390/cells10092443>.

Daniels, R.H., Elmore, M.A., Hill, M.E., Shimizu, Y., Lackie, J.M. und Finnen, M.J. (1994). Priming of the oxidative burst in human neutrophils by physiological agonists or cytochalasin B results from the recruitment of previously non-responsive cells. *Immunology* 82, 465. .

Das, S., Shapiro, B., Vucic, E.A., Vogt, S. und Bar-Sagi, D. (2020). Tumor cell-derived IL1 β promotes desmoplasia and immune suppression in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 80, 1088–1101. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2080/653925/AM/TUMOR-CELL-DERIVED-IL-1-PROMOTES-DESMOPLASIA-AND>.

Deak, S.B., Glaug, M.R., Pierce, R.A., Bancila, E., Amenta, P., Mackenzie, J.W., Greco, R.S. und Boyd, C.D. (1991). Desmoplasia in Benign and Malignant Breast Disease is Characterized by Alterations in Level of mRNAs Coding for Types I and III Procollagen. *Matrix* 11, 252–258. [https://doi.org/10.1016/S0934-8832\(11\)80232-5](https://doi.org/10.1016/S0934-8832(11)80232-5).

Degeorges, A., Tatoud, R., Fauvel-Lafeve, F., Podgorniak, M.-P., Millot, G., de Cremoux, P. und

Calvo, F. (1996). Stromal cells from human benign prostate hyperplasia produce a growth-inhibitory factor for LNCaP prostate cancer cells, identified as interleukin-6. *Int. J. Cancer* *68*, 207–214. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19961009\)68:2<207::AID-IJC12>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19961009)68:2<207::AID-IJC12>3.0.CO;2-7).

Deligne, C., Murdamoothoo, D., Gammage, A.N., Gschwandtner, M., Erne, W., Loustau, T., Marzeda, A.M., Carapito, R., Paul, N., Velazquez-Quesada, I., et al. (2020). Matrix-targeting immunotherapy controls tumor growth and spread by switching macrophage phenotype. *Cancer Immunol. Res.* *8*, 368–382. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0276/470872/AM/MATRIX-TARGETING-IMMUNOTHERAPY-CONTROLS-TUMOR>.

Dempke, W. (2008). *Molekulare Therapie in der Hämatologie/Onkologie. Grundlagen - Prinzipien - Perspektiven.* (Bremen: UNI-MED-Verlag).

Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. und Chen, Z.J. (2000). Activation of the I κ B Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. *Cell* *103*, 351–361. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00126-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00126-4).

Devarakonda, S., Morgensztern, D. und Govindan, R. (2015). Genomic alterations in lung adenocarcinoma. *Lancet Oncol.* *16*, e342–e351. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00077-7).

Van Dinther-Janssen, A.C.H.M., Pals, S.T., Scheper, R.J. und Meijer, C.J.L.M. (1993). Role of the CS1 adhesion motif of fibronectin in T cell adhesion to synovial membrane and peripheral lymph node endothelium. *Ann. Rheum. Dis.* *52*, 672–676. <https://doi.org/10.1136/ARD.52.9.672>.

Djouad, F., Ponce, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noël, D. und Jorgensen, C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* *102*, 3837–3844. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1193>.

Djouad, F., Bony, C., Apparailly, F., Louis-Ponce, P., Jorgensen, C. und Noël, D. (2006). Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation* *82*, 1060–1066. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000236098.13804.0b>.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J. und Horwitz, E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* *8*, 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.

Dong, C., Greathouse, K.M., Beacham, R.L., Palladino, S.P., Helton, E.S. und Ubogu, E.E. (2017).

Fibronectin connecting segment-1 peptide inhibits pathogenic leukocyte trafficking and inflammatory demyelination in experimental models of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Exp. Neurol.* 292, 35–45. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2017.02.012>.

Donovan, J.A. und Koretzky, G.A. (1993). CD45 and the immune response. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4, 976–985. <https://doi.org/10.1681/ASN.V44976>.

Dumitru, C.A., Hemedda, H., Jakob, M., Lang, S. und Brandau, S. (2014). Stimulation of mesenchymal stromal cells (MSCs) via TLR3 reveals a novel mechanism of autocrine priming. *FASEB J.* 28, 3856–3866. <https://doi.org/10.1096/FJ.14-250159>.

Eash, K.J., Means, J.M., White, D.W. und Link, D.C. (2009). CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* 113, 4711–4719. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-09-177287>.

Eash, K.J., Greenbaum, A.M., Gopalan, P.K. und Link, D.C. (2010). CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.* 120, 2423–2431. <https://doi.org/10.1172/JCI41649>.

Eigentler, T.K., Weide, B., De Braud, F., Spitaleri, G., Romanini, A., Pflugfelder, A., González-Iglesias, R., Tasciotti, A., Giovannoni, L., Schwager, K., et al. (2011). A dose-escalation and signal-generating study of the immunocytokine L19-IL2 in combination with dacarbazine for the therapy of patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* 17, 7732–7742. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1203/84447/AM/A-DOSE-ESCALATION-AND-SIGNAL-GENERATING-STUDY-OF>.

Eiró, N., González, L., González, L.O., Fernandez-Garcia, B., Andicoechea, A., Barbón, E., García-Muñiz, J.L. und Vizoso, F.J. (2013). Toll-like receptor-4 expression by stromal fibroblasts is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *J. Immunother.* 36, 342–349. <https://doi.org/10.1097/CJI.0B013E31829D85E6>.

Eklund, G. und Malec, E. (1978). Sunlight and incidence of cutaneous malignant melanoma: Effect of latitude and domicile in Sweden. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 12, 231–241. <https://doi.org/10.3109/02844317809012999>.

El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J.C., Gougerot-Pocidaló, M.A. und Dang, P.M.C. (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. *Immunol. Rev.* 273, 180–193. <https://doi.org/10.1111/imr.12447>.

Elbim, C., Bailly, S., Chollet-Martin, S., Hakim, J. und Gougerot-Pocidaló, M.A. (1994). Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst

in response to bacterial N-formyl peptides. *Infect. Immun.* 62, 2195–2201. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.6.2195-2201.1994>.

Elices, M.J., Fikes, J.D., Firestein, G.S., Elices, M.J., Tsai, V., Strahl, D., Goel, A.S., Tollefson, V., Arrhenius, T., Wayner, E.A., et al. (1994). Expression and functional significance of alternatively spliced CS1 fibronectin in rheumatoid arthritis microvasculature. Expression and Functional Significance of Alternatively Spliced CS1 Fibronectin in Rheumatoid Arthritis Microvasculature. *J Clin Invest* 93. <https://doi.org/10.1172/JCI116975>.

Elisia, I., Nakamura, H., Lam, V., Hofs, E., Cederberg, R., Cait, J., Hughes, M.R., Lee, L., Jia, W., Adomat, H.H., et al. (2016). DMSO Represses Inflammatory Cytokine Production from Human Blood Cells and Reduces Autoimmune Arthritis. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0152538>.

Ellert-Miklaszewska, A., Poleszak, K., Pasierbinska, M. und Kaminska, B. (2020). Integrin Signaling in Glioma Pathogenesis: From Biology to Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, Vol. 21, Page 888 21, 888. <https://doi.org/10.3390/IJMS21030888>.

Elshal, M.F., Khan, S.S., Raghavachari, N., Takahashi, Y., Barb, J., Bailey, J.J., Munson, P.J., Solomon, M.A., Danner, R.L. und McCoy, J.P. (2007). A unique population of effector memory lymphocytes identified by CD146 having a distinct immunophenotypic and genomic profile. *BMC Immunol.* 8, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-8-29>.

Elyada, E., Bolisetty, M., Laise, P., Flynn, W.F., Courtois, E.T., Burkhart, R.A., Teinor, J.A., Belleau, P., Biffi, G., Lucito, M.S., et al. (2019). Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts. *Cancer Discov.* 9, 1102. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0094>.

Engela, A.U., Baan, C.C., Litjens, N.H.R., Franquesa, M., Betjes, M.G.H., Weimar, W. und Hoogduijn, M.J. (2013a). Mesenchymal stem cells control alloreactive CD8+CD28- T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 174, 449–458. <https://doi.org/10.1111/cei.12199>.

Engela, A.U., Hoogduijn, M.J., Boer, K., Litjens, N.H.R., Betjes, M.G.H., Weimar, W. und Baan, C.C. (2013b). Human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells induce functional de-novo regulatory T cells with methylated FOXP3 gene DNA. *Clin. Exp. Immunol.* 173, 343–354. <https://doi.org/10.1111/cei.12120>.

Eruslanov, E.B. (2017). Phenotype and function of tumor-associated neutrophils and their subsets in early-stage human lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 66, 997–1006. <https://doi.org/10.1007/S00262-017-1976-0/FIGURES/2>.

Eruslanov, E., Neuberger, M., Daurkin, I., Perrin, G.Q., Algood, C., Dahm, P., Rosser, C., Vieweg,

J., Gilbert, S.M. und Kusmartsev, S. (2012). Circulating and tumor-infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer. *Int. J. Cancer* 130, 1109–1119. <https://doi.org/10.1002/IJC.26123>.

Eruslanov, E.B., Bhojnagarwala, P.S., Quatromoni, J.G., Stephen, T.L., Ranganathan, A., Deshpande, C., Akimova, T., Vachani, A., Litzky, L., Hancock, W.W., et al. (2014). Tumor-associated neutrophils stimulate T cell responses in early-stage human lung cancer. *J. Clin. Invest.* 124, 5466–5480. <https://doi.org/10.1172/JCI77053>.

Essani, N.A., Fisher, M.A. und Jaeschke, H. (1997). Inhibition of NF-kappa B activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF-alpha formation, reduced ICAM-1 gene transcription und protection against endotoxin-induced liver injury. *Shock* 7, 90–96. <https://doi.org/10.1097/00024382-199702000-00003>.

Eyles, J.L., Roberts, A.W., Metcalf, D. und Wicks, I.P. (2006). Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils—forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2006 29 2, 500–510. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0291>.

Fang, S., Dai, Y., Mei, Y., Yang, M., Hu, L., Yang, H., Guan, X. und Li, J. (2019). Clinical significance and biological role of cancer-derived Type I collagen in lung and esophageal cancers. *Thorac. Cancer* 10, 277–288. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12947>.

Fei, D., Meng, X., Yu, W., Yang, S., Song, N., Cao, Y., Jin, S., Dong, L., Pan, S. und Zhao, M. (2018). Fibronectin (FN) cooperated with TLR2/TLR4 receptor to promote innate immune responses of macrophages via binding to integrin β 1. *Virulence* 9, 1588–1600. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1528841>.

Femel, J., Huijbers, E.J.M., Saupe, F., Cedervall, J., Zhang, L., Roswall, P., Larsson, E., Olofsson, H., Pietras, K., Dimberg, A., et al. (2014). Therapeutic vaccination against fibronectin ED-A attenuates progression of metastatic breast cancer. *Oncotarget* 5, 12418. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2628>.

French-Constant, C., Van De Water, L., Dvorak, H.F. und Hynes, R.O. (1989). Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J. Cell Biol.* 109, 903–914. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.2.903>.

Fialkow, L., Wang, Y. und Downey, G.P. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic. Biol. Med.* 42, 153–164. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2006.09.030>.

Filippi, M.D. (2019). Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. *Blood* 133, 2149–2158. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2018-12-844605>.

Finisguerra, V., Di Conza, G., Di Matteo, M., Serneels, J., Costa, S., Thompson, A.A.R., Wauters, E., Walmsley, S., Prenen, H., Granot, Z., et al. (2015). MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nat.* 2015 5227556 522, 349–353. <https://doi.org/10.1038/nature14407>.

Fitzgerald, K.A., Palsson-Mcdermott, E.M., Bowie, A.G., Jefferies, C.A., Mansell, A.S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M.T., et al. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413, 78–83. <https://doi.org/10.1038/35092578>.

Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P.M. und Golenbock, D.T. (2003). LPS-TLR4 Signaling to IRF-3/7 and NF- κ B Involves the Toll Adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* 198, 1043. <https://doi.org/10.1084/JEM.20031023>.

Fore, F., Indriputri, C., Mamutse, J. und Nugraha, J. (2020). TLR10 and Its Unique Anti-Inflammatory Properties and Potential Use as a Target in Therapeutics. *Immune Netw.* 20. <https://doi.org/10.4110/IN.2020.20.E21>.

François, S., Usunier, B., Fogue-Lafitte, M.E., L'Homme, B., Benderitter, M., Douay, L., Gorin, N.C., Larsen, A.K. und Chapel, A. (2019). Mesenchymal Stem Cell Administration Attenuates Colon Cancer Progression by Modulating the Immune Component within the Colorectal Tumor Microenvironment. *Stem Cells Transl. Med.* 8, 285–300. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0117>.

Fraser, J.K., Wulur, I., Alfonso, Z. und Hedrick, M.H. (2006). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 24, 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.01.010>.

Freire-de-Lima, L., Gelfenbeyn, K., Ding, Y., Mandel, U., Clausen, H., Handa, K. und Hakomori, S.I. (2011). Involvement of O-glycosylation defining oncofetal fibronectin in epithelial-mesenchymal transition process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17690–17695. https://doi.org/10.1073/PNAS.1115191108/SUPPL_FILE/PNAS.201115191SI.PDF.

Frey, K., Fiechter, M., Schwager, K., Belloni, B., Barysch, M.J., Neri, D. und Dummer, R. (2011). Different patterns of fibronectin and tenascin-C splice variants expression in primary and metastatic melanoma lesions. *Exp. Dermatol.* 20, 685–688. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0625.2011.01314.X>.

Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S. und Albelda, S.M. (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2009.06.017/ATTACHMENT/5CC1B61F-987D-4932-9F82-B85F7B610DED/MMC1.PDF>.

Fukuda, T., Yoshida, N., Kataoka, Y., Manabe, R. ichiroh, Mizuno-Horikawa, Y., Sato, M., Kuriyama, K., Yasui, N. und Sekiguchi, K. (2002). Mice lacking the EDB segment of fibronectin develop normally but exhibit reduced cell growth and fibronectin matrix assembly in vitro. *Cancer Res.* *62*, 5603–5610. .

Fukushima, T., Matsuzawa, S.I., Kress, C.L., Bruey, J.M., Krajewska, M., Lefebvre, S., Zapata, J.M., Ronai, Z. und Reed, J.C. (2007). Ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 is a critical component of TNF receptor-associated factor (TRAF)-mediated inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 6371–6376. https://doi.org/10.1073/PNAS.0700548104/SUPPL_FILE/00548TABLE1.PDF.

Funderburg, N., Lederman, M.M., Feng, Z., Drage, M.G., Jadowsky, J., Harding, C. V., Weinberg, A. und Sieg, S.F. (2007). Human β -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 18631. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0702130104>.

Gabrilovich, D.I. und Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 162. <https://doi.org/10.1038/NRI2506>.

Galland, S. und Stamenkovic, I. (2020). Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *J. Pathol.* *250*, 555–572. <https://doi.org/10.1002/PATH.5357>.

Galleu, A., Riffo-Vasquez, Y., Trento, C., Lomas, C., Dolcetti, L., Cheung, T.S., Von Bonin, M., Barbieri, L., Halai, K., Ward, S., et al. (2017). Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces in vivo recipient-mediated immunomodulation. *Sci. Transl. Med.* *9*. https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAM7828/SUPPL_FILE/AAM7828_VIDEOS_S1_TO_S6.ZIP.

