

Aus dem Bereich Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Klinische Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Charakterisierung der Anti-Tumoraktivität zirkulierender myeloischer Zellen von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
(der Theoretischen Medizin, der Zahnheilkunde oder der Naturwissenschaften)
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2025**

vorgelegt von: Alexander Valcenko
geb. am 14.06.2001 in Dresden

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS.....	9
1. ABSTRACT	11
2. EINLEITUNG.....	13
2.2 NEUTROPHILE IM ALTER UND KRANKHEIT	20
2.3 VERSCHIEDENE NEUTROPHILE SUBSETS UND PROTEINE UND IHRE BEDEUTUNG IN KARZINOMEN	22
2.3.1 OLFM4-POSITIVE NEUTROPHILE	23
2.3.2 CD177- POSITIVE NEUTROPHILE UND DAS KILLING VON TUMORZELLEN	23
2.3.3 CD147	28
2.3.4 DON´T EAT ME UND SIRPA	29
2.3.5 NEUTROPHILE IM TME.....	30
2.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	33
3. MATERIALIEN UND METHODEN	35
3.1 MATERIAL- UND CHEMIKALIENLISTE	35
3.2 LÖSUNGEN.....	36
3.3 ANTIKÖRPER.....	37
3.4 GERÄTELISTE	38
3.5 VERWENDETE SOFTWARE	39
3.6 ISOLATION DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN	39
3.7 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE FÄRBUNG UND ANALYSE DER IMMUNZELLEN	44
3.8 IMPEDANZ-ASSAY	49
3.9 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	52
4. ERGEBNISSE.....	53
4.1 PATIENTEN- UND SPENDERDATEN DER DURCHFLUSSZYTOMETRISCH UNTERSUCHTEN NEUTROPHILEN.....	53
4.2 UNTERSCHIEDE BEI DER EXPRESSION VERSCHIEDENER OBERFLÄCHENPROTEINE DER NEUTROPHILEN ALLER SPENDER.....	57
4.2.1 UNTERSCHIEDE ZWISCHEN HNSCC- UND GESUNDEN SPENDERN	57
4.2.2 NEUTROPHILE VON HNSCC-PATIENTEN UNTERSCHIEDEN SICH PHÄNOTYPISCH.....	63
4.2.3 GESCHLECHTSABHÄNGIGER VERGLEICH DES NEUTROPHILEN-PHÄNOTYPS ZWISCHEN HNSCC-PATIENTEN UND GESUNDEN PROBANDEN.....	71
.....	72
4.3 PATIENTEN- UND SPENDERDATEN ZUM IMPEDANZ-ASSAY	75
4.4 UNTERSCHIEDE BEI DER IGA2.0-VERMITTELTEN ADCC IN ABHÄNGIGKEIT DER SPENDER.....	78
4.5 UNTERSCHIEDE BEI DER EXPRESSION VERSCHIEDENER OBERFLÄCHENPROTEINE DER NEUTROPHILEN VOM IMPEDANZ-ASSAY	82

4.6 UNTERSCHIEDE BEI DER ADCC IN ABHÄNGIGKEIT DES VERWENDETEN ANTIKÖRPERS	87
4.4 ADCC IN ABHÄNGIGKEIT DES CD177-SUBSETS	90
5. DISKUSSION	93
5.1 Kernaussagen und Limitationen	93
5.2 Zusammenhang zwischen Tumorprogression und Neutrophilenfunktion	94
5.3 Unterschiede im Immunsystem zwischen weiblichen und männlichen Spendern und ihre Auswirkungen auf die ADCC	99
5.4 ADCC in Abhängigkeit des verwendeten Antikörper-Typs.....	101
5.5 ADCC in Abhängigkeit des CD177-Subsets	104
5.6 Ausblick	105
6. LITERATURVERZEICHNIS	107
7. DANK	128
8. PUBLIKATIONEN.....	128
9. LEBENSLAUF	129

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ADCC	Antibody-dependent cellular toxicity
TME	Tumor microenvironment
EGFR	endothelial growth factor receptor
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
HPV	Humanes Papillomavirus
EBV	Ebstein-Barr-Virus
CD	Cluster of Differentiation
MHC	Major histocompatibility complex
PD1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death protein 1 ligand 1
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
IL-3	Interleukin-3
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
CXCR4 = CD184	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
PECAM1 = CD31	Platelet and endothelial cell adhesion molecule = cluster of differentiation 31
CD99	Cluster of differentiation
TNF	Tumornekrosefaktor
NET	Neutrophil extracellular trap
ROS	Reactive oxygen species
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorige Säure
IL-8	Interleukin-8
IL-23	Interleukin-23
IL-17	Interleukin-17
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor

OLFM4	Olfactomedin 4
TAN	Tumor-assoziierte Neutrophile
GPI	Glykoprotein-Anker
CD177 = NB1	Cluster of differentiation 177 =
ANCA	Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper
Anti-PR3	Anti-Proteinase 3
MAC-1 = CD18/CD11b	Macrophage-1 Antigen
CD18	Cluster of differentiation 18
CD11b	Cluster of differentiation 11b
PDPN	Podoplanin
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
CD89 = Fc α RI	Cluster of differentiation 89
CD64	Cluster of differentiation 64
CD32a und b	Cluster of differentiation 32a und b
CD16a und b	Cluster of differentiation 16a und b
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
LTB4	Leukotrien B4
CD147 = EMMPRIN	Cluster of differentiation 147
MMP	Matrixmetalloprotease
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
MCT	Monocarboxylat-Transporter
CD47	Cluster of differentiation 47
CD172a = SIRP α	Cluster of differentiation 172a
TGF- β	Transforming growth factor β
INF- β	Interferon β
LOX1	Lectin-like oxLDL receptor 1
CD62L = L-Selektin	Cluster of differentiation 62L
CD184	Cluster of differentiation 184
ADAM8	A Disintegrin and metalloproteinase domain- containing protein 8
ADAM10	A Disintegrin and metalloproteinase domain- containing protein 10
OSCC	Oral Squamous Cell Carcinoma
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

dH ₂ O	Destilliertes Wasser	
EtOH	Ethanol	
BSA	Bovine serum albumin	
FCS/FKS	fetal calve serum	
KCl	Kaliumchlorid	
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat	
1x PBS = DPBS	1x phosphate buffered saline	
PFA	Paraformaldehyd	
BV421	Brilliant Violet 421	
APC	Allophycocyanin	
PE	Phycoerythrin	
PerCPCy5.5	Peridinin-chlorophyll-protein	Complex:
	CY5.5 Conjugate	
UV	Ultraviolett	
RT	Raumtemperatur	
RPM	Rounds per minute	
Aqua dest.	Destilliertes Wasser	
FSC	Forward scatter	
SSC	Side scatter	
Abb.	Abbildung	
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	
PCR	Polymerase chain reaction	
IgA2.0	ImmunglobulinA 2.0	
Pani	Panitumumab	
IgA STD	IgA Standard	
IgG STD	IgG Standard	
SEM	Standardfehler	
nCI	Normierter Zellindex	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die wichtigsten Risikofaktoren für das Auftreten von HNSCC (Sun et al. 2021).....	14
Abbildung 2: (Wojtukiewicz et al. 2021): Interaktion von PD-L1 der Tumorzelle mit PD-1 der T-Zelle sowie daraus folgende Immuntherapien	15
Abbildung 3: Homöostase der Granulopoese im Kontext der IL23-IL17-G-CSF-Achse	19
Abbildung 4 (Bonaventura et al. 2019): Überblick über klassische Funktionen und neue Erkenntnisse der Neutrophilen.....	22
Abbildung 5: Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität führt zur Lyse der Tumorzelle	25
Abbildung 6 (modifiziert nach Ustyanovska Avtenyuk et al. 2020): Immunologische Synapse und Tötung der Tumorzelle	26
Abbildung 7: Ig-Signaling am Neutrophilen, IgA und IgG im Vergleich (aus Ustyanovska Avtenyuk et al. 2020).....	27
Abbildung 8: “Don’t eat me”-Interaktion zwischen einer Immun- und Tumorzelle (modifiziert nach Khalaji et al. 2023)	29
Abbildung 9: Einfluss der Zytokine INF-Beta und TGF-Beta auf die Polarisation von Neutrophilen (aus Masucci et al. 2019)	32
Abbildung 10: Lösung A und B und in den abgedunkelten Fläschchen die Pellets, welche mit Lösung A gelöst werden	40
Abbildung 11: Gemisch aus Blut und Lösung A und B vor und nach 15min im Magneten.....	41
Abbildung 12 (aus Silvestre-Roig et al. 2019): Schematische Darstellung der verschiedenen Schichten des Blutes nach Zentrifugation im Rahmen der Ficoll-Methode.....	42
Abbildung 13: Gating-Strategie zur Bestimmung Neutrophiler	45
Abbildung 14: Gating-Strategie zur Analyse neutrophiler Untergruppen mittels Durchflusszytometrie.....	46
Abbildung 15: Gating-Strategie für die verschiedenen Fluoreszenzkanäle	47
Abbildung 16: Quantifizierung der Neutrophilen-Subsets samt deren Fluoreszenzintensitäten in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen.....	48
Abbildung 17: E-Plate® nach vollzogener Messung.....	51
Abbildung 18: schematische Darstellung des Ablaufs des Impedanz-basierten ADCC-Assays	52
Abbildung 19: kranke und gesunde Spender unterscheiden sich weder bei der prozentualen Verteilung des CD177-Subsets, noch bei der CD177-Expression auf den positiven Zellen	57
Abbildung 20: Aufnahme eines Spenders mit drei verschiedenen.....	58
Abbildung 21: Vergleich der RFI für ausgewählte Proteine zwischen 45 kranken und 50 gesunden Spendern	60
Abbildung 22: Subset-abhängiger Vergleich der RFIs für ausgewählte Proteine zwischen HNSCC- und gesunden Spendern	62
Abbildung 23: Der Vergleich der RFI zwischen HNSCC-Spendern mit T<4 gegen T4 zeigt eine erhöhte Expression von CD177 auf den CD177-positiven Neutrophilen von T4-Spendern und eine erhöhte Expression von CD62L	64

Abbildung 24: Vergleich der RFI der Neutrophilen von T1- gegen T4-Spender zeigt signifikant erhöhte Expressionen von CD177, CD89, CD18, CD11b, ADAM8, ADAM10 und CD62L.....	66
Abbildung 25: Die Neutrophilen der HNSCC-Spender mit N0 exprimieren lediglich mehr CD11b, ansonsten gibt es keine signifikanten Unterschiede.....	68
Abbildung 26: Der Vergleich der RFI verschiedener Proteine auf Neutrophilen von unter und über 70-jährigen HNSCC-Patienten zeigt eine erhöhte Expression von CD177, CD89, CD172a und CD54 bei den über 70-jährigen	70
Abbildung 27: Es gibt keinerlei signifikante Unterschiede bei der Expression der untersuchten Proteine zwischen den kranken und gesunden Frauen	72
Abbildung 28: die Neutrophilen der kranken Männer exprimieren mehr CD177, CD147, CD11b, ADAM10 und CD62L.....	74
Abbildung 29: Der Vergleich der IgA2.0-abhängigen ADCC der Neutrophilen zwischen kranken und gesunden Spendern zeigt keinen Unterschied.....	79
Abbildung 30: Vergleich der ADCC-Fähigkeit mit IgA2.0 und Neutrophilen für die Tumorstadien T4 gegen <T4 (A und B), T2 gegen T4 (C), T3 gegen T4 (D) und T1 gegen T4 (E und F)	80
Abbildung 31: Vergleich des IgA2.0-abhängigen ADCC zwischen N0 (n=4) und N>0 (n=7)	81
Abbildung 32: Der Vergleich der prozentualen Verteilung für das CD177-positive- und negative Subset (A) sowie für die Expression verschiedener Oberflächenproteine (B – N) der kranken und gesunden ADCC-Spender zeigt keinerlei signifikante Unterschiede.....	83
Abbildung 33: Vergleich der Expression der Proteine zwischen kranken und gesunden Spendern mit Fokus auf die CD177-Subsets	85
Abbildung 34: Die Neutrophilen der Spender mit T4-Tumoren exprimieren mehr CD62L als die mit T1 bis T3.....	86
Abbildung 35: Vergleich der IgA2.0- und Panitumumab-abhängigen ADCC zeigt die Überlegenheit des IgA2.0.....	89
Abbildung 36: Vergleich der ADCC in Abhängigkeit des CD177-Subsets.....	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Material- und Chemikalienliste	35
Tabelle 2: Primäre monoklonale Antikörper fürs FACS (entnommen aus Valcenko et al. 2024)	37
Tabelle 3: Geräteliste.....	38
Tabelle 4: verwendete Software	39
Tabelle 5: Klinische Daten zu allen durchflusszytometrisch untersuchten gesunden sowie HNSCC-Spendern.....	53
Tabelle 6: Tumordaten sowie epidemiologische Daten zu den Spendern des Impedanz-Assays.....	75

1. Abstract

Neutrophils adapt to the tumor microenvironment (TME) and influence the progression and treatment outcomes of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). They have the capacity to lyse tumor cells via antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). In this work the ability to perform ADCC and the phenotype of neutrophils derived from patients with an HNSCC and from healthy donors were investigated. For the first time it was shown that not just neutrophils derived from healthy donors, but from HNSCC donors as well are superior to perform ADCC with an engineered IgA2 specific for the epidermal growth factor receptor (EGFR) in comparison to Panitumumab, a clinically used IgG2. Significant phenotypic differences between both groups also were shown. Male patients and those with advanced HNSCC might not respond as well to a neutrophil-centered immunotherapy. Only in neutrophils derived from healthy, not from HNSCC donors CD177-subset-depending differences in ADCC could be seen. The results of this work emphasize the Fc-receptor-dependent functional characteristics and the ADCC-competence of neutrophils in the context of innate neutrophil-subsets. In the context of malignant diseases further investigation is needed to understand, how innate neutrophil-subsets influence efficacy of antibody-dependent therapy. This work shows the potential of the IgA-FcαRI-axis and the importance of adjusting the immunotherapy to the patient profile for improving clinical outcomes for HNSCCs.

Neutrophile passen sich an die Tumormikroumgebung (TME) an und beeinflussen Prognose sowie Therapieansätze maligner Tumore. Sie besitzen die Fähigkeit, Tumorzellen mittels Antikörper-abhängiger, Zell-vermittelter Zytotoxizität (ADCC) zu lysieren. In dieser Arbeit wurden Neutrophile von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) und von gesunden Spendern isoliert und in Hinblick auf ihre ADCC-Fähigkeit und ihren Phänotyp untersucht. Zum ersten Mal wurde nicht nur seitens gesunder, sondern auch seitens der HNSCC-Spender eine Überlegenheit der ADCC mit einem speziell gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) entwickelten IgA2 im Vergleich zu Panitumumab, einem klinisch verwendeten IgG2, gezeigt. Auch signifikante phänotypische Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen stellten sich heraus. Männliche Patienten und solche mit fortgeschrittenem Stadium sprechen möglicherweise weniger gut auf eine Neutrophilen-vermittelte Immuntherapie an. Nur bei den gesunden, nicht jedoch bei den HNSCC-Spendern ließen sich in Abhängigkeit des CD177-Subsets Unterschiede der ADCC aufzeigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die F_c -Rezeptor-abhängigen, funktionellen Eigenschaften und die ADCC-Kompetenz von Neutrophilen im Kontext angeborener Neutrophilen-Subtypen. Im Kontext maligner Erkrankungen bedarf es weiterführender Untersuchungen, inwieweit angeborene Neutrophilen-Untergruppen einen Einfluss auf die Wirksamkeit Antikörper-basierter Immuntherapien haben. Es zeigt sich das therapeutische Potenzial der IgA- $Fc\alpha RI$ -Achse und die Bedeutung einer Anpassung immuntherapeutischer Strategien an das individuelle Patientenprofil zur Verbesserung der klinischen Ergebnisse bei HNSCCs.

2. Einleitung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs, auch HNSCC (head and neck squamous cell carcinomas) genannt, zählen laut GLOBOCAN zu den sechst-häufigsten Karzinomen weltweit und machen ungefähr drei Prozent aller malignen Erkrankungen aus (Starska-Kowarska et. al 2023). Im Jahr 2018 gab es ca. 890.000 Neuerkrankungen und 450.000 Todesfälle weltweit, Tendenz steigend. Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe an Malignomen, die vom Epithel verschiedener Bereiche des Mund-Rachen-Bereiches ausgehen können; dazu gehören der Nasopharynx, der Oropharynx samt Zungengrund, Tonsillen und Weichgaumen, der Mundboden, die Wangenschleimhaut, Laryngopharynx, sowie der Kehlkopf (Johnson et. al 2020).