García-Culebras, A., Durán-Laforet, V., Peña-Martínez, C., Moraga, A., Ballesteros, I., Cuartero, M.I., de la Parra, J., Palma-Tortosa, S., Hidalgo, A., Corbí, A.L., et al. (2019). Role of TLR4 (Toll-like receptor 4) in N1/N2 neutrophil programming after stroke. *Stroke* *50*, 2922–2932. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.025085>.

George, E.L., Georges-Labouesse, E.N., Patel-King, R.S., Rayburn, H. und Hynes, R.O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* *119*, 1079–1091. <https://doi.org/10.1242/DEV.119.4.1079>.

Georgiades, P., Ogilvy, S., Duval, H., Licence, D.R., Charnock-Jones, D.S., Smith, S.K. und Print, C.G. (2002). vavCre transgenic mice: A tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages. *Genesis* *34*, 251–256. <https://doi.org/10.1002/gene.10161>.

Germic, N., Frangez, Z., Yousefi, S. und Simon, H.U. (2019). Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. *Cell Death Differ.* 2019 264 26, 715–727. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0297-6>.

Gershkovitz, M., Caspi, Y., Fainsod-Levi, T., Katz, B., Michaeli, J., Khawaled, S., Lev, S., Polyansky, L., Shaul, M.E., Sionov, R. V., et al. (2018). TRPM2 mediates neutrophil killing of disseminated tumor cells. *Cancer Res.* 78, 2680–2690. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3614/653280/AM/TRPM2-MEDIATES-NEUTROPHIL-KILLING-OF-DISSEMINATED>.

Gershkovitz, M., Fainsod-Levi, T., Zelter, T., Sionov, R. V. und Granot, Z. (2019). TRPM2 modulates neutrophil attraction to murine tumor cells by regulating CXCL2 expression. *Cancer Immunol. Immunother.* 68, 33–43. <https://doi.org/10.1007/S00262-018-2249-2/FIGURES/4>.

Ghura, H., Keimer, M., von Au, A., Hackl, N., Klemis, V. und Nakchbandi, I.A. (2021). Inhibition of fibronectin accumulation suppresses tumor growth. *Neoplasia* 23, 837–850. <https://doi.org/10.1016/J.NEO.2021.06.012>.

Godleski, J.J., Lee, R.E. und Leighton, J. (1970). Studies on the role of polymorphonuclear leukocytes in neoplastic disease with the chick embryo and Walker carcinosarcoma 256 in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 30, 1986–1993. .

Gohda, J., Matsumura, T. und Inoue, J. (2004). Cutting Edge: TNFR-Associated Factor (TRAF) 6 Is Essential for MyD88-Dependent Pathway but Not Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- β (TRIF)-Dependent Pathway in TLR Signaling. *J. Immunol.* 173, 2913–2917. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.173.5.2913>.

Gok Yavuz, B., Gunaydin, G., Gedik, M.E., Kosemehmetoglu, K., Karakoc, D., Ozgur, F. und Guc, D. (2019). Cancer associated fibroblasts sculpt tumour microenvironment by recruiting monocytes and inducing immunosuppressive PD-1 + TAMs. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39553-z>.

Goldstein, A.M. und Tucker, M.A. (2001). Genetic epidemiology of cutaneous melanoma; A Global Perspective. *Arch. Dermatol.* 137, 1493–1496. <https://doi.org/10.1001/archderm.137.11.1493>.

Gonçalves, F.D.C., Luk, F., Korevaar, S.S., Bouzid, R., Paz, A.H., López-Iglesias, C., Baan, C.C., Merino, A. und Hoogduijn, M.J. (2017). Membrane particles generated from mesenchymal stromal cells modulate immune responses by selective targeting of pro-inflammatory monocytes. *Sci. Reports* 2017 71 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12121-z>.

Gondokaryono, S.P., Ushio, H., Ois Niyonsaba, F., Hara, M., Takenaka, H., Sumanasiri, †,

Jayawardana, T.M., Ikeda, S., Okumura, K. und Ogawa, H. (2007). The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via Toll-like receptor 4. *J. Leukoc. Biol.* 82, 657–665. <https://doi.org/10.1189/JLB.1206730>.

González-Jiménez, E. (2018). Breastfeeding and Reduced Risk of Breast Cancer in Women: A Review of Scientific Evidence. *Sel. Top. Breastfeed.* <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.72688>.

Granot, Z., Henke, E., Comen, E.A., King, T.A., Norton, L. und Benezra, R. (2011). Tumor Entrained Neutrophils Inhibit Seeding in the Premetastatic Lung. *Cancer Cell* 20, 300–314. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2011.08.012>.

Grassin-Delye, S., Abrial, C., Salvator, H., Brolo, M., Naline, E. und Devillier, P. (2020). The Role of Toll-Like Receptors in the Production of Cytokines by Human Lung Macrophages. *J. Innate Immun.* 12, 63–73. <https://doi.org/10.1159/000494463>.

Greten, F.R., Eckmann, L., Greten, T.F., Park, J.M., Li, Z.W., Egan, L.J., Kagnoff, M.F. und Karin, M. (2004). IKK β Links Inflammation and Tumorigenesis in a Mouse Model of Colitis-Associated Cancer. *Cell* 118, 285–296. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2004.07.013>.

Griffiths, M.J.D., Bonnet, D. und Janes, S.M. (2005). Stem cells of the alveolar epithelium. *Lancet* 366, 249–260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66916-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66916-4).

Grither, W.R., Divine, L.M., Meller, E.H., Wilke, D.J., Desai, R.A., Loza, A.J., Zhao, P., Lohrey, A., Longmore, G.D. und Fuh, K.C. (2018). TWIST1 induces expression of Discoidin Domain Receptor2 (DDR2) to Promote Ovarian Cancer Metastasis. *Oncogene* 37, 1714. <https://doi.org/10.1038/S41388-017-0043-9>.

Grünwald, B.T., Devisme, A., Andrieux, G., Vyas, F., Aliar, K., McCloskey, C.W., Macklin, A., Jang, G.H., Denroche, R., Romero, J.M., et al. (2021). Spatially confined sub-tumor microenvironments in pancreatic cancer. *Cell* 184, 5577-5592.e18. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.09.022/ATTACHMENT/A0650C7F-0514-495F-AF79-76D51E6F5951/MMC6.XLSX>.

Grzywa, T.M., Paskal, W. und Włodarski, P.K. (2017). Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Transl. Oncol.* 10, 956–975. <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2017.09.007>.

Gu, H., Yan, C., Wan, H., Wu, L., Liu, J., Zhu, Z. und Gao, D. (2021). Mesenchymal stem cell-derived exosomes block malignant behaviors of hepatocellular carcinoma stem cells through a lncRNA C5orf66-AS1/microRNA-127-3p/DUSP1/ERK axis. *Hum. Cell* 34, 1812–1829. <https://doi.org/10.1007/S13577-021-00599-9/FIGURES/9>.

Guan, J.L. und Hynes, R.O. (1990). Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor $\alpha 4\beta 1$. *Cell* *60*, 53–61. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90715-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90715-Q).

Haas, L. und Obenauf, A.C. (2019). Allies or Enemies—The Multifaceted Role of Myeloid Cells in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* *10*, 2746. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02746/BIBTEX>.

Häcker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L.C., Wang, G.G., Kamps, M.P., Raz, E., Wagner, H., Häcker, G., et al. (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* *439*, 204–207. <https://doi.org/10.1038/nature04369>.

Hall, S.R.R., Tsoyi, K., Ith, B., Padera, R.F., Lederer, J.A., Wang, Z., Liu, X. und Perrella, M.A. (2013a). Mesenchymal Stromal Cells Improve Survival During Sepsis in the Absence of Heme Oxygenase-1: The Importance of Neutrophils. *Stem Cells* *31*, 397. <https://doi.org/10.1002/STEM.1270>.

Hall, S.R.R., Jiang, Y., Leary, E., Yavanian, G., Eminli, S., O’Neill, D.W. und Marasco, W.A. (2013b). Identification and Isolation of Small CD44-Negative Mesenchymal Stem/Progenitor Cells From Human Bone Marrow Using Elutriation and Polychromatic Flow Cytometry. *Stem Cells Transl. Med.* *2*, 567. <https://doi.org/10.5966/SCTM.2012-0155>.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* *12*, 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).

Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* *144*, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J.W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R.K. und McDonald, D.M. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* *156*, 1363–1380. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65006-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65006-7).

Hayden, M.S. und Ghosh, S. (2008). Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* *132*, 344–362. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.01.020>.

He, J., Teng, X., Yu, Y., Huang, H., Ye, W., Ding, Y. und Shen, Z. (2013). Injection of Sca-1+/CD45+/CD31+ mouse bone mesenchymal stromal-like cells improves cardiac function in a mouse myocardial infarct model. *Differentiation*. *86*, 57–64.

<https://doi.org/10.1016/J.DIFF.2013.07.002>.

Hedrick, C.C. und Malanchi, I. (2021). Neutrophils in cancer: heterogeneous and multifaceted. *Nat. Rev. Immunol.* 2021 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00571-6>.

Hegde, S., Leader, A.M. und Merad, M. (2021). MDSC: Markers, development, states und unaddressed complexity. *Immunity* 54, 875–884. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2021.04.004>.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. und Bauer, S. (2004). Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* (80-). 303, 1526–1529. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1093620/SUPPL_FILE/HEIL.SOM.PDF.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740–745. <https://doi.org/10.1038/35047123>.

Henke, E., Nandigama, R. und Ergün, S. (2020). Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front. Mol. Biosci.* 6, 160. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2019.00160/BIBTEX>.

Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M.O., Fiedler, J., Boehm, B.O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R., et al. (2004). Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J. Cell Sci.* 117, 4411–4422. <https://doi.org/10.1242/jcs.01307>.

Hershberger, R.P. und Culp, L.A. (1990). Cell-type-specific expression of alternatively spliced human fibronectin IIICS mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 10, 662–671. <https://doi.org/10.1128/MCB.10.2.662-671.1990>.

Hey, Y.Y., Tan, J.K.H. und O’Neill, H.C. (2016). Redefining myeloid cell subsets in murine spleen. *Front. Immunol.* 6, 652. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2015.00652/BIBTEX>.

Hielscher, A., Ellis, K., Qiu, C., Porterfield, J. und Gerecht, S. (2016). Fibronectin Deposition Participates in Extracellular Matrix Assembly and Vascular Morphogenesis. *PLoS One* 11, e0147600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147600>.

Hirschhorn, D., Budhu, S., Schröder, D., kraehenbuehl, L., Flammar, A.-L., Chow, A., Schulze, I., Schad, S., Ricca, J., Gasmi, B., et al. (2021). 99 T cell immunotherapies trigger neutrophil activation to eliminate tumor antigen escape variants. *J. Immunother. Cancer* 9, A108–A108. <https://doi.org/10.1136/JITC-2021-SITC2021.099>.

Ho, I.A.W., Toh, H.C., Ng, W.H., Teo, Y.L., Guo, C.M., Hui, K.M. und Lam, P.Y.P. (2013). Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Suppress Human Glioma Growth Through Inhibition of Angiogenesis. *Stem Cells* 31, 146–155. <https://doi.org/10.1002/STEM.1247>.

Holmes, C. und Stanford, W.L. (2007). Concise Review: Stem Cell Antigen-1: Expression, Function und Enigma. *Stem Cells* 25, 1339–1347. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2006-0644>.

Hornig, T., Barton, G.M., Flavell, R.A. und Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420, 329–333. <https://doi.org/10.1038/nature01180>.

Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S. und Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395. <https://doi.org/10.1080/14653240500319234>.

Hsu, Y.-Y., Shi, G.-Y., Wang, K.-C., Ma, C.-Y., Cheng, T.-L., Wu, H.-L., Hsu, Y.-Y., Shi, G.-Y., Wang, K.-C., Ma, C.-Y., et al. (2016). Thrombomodulin promotes focal adhesion kinase activation and contributes to angiogenesis by binding to fibronectin. *Oncotarget* 7, 68122–68139. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.11828>.

Hu, C.-H.D., Kosaka, Y., Marcus, P., Rashedi, I. und Keating, A. (2019). Differential Immunomodulatory Effects of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells on Natural Killer Cells. *Stem Cells Dev.* 28, 933–943. <https://doi.org/10.1089/scd.2019.0059>.

Hua, D., Liu, M. yuan, Cheng, Z. de, Qin, X. jing, Zhang, H. mou, Chen, Y., Qin, G. jian, Liang, G., Li, J. nan, Han, X. feng, et al. (2009). Small interfering RNA-directed targeting of Toll-like receptor 4 inhibits human prostate cancer cell invasion, survival und tumorigenicity. *Mol. Immunol.* 46, 2876–2884. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2009.06.016>.

Huijbers, E.J.M., Femel, J., Andersson, K., Björkelund, H., Hellman, L. und Olsson, A.K. (2012). The non-toxic and biodegradable adjuvant Montanide ISA 720/CpG can replace Freund's in a cancer vaccine targeting ED-B—a prerequisite for clinical development. *Vaccine* 30, 225–230. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2011.11.010>.

Humphries, M.J., Komoriya, A., Akiyama, S.K., Olden, K. und Yamada, K.M. (1987). Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin that promote cell type-specific adhesion. *J. Biol. Chem.* 262, 6886–6892. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)48327-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48327-5).

Hutton, C., Heider, F., Blanco-Gomez, A., Banyard, A., Kononov, A., Zhang, X., Karim, S., Paulus-

Hock, V., Watt, D., Steele, N., et al. (2021). Single-cell analysis defines a pancreatic fibroblast lineage that supports anti-tumor immunity. *Cancer Cell* 39, 1227-1244.e20. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2021.06.017>.

Hwa Cho, H., Bae, Y.C. und Jung, J.S. (2006). Role of Toll-Like Receptors on Human Adipose-Derived Stromal Cells. *Stem Cells* 24, 2744–2752. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2006-0189>.

Hwang, H.S., Park, S.J., Cheon, E.J., Lee, M.H. und Kim, H.A. (2015). Fibronectin fragment-induced expression of matrix metalloproteinases is mediated by MyD88-dependent TLR-2 signaling pathway in human chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* 17, 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13075-015-0833-9/FIGURES/6>.

Hwang, H.S., Lee, M.H., Choi, M.H. und Kim, H.A. (2019). Induction of pro-inflammatory cytokines by 29-kDa FN-f via cGAS/STING pathway. *BMB Rep.* 52, 336. <https://doi.org/10.5483/BMBREP.2019.52.5.072>.

Hwang, H.S., Lee, M.H. und Kim, H.A. (2021). The TLR-2/TonEBP signaling pathway regulates 29-kDa fibronectin fragment-dependent expression of matrix metalloproteinases. *Sci. Reports* 2021 111 11, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87813-8>.

Hwang, S.H., Cho, H.K., Park, S.H., Lee, W.S., Lee, H.J., Lee, D.C., Oh, J.H., Park, S.H., Kim, T.G., Sohn, H.J., et al. (2014). Toll like Receptor 3 & 4 Responses of Human Turbinate Derived Mesenchymal Stem Cells: Stimulation by Double Stranded RNA and Lipopolysaccharide. *PLoS One* 9, e101558. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0101558>.