Wo genau sich das HNSCC manifestiert und in welchem Alter es diagnostiziert wird, scheint mit verschiedenen Risikofaktoren zusammenzuhängen. Die wichtigsten sind hierbei das Rauchen, Alkoholkonsum, Infektionen insbesondere mit HPV, EBV und *Candida albicans*, mangelnde Hygiene, Mangelernährung und der Verzehr bestimmter Speisen (siehe Abb. 1). Rauchen scheint insbesondere mit HNSCCs in der Mundhöhle, dem Hypopharynx und dem Larynx zusammenzuhängen. Alkohol hat hierbei möglicherweise synergistische Effekte (Johnson et. al 2020). EBV ist insbesondere für das Nasopharynxkarzinom ein wichtiger Risikofaktor (Tsang et al. 2020) und HPV vor allem für das Tonsillenzkarzinom (Hennessey et al. 2009). Nichtsdestotrotz scheint generell eine Assoziation zwischen den im Oropharynx entstehenden HNSCC und HPV zu bestehen, nicht nur für das Tonsillenzkarzinom (Johnsons et al. 2020). Seit 2017 wird deshalb von der UICC das HPV-positive Oropharynxkarzinom sogar als eigene Tumorentität aufgeführt und Betroffene haben bei Erstdiagnose einen kleineren Primärtumor sowie eine bessere 5-Jahre-Überlebenschance im Vergleich zu HPV-negativen HNSCC im Oropharynx (Riders et al. 2022).

Bei den nicht-Virus-assoziierten Tumorentitäten ist der Median für die Diagnose 66 Jahre, bei HPV- bzw. EBV-assoziierten Karzinomen 53 bzw. 50 Jahre (Pulte et al. 2010). Leider ist bei mehr als der Hälfte der betroffenen Patienten bei der Diagnose das Karzinom in einem fortgeschrittenen UICC-Stadium (Sun et al. 2021) und die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 55 bis 60 Prozent (Reyes-Gibby et al. 2014).

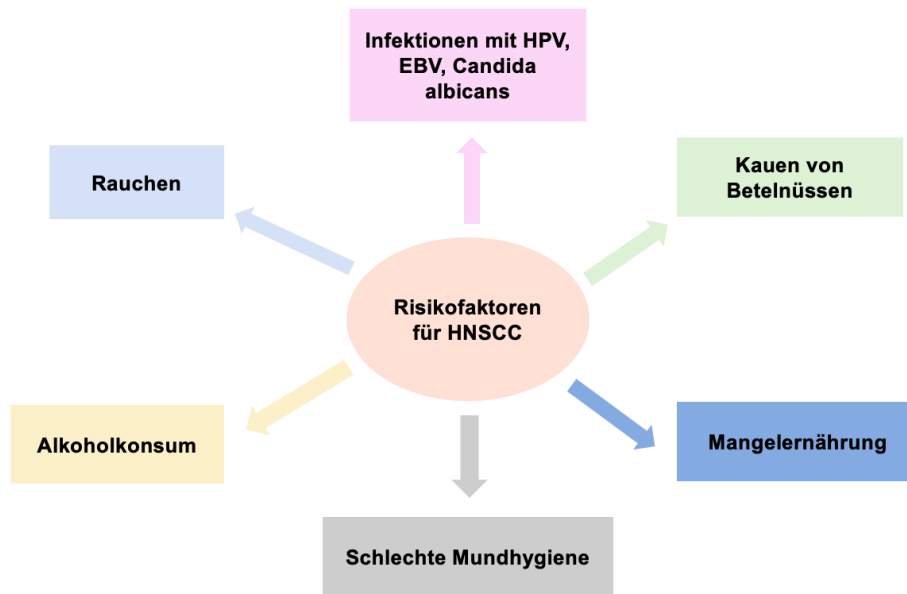


Abbildung 1: Übersicht über die wichtigsten Risikofaktoren für das Auftreten von HNSCC (Sun et al. 2021)

Zu den gängigen Therapiemöglichkeiten zählt die operative Entfernung des Primärtumors samt lokaler Lymphknoten, die Bestrahlung und die Chemotherapie (Johnson et al. 2020). Ein vielversprechender Ansatz ist die Immuntherapie und sogenannte „Molecular targeted therapies“ (Goel et al. 2022). Denn prinzipiell ist das Immunsystem dazu in der Lage, Tumorzellen als solche zu erkennen und verfügt auch über Zellen und Mechanismen, um diese aus dem Verkehr zu ziehen. So sind CD8-positive, zytotoxische T-Zellen dazu in der Lage, über MHC1 an der Tumorzelloberfläche präsentierte Antigene zu erkennen und daraufhin zu lysieren (Waldman et al. 2020). Problem an der Sache ist, dass das TME, das tumor microenviroment, widrige Bedingungen für das Immunsystem schafft und sich über verschiedene Wege der Wirkung des Immunsystems entzieht. So ist das Tumormilieu geprägt von einem sauren pH sowie einer Hypoxie und es kommt zur Bildung schwer durchdringbarer Extrazellulärmatrix. Außerdem brauchen die Tumorzellen Nährstoffe auf, die die Zellen des Immunsystems für eine suffiziente Immunabwehr brauchen (Yu et al. 2022). Schaffen Lymphozyten es dennoch, die Tumorzellen des HNSCC zu erreichen, so kann es sein, dass sie durch die Aktivierung bestimmter Rezeptoren auf der Lymphozytenoberfläche, wie z.B. PD-1 oder CTLA-4, gehemmt werden. Hierfür besitzen die Tumorzellen des HNSCC Liganden für diese Rezeptoren, z.B. den PD-L1 für PD-1. PD-1 lässt sich nicht nur auf Lymphozyten, sondern auch auf NK-Zellen und Monozyten finden, und durch eine Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor können somit unter anderem die Zytokinproduktion und -freisetzung sowie

die Synthese anti-apoptotischer Proteine in Lymphozyten und somit auch die spezifische Immunabwehr und die Abwehr des HNSCC inhibiert werden (Wojtukiewicz et al. 2021).

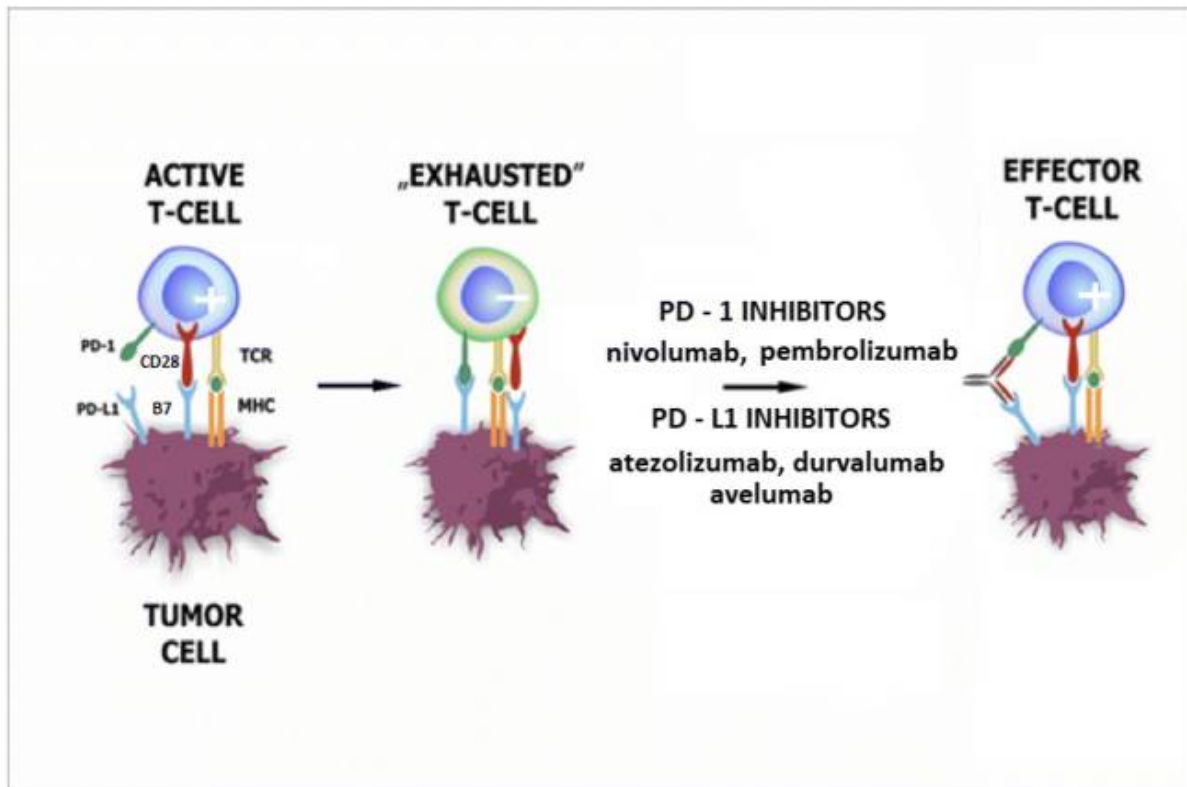


Abbildung 2: (Wojtukiewicz et al. 2021): Interaktion von PD-L1 der Tumorzelle mit PD-1 der T-Zelle sowie daraus folgende Immuntherapien

PD-L1 der Tumorzelle kann PD-1 der T-Zelle binden und somit die T-Zelle in ihrer Funktion inhibieren. Verhindert man diese Interaktion entweder durch Inhibition von PD-1 oder PD-L1, so lässt sich die Inhibition der T-Zelle verhindern und sie kann die Tumorzelle aus dem Verkehr ziehen.