Hynes, R.O. (1990). Fibronectins. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3264-3>.

Hynes, R. O, Destree, A.T., Perkins, M.E. und Wagner, D.D. (1979). Cell Surface Fibronectin and Oncogenic Transformation. *J. Supramol. Struct.* 11, 1–80. .

Ishikawa, T., Kokura, S., Enoki, T., Sakamoto, N., Okayama, T., Ideno, M., Mineno, J., Uno, K., Yoshida, N., Kamada, K., et al. (2014). Phase I Clinical Trial of Fibronectin CH296-Stimulated T Cell Therapy in Patients with Advanced Cancer. *PLoS One* 9, e83786. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0083786>.

Ismail-Khan, R. und Bui, M.M. (2010). A Review of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Control* 17. .

Jablonska, J., Leschner, S., Westphal, K., Lienenklaus, S. und Weiss, S. (2010). Neutrophils responsive to endogenous IFN- β regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J. Clin. Invest.* 120, 1151. <https://doi.org/10.1172/JCI37223>.

Jang, S., Park, J.-S., Won, Y.-H., Yun, S.-J. und Kim, S.-J. (2012). The Expression of Toll-Like Receptors (TLRs) in Cultured Human Skin Fibroblast is Modulated by Histamine. *Chonnam Med. J.* *48*, 7–14. <https://doi.org/10.4068/CMJ.2012.48.1.7>.

Jia, D., Entersz, I., Butler, C. und Foty, R.A. (2012). Fibronectin matrix-mediated cohesion suppresses invasion of prostate cancer cells. *BMC Cancer* *12*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-94/FIGURES/9>.

Jiang, L., Wang, Y.J., Zhao, J., Uehara, M., Hou, Q., Kasinath, V., Ichimura, T., Banouni, N., Dai, L., Li, X., et al. (2020). Direct Tumor Killing and Immunotherapy through Anti-SerpineB9 Therapy. *Cell* *183*, 1219–1233.e18. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.10.045>.

Jin, C., Cleveland, J.C., Ao, L., Li, J., Zeng, Q., Fullerton, D.A. und Meng, X. (2014). Human Myocardium Releases Heat Shock Protein 27 (HSP27) after Global Ischemia: The Proinflammatory Effect of Extracellular HSP27 through Toll-like Receptor (TLR)-2 and TLR4. *Mol. Med.* *20*, 280. <https://doi.org/10.2119/MOLMED.2014.00058>.

Johannsen, M., Spitaleri, G., Curigliano, G., Roigas, J., Weikert, S., Kempkensteffen, C., Roemer, A., Kloeters, C., Rogalla, P., Pecher, G., et al. (2010). The tumour-targeting human L19-IL2 immunocytokine: Preclinical safety studies, phase I clinical trial in patients with solid tumours and expansion into patients with advanced renal cell carcinoma. *Eur. J. Cancer* *46*, 2926–2935. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2010.07.033>.

Joseph, C., Quach, J.M., Walkley, C.R., Lane, S.W., Lo Celso, C. und Purton, L.E. (2013). Deciphering Hematopoietic Stem Cells in Their Niches: A Critical Appraisal of Genetic Models, Lineage Tracing und Imaging Strategies. *Cell Stem Cell* *13*, 520–533. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2013.10.010>.

Joshkon, A., Heim, X., Dubrou, C., Bachelier, R., Traboulsi, W., Stalin, J., Fayyad-Kazan, H., Badran, B., Foucault-Bertaud, A., Leroyer, A.S., et al. (2020). Role of CD146 (MCAM) in Physiological and Pathological Angiogenesis—Contribution of New Antibodies for Therapy. *Biomedicines* *8*, 1–19. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES8120633>.

Julier, Z., Martino, M.M., De Titta, A., Jeanbart, L. und Hubbell, J.A. (2015). The TLR4 Agonist Fibronectin Extra Domain A is Cryptic, Exposed by Elastase-2; use in a fibrin matrix cancer vaccine. *Sci. Reports* *2015* *5*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep08569>.

Jung, Y., Kim, J.K., Shiozawa, Y., Wang, J., Mishra, A., Joseph, J., Berry, J.E., McGee, S., Lee, E., Sun, H., et al. (2013). Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat. Commun.* *4*, 1795. <https://doi.org/10.1038/ncomms2766>.

Kamal, M., El-Gerbed, M., Talaat, A., Abdul-aziz, K., Shalaby, A., Khedr, R. und Salem, M.

(2021). Fibronectin, but not laminin, expression is associated with favorable outcomes in breast cancer patients. *Int. J. Cancer Biomed. Res.* 5, 0–0. <https://doi.org/10.21608/jcbr.2021.63387.1176>.

Kamarajan, P., Garcia-Pardo, A., D'Silva, N.J. und Kapila, Y.L. (2010). The CS1 segment of fibronectin is involved in human OSCC pathogenesis by mediating OSCC cell spreading, migration und invasion. *BMC Cancer* 10, 330. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-330>.

Kang, J.S., Wang, X.P., Miner, J.H., Morello, R., Sado, Y., Abrahamson, D.R. und Borza, D.B. (2006). Loss of $\alpha 3/\alpha 4(IV)$ collagen from the glomerular basement membrane induces a strain-dependent isoform switch to $\alpha 5\alpha 6(IV)$ collagen associated with longer renal survival in Col4a3-/- Alport mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 1962–1969. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006020165>.

Kaplan, M.J. und Radic, M. (2012). Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity. *J. Immunol.* 189, 2689. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1201719>.

Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. und Weissman, D. (2004). mRNA Is an Endogenous Ligand for Toll-like Receptor 3. *J. Biol. Chem.* 279, 12542–12550. <https://doi.org/10.1074/JBC.M310175200>.

Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R. und Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557–563. <https://doi.org/10.1038/nature06188>.

Kaupilla, S., Stenbäck, F., Risteli, J., Jukkola, A. und Risteli, L. (1998). Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. *J. Pathol.* 186, 262–268. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(1998110\)186:3<262::AID-PATH191>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(1998110)186:3<262::AID-PATH191>3.0.CO;2-3).

Kawai, T. und Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 2010 115 11, 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.

Kawelke, N., Bentmann, A., Hackl, N., Hager, H.D., Feick, P., Geursen, A., Singer, M. V. und Nakchbandi, I.A. (2008). Isoform of Fibronectin Mediates Bone Loss in Patients With Primary Biliary Cirrhosis by Suppressing Bone Formation. *J. Bone Miner. Res.* 23, 1278–1286. <https://doi.org/10.1359/JBMR.080313>.

Kelly, K. und Rasko, J.E.J. (2021). Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Graft Versus Host Disease. *Front. Immunol.* 12, 4457. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.761616/XML/NLM>.

Kelsh-Lasher, R.M., Ambesi, A., Bertram, C. und McKeown-Longo, P.J. (2017). Integrin $\alpha 4\beta 1$ and TLR4 Cooperate to Induce Fibrotic Gene Expression in Response to Fibronectin's EDA Domain. *J. Invest. Dermatol.* 137, 2505–2512. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.08.005>.

Kelsh, R., You, R., Horzempa, C., Zheng, M. und McKeown-Longo, P.J. (2014). Regulation of the Innate Immune Response by Fibronectin: Synergism between the III-1 and EDA Domains. *PLoS One* 9, e102974. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0102974>.

van Kesse, K.P.M., Bestebroer, J. und van Strijp, J.A.G. (2014). Neutrophil-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus*. *Front. Immunol.* 5, 467. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00467/BIBTEX>.

Kettritz, R., Choi, M., Rolle, S., Wellner, M. und Luft, F.C. (2004). Integrins and cytokines activate nuclear transcription factor- κ B in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 279, 2657–2665. <https://doi.org/10.1074/JBC.M309778200>.

Khan, Z.A., Chan, B.M., Uniyal, S., Barbin, Y.P., Farhangkhoe, H., Chen, S. und Chakrabarti, S. (2005). EDB fibronectin and angiogenesis - A novel mechanistic pathway. *Angiogenesis* 8, 183–196. <https://doi.org/10.1007/s10456-005-9017-6>.

Khazen, W., M'Bika, J.P., Tomkiewicz, C., Benelli, C., Chany, C., Achour, A. und Forest, C. (2005). Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Lett.* 579, 5631–5634. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2005.09.032>.

Kidd, S., Caldwell, L., Dietrich, M., Samudio, I., Spaeth, E.L., Watson, K., Shi, Y., Abbruzzese, J., Konopleva, M., Andreeff, M., et al. (2010). Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon- β suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment. *Cytotherapy* 12, 615–625. <https://doi.org/10.3109/14653241003631815>.

Kidd, S., Spaeth, E., Watson, K., Burks, J., Lu, H., Klopp, A., Andreeff, M. und Marini, F.C. (2012). Origins of the Tumor Microenvironment: Quantitative Assessment of Adipose-Derived and Bone Marrow-Derived Stroma. *PLoS One* 7, e30563. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0030563>.

Kim, S., Takahashi, H., Lin, W.W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J.L. und Karin, M. (2009). Carcinoma Produced Factors Activate Myeloid Cells via TLR2 to Stimulate Metastasis. *Nature* 457, 102. <https://doi.org/10.1038/NATURE07623>.

Kim, Y.G., Kamada, N., Shaw, M.H., Warner, N., Chen, G.Y., Franchi, L. und Núñez, G. (2011). The Nod2 Sensor Promotes Intestinal Pathogen Eradication via the Chemokine CCL2-Dependent Recruitment of Inflammatory Monocytes. *Immunity* 34, 769–780. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2011.04.013>.

Klopp, A.H., Gupta, A., Spaeth, E., Andreeff, M. und Marini, F. (2011). Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: Do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 29, 11–19. <https://doi.org/10.1002/stem.559>.

Kobayashi, N., Miyoshi, S., Mikami, T., Koyama, H., Kitazawa, M., Takeoka, M., Sano, K., Amano, J., Isogai, Z., Niida, S., et al. (2010). Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization. *Cancer Res.* 70, 7073–7083. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4687>.

Koliaraki, V., Chalkidi, N., Henriques, A., Tzaferis, C., Polykratis, A., Waisman, A., Muller, W., Hackam, D.J., Pasparakis, M. und Kollias, G. (2019). Innate Sensing through Mesenchymal TLR4/MyD88 Signals Promotes Spontaneous Intestinal Tumorigenesis. *Cell Rep.* 26, 536-545.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.072>.

Komoriyas, A., Green#, L.J., Mervicq, M., Yamadall, S.S., Yamadall, K.M. und Humphriesg, M.J. (1991). The Minimal Essential Sequence for a Major Cell Type-specific Adhesion Site (CS1) within the Alternatively Spliced Type I11 Connecting Segment Domain of Fibronectin Is Leucine-Aspartic Acid-Valine". *J. Biol. Chem.* 266, 15075–15079. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)98588-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98588-1).

Krock, E., Rosenzweig, D.H., Currie, J.B., Bisson, D.G., Ouellet, J.A. und Haglund, L. (2017). Toll-like Receptor Activation Induces Degeneration of Human Intervertebral Discs. *Sci. Rep.* 7, 17184. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17472-1>.

Krombach, J., Hennel, R., Brix, N., Orth, M., Schoetz, U., Ernst, A., Schuster, J., Zuchriegel, G., Reichel, C.A., Bierschenk, S., et al. (2019). Priming anti-tumor immunity by radiotherapy: Dying tumor cell-derived DAMPs trigger endothelial cell activation and recruitment of myeloid cells. *Oncoimmunology* 8. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1523097>.

Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M. und Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* (80-.). 269, 1427–1429. <https://doi.org/10.1126/science.7660125>.

Küper, C., Beck, F.X. und Neuhofer, W. (2012). Toll-like receptor 4 activates NF-κB and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 302, 38–46. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00590.2010>.

Kuwabara, W.M.T., Andrade-Silva, J., Pereira, J.N.B., Scialfa, J.H. und Cipolla-Neto, J. (2019). Neutrophil activation causes tumor regression in Walker 256 tumor-bearing rats. *Sci. Reports* 2019 9, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52956-2>.

Kwon, A., Chae, I.H., You, E., Kim, S.H., Ahn, S. yeon, Lee, O.J., Park, Z.Y., Rhee, S., Huh, Y.H.

und Song, W.K. (2020). Extra domain A-containing fibronectin expression in Spin90-deficient fibroblasts mediates cancer-stroma interaction and promotes breast cancer progression. *J. Cell. Physiol.* 235, 4494–4507. <https://doi.org/10.1002/JCP.29326>.

Lambrechts, D., Wauters, E., Boeckx, B., Aibar, S., Nittner, D., Burton, O., Bassez, A., Decaluwé, H., Pircher, A., Van den Eynde, K., et al. (2018). Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nat. Med.* 2018 248 24, 1277–1289. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0096-5>.

Lao, X.M., Liang, Y.J., Su, Y.X., Zhang, S.E., Zhou, X. und Liao, G.Q. (2016). Distribution and significance of interstitial fibrosis and stroma-infiltrating B cells in tongue squamous cell carcinoma. *Oncol. Lett.* 11, 2027–2034. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4184>.

Lasarte, J.J., Casares, N., Gorraiz, M., Hervás-Stubbs, S., Arribillaga, L., Mansilla, C., Durantez, M., Llopiz, D., Sarobe, P., Borrás-Cuesta, F., et al. (2007). The Extra Domain A from Fibronectin Targets Antigens to TLR4-Expressing Cells and Induces Cytotoxic T Cell Responses In Vivo. *J. Immunol.* 178, 748–756. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.2.748>.

Leadbetter, E.A., Rifkin, I.R., Hohlbaum, A.M., Beaudette, B.C., Shlomchik, M.J. und Marshak-Rothstein, A. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 416, 603–607. <https://doi.org/10.1038/416603a>.

Lee, P.Y., Wang, J.-X., Parisini, E., Dascher, C.C. und Nigrovic, P.A. (2013). Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J. Leukoc. Biol.* 94, 585–594. <https://doi.org/10.1189/JLB.0113014>.

Lee, S.M.Y., Yip, T.F., Yan, S., Jin, D.Y., Wei, H.L., Guo, R.T. und Peiris, J.S.M. (2018). Recognition of double-stranded RNA and regulation of interferon pathway by toll-like receptor 10. *Front. Immunol.* 9, 516. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00516/BIBTEX>.

Lee, W.L., Harrison, R.E. und Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* 5, 1299–1306. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.014>.

Lefebvre, J.S., Lévesque, T., Picard, S., Paré, G., Gravel, A., Flamand, L. und Borgeat, P. (2011). Extra domain a of fibronectin primes leukotriene biosynthesis and stimulates neutrophil migration through activation of Toll-like receptor 4. *Arthritis Rheum.* 63, 1527–1533. <https://doi.org/10.1002/ART.30308>.

Lehnert, K., Print, C.G., Yang, Y. und Krissansen, G.W. (1998). MAdCAM-1 costimulates T cell proliferation exclusively through integrin $\alpha 4\beta 7$, whereas VCAM-1 and CS-1 peptide use $\alpha 4\beta 1$: Evidence for “remote” costimulation and induction of hyperresponsiveness to B7 molecules. *Eur. J. Immunol.* 28, 3605–3615. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199811\)28:11<3605::AID-IMMU3605>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11<3605::AID-IMMU3605>3.0.CO;2-J).