Bei ca. 60% der HNSCC lässt sich eine erhöhte Expression an PD-1 im TME finden und es liegt dementsprechend nahe, dass HNSCCs sich über diesen Mechanismus dem Immunsystem entziehen können (Starska-Kowarska et al. 2023). Diese Tatsache macht man sich bei der Erstlinientherapie eines PD-L1-positiven HNSCC-Rezidivs und bei PD-L1-positiven metastasierten HNSCC zunutze und gibt Pembrolizumab, einen monoklonalen IgG₄ als PD-L1-Blocker, entweder allein bei hoher Expression an PD-L1 oder in Kombination mit Chemotherapie bei geringer Expression (Johnson et al. 2020). Der Einsatz von Pembrolizumab entweder allein oder in Kombination mit Chemotherapie konnte bei metastasierten HNSCCs im Vergleich zur Chemotherapie kombiniert mit Cetuximab die Lebenserwartung um ca. 2 Monate verlängern (Burtneß et al. 2019). Derzeit wird in der klinischen HNO-Onkologie Pembrolizumab zur Behandlung von rezidierten oder metastasierten HNSCCs als Monotherapie in der Zweitlinienbehandlung und entweder als Monotherapie oder kombiniert mit Chemotherapie in der Erstlinienbehandlung eingesetzt (basierend auf Daten der KEYNOTE-040-Studie und der KEYNOTE-048-Studie) (Cohen et al.

2019; Harrington et al. 2023). In der Zweitlinie kann als Alternative auch der PD-1-Antikörper Nivolumab basierend auf den Daten der CHECKMATE141-Studie eingesetzt werden. Darüber hinaus ist durch die positiven Daten der KEYNOTE-689-Studie Pembrolizumab kürzlich auch zur perioperativen Therapie von Patienten mit lokal-fortgeschrittenem HNSCC zugelassen worden. Cetuximab ist ein weiterer monoklonaler Antikörper, ein IgG₁, der bei der Behandlung von HNSCCs seit 2006 Anwendung findet (Johnson et al. 2020). Ca. 90 Prozent der HNSCCs exprimieren den EGFR auf ihrer Zelloberfläche, und das sehr stark (Kalyankrishna et al. 2006). Der EGFR ist einer der wichtigsten Rezeptoren auf Zellen von Säugetieren und seine Aktivierung beeinflusst maßgeblich das Wachstum und die Vermehrung von Zellen vermittelt durch Dimerisation von EGFR und Autophosphorylierung. Cetuximab verhindert diese Dimerisation und Autophosphorylierung und die Signalkaskade wird gestoppt (Krishnamurthy et al. 2022). Eine Studie von Bonner et al. aus dem Jahr 2006 konnte zeigen, dass die Kombination von Cetuximab mit Bestrahlung der Bestrahlung allein bei lokal fortgeschrittenen HNSCC überlegen ist in Hinblick auf die lokale Tumorkontrolle und das Überleben. Aus heutiger Sicht ist diese Studie und auch die Wirksamkeit von Cetuximab umstritten; neuere Studien konnten diesen Effekt nicht feststellen und der Einsatz von Cetuximab bringt vielen Patienten keinen Vorteil, dafür aber gesteigerte Kosten (Saraswhatula et al. 2019). Ein weiterer Antikörper, der EGFR bindet und bei Patienten mit metastasiertem HNSCC oder mit Rezidiv zusätzlich zur Chemotherapie eingesetzt werden kann, ist Panitumumab, ein IgG₂. Dieser verlängert nicht das Überleben, hemmt aber die Progression des HNSCC und hat dabei eine gute Verträglichkeit (Vermorken et al. 2013). Panitumumab ist wohlgeemerkt in der EU nur beim kolorektalen Karzinom zugelassen (Musch 2008).

Der Durchbruch bei der Therapie von HNSCC mit neuen Ansätzen ist bislang ausgeblieben. Eine große Hürde ist – wie schon erwähnt – das TME. Dieses enthält neben den eigentlichen Tumorzellen Fibroblasten, Lymphozyten, NK-Zellen, Antigen-präsentierende Zellen, Makrophagen und auch Neutrophile (Curry et al. 2014). Paradoxerweise können manche Zellen des Immunsystems unter bestimmten Bedingungen das Wachstum des Tumors unterstützen und gleichzeitig das Immunsystem hemmen. So können Tumor-assoziierte Makrophagen als M1-Makrophagen vorliegen, die entzündungsfördernd und tumorhemmend sind oder als M2-Makrophagen mit gegenteiligem Effekt (Parisi et al. 2019). Auch bei Tumor-assoziierten Neutrophilen ist so eine Polarisierung mit N1-Neutrophilen mit indirekter oder direkter Tumorzytotoxizität und N2-Neutrophilen, die immunsupprimierend wirken und das Tumorstadium sowie die Angiogenese und Metastasierung fördern, möglich (Masucci et al. 2019). Ein genauer Blick auf all die verschiedenen Komponenten des TME mit ihren Tumorfördernden und -hemmenden Eigenschaften würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Für ein besseres Verständnis dieser Arbeit wird im folgenden Kapitel ein genauerer Blick auf Neutrophile und ihre Bedeutung für HNSCCs geworfen.

2.1 Neutrophile Granulozyten

Wirft man einen Blick in Lehrbücher der Physiologie, so werden die neutrophilen Granulozyten dem unspezifischen Immunsystem zugeordnet und sind nach Barrieren wie Haut und Schleimhaut die zweite Abwehrfront gegen Mikroorganismen, allem voran Bakterien und Pilze (Nathan 2006). Dabei machen sie ca. 40 – 60 Prozent der im Blut befindlichen Leukozyten aus (Silbernagl et al. 2023). Im Knochenmark differenzieren multipotente hämatopoetische Stammzellen zu myeloischen Vorläuferzellen, aus welchen dann Granulozyten-Monozyten-Vorläufer entstehen. Unter Einfluss von IL-3 und GM-CSF entstehen Granulozyten-Vorläufer, welche dann zu Myeloblasten werden (Silbernagl et al. 2023). Diese reifen dann zu Promyelozyten, Myelozyten, Metamyelozyten, Band-Zellen und schließlich Neutrophilen heran. So entstehen jeden Tag ca. $1-2 \times 10^{11}$ Neutrophile bei einem gesunden Erwachsenen, wobei G-CSF essenziell ist (Borregaard et al. 2010). Die im Knochenmark befindlichen Neutrophilen tragen auf ihrer Oberfläche CXCR4. Erst der Verlust von CXCR4 ermöglicht den Shift aus dem Neutrophilen-Pool im Knochenmark rüber ins Blut (Eash et al. 2009). Im Blutstrom rollen die Neutrophilen am Gefäßendothel entlang vermittelt über P-, L- und E-Selektine. L-Selektin wird auch CD62L genannt und ist maßgeblich am Rolling am Gefäßendothel in postkapillären Venolen und somit an der Migration in Gewebe beteiligt (Rahman et al. 2021). Zhang et al. konnten im Jahr 2015 zeigen, dass Neutrophile mit zunehmendem Alter das L-Selektin verlieren, weswegen eine hohe Expression von CD62L für ein junges Alter der Neutrophilen spricht. CXCR4 wird auch CD184 genannt und ist ein Chemokinrezeptor, welcher mit zunehmendem Alter des Neutrophilen hochreguliert wird (Beyrau et al. 2012). Sobald eine Infektion oder eine Entzündung vorliegt und es zur Freisetzung von Chemokinen oder PAMPs kommt, kommt es über eine Bindung von β_1 - und β_2 -Integrinen der Neutrophilen an ICAM1 des Endothels zu einem Stillstehen des Neutrophilen an der Gefäßwand. Im nächsten Schritt können die Neutrophile entweder zwischen zwei Endothelzellen oder durch eine Endothelzelle hindurch das Gefäß verlassen. Eine Interaktion zwischen PECAM1 und CD99, welche sich sowohl auf den Neutrophilen als auch auf dem Endothel finden lassen, ist hierbei maßgeblich (Mayadas et al. 2014). Ältere CXCR4_{high}CD62L_{low}-Neutrophilen können, wenn eine Entzündung aufkommt, anstatt für den Abbau zum Beispiel ins Knochenmark, in den Entzündungsherd einwandern und haben hier dann eine höhere Phagozytose-Aktivität als jüngere Neutrophile, was darauf hindeuten lässt, dass die volle Funktionstüchtigkeit erst nach einer gewissen Zirkulation im Blut erreicht wird (Uhl et al. 2016).

Im Entzündungsherd angekommen erfolgt eine weitere Aktivierung des Neutrophilen unter anderem durch PAMPs und Opsonine, für welche Rezeptoren auf der Neutrophilenoberfläche vorhanden sind. Dabei ist anzumerken, dass die Aktivierung nicht durch einen einzelnen

Stimulus, sondern viel mehr durch die Summe mehrerer Stimuli erfolgt. Dazu gehört bereits die Adhäsion am Endothel, die Transmigration und im weiteren Verlauf das Vorhandensein von PAMPs und Opsoninen, aber auch eine Aktivierung durch TNF-Alpha und anderer Chemokine (Mayadas et al. 2014). Mindestens zwei Stimuli sind für eine suffiziente Aktivierung von Nöten, dabei scheint es keine große Rolle zu spielen, welche zwei miteinander kombiniert werden (Mol et al. 2018). Schließlich können die eingedrungenen Mikroorganismen über verschiedene Wege von den Neutrophilen aus dem Verkehr gezogen werden; dazu gehört die Phagozytose, NETose, Bildung von ROS und Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden und Enzymen. Bei der Phagozytose wird der Erreger aufgenommen und ist dann von einer Membran umgeben, dem Phagosom. In diesem kommt es, vermittelt durch die NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase zur Entstehung von Superoxidanionen, H_2O_2 und HOCl, welche den Erreger abtöten (Hurst 2019), zudem verfügen Neutrophile über eine Vielzahl an Granula, die mit dem Phagosom verschmelzen, sodass der Erreger über oxidative und nicht-oxidative Wege abgetötet wird (Othman et al. 2018). Die Granula enthalten neben den bereits genannten noch weitere Enzyme, darunter verschiedene Serin-Proteasen wie Elastase, Proteinase-3, Lysozym und Lactoferrin als Eisen-bindendes Protein. Es lassen sich verschiedene Granula charakterisieren, die sich durch ihren Inhalt unterscheiden (Othman et al. 2018). Ist der Erreger zu groß, um phagozytiert zu werden, kann der Inhalt der Granula auch in den Extrazellularraum freigegeben werden (Nauseef et al. 2014). Ein weiterer Prozess ist die NETose, bei welcher Chromatin des Neutrophilen mit antimikrobiellen Proteinen und Enzymen wie eine Art Netz ausgeworfen wird. Getriggert wird dieser Prozess durch Entzündungsmediatoren wie IL8 oder TNF, aber auch durch PAMPs; die Bildung von ROS wird als weiterer Stimulus diskutiert (Remijne et al. 2010). Die Erreger werden vom Chromatinnetz gebunden und von den im Netz befindlichen antimikrobiellen Proteinen getötet. Doch nicht nur der Erreger, sondern auch der Neutrophile ist nach diesem Vorgang tot (Mayadas et al. 2014).

Neben der Abwehr des Erregers gehört auch die Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems zur Aufgabe der Neutrophilen. So rekrutieren sie dendritische Zellen dadurch, dass verschiedene Inhalte ihrer Granula, unter anderem Lactoferrin, eine chemotaktische Wirkung haben. Die dendritischen Zellen fungieren dann als Antigen-präsentierende Zellen. (Yang et al. 2009). Auch die Reifung von NK-Zellen (Jaeger et al. 2012), die Phagozytose und Interleukinfreisetzung seitens der Makrophagen (Soehnlein et al. 2009), die Aktivierung und das Überleben von B-Zellen (Scapini et al. 2007) und die Differenzierung bestimmter T_H -Zellen (Abdallah et al. 2011) werden durch Neutrophile beeinflusst. Die Neutrophilen werden nach ihrem Wirken von Makrophagen phagozytiert. Die dabei von den Makrophagen aufgenommenen antimikrobiellen Proteine werden von dem Makrophagen für die Abwehr von Erregern, z.B. Mykobakterien, verwendet (Tan et al. 2008). Makrophagen bilden IL-23, welches eine Bildung und Freisetzung von IL17 aus T_{H17} -Zellen stimuliert. Letzteres erhöht wiederum

die G-CSF-Freisetzung und der Kreislauf beginnt wieder von vorne. Damit es zu keiner überschießenden Granulopoese kommt, hemmt die Neutrophilen-Phagozytose durch die Makrophagen die IL-23-Freisetzung und somit die IL-23-IL17-G-CSF-Achse (Stark et al. 2005). Dadurch wird ein Gleichgewicht zwischen Bildung und Abbau von Neutrophilen aufrechterhalten und einer überschießenden Immunreaktion wird entgegengewirkt.

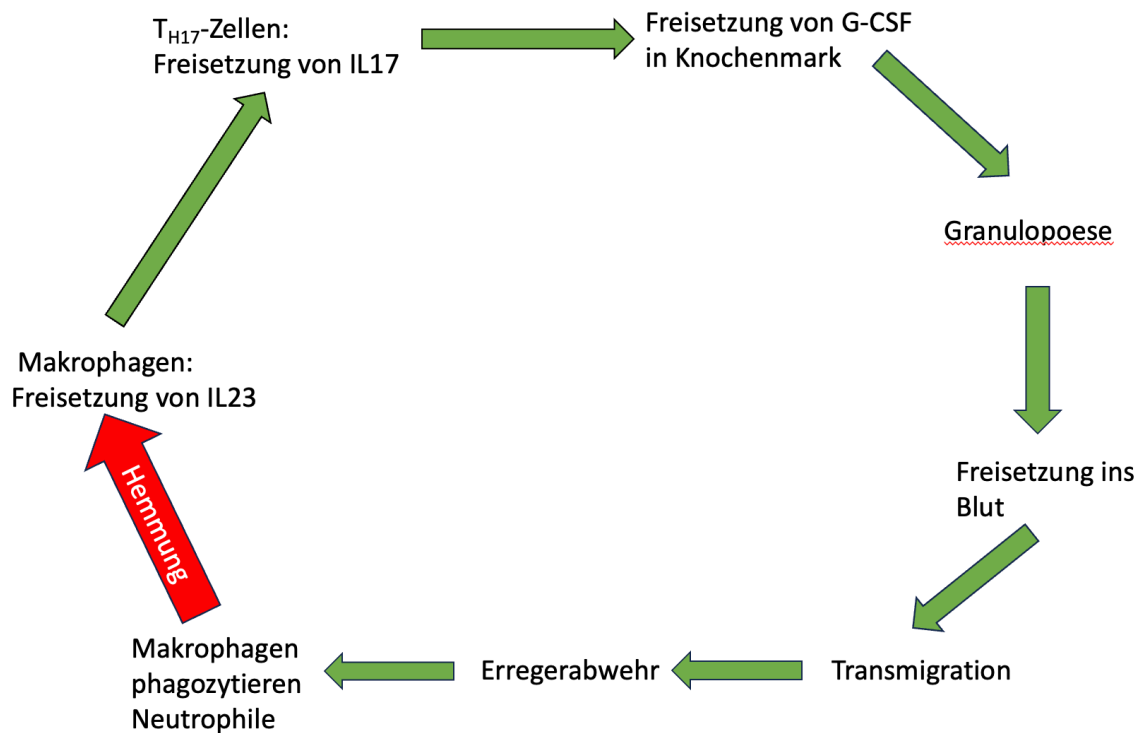


Abbildung 3: Homöostase der Granulopoese im Kontext der IL23-IL17-G-CSF-Achse

Nachdem die Neutrophilen ihren Beitrag zur Erregerabwehr geleistet haben, werden sie von Makrophagen phagozytiert. Makrophagen regulieren gemeinsam mit bestimmten T-Lymphozyten die G-CSF-Freisetzung und Granulopoese. Diese Achse wird wiederum gehemmt, wenn Makrophagen Neutrophile phagozytieren und ihre IL23-Freisetzung runterfahren. So wird eine Homöostase zwischen Neutrophilen-Abbau und -Neubildung aufrechterhalten.

Neutrophile sind nicht nur als eine der ersten Zellen am Ort der Infektion oder Entzündung und direkt an der Erregerabwehr beteiligt, sondern sie beeinflussen auch maßgeblich das spezifische Immunsystem.

So viel zu Neutrophilen für die Abwehr von Erregern. In den letzten Jahrzehnten hat sich jedoch abgezeichnet, dass Neutrophile viel mehr können, als Bakterien aus dem Verkehr zu ziehen. Sie haben maßgeblich Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf verschiedener Krankheiten. Und nur von einer Population an Neutrophilen zu sprechen, wird ihnen

keineswegs gerecht. Im Folgenden wird ein Blick auf die Bedeutung von Neutrophilen im Alter und ihre Bedeutung in der Kopf-Hals-Onkologie geworfen.