Lertkiatmongkol, P., Liao, D., Mei, H., Hu, Y. und Newman, P.J. (2016). Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Curr. Opin. Hematol.* 23, 253. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000239>.

Li, P., Lu, M., Shi, J., Hua, L., Gong, Z., Li, Q., Shultz, L.D. und Ren, G. (2020). Dual roles of neutrophils in metastatic colonization are governed by the host NK cell status. *Nat. Commun.* 2020 111 11, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18125-0>.

Li, Q., Zhang, X., Peng, Y., Chai, H., Xu, Y., Wei, J., Ren, X., Wang, X., Liu, W., Chen, M., et al. (2013). Comparison of the sorting efficiency and influence on cell function between the sterile flow cytometry and immunomagnetic bead purification methods. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 43, 197–206. <https://doi.org/10.1080/10826068.2012.719846>.

Li, R., Zhou, R., Wang, H., Li, W., Pan, M., Yao, X., Zhan, W., Yang, S., Xu, L., Ding, Y., et al. (2019a). Gut microbiota-stimulated cathepsin K secretion mediates TLR4-dependent M2 macrophage polarization and promotes tumor metastasis in colorectal cancer. *Cell Death Differ.* 2019 2611 26, 2447–2463. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0312-y>.

Li, S., Strelow, A., Fontana, E.J. und Wesche, H. (2002). IRAK-4: A novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5567–5572. <https://doi.org/10.1073/PNAS.082100399>.

Li, W., Ren, G., Huang, Y., Su, J., Han, Y., Li, J., Chen, X., Cao, K., Chen, Q., Shou, P., et al. (2012). Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ.* 2012 199 19, 1505–1513. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.26>.

Li, X., Wang, S., Zhu, R., Li, H., Han, Q. und Zhao, R.C. (2016). Lung tumor exosomes induce a pro-inflammatory phenotype in mesenchymal stem cells via NFκB-TLR signaling pathway. *J. Hematol. Oncol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13045-016-0269-Y/TABLES/2>.

Li, Y., Wang, W., Yang, F., Xu, Y., Feng, C. und Zhao, Y. (2019b). The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity. *Cell Commun. Signal.* 17, 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12964-019-0471-Y/FIGURES/1>.

Liao, S.J., Zhou, Y.H., Yuan, Y., Li, D., Wu, F.H., Wang, Q., Zhu, J.H., Yan, B., Wei, J.J., Zhang, G.M., et al. (2012). Triggering of Toll-like receptor 4 on metastatic breast cancer cells promotes αβ3-mediated adhesion and invasive migration. *Breast Cancer Res. Treat.* 133, 853–863. <https://doi.org/10.1007/S10549-011-1844-0/FIGURES/6>.

Libermann, T.A. und Baltimore, D. (1990). Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2327. <https://doi.org/10.1128/MCB.10.5.2327>.

Lieschke, G.J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K.J., Basu, S., Zhan, Y.F. und Dunn, A.R. (1994). Mice Lacking Granulocyte Colony-Stimulating Factor Have Chronic Neutropenia, Granulocyte and Macrophage Progenitor Cell Deficiency und Impaired Neutrophil Mobilization. *Blood* **84**, 1737–1746. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V84.6.1737.1737>.

Lim, C.H., Moon, S.H., Cho, Y.S., Choi, J.Y., Lee, K.H. und Hyun, S.H. (2019). Prognostic value of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in patients with combined hepatocellular-cholangiocarcinoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **46**, 1705–1712. <https://doi.org/10.1007/S00259-019-04327-2/FIGURES/1>.

Lim, E.J., Lee, S.H., Lee, J.G., Kim, J.R., Yun, S.S., Baek, S.H. und Lee, C. (2007). Toll-like receptor 9 dependent activation of MAPK and NF- κ B is required for the CpG ODN-induced matrix metalloproteinase-9 expression. *Exp. Mol. Med.* **2007** **39**, 239–245. <https://doi.org/10.1038/emm.2007.27>.

Lin, G., Yang, R., Banie, L., Wang, G., Ning, H., Li, L.-C., Lue, T.F. und Lin, C.-S. (2010a). Effects of transplantation of adipose tissue-derived stem cells on prostate tumor. *Prostate* **70**, 1066–1073. <https://doi.org/10.1002/pros.21140>.

Lin, S.C., Lo, Y.C. und Wu, H. (2010b). Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nat.* **2010** **465**, 885–890. <https://doi.org/10.1038/nature09121>.

Lin, T.C., Yang, C.H., Cheng, L.H., Chang, W.T., Lin, Y.R. und Cheng, H.C. (2019). Fibronectin in Cancer: Friend or Foe. *Cells* **2020**, Vol. **9**, Page **27** **9**, 27. <https://doi.org/10.3390/CELLS9010027>.

Liu, H., Dolkas, J., Hoang, K., Angert, M., Chernov, A. V, Remacle, A.G., Shiryayev, S.A., Strongin, A.Y., Nishihara, T. und Shubayev, V.I. (2015). The alternatively spliced fibronectin CS1 isoform regulates IL-17A levels and mechanical allodynia after peripheral nerve injury. *J. Neuroinflammation* **12**. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0377-6>.

Liu, T., Han, C., Wang, S., Fang, P., Ma, Z., Xu, L. und Yin, R. (2019). Cancer-associated fibroblasts: An emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.* **12**, 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13045-019-0770-1/TABLES/2>.

Long, F., Lin, H., Zhang, X., Zhang, J., Xiao, H. und Wang, T. (2020). Atractylenolide-I Suppresses Tumorigenesis of Breast Cancer by Inhibiting Toll-Like Receptor 4-Mediated Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway. *Front. Pharmacol.* **11**, 1978. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2020.598939/BIBTEX>.

López, J.I., Errarte, P., Erramuzpe, A., Guarch, R., Cortés, J.M., Angulo, J.C., Pulido, R., Irazusta,

J., Llarena, R. und Larrinaga, G. (2016). Fibroblast activation protein predicts prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *Hum. Pathol.* *54*, 100–105. <https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2016.03.009>.

Loughner, C.L., Bruford, E.A., McAndrews, M.S., Delp, E.E., Swamynathan, S. und Swamynathan, S.K. (2016). Organization, evolution and functions of the human and mouse Ly6/uPAR family genes. *Hum. Genomics* *10*, 10. <https://doi.org/10.1186/S40246-016-0074-2>.

Lu, C., Vickers, M.F. und Kerbel, R.S. (1992). Interleukin 6: A fibroblast-derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression (metastasis/multicytokine resistance). *Cell Biol.* *89*, 9215–9219. .

Lu, H.T., Lu, J.W., Lee, C.H., Peng, Y.J., Lee, H.S., Chu, Y.H., Ho, Y.J., Liu, F.C., Shen, P.H. und Wang, C.C. (2021). Attenuative effects of platelet-rich plasma on 30 kDa fibronectin fragment-induced MMP-13 expression associated with TLR2 signaling in osteoarthritic chondrocytes and synovial fibroblasts. *J. Clin. Med.* *10*, 4496. <https://doi.org/10.3390/JCM10194496/S1>.

Lu, L., Chen, G., Yang, J., Ma, Z., Yang, Y., Hu, Y., Lu, Y., Cao, Z., Wang, Y. und Wang, X. (2019). Bone marrow mesenchymal stem cells suppress growth and promote the apoptosis of glioma U251 cells through downregulation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Biomed. Pharmacother.* *112*, 108625. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.108625>.

Lu, Y., Huang, Y., Huang, L., Xu, Y., Wang, Z., Li, H., Zhang, T., Zhong, M., Gao, W.Q. und Zhang, Y. (2020). CD16 expression on neutrophils predicts treatment efficacy of capecitabine in colorectal cancer patients. *BMC Immunol.* *21*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12865-020-00375-8/FIGURES/6>.

Lu, Y.C., Yeh, W.C. und Ohashi, P.S. (2008a). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* *42*, 145–151. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2008.01.006>.

Lu, Y.R., Yuan, Y., Wang, X.J., Wei, L.L., Chen, Y.N., Cong, C., Li, S.F., Long, D., Tan, W.D., Mao, Y.Q., et al. (2008b). The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. [Http://Dx.Doi.Org/10.4161/Cbt.7.2.5296](http://Dx.Doi.Org/10.4161/Cbt.7.2.5296) *7*, 245–251. <https://doi.org/10.4161/CBT.7.2.5296>.

Lynch, H.T. und Shaw, T.G. (2016). Familial atypical multiple mole melanoma (FAMMM) syndrome: history, genetics und heterogeneity. *Fam. Cancer* *15*, 487–491. <https://doi.org/10.1007/s10689-016-9888-2>.

Ma, B., Jiang, H., Jia, J., Di, L., Song, G., Yu, J., Zhu, Y., Lu, Z., Wang, X., Zhou, X., et al. (2012). Murine bone marrow stromal cells pulsed with homologous tumor-derived exosomes inhibit proliferation of liver cancer cells. *Clin. Transl. Oncol.* *14*, 764–773.

<https://doi.org/10.1007/S12094-012-0860-9/FIGURES/6>.

Ma, D., Liu, S., Lal, B., Wei, S., Wang, S., Zhan, D., Zhang, H., Lee, R.S., Gao, P., Lopez-Bertoni, H., et al. (2019a). Extracellular Matrix Protein Tenascin C Increases Phagocytosis Mediated by CD47 Loss of Function in Glioblastoma. *Cancer Res.* *79*, 2697–2708. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3125>.

Ma, J., Xu, Y., Zheng, Q., Wang, Y., Hu, M., Ma, F., Long, H., Qin, Z. und Tao, N. (2019b). Ligustilide inhibits the activation of cancer-associated fibroblasts. *Life Sci.* *218*, 58–64. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2018.12.032>.

Ma, Y., Yabluchanskiy, A., Iyer, R.P., Cannon, P.L., Flynn, E.R., Jung, M., Henry, J., Cates, C.A., Deleon-Pennell, K.Y. und Lindsey, M.L. (2016). Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* *110*, 51–61. <https://doi.org/10.1093/CVR/CVW024>.

Maestroni, G.J.M., Hertens, E. und Galli, P. (1999). Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice. *Cell. Mol. Life Sci.* *55*, 663–667. <https://doi.org/10.1007/s000180050322>.

Magnuson, V.L., Young, M., Schattenberg, D.G., Mancini, M.A., Chen, D., Steffensen, B. und Klebe, R.J. (1991). The Alternative Splicing of Fibronectin Pre-mRNA Is Altered during Aging and in Response to Growth Factors*. *J. Biol. Chem.* *266*, 14654–14662. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)98735-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)98735-1).

Mahoney, Z.X., Stappenbeck, T.S. und Miner, J.H. (2008). Laminin $\alpha 5$ influences the architecture of the mouse small intestine mucosa. *J. Cell Sci.* *121*, 2493–2502. <https://doi.org/10.1242/JCS.025528>.

Majore, I., Moretti, P., Hass, R. und Kasper, C. (2009). Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun. Signal.* *7*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-7-6>.

Malara, A., Gruppi, C., Abbonante, V., Cattaneo, D., De Marco, L., Massa, M., Iurlo, A., Gianelli, U., Balduini, C.L., Tira, M.E., et al. (2019). EDA fibronectin–TLR4 axis sustains megakaryocyte expansion and inflammation in bone marrow fibrosis. *J. Exp. Med.* *216*, 587. <https://doi.org/10.1084/JEM.20181074>.

Malik, G., Knowles, L.M., Dhir, R., Xu, S., Yang, S., Ruoslahti, E. und Pilch, J. (2010). Plasma fibronectin promotes lung metastasis by contributions to fibrin clots and tumor cell invasion. *Cancer Res.* *70*, 4327–4334. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3312>.

Mandel, U., Hamilton Therkildsen, M., Reibel, J., Sweeney, B., Matsuura, H., Hakomori, S.,

Dabelsteen, E. und Clausen, H. (1992). Cancer-associated changes in glycosylation of fibronectin. Immunohistological localization of oncofetal fibronectin defined by monoclonal antibodies. *APMIS* 100, 817–826. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1992.tb04005.x>.

Mansilla, C., Berraondo, P., Durantez, M., Martínez, M., Casares, N., Arribillaga, L., Rudilla, F., Fioravanti, J., Lozano, T., Villanueva, L., et al. (2012). Eradication of large tumors expressing human papillomavirus E7 protein by therapeutic vaccination with E7 fused to the extra domain a from fibronectin. *Int. J. Cancer* 131, 641–651. <https://doi.org/10.1002/IJC.26412>.

Mao, X., Xu, J., Wang, W., Liang, C., Hua, J., Liu, J., Zhang, B., Meng, Q., Yu, X. und Shi, S. (2021). Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol. Cancer* 2021 201 20, 1–30. <https://doi.org/10.1186/S12943-021-01428-1>.

Martín-Otal, C., Lasarte-Cia, A., Serrano, D., Casares, N., Conde, E., Navarro, F., Sánchez-Moreno, I., Gorraiz, M., Sarrión, P., Calvo, A., et al. (2022). Targeting the extra domain A of fibronectin for cancer therapy with CAR-T cells. *J. Immunother. Cancer* 10, e004479. <https://doi.org/10.1136/JITC-2021-004479>.

Martin, C., Burdon, P.C.E., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J.C., Williams, T.J. und Rankin, S.M. (2003). Chemokines Acting via CXCR2 and CXCR4 Control the Release of Neutrophils from the Bone Marrow and Their Return following Senescence. *Immunity* 19, 583–593. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00263-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00263-2).

Massena, S., Christoffersson, G., Hjertström, E., Zcharia, E., Vlodavsky, I., Ausmees, N., Rolny, C., Li, J.P. und Phillipson, M. (2010). A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood* 116, 1924–1931. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2010-01-266072>.

Matsumoto, E.I., Yoshida, T., Kawarada, Y. und Sakakura, T. (1999). Expression of Fibronectin Isoforms in Human Breast Tissue: Production of Extra Domain A+/Extra Domain B+ by Cancer Cells and Extra Domain A+ by Stromal Cells. *Japanese J. Cancer Res.* 90, 320–325. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.1999.TB00750.X>.

Matsuura, H. und Hakomori, S.I. (1985). The oncofetal domain of fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6: Its presence in fibronectins from fetal and tumor tissues and its absence in those from normal adult tissues and plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 6517–6521. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.19.6517>.

McDoniels-Silvers, A.L., Nimri, C.F., Stoner, G.D., Lubet, R.A. und You, M. (2002). Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 8, 1127–1138. .

McFarlane, A.J., Fercoq, F., Coffelt, S.B. und Carlin, L.M. (2021). Neutrophil dynamics in the tumor microenvironment. *J. Clin. Invest.* *131*. <https://doi.org/10.1172/JCI143759>.

Means, T.K., Hayashi, F., Smith, K.D., Aderem, A. und Luster, A.D. (2003). The Toll-Like Receptor 5 Stimulus Bacterial Flagellin Induces Maturation and Chemokine Production in Human Dendritic Cells. *J. Immunol.* *170*, 5165–5175. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.170.10.5165>.

Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W. und Dilloo, D. (2004). Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* *103*, 4619–4621. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3909>.

de Menezes, F.C., Cabral, L.G. de S., Petrellis, M.C., Neto, C.F. und Maria, D.A. (2020). Antitumor effect of cell therapy with mesenchymal stem cells on murine melanoma B16-F10. *Biomed. Pharmacother.* *128*, 110294. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110294>.

Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M. und Tschopp, J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- κ B activation. *Nat. Immunol.* *2004* 55 5, 503–507. <https://doi.org/10.1038/ni1061>.

Mhaidly, R. und Mehta-Grigoriou, F. (2021). Role of cancer-associated fibroblast subpopulations in immune infiltration, as a new means of treatment in cancer. *Immunol. Rev.* *302*, 259–272. <https://doi.org/10.1111/IMR.12978>.

Midulla, M., Verma, R., Pignatelli, M., Ritter, M.A., Courtenay-Luck, N.S. und George, A.J.T. (2000). Source of oncofetal ED-B-containing fibronectin: Implications of production of both tumor and endothelial cells. *Cancer Res.* *60*, 164–169. .

Millrud, C.R., Kågedal, Å., Kumlien Georén, S., Winqvist, O., Uddman, R., Razavi, R., Munck-Wikland, E. und Cardell, L.O. (2017). NET-producing CD16 high CD62L dim neutrophils migrate to tumor sites and predict improved survival in patients with HNSCC. *Int. J. Cancer* *140*, 2557–2567. <https://doi.org/10.1002/IJC.30671>.

Mishalian, I., Bayuh, R., Levy, L., Zolotarov, L., Michaeli, J. und Fridlender, Z.G. (2013). Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol. Immunother.* *62*, 1745–1756. <https://doi.org/10.1007/S00262-013-1476-9/FIGURES/5>.

Mitsuzawa, H., Nishitani, C., Hyakushima, N., Shimizu, T., Sano, H., Matsushima, N., Fukase, K. und Kuroki, Y. (2006). Recombinant Soluble Forms of Extracellular TLR4 Domain and MD-2 Inhibit Lipopolysaccharide Binding on Cell Surface and Dampen Lipopolysaccharide-Induced

Pulmonary Inflammation in Mice. *J. Immunol.* 177, 8133–8139. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.11.8133>.

Mittendorf, E.A., Alatrash, G., Qiao, N., Wu, Y., Sukhumalchandra, P., St. John, L.S., Philips, A. V., Xiao, H., Zhang, M., Ruisaard, K., et al. (2012). Breast Cancer Cell Uptake of the Inflammatory Mediator Neutrophil Elastase Triggers an Anti-Cancer Adaptive Immune Response. *Cancer Res.* 72, 3153. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4135>.

Mollapour, E., Linch, D.C. und Roberts, P.J. (2001). Activation and priming of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and phospholipase A2 are dissociated by inhibitors of the kinases p42ERK2 and p38SAPK and by methyl arachidonyl fluorophosphonate, the dual inhibitor of cytosolic and calcium-independent phospholipase A2. *Blood* 97, 2469–2477. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V97.8.2469>.

Montesinos, J.J., Mora-García, M.D.L., Mayani, H., Flores-Figueroa, E., García-Rocha, R., Fajardo-Orduña, G.R., Castro-Manreza, M.E., Weiss-Steider, B. und Monroy-García, A. (2013). In vitro evidence of the presence of mesenchymal stromal cells in cervical cancer and their role in protecting cancer cells from cytotoxic T cell activity. *Stem Cells Dev.* 22, 2508–2519. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0084>.

Moraes, T.J., Zurawska, J.H. und Downey, G.P. (2006). Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr. Opin. Hematol.* 13, 21–27. <https://doi.org/10.1097/01.MOH.0000190113.31027.D5>.

Mould, A.P., Wheldon, L.A., Komoriya, A., Wayner, E.A., Yamada, K.M. und Humphries, M.J. (1990). Affinity chromatographic isolation of the melanoma adhesion receptor for the IIIICS region of fibronectin and its identification as the integrin alpha 4 beta 1. *J. Biol. Chem.* 265, 4020–4024. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39696-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39696-6).

Munir, H., Jones, J., Janowitz, T., Martins, C., Welsh, S. und Shields, J. (2020). Stromal Amyloid β drives Neutrophil extracellular trap formation to augment tumour growth. *BioRxiv* 2020.01.10.901686. <https://doi.org/10.1101/2020.01.10.901686>.

Murphy, K. und Weaver, C. (2018). *Janeway Immunologie*.

Nagae, M., Re, S., Mihara, E., Nogi, T., Sugita, Y. und Takagi, J. (2012). Crystal structure of $\alpha 5 \beta 1$ integrin ectodomain: Atomic details of the fibronectin receptor. *J. Cell Biol.* 197, 131–140. <https://doi.org/10.1083/JCB.201111077/VIDEO-7>.

Nagaraj, S. und Gabrilovich, D.I. (2012). Regulation of suppressive function of myeloid-derived suppressor cells by CD4⁺ T cells. *Semin. Cancer Biol.* 22, 282–288. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2012.01.010>.

Nagashima, H., Iwatani, S., Cruz, M., Abreu, J.A.J., Uchida, T., Mahachai, V., Vilaichone, R.K., Graham, D.Y. und Yamaoka, Y. (2015). Toll-like Receptor 10 in Helicobacter pylori Infection. *J. Infect. Dis.* 212, 1666–1676. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIV270>.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R. und de Crombrughe, B. (2002). The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 108, 17–29. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00622-5).

Naor, D., Nedvetzki, S., Golan, I., Melnik, L. und Fajelson, Y. (2008). CD44 in Cancer. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10408360290795574](http://dx.doi.org/10.1080/10408360290795574) 39, 527–579. <https://doi.org/10.1080/10408360290795574>.

Nasef, A., Chapel, A., Mazurier, C., Bouchet, S., Lopez, M., Mathieu, N., Sensebé, L., Zhang, Y., Gorin, N.C., Thierry, D., et al. (2007). Identification of IL-10 and TGF- β transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Express* Nasef, A., Chapel, A., Maz. C., Bouchet, S., Lopez, M., Mathieu, N., Sensebé, L., Zhang, Y., Gorin, N. C., Thierry, D., Fouill. L. (2007). Identif. IL-10 TGF- β Transcr. Invol. Inhib. T-Lymphocyte Proli 13, 217–226. <https://doi.org/10.3727/000000006780666957>.

Naugler, W.E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A.M. und Karin, M. (2007). Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in MyD88-Dependent IL-6 Production. *Science* (80-.). 317, 121–124. <https://doi.org/10.1126/science.1140485>.

Newton, K. und Dixit, V.M. (2012). Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a006049. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A006049>.

Ning, X., Zhang, H., Wang, C. und Song, X. (2018). Exosomes released by gastric cancer cells induce transition of pericytes into cancer-associated fibroblasts. *Med. Sci. Monit.* 24, 2350–2359. <https://doi.org/10.12659/MSM.906641>.

Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J.I., Cao, Z. und Matsumoto, K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252–256. <https://doi.org/10.1038/18465>.

Nojima, Y., Humphries, M.J., Paul Mould, A., Komoriya, A., Yamada, K.M., Schlossman, S.F. und Morimoto, C. (1990). VLA-4 mediates CD3-dependent CD4+ T cell activation via the CS1 alternatively spliced domain of fibronectin. *J. Exp. Med.* 172, 1185. <https://doi.org/10.1084/JEM.172.4.1185>.

Nong, Y., Wu, D., Lin, Y., Zhang, Y., Bai, L. und Tang, H. (2015). Tenascin-C expression is

associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma (HCC) patients and the inflammatory cytokine TNF- α -induced TNC expression promotes migration in HCC cells. *Am. J. Cancer Res.* 5, 782. .

Novoseletskaya, E., Grigorieva, O., Nimiritsky, P., Basalova, N., Eremichev, R., Milovskaya, I., Kulebyakin, K., Kulebyakina, M., Rodionov, S., Omelyanenko, N., et al. (2020). Mesenchymal Stromal Cell-Produced Components of Extracellular Matrix Potentiate Multipotent Stem Cell Response to Differentiation Stimuli. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 983. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.555378/BIBTEX>.

Nyati, K.K., Masuda, K., Mahabub-Uz Zaman, M., Dubey, P.K., Millrine, D., Chalise, J.P., Higa, M., Li, S., Standley, D.M., Saito, K., et al. (2017). TLR4-induced NF- κ B and MAPK signaling regulate the IL-6 mRNA stabilizing protein Arid5a. *Nucleic Acids Res.* 45, 2687. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX064>.

Odajima, T., Onishi, M., Hayama, E., Motoji, N., Momose, Y. und Shigematsu, A. (1996). Cytolysis of B-16 melanoma tumor cells mediated by the myeloperoxidase and lactoperoxidase systems. *Biol. Chem.* 377, 689–693. <https://doi.org/10.1515/BCHM3.1996.377.11.689/HTML>.

Oganesyan, G., Saha, S.K., Guo, B., He, J.Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A. und Cheng, G. (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439, 208–211. <https://doi.org/10.1038/nature04374>.

Ohlsson, L.B., Varas, L., Kjellman, C., Edvardsen, K. und Lindvall, M. (2003). Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp. Mol. Pathol.* 75, 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2003.06.001>.

Ohms, M., Möller, S. und Laskay, T. (2020). An Attempt to Polarize Human Neutrophils Toward N1 and N2 Phenotypes in vitro. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00532/FULL>.

Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E.S., Young, D.W., Ishizaka, S.T., Rose, J., Chow, J.C. und Strauss, J.F. (2001). The Extra Domain A of Fibronectin Activates Toll-like Receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276, 10229–10233. .

Oosting, M., Cheng, S.C., Bolscher, J.M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T.S., Verschueren, I.C., Arts, P., Garritsen, A., Van Eenennaam, H., Sturm, P., et al. (2014). Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E4478–E4484. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1410293111>.

Orr, A.W., Sanders, J.M., Bevard, M., Coleman, E., Sarembock, I.J. und Schwartz, M.A. (2005).

The subendothelial extracellular matrix modulates NF- κ B activation by flow a potential role in atherosclerosis. *J. Cell Biol.* 169, 191–202. <https://doi.org/10.1083/JCB.200410073>.

Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M. und Seya, T. (2003). TIR-containing Adapter Molecule (TICAM)-2, a Bridging Adapter Recruiting to Toll-like Receptor 4 TICAM-1 That Induces Interferon- β . *J. Biol. Chem.* 278, 49751–49762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305820200>.

Otsu, K., Das, S., Houser, S.D., Quadri, S.K., Bhattacharya, S. und Bhattacharya, J. (2009). Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood* 113, 4197–4205. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-09-176198>.

Otte, J.M., Rosenberg, I.M. und Podolsky, D.K. (2003). Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology* 124, 1866–1878. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)00403-7](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)00403-7).

Ou, J., Deng, J., Wei, X., Xie, G., Zhou, R., Yu, L. und Liang, H. (2013). Fibronectin extra domain A (EDA) sustains CD133+/CD44+ subpopulation of colorectal cancer cells. *Stem Cell Res.* 11, 820–833. <https://doi.org/10.1016/J.SCR.2013.05.009>.

Ou, J., Peng, Y., Deng, J., Miao, H., Zhou, J., Zha, L., Zhou, R., Yu, L., Shi, H. und Liang, H. (2014). Endothelial cell-derived fibronectin extra domain A promotes colorectal cancer metastasis via inducing epithelial–mesenchymal transition. *Carcinogenesis* 35, 1661–1670. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGU090>.

Ou, J.J., Wu, F. und Liang, H.J. (2010). Colorectal tumor derived fibronectin alternatively spliced EDA domain exerts lymphangiogenic effect on human lymphatic endothelial cells. *Cancer Biol. Ther.* 9, 186–191. <https://doi.org/10.4161/cbt.9.3.10651>.

Owens, B.M.J., Steevels, T.A.M., Dudek, M., Walcott, D., Sun, M.Y., Mayer, A., Allan, P. und Simmons, A. (2013). CD90+ stromal cells are non-professional innate immune effectors of the human colonic mucosa. *Front. Immunol.* 4, 307. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00307/BIBTEX>.

Özdemir, B.C., Pentcheva-Hoang, T., Carstens, J.L., Zheng, X., Wu, C.C., Simpson, T.R., Laklai, H., Sugimoto, H., Kahlert, C., Novitskiy, S. V., et al. (2014). Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell* 25, 719–734. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2014.04.005>.

Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L. und Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

U. S. A. 97, 13766. <https://doi.org/10.1073/PNAS.250476497>.

Pacioni, S., D'Alessandris, Q.G., Giannetti, S., Morgante, L., Coccè, V., Bonomi, A., Buccarelli, M., Pascucci, L., Alessandri, G., Pessina, A., et al. (2017). Human mesenchymal stromal cells inhibit tumor growth in orthotopic glioblastoma xenografts. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13287-017-0516-3/FIGURES/3>.

Pagani, F., Zagato, L., Vergani, C., Casari, G., Sidoli, A., Barallell, F.E. und Rivetti, F. (1991). Tissue-specific Splicing Pattern of Fibronectin Messenger RNA Precursor during Development and Aging in Rat. *J. Cell Biol.* 113. .

Paland, N., Kamer, I., Kogan-Sakin, I., Madar, S., Goldfinger, N. und Rotter, V. (2009). Differential influence of normal and cancer-associated fibroblasts on the growth of human epithelial cells in an in vitro cocultivation model of prostate cancer. *Mol. Cancer Res.* 7, 1212–1223. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0073/356946/P/DIFFERENTIAL-INFLUENCE-OF-NORMAL-AND-CANCER>.

Panaroni, C., Tzeng, Y.S., Saeed, H. und Wu, J.Y. (2014). Mesenchymal Progenitors and the Osteoblast Lineage in Bone Marrow Hematopoietic Niches. *Curr. Osteoporos. Rep.* 12, 22. <https://doi.org/10.1007/S11914-014-0190-7>.

Pankov, R. und Yamada, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* 115, 3861–3863. <https://doi.org/10.1242/jcs.00059>.

Papayannopoulos, V. (2017). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2017 182 18, 134–147. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>.

Parajuli, H., Teh, M.T., Abrahamsen, S., Christoffersen, I., Neppelberg, E., Lybak, S., Osman, T., Johannessen, A.C., Gullberg, D., Skarstein, K., et al. (2017). Integrin $\alpha 11$ is overexpressed by tumour stroma of head and neck squamous cell carcinoma and correlates positively with alpha smooth muscle actin expression. *J. Oral Pathol. Med.* 46, 267–275. <https://doi.org/10.1111/jop.12493>.

Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.S., Lee, H. und Lee, J.O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nat.* 2009 4587242 458, 1191–1195. <https://doi.org/10.1038/nature07830>.

Park, D., Spencer, J.A., Koh, B.I., Kobayashi, T., Fujisaki, J., Clemens, T.L., Lin, C.P., Kronenberg, H.M. und Scadden, D.T. (2012). Endogenous Bone Marrow MSCs Are Dynamic, Fate-Restricted Participants in Bone Maintenance and Regeneration. *Cell Stem Cell* 10, 259–272. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2012.02.003>.

Park, J.S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.Y., Strassheim, D., Ishizaka, A. und Abraham, E. (2004). Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J. Biol. Chem.* 279, 7370–7377. <https://doi.org/10.1074/JBC.M306793200>.

Park, S.H., Choi, H.J., Lee, S.Y. und Han, J.S. (2015). TLR4-mediated IRAK1 activation induces TNF- α expression via JNK-dependent NF- κ B activation in human bronchial epithelial cells. *Eur. J. Inflamm.* 13, 183–195. <https://doi.org/10.1177/1721727X15619185>.

Pasparakis, M., Luedde, T. und Schmidt-Supprian, M. (2006). Dissection of the NF- κ B signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell Death Differ.* 2006 135 13, 861–872. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401870>.

Pasqualini, R., Bourdoulous, S., Koivunen, E., Woods, V.L. und Ruoslahti, E. (1996). A polymeric form of fibronectin has antimetastatic effects against multiple tumor types. *Nat. Med.* 1996 211 2, 1197–1203. <https://doi.org/10.1038/nm1196-1197>.

Patel, S.A., Meyer, J.R., Greco, S.J., Corcoran, K.E., Bryan, M. und Rameshwar, P. (2010). Mesenchymal Stem Cells Protect Breast Cancer Cells through Regulatory T Cells: Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived TGF- β . *J. Immunol.* 184, 5885–5894. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903143>.

Pecorino, L. (2012). *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets und Therapeutics* (Oxford: Oxford Univ. Press).

Pelleitier, M. und Montplaisir, S. (1975). The nude mouse: a model of deficient T-cell function. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 7, 149–166. .

Peters, J.H. und Hynes, R.O. (1996). Fibronectin isoform distribution in the mouse: I. The alternatively spliced EIIIB, EIIIA und V segments show widespread codistribution in the developing mouse embryo. *Cell Commun. Adhes.* 4, 103–125. <https://doi.org/10.3109/15419069609010766>.

Peters, J.H., Chen, G. und Hynes, R.O. (1996). Fibronectin isoform distribution in the mouse: II. Differential distribution of the alternatively spliced EIIIB, EIIIA und V segments in the adult mouse. *Cell Commun. Adhes.* 4, 127–148. <https://doi.org/10.3109/15419069609010767>.

Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S. und Goff, J.P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* (80-.). 284, 1168–1170. <https://doi.org/10.1126/science.284.5417.1168>.

Pham, L.H., Vu, N.B. und Van Pham, P. (2019). The subpopulation of CD105 negative mesenchymal stem cells show strong immunomodulation capacity compared to CD105

positive mesenchymal stem cells. *Biomed. Res. Ther.* 6, 3131–3140. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v6i4.538>.

Pickl, W.F., Majdic, O., Fischer, G.F., Petzelbauer, P., Faé, I., Waclavicek, M., Stöckl, J., Scheinecker, C., Vidicki, T., Aschauer, H., et al. (1997). MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 158, 2107–2115. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.158.5.2107>.

Pikarsky, E., Porat, R.M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Uriell-Shoval, S., Galun, E. und Ben-Neriah, Y. (2004). NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431, 461–466. <https://doi.org/10.1038/nature02924>.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. und Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* (80-). 284, 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.

Pompili, S., Latella, G., Gaudio, E., Sferra, R. und Vetuschi, A. (2021). The Charming World of the Extracellular Matrix: A Dynamic and Protective Network of the Intestinal Wall. *Front. Med.* 8, 477. <https://doi.org/10.3389/FMED.2021.610189/XML/NLM>.

Powell, D.R. und Huttenlocher, A. (2016). Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol.* 37, 41–52. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2015.11.008>.

Preda, M.B., Neculachi, C.A., Fenyó, I.M., Vacaru, A.M., Publik, M.A., Simionescu, M. und Burlacu, A. (2021). Short lifespan of syngeneic transplanted MSC is a consequence of in vivo apoptosis and immune cell recruitment in mice. *Cell Death Dis.* 2021 126 12, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03839-w>.

Primac, I., Maquoi, E., Blacher, S., Heljasvaara, R., van Deun, J., Smeland, H.Y.H., Canale, A., Louis, T., Stuhr, L., Sounni, N.E., et al. (2019). Stromal integrin α 11 regulates PDGFR β signaling and promotes breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* 129, 4609–4628. <https://doi.org/10.1172/JCI125890>.

Proust, M. (2017). Malignant melanoma: From cause to cure. *Mod. Pathol.* 30, 786–787. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.28>.

Qiao, L., Xu, Z. li, Zhao, T. jun, Ye, L. hong und Zhang, X. dong (2008a). Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett.* 269, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.04.032>.

Qiao, L., Xu, Z., Zhao, T., Zhao, Z., Shi, M., Zhao, R.C., Ye, L. und Zhang, X. (2008b). Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res.* *18*, 500–507. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.40>.

Quante, M., Tu, S.P., Tomita, H., Gonda, T., Wang, S.S.W., Takashi, S., Baik, G.H., Shibata, W., DiPrete, B., Betz, K.S., et al. (2011). Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth. *Cancer Cell* *19*, 257–272. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2011.01.020/ATTACHMENT/D9BE0C9D-C753-4175-A637-E2F4AF4D5D3C/MMC2.MOV>.

Qwarnström, E.E., Ostberg, C.O., Turk, G.L., Richardson, C.A. und Bomsztyk, K. (1994). Fibronectin attachment activates the NF-kappa B p50/p65 heterodimer in fibroblasts and smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* *269*, 30765–30768. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47345-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47345-0).

Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello, L. und Pistoia, V. (2008). Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche. *Stem Cells* *26*, 151–162. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2007-0416>.

Rakoff-Nahoum, S. und Medzhitov, R. (2007). Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science* (80-.). *317*, 124–127. <https://doi.org/10.1126/science.1140488>.

Ramón y Cajal, S., Sesé, M., Capdevila, C., Aasen, T., De Mattos-Arruda, L., Diaz-Cano, S.J., Hernández-Losa, J. und Castellví, J. (2020). Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. *J. Mol. Med.* *2020* *982* *98*, 161–177. <https://doi.org/10.1007/S00109-020-01874-2>.

Ran, S., Bhattarai, N., Patel, R., Volk-Draper, L., Ran, S., Bhattarai, N., Patel, R. und Volk-Draper, L. (2019). TLR4-Induced Inflammation Is a Key Promoter of Tumor Growth, Vascularization und Metastasis. *Transl. Stud. Inflamm.* <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.85195>.

Rassa, J.C., Meyers, J.L., Zhang, Y., Kudaravalli, R. und Ross, S.R. (2002). Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 2281–2286. https://doi.org/10.1073/PNAS.042355399/SUPPL_FILE/3553FIG9LEGEND.HTML.

Rathore, M., Girard, C., Ohanna, M., Tichet, M., Ben Jouira, R., Garcia, E., Larbret, F., Gesson, M., Audebert, S., Lacour, J.P., et al. (2019). Cancer cell-derived long pentraxin 3 (PTX3) promotes melanoma migration through a toll-like receptor 4 (TLR4)/NF-κB signaling pathway. *Oncogene* *38*, 5873–5889. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0848-9>.

Ricci, B., Tycksen, E., Celik, H., Belle, J.I., Fontana, F., Civitelli, R. und Faccio, R. (2020). Osterix-Cre marks distinct subsets of CD45- and CD45+ stromal populations in extra-skeletal tumors with pro-tumorigenic characteristics. *Elife* 9, 1–29. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.54659>.

Rodda, S.J. und McMahon, A.P. (2006). Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development* 133, 3231–3244. <https://doi.org/10.1242/DEV.02480>.

Rogava, M., Braun, A.D., van der Sluis, T.C., Shridhar, N., Tüting, T. und Gaffal, E. (2022). Tumor cell intrinsic Toll-like receptor 4 signaling promotes melanoma progression and metastatic dissemination. *Int. J. Cancer* 150, 142–151. <https://doi.org/10.1002/IJC.33804>.

Romieu-Mourez, R., François, M., Boivin, M.-N., Bouchentouf, M., Spaner, D.E. und Galipeau, J. (2009). Cytokine Modulation of TLR Expression and Activation in Mesenchymal Stromal Cells Leads to a Proinflammatory Phenotype. *J. Immunol.* 182, 7963–7973. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0803864>.

Rossi, E., Bernabeu, C. und Smadja, D.M. (2019). Endoglin as an adhesion molecule in mature and progenitor endothelial cells: A function beyond TGF- β . *Front. Med.* 6, 10. <https://doi.org/10.3389/FMED.2019.00010/BIBTEX>.

Rosnagl, S., Altmann, E., Sens, C., Kraft, S., Rau, K., Milsom, M.D., Giese, T., Samstag, Y. und Nakchbandi, I.A. (2016). EDA-Fibronectin Originating from Osteoblasts Inhibits the Immune Response against Cancer. *PLOS Biol.* 14, e1002562. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1002562>.

Rosnagl, S., Ghura, H., Groth, C., Altmann, E., Jakob, F., Schott, S., Wimberger, P., Link, T., Kuhlmann, J.D., Stenzl, A., et al. (2018). A Subpopulation of Stromal Cells Controls Cancer Cell Homing to the Bone Marrow. *Cancer Res.* 78, 129–142. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3507>.

Ruegg, C., Postigo, A.A., Sikorski, E.E., Butcher, E.C., Pytela, R. und Erle, D.J. (1992). Role of integrin alpha 4 beta 7/alpha 4 beta P in lymphocyte adherence to fibronectin and VCAM-1 and in homotypic cell clustering. *J. Cell Biol.* 117, 179–189. <https://doi.org/10.1083/JCB.117.1.179>.

Rybak, J.N., Roesli, C., Kaspar, M., Villa, A. und Neri, D. (2007). The Extra-domain A of Fibronectin Is a Vascular Marker of Solid Tumors and Metastases. *Cancer Res.* 67, 10948–10957. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1436>.

Ryu, J.H., Park, M., Kim, B.K., Ryu, K.H. und Woo, S.Y. (2015). Tonsil-derived mesenchymal stromal cells produce CXCR2-binding chemokines and acquire follicular dendritic cell-like

phenotypes under TLR3 stimulation. *Cytokine* 73, 225–235. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2015.02.028>.

Ryu, J.K., Kim, S.J., Rah, S.H., Kang, J.I., Jung, H.E., Lee, D., Lee, H.K., Lee, J.O., Park, B.S., Yoon, T.Y., et al. (2017). Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14 und TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity* 46, 38–50. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2016.11.007/ATTACHMENT/B25C24F0-2CBC-4227-B615-99EF1A9E0530/MMC1.PDF>.

Sagiv, J.Y., Michaeli, J., Assi, S., Mishalian, I., Kisos, H., Levy, L., Damti, P., Lumbroso, D., Polyansky, L., Sionov, R. V., et al. (2015). Phenotypic Diversity and Plasticity in Circulating Neutrophil Subpopulations in Cancer. *Cell Rep.* 10, 562–573. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.12.039>.

Saiki, I., Murata, J., Makabe, T., Matsumoto, Y., Ohdate, Y., Kawase, Y., Taguchi, Y., Shimojo, T., Kimizuka, F., Kato, I., et al. (1990). Inhibition of Lung Metastasis by Synthetic and Recombinant Fragments of Human Fibronectin with Functional Domains. *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 1003. <https://doi.org/10.1111/J.1349-7006.1990.TB03338.X>.

Sakaguchi, S., Negishi, H., Asagiri, M., Nakajima, C., Mizutani, T., Takaoka, A., Honda, K. und Taniguchi, T. (2003). Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon- β gene expression and endotoxin shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 860–866. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01049-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01049-0).

Sample, A. und He, Y.Y. (2018). Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 34, 13–24. <https://doi.org/10.1111/phpp.12329>.

Santos, J.A., Luz, G.A., Oliveira, K.P., Oliveira, L.F., Andrade Júnior, A.S., Valente, S.E.S., Lima, P.S.C. und Mol, G. (2016). DNase concentration assay to obtain DNA-free RNA from sugarcane leaves. *Genet. Mol. Res.* 15, 15049073. <https://doi.org/10.4238/gmr15049073>.

Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K. und Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109, 228–234. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002246>.

Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K. und Akira, S. (2003). Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- β (TRIF) Associates with TNF Receptor-Associated Factor 6 and TANK-Binding Kinase 1 und Activates Two Distinct Transcription Factors, NF- κ B and IFN-Regulatory Factor-3, in the Toll-Like Receptor Signaling. *J. Immunol.* 171, 4304–4310. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.171.8.4304>.

Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K.,

Takeuchi, O. und Akira, S. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2005 611 6, 1087–1095. <https://doi.org/10.1038/ni1255>.

Schwarzbauer, J.E., Spencer, C.S. und Wilson, C.L. (1989). Selective secretion of alternatively spliced fibronectin variants. *J. Cell Biol.* 109, 3445–3453. <https://doi.org/10.1083/JCB.109.6.3445>.

Serini, G., Bochaton-Piallat, M.L., Ropraz, P., Geinoz, A., Borsi, L., Zardi, L. und Gabbiani, G. (1998). The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J. Cell Biol.* 142, 873–881. <https://doi.org/10.1083/JCB.142.3.873>.

Shaul, M.E., Levy, L., Sun, J., Mishalian, I., Singhal, S., Kapoor, V., Horng, W., Fridlender, G., Albelda, S.M. und Fridlender, Z.G. (2016). Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF β modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncoimmunology* 5. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1232221>.

Shi, S. und Gronthos, S. (2003). Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *J. Bone Miner. Res.* 18, 696–704. <https://doi.org/10.1359/JBMR.2003.18.4.696>.

Shi, Y.J., Zhao, Q.Q., Liu, X.S., Dong, S.H., Ji-Fu, E., Li, X., Liu, C. und Wang, H. (2020). Toll-like receptor 4 regulates spontaneous intestinal tumorigenesis by up-regulating IL-6 and GM-CSF. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 385–397. <https://doi.org/10.1111/JCMM.14742>.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. und Kimoto, M. (1999). MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *J. Exp. Med.* 189, 1777–1782. <https://doi.org/10.1084/jem.189.11.1777>.

Shimshek, D.R., Kim, J., Hübner, M.R., Spengel, D.J., Buchholz, F., Casanova, E., Stewart, A.F., Seeburg, P.H. und Sprengel, R. (2002). Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis* 32, 19–26. <https://doi.org/10.1002/GENE.10023>.

Shinde, A., Libring, S., Alpsoy, A., Abdullah, A., Schaber, J.A., Solorio, L. und Wendt, M.K. (2018). Autocrine fibronectin inhibits breast cancer metastasis. *Mol. Cancer Res.* 16, 1579–1589. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0151/81698/AM/AUTOCRINE-FIBRONECTIN-INHIBITS-BREAST-CANCER>.

Shoshina, O.O., Kozhin, P.M., Shadrin, V.S., Romashin, D.D., Rusanov, A.L. und Luzgina, N.G. (2020). Phenotypic Features of Mesenchymal Stem Cell Subpopulations Obtained under the Influence of Various Toll-Like Receptors Ligands. *Technologies Biol. Med.* 267–271. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05105-7>.

Siddiqui, I.A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M. und Mukhtar, H. (2015). Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1348, 20–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12811>.

Singhal, S., Bhojnarwala, P.S., O'Brien, S., Moon, E.K., Garfall, A.L., Rao, A.S., Quatromoni, J.G., Stephen, T.L., Litzky, L., Deshpande, C., et al. (2016). Origin and Role of a Subset of Tumor-Associated Neutrophils with Antigen-Presenting Cell Features in Early-Stage Human Lung Cancer. *Cancer Cell* 30, 120–135. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2016.06.001>.