2.2 Neutrophile im Alter und Krankheit

Neutrophile Granulozyten haben eine Halbwertszeit von wenigen Stunden, bevor sie aus Blutgefäßen ins Gewebe gelangen (Yang et al. 2019). Im Laufe des Lebens eines Neutrophilen scheint sich sein Phänotyp zu ändern sowie die Expression verschiedener Proteine auf seiner Oberfläche, darunter CXCR4, das hochreguliert wird auf gealterten Neutrophilen, um so für den Abbau im Knochenmark markiert zu werden (Rankin 2010). Auch die Expression von L-Selektin (auch CD62L genannt) verändert sich und wird mit der Zeit weniger (Tanji-Matsuba et al. 1998). Nicht nur das Alter des Neutrophilen, sondern auch das Alter der Menschen scheint Einfluss auf den Phänotyp und allem voran auf die Funktionstüchtigkeit der Neutrophilen zu nehmen. Im hohen Alter ist die Wahrscheinlichkeit, an einer Infektionskrankheit zu erkranken und zu versterben höher (Miller 1996). Und selbst, wenn kein Erreger da ist, befindet sich der alte Mensch in einem chronischen Zustand der Entzündung mit erhöhten inflammatorischen Zytokinen und Akute-Phase-Proteinen (Ferucci et al. 2005).

Die Neutrophilenanzahl im Blut sowie das Vorkommen von Vorläufern im Knochenmark ist im Alter nicht vermindert, die G-CSF-vermittelte Proliferation möglicherweise nur ein wenig (Chatta et al. 1993). Was sich dafür verschlechtert, ist die Chemotaxis; die Neutrophilen lassen sich also schlechter anlocken (Van Avondt et al. 2023). Die Migration läuft ebenfalls langsamer und verschlechtert ab (Sapey et al. 2017). Diese verschlechtere Chemotaxis und Migration könnte in Tierversuchen mit Mäusen als Ursache für verschlechterte Wundheilung bei alten Mäusen als Erklärung dienen (Brubaker et al. 2014). Auch die Fähigkeit zur Phagozytose hat sich *in vitro* als vermindert gezeigt (Mege et al. 1988). Zudem mindert sich die Überlebensfähigkeit der Neutrophilen beim alten Menschen generell und die Verzögerung der Apoptose durch das Vorhandensein von bakteriellen Antigenen wie z.B. Lipopolysaccharide oder durch G-CSF nimmt ab (Kirkwood 1996).

Offenbar ist im Alter nicht nur die Reaktion der Neutrophilen auf Entzündungsreize vermindert, sondern auch die für sie typischen Fähigkeiten im Umgang mit Infektionen.

Das Alter beeinflusst die Neutrophilen, umgekehrt beeinflussen die Neutrophilen das Alter bzw. alterstypische Erkrankungen. Wie bereits erwähnt, häufen sich Infekte im hohen Alter und die Mortalität steigt. Diese verminderte Fähigkeit, adäquat auf Infekte oder Impfungen im Alter zu reagieren, wird Immunoseneszenz genannt (Crooke et al. 2013). Schon bei gesunden alten Patienten scheint eine verstärkte Einwanderung von Neutrophilen in die Lunge zu erfolgen und

in einer bronchoalveolären Lavage lassen sich eine signifikant größere Anzahl an Neutrophilen feststellen ohne gleichzeitige Erhöhung dieser im Blut (Pignatti et al. 2011).

Bei viralen oder bakteriellen Infekten ist dies ebenfalls der Fall (Menter et al. 2014) und es kommt unter anderem zu einer verstärkten Elastase-Freisetzung (Sapey et al. 2014), welche zu einer Schädigung von Epithel und Gefäßen in der Lunge führen kann (Domon et al. 2016). Zudem konnte in Mausversuchen gezeigt werden, dass bei pulmonalen Infekten bei jungen Mäusen ein Neutrophilen-Peak erreicht wird, welcher dann abfällt. Dieser Abfall und somit auch der Rückgang der Entzündung konnte in älteren Mäusen so nicht festgestellt werden und die Entfernung von Neutrophilen aus alten Mäusen im Verlauf konnte tatsächlich die Sterblichkeit dieser reduzieren (Kulkarni et al. 2019). Auch die NETose, die eigentlich der Erregerabwehr dient, kann hinderlich sein und erhöhte NETose-Marker im Blut stehen in Verbindung mit einer höheren 30-Tage-Sterblichkeit bei Pneumonien (Ebrahimi et al. 2018). Hier zeigt sich schon die Ambivalenz der Neutrophilen, die zwar Erreger aus dem Verkehr ziehen und somit elementar für eine Genesung sind, aber genauso Gewebe schädigen und die Prognose bei infektiösen Lungenerkrankungen verschlechtern können.

Neben akuten Infektionen beeinflussen Neutrophile auch chronisch-entzündliche und Autoimmunerkrankungen. So lassen sich bei chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Psoriasis Neutrophil-Thrombozyten-Komplexe finden, welche die Adhäsion der Neutrophilen ans Endothel und den NETose-Vorgang begünstigen (Herrero-Cervera et al. 2017). Bei rheumatoider Arthritis lassen sich Neutrophile als häufigste Zellpopulation in der Synovialflüssigkeit feststellen (Fu et al. 2021) und die bei der NETose freiwerdenden intrazellulären Antigene haben möglicherweise Einfluss auf die Entstehung von systemischem Lupus Erythematoses (Appelgren et al. 2018). Insbesondere sogenannte LDNs, Neutrophile mit einer geringeren Dichte, scheinen hier von Bedeutung zu sein (Tay et al. 2020).

Offenbar sind nicht alle Neutrophile gleich, sondern unterscheiden sich durch ihre Dichte, ihre Expression von Proteinen und dadurch auch durch ihren Einfluss auf verschiedene Erkrankungen. Im Folgenden soll ein genauerer Blick auf verschiedene Subsets der Neutrophilen und ihre Bedeutung für Karzinome, insbesondere HNSCC geworfen werden.

2.3 verschiedene Neutrophile Subsets und Proteine und ihre Bedeutung in Karzinomen

In den letzten Jahrzehnten haben sich die Neutrophilen zunehmend als heterogene Zellpopulation herauskristallisiert und es haben sich viele neue Erkenntnisse über ihre Beteiligungen an verschiedenen Erkrankungen ergeben.

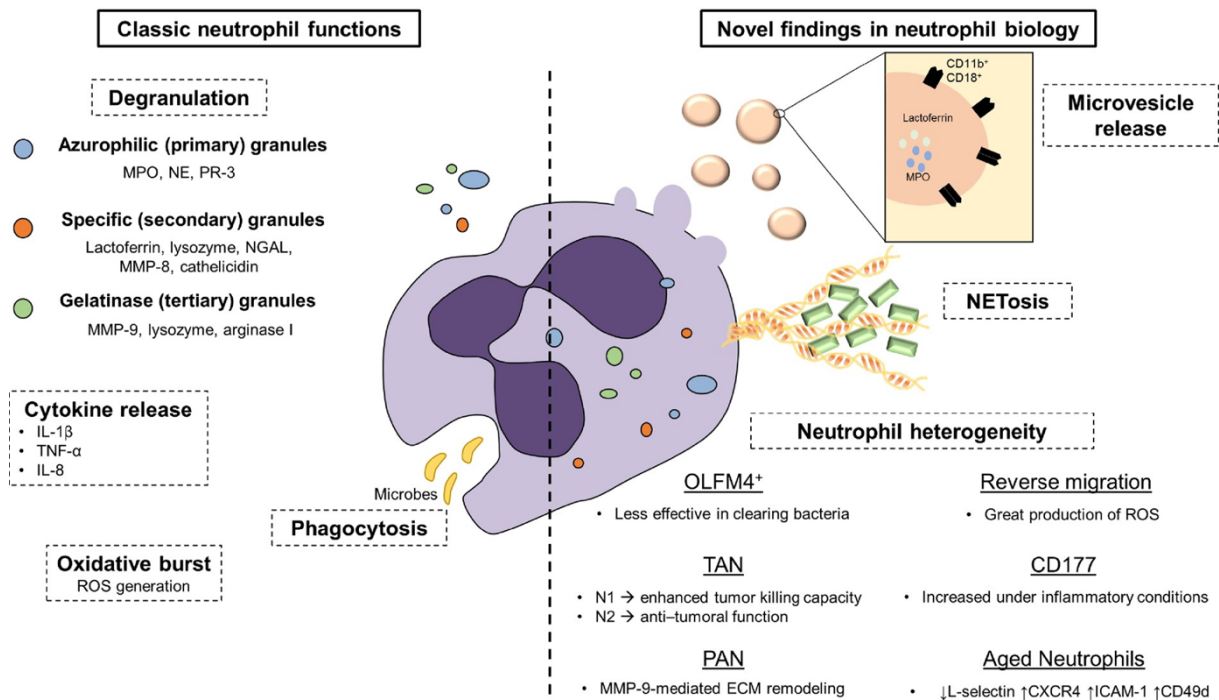


Abbildung 4 (Bonaventura et al. 2019): Überblick über klassische Funktionen und neue Erkenntnisse der Neutrophilen

Links werden die klassischen antibakteriellen Funktionen der Neutrophilen dargestellt. Rechts ist ein Überblick über „neue“ Abwehrmechanismen, NETose und Bildung von Mikrovesikeln und über die verschiedenen Subsets, darunter Tumor-assoziierte, die Angiogenese fördernde (PAN), OLFM4-positive und CD177-positive.

Es ist auch gezeigt worden, dass nicht nur das Alter für Veränderung des Neutrophilenphänotyps sorgt, sondern, dass auch schon bei der Granulopoese verschiedene Subsets differenziert werden können, dadurch dass sie verschiedene Proteine auf ihrer Oberfläche oder in ihren Granula tragen.

2.3.1 OLFM4-positive Neutrophile

Ein Subset ist charakterisiert durch das Vorhandensein von OLFM4, einem Glykoprotein innerhalb der Granulae, welches sich nur in ca. 25 Prozent der Neutrophilen finden lässt (Alder et al. 2019), obwohl die zugehörige mRNA in allen Myelozyten gefunden werden konnte, was nahelegen lässt, dass nach der Transkription Mechanismen greifen, die eine Expression verhindern (Clemmensen et al. 2012). Höhere Anteile OLFM4-positiver Zellen stehen im Zusammenhang mit einem höheren Risiko für Organversagen und Tod im Rahmen einer Sepsis (Alder et al. 2017) und in Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass OLFM4 Cathepsin C, eine Cysteinprotease, die wichtig für die Elimination von Bakterien ist, inhibiert und somit OLFM4-positive Neutrophile den negativen bei der Bakterienabwehr unterlegen sind (Liu et al. 2012). Offenbar lassen sich schon bei den neu entstandenen Neutrophilen Unterschiede beschreiben, die ihre Funktionstüchtigkeit beeinflussen. OLFM4 hat vor allem Einfluss auf die Erregerabwehr. Es ist auch ein anderes Subset bekannt, von dem bereits Einflüsse auf den Verlauf von infektiösen und malignen Entartungen bekannt sind, und zwar das CD177-Subset.

2.3.2 CD177- positive Neutrophile und das Killing von Tumorzellen

Ein weiteres Subset wird durch das Vorhandensein von CD177 charakterisiert. CD177 ist ein Glykoprotein, welches mittels GPI an der Außenseite des Neutrophilen verankert ist (Bai et al. 2017). Erstmals wurde es 1971 von Lalezari et al. beschrieben im Rahmen von Neutropenien bei Neugeborenen bedingt durch eine Bildung von Antikörpern durch die Mutter gegen CD177-positive Zellen des Kindes. Diese Immunreaktion kann dadurch erklärt werden, dass ein kleiner Anteil der Menschen keinerlei CD177-positive Neutrophile besitzt. Bei den anderen lassen sich zwei Populationen charakterisieren: CD177-positive und CD177-negative Neutrophile. Der Anteil der positiven schwankt hierbei von Person zu Person und liegt bei ca. 20 – 80 Prozent (Matsuo et al. 2000). Manche Spender haben auch keine positive Population. Der Anteil dieser beträgt ca. 6% (Eulenberg-Gustavus et al. 2017). Die Spannweite ist offenbar sehr weit und die Verteilung bleibt über das gesamte Leben hinweg gleich (Dahlstrand Rudin et al. 2021). Was sich jedoch ändern kann, ist die Expression des CD177 auf CD177-positiven Neutrophilen. Eine erhöhte Expression im Vergleich zu gesunden Probanden konnte bei Patienten mit schweren bakteriellen Infektionen, bei an Polycythemia vera erkrankten Patienten (Göhring et al. 2004), sowie bei Schwangeren gezeigt werden (Caruccio et al. 2003). CD177 ist nicht nur über einen GPI-Anker gebunden, sondern ist auch selbst ein Anker für

Proteinase 3, eine Serinprotease (Bauer et al. 2007), gegen welche im Rahmen von ANCA-assoziierten Vaskulitiden Antikörper gebildet werden. Diese Anti-PR3 können die CD177-positiven Neutrophilen aktivieren und eine Degranulation und Bildung von ROS bewirken (Jerke et al. 2011). Ein weiterer Proteinkomplex, der mit CD177 assoziiert ist, ist der MAC-1-Komplex bestehend aus CD11b und CD18. Wird dieser blockiert, kann keine Aktivierung durch Anti-PR3 erfolgen, was darauf schließen lässt, dass MAC-1 an diesem Prozess beteiligt ist (Jerke et al. 2011).

CD177 ist zudem dazu in der Lage, PECAM-1 auf der Oberfläche von Endothelzellen zu binden. *In vitro* konnte die PECAM-1-vermittelte Migration von CD177-pos. Neutrophilen durch eine Blockade von PECAM-1 vermindert werden (Bai et al. 2017). *In vivo* konnte jedoch kein Vorteil der CD177-positiven Neutrophilen bei der Migration in die Synovia oder das Peritoneum gezeigt werden (Bai et al. 2017).

Das CD177-Subset scheint Einfluss zu nehmen auf die Prognose von infektiösen Erkrankungen aber auch auf Karzinomkrankungen. Bei Covid-Erkrankungen konnten hohe CD177-Spiegel im Serum als Ausdruck einer Neutrophilen-Aktivierung mit einem schwereren Verlauf und schlechterer Prognose in Verbindung gebracht werden (Levy et al. 2021). Bei Karzinomen hingegen scheint CD177 förderlich zu sein.

Im Vorfeld wurde bereits das TME thematisiert, welches unter anderem aus Tumor-assoziierten Fibroblasten besteht. Diese tragen auf ihrer Oberfläche den PDPN, einen Rezeptor, dessen Aktivierung zu einer Proliferation der Fibroblasten führt und das Tumorwachstum fördert. Das Vorhandensein von PDPN im TME erschwert möglicherweise durch eine verstärkte Kontraktilität von Aktinfasern das Einwandern von Lymphozyten und somit auch die Bekämpfung des Tumors. CD177 scheint ein funktioneller Antagonist gegen das PDPN zu sein und könnte auf die Fibroblasten-Proliferation und Ausbildung des TMEs Einfluss haben. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine hohe PDPN-Expression im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose steht. Die CD177-PDPN-Interaktion könnte also als Ansatz für neue Therapien dienen (Astarita et al. 2021). Ein positiver Einfluss des Subsets konnte schon beim Mamma-Karzinom gezeigt werden; CD177 steht in Verbindung mit einer besseren Prognose, geringerem Rezidivrisiko und seltenerer Metastasierung. Dabei hemmt das CD177-Subset die Transkription von Beta-Catenin, welches selbst Einfluss auf die Proliferation von Epithelzellen nimmt (Kluz et al. 2020). Das Fehlen von CD177 in Magen-Kolon-, und Cervixkarzinomen steht im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose (Dalerba et al. 2011; Toyoda et al. 2013; Liao et al. 2023). Kaneko et al. konnten im Jahr 2022 zeigen, dass sich bei HPV-positiven HNSCC das TME der Rezidive von dem der Primärtumoren unterscheidet. Im TME der Rezidive konnten mehr Tumor-assoziierte Fibroblasten, Extrazellulärmatrix sowie Neutrophile gefunden werden. Gleichzeitig konnten in

den Rezidiven mehr CD177-positive Neutrophile gefunden werden. Was genau dies bedeutet, ist noch nicht abschließend geklärt, genauso wenig wie Bedeutung des Subsets.

Was jedoch bereits geklärt ist, ist die Tatsache, dass Neutrophile dazu in der Lage sind, unter anderem Antikörper-vermittelt, Tumorzellen zu töten. Dies kann über verschiedene Wege geschehen: Über die Aktivierung von Todesrezeptoren, Phagozytose, Trogozytose und Freisetzung von zytotoxischen Proteinen und ROS.