Sionov, R.V., Fainsod-Levi, T., Zelter, T., Polyansky, L., Pham, C.T. und Granot, Z. (2019). Neutrophil Cathepsin G and Tumor Cell RAGE Facilitate Neutrophil Anti-Tumor Cytotoxicity. *Oncoimmunology* 8. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1624129>.

Sofat, N., Robertson, S.D. und Wait, R. (2012). Fibronectin III 13-14 Domains Induce Joint Damage via Toll-Like Receptor 4 Activation and Synergize with Interleukin-1 and Tumour Necrosis Factor. *J. Innate Immun.* 4, 69–79. <https://doi.org/10.1159/000329632>.

Sottile, J., Shi, F., Rublyevska, I., Chiang, H.Y., Lust, J. und Chandler, J. (2007). Fibronectin-dependent collagen I deposition modulates the cell response to fibronectin. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 293, 1934–1946. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00130.2007/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH00120754470013.JPEG>.

Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C. und Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111, 1327–1333. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-074997>.

Stanton, H., Ung, L. und Fosang, A.J. (2002). The 45 kDa collagen-binding fragment of fibronectin induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes and aggrecan degradation by aggrecanases. *Biochem. J* 364, 181–190. .

Stenman, S. und Vaheri, A. (1981). Fibronectin in human solid tumors. *Int. J. Cancer* 27, 427–435. <https://doi.org/10.1002/IJC.2910270403>.

Stenzel, D., Lundkvist, A., Sauvaget, D., Busse, M., Graupera, M., van der Flier, A., Wijelath, E.S., Murray, J., Sobel, M., Costell, M., et al. (2011). Integrin-dependent and -independent functions of astrocytic fibronectin in retinal angiogenesis. *Development* 138, 4451–4463. <https://doi.org/10.1242/DEV.071381>.

Su, S.L., Tsai, C.D., Lee, C.H., Salter, D.M. und Lee, H.S. (2005). Expression and regulation of Toll-like receptor 2 by IL-1 β and fibronectin fragments in human articular chondrocytes.

Osteoarthr. Cartil. 13, 879–886. <https://doi.org/10.1016/J.JOCA.2005.04.017>.

Sugimoto, H., Mundel, T.M., Kieran, M.W. und Kalluri, R. (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1640–1646. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.12.3354>.

Sun, B., Roh, K.H., Park, J.R., Lee, S.R., Park, S.B., Jung, J.W., Kang, S.K., Lee, Y.S. und Kang, K.S. (2009). Therapeutic potential of mesenchymal stromal cells in a mouse breast cancer metastasis model. *Cytotherapy* 11, 289–298. <https://doi.org/10.1080/14653240902807026>.

Sun, B., Dwivedi, N., Bechtel, T.J., Paulsen, J.L., Muth, A., Bawadekar, M., Li, G., Thompson, P.R., Shelef, M.A., Schiffer, C.A., et al. (2017). Citrullination of NF- κ B p65 promotes its nuclear localization and TLR-induced expression of IL-1 and TNF. *Sci. Immunol.* 2. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aal3062>.

Sun, B., Qin, W., Song, M., Liu, L., Yu, Y., Qi, X., Sun, H. und Bingwei Sun, P. (2018). Neutrophil Suppresses Tumor Cell Proliferation via Fas /Fas Ligand Pathway Mediated Cell Cycle Arrested. *Int. J. Biol. Sci* 14, 2103–2113. <https://doi.org/10.7150/ijbs.29297>.

Sun, R., Luo, J., Li, D., Shu, Y., Luo, C., Wang, S.S., Qin, J., Zhang, G.M. und Feng, Z.H. (2014). Neutrophils with protumor potential could efficiently suppress tumor growth after cytokine priming and in presence of normal NK cells. *Oncotarget* 5, 12621–12634. .

Sung, P.H., Chang, C. Lo, Tsai, T.H., Chang, L.T., Leu, S., Chen, Y.L., Yang, C.C., Chua, S., Yeh, K.H., Chai, H.T., et al. (2013). Apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy protects against lung and kidney injury in sepsis syndrome caused by cecal ligation puncture in rats. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 1–20. <https://doi.org/10.1186/SCRT385/FIGURES/14>.

Suzuki, N., Suzuki, S., Duncan, G.S., Millar, D.G., Wada, T., Mirtsos, C., Takada, H., Wakeham, A., Itie, A., Li, S., et al. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 416, 750–754. <https://doi.org/10.1038/nature736>.

Takahashi, H., Sakakura, K., Kudo, T., Toyoda, M., Kaira, K., Oyama, T. und Chikamatsu, K. (2017). Cancer-associated fibroblasts promote an immunosuppressive microenvironment through the induction and accumulation of protumoral macrophages. *Oncotarget* 8, 8633–8647. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14374>.

Takeda, K., Takeuchi, O. und Akira, S. (2002). Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 8, 459–463. <https://doi.org/10.1177/09680519020080060101>.

Takeuchi, E., Tanaka, T., Umemoto, E., Tomita, T., Shi, K., Takahi, K., Suzuki, R., Ochi, T. und Miyasaka, M. (2002). VLA-4-dependent and -independent pathways in cell contact-induced

proinflammatory cytokine production by synovial nurse-like cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res.* 4, R10. <https://doi.org/10.1186/AR593/FIGURES/7>.

Tamassia, N., Bianchetto-Aguilera, F., Arruda-Silva, F., Gardiman, E., Gasperini, S., Calzetti, F. und Cassatella, M.A. (2018). Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the “dark side of the moon.” *Eur. J. Clin. Invest.* 48, e12952. <https://doi.org/10.1111/EJC.12952>.

Tan, H.B., Giannoudis, P. V., Boxall, S.A., McGonagle, D. und Jones, E. (2015). The systemic influence of platelet-derived growth factors on bone marrow mesenchymal stem cells in fracture patients. *BMC Med.* 13, 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12916-014-0202-6/FIGURES/5>.

Tao, Z., Huang, C., Wang, D., Wang, Q., Gao, Q., Zhang, H., Zhao, Y., Wang, M., Xu, J., Shen, B., et al. (2023). Lactate induced mesenchymal stem cells activation promotes gastric cancer cells migration and proliferation. *Exp. Cell Res.* 424, 113492. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2023.113492>.

Tavassoli, M. und Crosby, W.H. (1968). Transplantation Marrow. *Science* (80-). 161, 54–56. .

Tecchio, C., Micheletti, A. und Cassatella, M.A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. *Front. Immunol.* 5, 508. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00508/BIBTEX>.

Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C. und Simon, J.C. (2002). Oligosaccharides of Hyaluronan Activate Dendritic Cells via Toll-like Receptor 4. *J. Exp. Med.* 195, 99–111. <https://doi.org/10.1084/JEM.20001858>.

Thanos, D. und Maniatis, T. (1992). The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. *Cell* 71, 777–789. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90554-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90554-P).

Tobias, P.S., Soldau, K. und Ulevitch, R.J. (1986). Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J. Exp. Med.* 164, 777. <https://doi.org/10.1084/JEM.164.3.777>.

Tomchuck, S.L., Zvezdaryk, K.J., Coffelt, S.B., Waterman, R.S., Danka, E.S. und Scandurro, A.B. (2008). Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive Their Migration and Immunomodulating Responses. *Stem Cells* 26, 99–107. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2007-0563>.

Tommelein, J., Verset, L., Boterberg, T., Demetter, P., Bracke, M. und De Wever, O. (2015). Cancer-associated fibroblasts connect metastasispromoting communication in colorectal

cancer. *Front. Oncol.* 5, 63. <https://doi.org/10.3389/FONC.2015.00063/BIBTEX>.

Tsang, T.M., Annis, D.S., Kronshage, M., Fenno, J.T., Usselman, L.D., Mosher, D.F. und Krukonis, E.S. (2012). Ail protein binds ninth type III fibronectin repeat (9FNIII) within central 120-kDa region of fibronectin to facilitate cell binding by *Yersinia pestis*. *J. Biol. Chem.* 287, 16759–16767. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.358978>.

Ueda, T., Yokota, T., Okuzaki, D., Uno, Y., Mashimo, T., Kubota, Y., Sudo, T., Ishibashi, T., Shingai, Y., Doi, Y., et al. (2019). Stem Cell Reports Article Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule Contributes to the Development of Definitive Hematopoiesis in the Fetal Liver. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.11.002>.

Vanhaver, C., van der Bruggen, P. und Bruger, A.M. (2021). MDSC in Mice and Men: Mechanisms of Immunosuppression in Cancer. *J. Clin. Med.* 2021, Vol. 10, Page 2872 10, 2872. <https://doi.org/10.3390/JCM10132872>.

Veglia, F., Sanseviero, E. und Gabrilovich, D.I. (2021). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* 2021 218 21, 485–498. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00490-y>.

Vieira, S.M., Lemos, H.P., Grespan, R., Napimoga, M.H., Dal-Secco, D., Freitas, A., Cunha, T.M., Verri, W.A., Souza, D.A., Jamur, M.C., et al. (2009). A crucial role for TNF- α in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. *Br. J. Pharmacol.* 158, 779. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2009.00367.X>.

Vollmer, J., Tluk, S., Schmitz, C., Hamm, S., Jurk, M., Forsbach, A., Akira, S., Kelly, K.M., Reeves, W.H., Bauer, S., et al. (2005). Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J. Exp. Med.* 202, 1575–1585. <https://doi.org/10.1084/jem.20051696>.

Wagener, C. und Müller, O. (2009). *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte* (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).

Wagner, J., Wickman, E., Shaw, T.I., Anido, A.A., Langfitt, D., Zhang, J., Porter, S.N., Pruett-Miller, S.M., Tillman, H., Krenciute, G., et al. (2021). Antitumor effects of CAR T cells redirected to the EDB splice variant of fibronectin. *Cancer Immunol. Res.* 9, 279. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-20-0280>.

Waks, A.G. und Winer, E.P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 321, 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>.

Wang, J. (2018). Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell Tissue Res.* 371, 531. <https://doi.org/10.1007/S00441-017-2785-7>.

Wang, E.L., Qian, Z.R., Nakasono, M., Tanahashi, T., Yoshimoto, K., Bando, Y., Kudo, E., Shimada, M. und Sano, T. (2010). High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 2010 1025 102, 908–915. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605558>.

Wang, Z., Xu, Q., Zhang, N., Du, X., Xu, G. und Yan, X. (2020). CD146, from a melanoma cell adhesion molecule to a signaling receptor. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020 51 5, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00259-8>.

Ward, L.S.C., Sheriff, L., Marshall, J.L., Manning, J.E., Brill, A., Nash, G.B. und McGettrick, H.M. (2019). Podoplanin regulates the migration of mesenchymal stromal cells and their interaction with platelets. *J. Cell Sci.* 132. <https://doi.org/10.1242/JCS.222067/265863/AM/PODOPLANIN-REGULATES-THE-MIGRATION-OF-MESENCHYMAL>.

Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L. und Betancourt, A.M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5, e10088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>.

Waterman, R.S., Henkle, S.L. und Betancourt, A.M. (2012a). Mesenchymal Stem Cell 1 (MSC1)-Based Therapy Attenuates Tumor Growth Whereas MSC2-Treatment Promotes Tumor Growth and Metastasis. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045590>.

Waterman, R.S., Morgenweck, J., Nossaman, B.D., Scandurro, A.E., Scandurro, S.A. und Betancourt, A.M. (2012b). Anti-Inflammatory Mesenchymal Stem Cells (MSC2) Attenuate Symptoms of Painful Diabetic Peripheral Neuropathy. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 557–565. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0025>.

Wayner, E.A., Garcia-Pardo, A., Humphries, M.J., McDonald, J.A. und Carter, W.G. (1989). Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J. Cell Biol.* 109, 1321–1330. <https://doi.org/10.1083/JCB.109.3.1321>.

Wculek, S.K. und Malanchi, I. (2015). Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells. *Nat.* 2015 5287582 528, 413–417. <https://doi.org/10.1038/nature16140>.

Weinberg, R.A. (2013). *The Biology of Cancer* (New York: Garland Science).

Wen, X., He, X., Jiao, F., Wang, C., Yang, S., Ren, X. und Li, Q. (2017). Fibroblast Activation Protein- α -Positive Fibroblasts Promote Gastric Cancer Progression and Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Oncol. Res.* *25*, 629. <https://doi.org/10.3727/096504016X14768383625385>.

Wengner, A.M., Pitchford, S.C., Furze, R.C. und Rankin, S.M. (2008). The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood* *111*, 42–49. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2007-07-099648>.

White, E.S. und Muro, A.F. (2011). Fibronectin splice variants: Understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. *IUBMB Life* *63*, 538–546. <https://doi.org/10.1002/IUB.493>.

Widowati, W., Noverina, R., Ayuningtyas, W., Kurniawan, D., Kusuma, H.S.W., Arumwardana, S., Artie, D.S., Sholihah, I.A., Handayani, R.A.S., Laksmiawati, D.R., et al. (2019). Proliferation, Characterization and Differentiation Potency of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells (AT-MSCs) Cultured in Fresh Frozen and non-Fresh Frozen Plasma. *Int. J. Mol. Cell. Med.* *8*, 283. <https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.8.4.283>.

Winkler, J., Abisoye-Ogunniyan, A., Metcalf, K.J. und Werb, Z. (2020). Concepts of extracellular matrix remodelling in tumour progression and metastasis. *Nat. Commun.* *11*, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18794-x>.

Wirth, F., Lubosch, A., Hamelmann, S. und Nakchbandi, I.A. (2020). Fibronectin and Its Receptors in Hematopoiesis. *Cells* *9*, 2717. <https://doi.org/10.3390/cells9122717>.

Wright, S.D., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. und Ramos, R.A. (1989). Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* *170*, 1231–1241. <https://doi.org/10.1084/JEM.170.4.1231>.

Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. und Mathison, J.C. (1990). CD14, a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide (LPS) and LPS Binding Protein. *Science* (80-.). *249*, 1431–1433. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1698311>.

Wu, C.J., Conze, D.B., Li, T., Srinivasula, S.M. und Ashwell, J.D. (2006). Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF- κ B activation. *Nat. Cell Biol.* *2006* *8*, 398–406. <https://doi.org/10.1038/ncb1384>.

Wu, M., Ma, M., Tan, Z., Zheng, H. und Liu, X. (2020a). Neutrophil: A New Player in Metastatic Cancers. *Front. Immunol.* *11*, 2198. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.565165/BIBTEX>.

Wu, Z., Liu, W., Wang, Z., Zeng, B., Peng, G., Niu, H., Chen, L., Liu, C., Hu, Q., Zhang, Y., et al.

(2020b). Mesenchymal stem cells derived from iPSCs expressing interleukin-24 inhibit the growth of melanoma in the tumor-bearing mouse model. *Cancer Cell Int.* *20*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-1112-7>.

Xing, F., Saidou, J. und Watabe, K. (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front. Biosci.* *15*, 166–179. <https://doi.org/10.2741/3613>.

Xiong, G.-F. und Xu, R. (2016). Function of cancer cell-derived extracellular matrix in tumor progression. *J. Cancer Metastasis Treat.* *2*, 357. <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2016.08>.

Xu, D. und Lu, W. (2020). Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity. *Front. Immunol.* *11*, 764. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00764/BIBTEX>.

Xu, Y., Swerlick, R.A., Sepp, N., Bosse, D., Ades, E.W. und Lawley, T.J. (1994). Characterization of Expression and Modulation of Cell Adhesion Molecules on an Immortalized Human Dermal Microvascular Endothelial Cell Line (HMEC-1). *J. Invest. Dermatol.* *102*, 833–837. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.EP12382086>.

Xu, Y., Ma, J., Zheng, Q., Wang, Y., Hu, M., Ma, F., Qin, Z., Lei, N. und Tao, N. (2019). MPSSS impairs the immunosuppressive function of cancer-associated fibroblasts via the TLR4-NF- κ B pathway. *Biosci. Rep.* *39*, 20182171. <https://doi.org/10.1042/BSR20182171>.

Yakubenko, V.P., Lobb, R.R., Plow, E.F. und Ugarova, T.P. (2000). Differential Induction of Gelatinase B (MMP-9) and Gelatinase A (MMP-2) in T Lymphocytes upon α 4 β 1-Mediated Adhesion to VCAM-1 and the CS-1 Peptide of Fibronectin. *Exp. Cell Res.* *260*, 73–84. <https://doi.org/10.1006/EXCR.2000.5002>.

Yan, J., Kloecker, G., Fleming, C., Bousamra, M., Hansen, R., Hu, X., Ding, C., Cai, Y., Xiang, D., Donninger, H., et al. (2014). Human polymorphonuclear neutrophils specifically recognize and kill cancerous cells. *Oncoimmunology* *3*, e950163. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.950163>.

Yang, S.H., Park, M.J., Yoon, I.H., Kim, S.Y., Hong, S.H., Shin, J.Y., Nam, H.Y., Kim, Y.H., Kim, B. und Park, C.G. (2009). Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp. Mol. Med.* *41*, 315–324. <https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.5.035>.

Yang, Y., Lv, J., Jiang, S., Ma, Z., Wang, D., Hu, W., Deng, C., Fan, C., Di, S., Sun, Y., et al. (2016). The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation. *Cell Death Dis.* *2016* *7*, e2234–e2234. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.140>.

Yano, T. und Ogura, N. (2018). **CXCL1, 2 und 3 Expression Stimulated by Fibronectin**

Fragments in Synovial Fibroblasts from Human Temporomandibular Joints . *Int. J. Oral-Medical Sci.* *16*, 70–77. <https://doi.org/10.5466/ijoms.16.70>.

Yao, C., Oh, J.H., Lee, D.H., Bae, J.S., Jin, C.L., Park, C.H. und Chung, J.H. (2015). Toll-like receptor family members in skin fibroblasts are functional and have a higher expression compared to skin keratinocytes. *Int. J. Mol. Med.* *35*, 1443–1450. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2015.2146/HTML>.

Yi, M. und Ruoslahti, E. (2001). A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis und metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 620–624. <https://doi.org/10.1073/PNAS.98.2.620>.

Yip, H.K., Chang, Y.C., Wallace, C.G., Chang, L.T., Tsai, T.H., Chen, Y.L., Chang, H.W., Leu, S., Zhen, Y.Y., Tsai, C.Y., et al. (2013). Melatonin treatment improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute lung ischemia–reperfusion injury. *J. Pineal Res.* *54*, 207–221. <https://doi.org/10.1111/JPI.12020>.

Yipp, B.G. und Kubes, P. (2013). NETosis: How vital is it? *Blood* *122*, 2784–2794. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-457671>.

Yoon, H., Tang, C.M., Banerjee, S., Delgado, A.L., Yebra, M., Davis, J. und Sicklick, J.K. (2021). TGF- β 1-mediated transition of resident fibroblasts to cancer-associated fibroblasts promotes cancer metastasis in gastrointestinal stromal tumor. *Oncog.* *2021* *102* *10*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00302-5>.

Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., Sato, K., Inoue, K., Nagase, T., Koshima, I., et al. (2006). Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell. Physiol.* *208*, 64–76. <https://doi.org/10.1002/JCP.20636>.

You, R., Zheng, M. und McKeown-Longo, P.J. (2010). The First Type III Repeat in Fibronectin Activates an Inflammatory Pathway in Dermal Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* *285*, 36255. <https://doi.org/10.1074/JBC.C110.176990>.

Yu, B. und Wright, S.D. (1996). Catalytic Properties of Lipopolysaccharide (LPS) Binding Protein: TRANSFER OF LPS TO SOLUBLE CD14 (*). *J. Biol. Chem.* *271*, 4100–4105. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.8.4100>.

Yuan, X., Zhou, Y., Wang, W., Li, J., Xie, G., Zhao, Y., Xu, D. und Shen, L. (2013). Activation of TLR4 signaling promotes gastric cancer progression by inducing mitochondrial ROS production. *Cell Death Dis.* *4*, e794. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2013.334>.

Yvan-Charvet, L. und Ng, L.G. (2019). Granulopoiesis and Neutrophil Homeostasis: A Metabolic, Daily Balancing Act. *Trends Immunol.* *40*, 598–612. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2019.05.004>.

Zabouo, G., Imbert, A.M., Jacquemier, J., Finetti, P., Moreau, T., Esterni, B., Birnbaum, D., Bertucci, F. und Chabannon, C. (2009). CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.* *11*, 1–14. <https://doi.org/10.1186/BCR2215/TABLES/2>.

Zeisel, M.B., Druet, V.A., Sibilila, J., Klein, J.-P., Quesniaux, V. und Wachsmann, D. (2005). Cross Talk between MyD88 and Focal Adhesion Kinase Pathways. *J. Immunol.* *174*, 7393–7397. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.174.11.7393>.

Zhang, R., Qi, F., Zhao, F., Li, G., Shao, S., Zhang, X., Yuan, L. und Feng, Y. (2019). Cancer-associated fibroblasts enhance tumor-associated macrophages enrichment and suppress NK cells function in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* *10*. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1435-2>.

Zhang, Y., Diao, N., Lee, C.K., Chu, H.W., Bai, L. und Li, L. (2020). Neutrophils Deficient in Innate Suppressor IRAK-M Enhances Anti-tumor Immune Responses. *Mol. Ther.* *28*, 89–99. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2019.09.019>.

Zhao, C., Pavicic, P.G., Datta, S., Sun, D., Novotny, M. und Hamilton, T.A. (2014). Cellular Stress Amplifies TLR3/4-Induced CXCL1/2 Gene Transcription in Mononuclear Phagocytes via RIPK1. *J. Immunol.* *193*, 879–888. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1303396/-/DCSUPPLEMENTAL>.

Zhao, X.L., Lin, Y., Jiang, J., Tang, Z., Yang, S., Lu, L., Liang, Y., Liu, X., Tan, J., Hu, X.G., et al. (2017). High-mobility group box 1 released by autophagic cancer-associated fibroblasts maintains the stemness of luminal breast cancer cells. *J. Pathol.* *243*, 376–389. <https://doi.org/10.1002/PATH.4958>.

Zheng, B., Ohuchida, K., Chijiwa, Y., Zhao, M., Mizuuchi, Y., Cui, L., Horioka, K., Ohtsuka, T., Mizumoto, K., Oda, Y., et al. (2016a). CD146 attenuation in cancer-associated fibroblasts promotes pancreatic cancer progression. *Mol. Carcinog.* *55*, 1560–1572. <https://doi.org/10.1002/MC.22409>.

Zheng, H., Zou, W., Shen, J., Xu, L., Wang, S., Fu, Y.-X. und Fan, W. (2016b). Opposite Effects of Coinjection and Distant Injection of Mesenchymal Stem Cells on Breast Tumor Cell Growth. *Stem Cells Transl. Med.* *5*, 1216–1228. <https://doi.org/10.5966/SCTM.2015-0300/-/DC1>.

Zheng, M., Jones, D.M., Horzempa, C., Prasad, A. und McKeown-Longo, P.J. (2011). The First

Type III Domain of Fibronectin is Associated with the Expression of Cytokines within the Lung Tumor Microenvironment. *J. Cancer* 2, 478. <https://doi.org/10.7150/JCA.2.478>.

Zheng, M., Ambesi, A. und McKeown-Longo, P.J. (2020). Role of TLR4 Receptor Complex in the Regulation of the Innate Immune Response by Fibronectin. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/CELLS9010216>.

Zhou, B.O., Yue, R., Murphy, M.M., Peyer, J.G. und Morrison, S.J. (2014). Leptin Receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* 15, 154. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2014.06.008>.

Zhou, S., Du, R., Wang, Z., Shen, W., Gao, R., Jiang, S., Fang, Y., Shi, Y., Chang, A., Liu, L., et al. (2019). TLR4 increases the stemness and is highly expressed in relapsed human hepatocellular carcinoma. *Cancer Med.* 8, 2325–2337. <https://doi.org/10.1002/CAM4.2070>.

Zhu, H., Mitsuhashi, N., Klein, A., Barsky, L.W., Weinberg, K., Barr, M.L., Demetriou, A. und Wu, G.D. (2006). The Role of the Hyaluronan Receptor CD44 in Mesenchymal Stem Cell Migration in the Extracellular Matrix. *Stem Cells* 24, 928–935. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2005-0186>.

Zivkovic, M., Poljak-Blazi, M., Zarkovic, K., Mihaljevic, D., Schaur, R.J. und Zarkovic, N. (2007). Oxidative burst of neutrophils against melanoma B16-F10. *Cancer Lett.* 246, 100–108. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2006.02.002>.

7. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name, Vorname: Lubosch, Alexander
Geburtsdatum: 13.09.1990
Geburtsort: Fürth

Schulischer Werdegang

1997 – 2001 Grundschule „Volksschule Hammerbachtal“, Offenhausen
2001 – 2010 „Paul-Pfinzing-Gymnasium“, Hersbruck
25.06.2010 Abitur: Note: 1,9

Universitärer Werdegang

2010 – 2014 Bachelor of Science: Biologie, Universität Bayreuth
Note: 2,0
21.02.2014 Bachelorarbeit: Embryonal- und Bakteriomentwicklung ausgewählter Wanzenpezies
Note: 1,5
2014 – 2017 Master of Science: Molekulare Ökologie, Universität Bayreuth
Note: 1,4
29.03.2017 Masterarbeit: Wirkungstestung potentieller Krebsmedikamente auf verschiedene Krebszelllinien mit Referenz zu gesunden bovinen Chondrozyten
Note: 1,3

Beruflicher Werdegang:

05/2017 – heute Universitätsklinikum Heidelberg, Institut für Immunologie und Serologie
Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Promotion

Publikationen

Wirth, F.*, Huck, K.*, **Lubosch, A.***, Zoeller, C., Ghura, H., Porubsky, S. und Nakchbandi, I.A. (2021). Cdc42 in osterix-expressing cells alters osteoblast behavior and myeloid lineage commitment. Bone 153, 116150. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.116150>.

***Geteilte Erstautorschaft**

Wirth, F., **Lubosch, A.**, Hamelmann, S. und Nakchbandi, I.A. (2020). Fibronectin and Its Receptors in Hematopoiesis. Cells 9, 2717. <https://doi.org/10.3390/cells9122717>.

Tagungsbeiträge

06/2022

Poster, EACR

Lubosch, A., Zöller, C., Wirth, F. und Nakchbandi, I.A. (2022). Studies on fibroblastic contribution to tumor growth.

05/2022

Poster, ECTS

Lubosch, A., Zöller, C., Wirth, F. und Nakchbandi, I. (2022). Pre-osteoblast fibronectin suppresses tumor growth by acting on another bone-marrow-stromal subpopulation. Bone Reports, 16, 101373.

05/2022

Poster, ECTS

Wirth, F., **Lubosch, A.**, Zöller, C. und Nakchbandi, I. (2022). Pre-osteoblasts and endothelial progenitors differently affect homing of breast cancer cells to the bone marrow. Bone Reports, 16, 101372.

05/2022

Poster, ECTS

Zöller, C., **Lubosch, A.**, Wirth, F. und Nakchbandi, I. (2022). New insight on the difference between the bone microenvironment and the mammary gland for breast cancer growth. Bone Reports, 16, 101374.

05/2021

- Vortrag, ECTS **Lubosch, A.**, Wirth, F., Zöller, C. und Nakchbandi, I. (2021). Fibronectin derived from osteoblastic progenitors suppresses tumour growth. *Bone Reports*, 14, 100792.
- 05/2021
- Vortrag, ECTS Wirth, F., **Lubosch, A.**, Zöller, C., Huck, K., & Nakchbandi, I. (2021). The Rho GTPase Cdc42 modulates osteoblast number and function depending on the time of its expression. *Bone Reports*, 14, 100793.
- 03/2021
- Vortrag, Osteologie Wirth, F., **Lubosch, A.**, Zöller, C., Huck, K. und Nakchbandi, I. (2021). Osteoblasten stimulieren die Hämatopoese durch IL-4 Produktion. *Osteologie* 30, V 1.4. <https://doi.org/10.1055/S-0040-1722115>.
- 03/2021
- Vortrag, Osteologie Zöller, C., **Lubosch, A.**, Sens, C. und Nakchbandi, I. (2021). Die Fibronektinisoform EDB verbessert die Knochendichte in vivo. *Osteologie* 30, V 1.9. <https://doi.org/10.1055/S-0040-1722120>.
- 09/2020
- Vortrag, ASBMR **Lubosch, A.**, Wirth, F., Huck, K., Zoeller, C., Ghura, H., Hamelmann, S., Porubsky, S., Nakchbandi, I. (2020, November). Preosteoblasts modulate myelopoiesis in the bone marrow by producing the chemokines CCL3 and CCL4. In *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH* (Vol. 35, pp. 29-29). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY.
- 03/2019
- Vortrag, Osteologie **Lubosch, A.**, Hamelmann, S. und Nakchbandi, I. (2019). Fibronektin aus Osteoblastenvorläufern inhibiert das Tumorwachstum. *Osteologie* 28, V 7.4. <https://doi.org/10.1055/S-0039-1680007>.

8. DANKSAGUNG

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen Personen, die mir bei der Durchführung meiner Dissertation geholfen haben, an meiner Seite standen und mich während der ganzen Zeit unterstützt haben.

Besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. med. Inaam Nakchbandi für die außergewöhnlich gute Betreuung, sowie für die Möglichkeit meine Dissertation in Ihrer Arbeitsgruppe und über ein so spannendes Thema zu verfassen. Ich bedanke mich auch herzlich für die intensiven Gespräche, dass ich stets einen Ansprechpartner bei Fragen jedweder Art fand und dass ich während meiner Promotionszeit so viel lernen und mich weiterentwickeln konnte.

Ein großer Dank geht auch an meine Gutachter/innen für die Zeit und die Mühe, welche Sie in diese Arbeit investieren.

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Axel Roers bedanken, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die enge Zusammenarbeit mit den anderen Arbeitsgruppen am Institut.

Vor allem möchte ich mich auch bei meinen aktuellen und ehemaligen Kolleg/innen Caren Zöller, Franziska Wirth, Anna Babin-Ebell, Kim Carlstedt, Franziska Dusi, Dr. Hiba Ghura, Dr. Stefan Hamelmann und Dr. Katrin Huck bedanken. Es war eine einmalige Zeit mit euch im Labor, die mit vielen wundervollen Erinnerungen gespickt war, die mir lebenslang erhalten bleiben.

Außerordentlicher Dank geht natürlich auch an meine Familie und insbesondere an meine Eltern, die mir stets mit aller erdenklichen Mühe beistanden und ohne die ich niemals dort im Leben stehen würde, wo ich heute stehe.