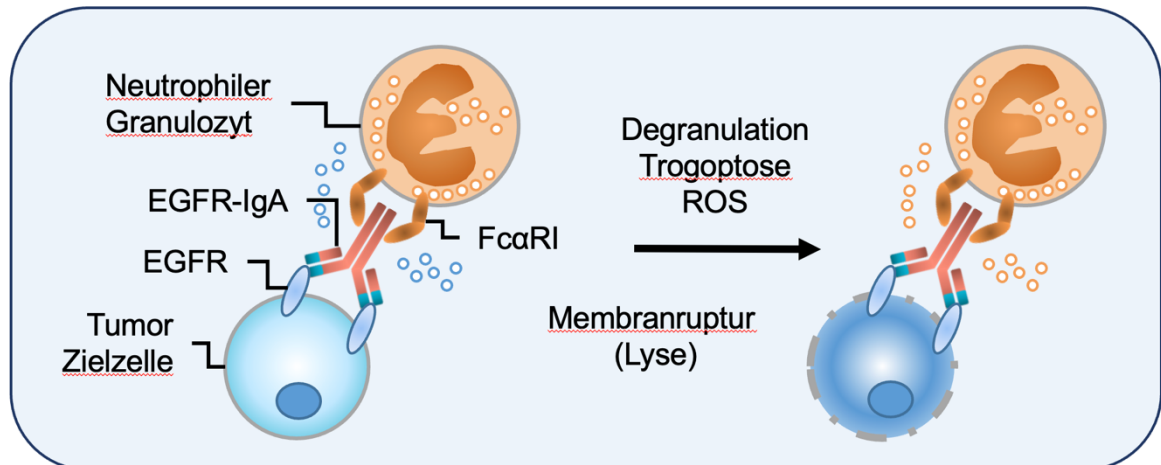


Abbildung 5: Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität führt zur Lyse der Tumorzelle

Auf der Oberfläche von Neutrophilen finden sich FAS-Liganden sowie TNF-assoziierte, Apoptose-induzierende Liganden, auch TRAIL genannt, welche FAS-Rezeptoren, bzw. TRAIL-Rezeptoren auf der Tumorzelloberfläche aktivieren, was zur Apoptose der Tumorzelle führt. Die TRAIL-Expression wird dabei durch IFN γ erhöht (Sun et al. 2018; Kamohara et al. 2004). Dieser Prozess ist nicht auf Antikörper angewiesen. Die anderen drei Mechanismen, also die Phagozytose, Trogozytose und Freisetzung von zytotoxischen Proteinen und ROS (auch ADCC genannt) hingegen schon.

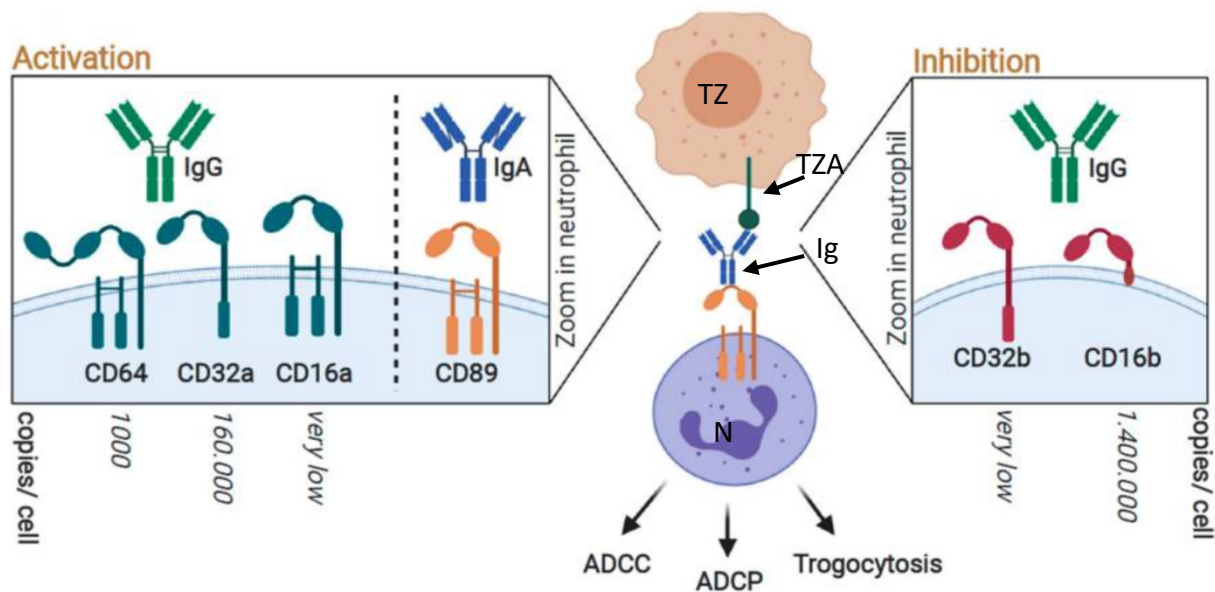


Abbildung 6 (modifiziert nach Ustyanovska Avtenyuk et al. 2020): Immunologische Synapse und Tötung der Tumorzelle

Nach Ausbildung einer Antikörper-vermittelten immunologischen Synapse kann der Neutrophile die Tumorzelle über drei verschiedene Wege aus dem Verkehr ziehen: ADCC, ADCP oder Trophocytose. Der Antikörper ist entweder ein IgA oder ein IgG, der dann an CD89 bzw. CD64, CD32a oder CD16a bindet. Die Bindung vom F_c-Teil des IgG an CD32b oder CD16b hat eine hemmende Wirkung. (TZ=Tumorzelle; TZA = Tumorzellantigen; Ig=Immunglobulin)

Bei der ADCC kommt es zur Bildung von ROS und zur Freisetzung verschiedener Enzyme, darunter Elastase, Cathepsine, Lactoferrin und andere, wodurch dann die Tumorzelle eliminiert wird. Bei der Phagozytose kommt es zur Internalisierung der Tumorzelle und Verschmelzung des Phagosoms mit Granula und bei der Trophocytose zu einer Schädigung der Zellmembran der Tumorzelle (Ustyanovska Avtenyuk et al. 2020).

Die Maschinerie, die eingangs im Rahmen der unspezifischen Abwehr von bakteriellen Erregern erwähnt wurde, ist offenbar auch für den direkten Untergang von Tumorzellen von Bedeutung. Damit diese Prozesse suffizient stattfinden können, benötigt es einen Antikörper, welcher die Tumorzelle opsoniert. Gleichzeitig bindet der Neutrophile den F_c-Teil des Antikörpers, was im Inneren des Neutrophilen ITAM-Domains aktiviert und Signalkaskaden auslöst, um eben erwähnte Prozesse in Gangzusetzen (siehe Abb. 6) (Ustyanovska Avtenyuk et al. 2020). Diese Interaktion zwischen einer Immun- und einer Zielzelle wird auch immunologische Synapse genannt. Häufig findet dieser Begriff Anwendung, um die Interaktion zwischen T-Lymphozyt und Zielzelle zu beschreiben (Alarcón et al. 2011). Die Bildung der immunologischen Synapse und somit auch die ADCC kann IgA- und IgG-vermittelt erfolgen, wobei IgA überlegen ist (Brandsma et al. 2019). Ein verstärktes Killing von IgA im Vergleich zu IgG im Rahmen der ADCC *in vivo* konnte bereits bei EGFR-exprimierenden Tumoren

festgestellt werden (Boross et al. 2013). Mit der EGFR-Bindungs-fähigkeit hat dies jedoch nichts zu tun, denn bei dieser sind IgA und IgG gleichwertig (Dechant et al. 2007).

Wodurch sich die beiden Antikörperklassen unterscheiden, ist die Bindungsstelle am Neutrophilen. IgA bindet an CD89, auch FcαRI genannt (Morton et al. 2001), wohingegen IgG insbesondere an CD32a bindet. Letzteres ist im Vergleich zu CD89 doppelt so stark an der Neutrophilenoberfläche exprimiert (Brandsma et al. 2019). Das widerspricht dem besseren IgA-Killing. Für das IgA spricht jedoch eine höhere Affinität zu CD89 als beim IgG zu CD32a (Mazengera et al. 1990; Bruhns et al. 2009) und eine andere Stöchiometrie. Ein IgG bindet an einen F_C-Rezeptor. Diess Verhältnis zwischen Antikörper und F_C-Rezeptor ist bei IgA ein anderes. Hier binden zwei Antikörper an einen F_C-Rezeptor (Herr et al. 2003). Aus dem anderen Bindungsverhältnis folgt auch ein stärkeres intrazelluläres Signaling, dadurch, dass IgA-vermittelt vier ITAM-Domains aktiviert werden, IgG-vermittelt hingegen nur eine (siehe Abb. 7). Die Bindung des IgAs an FcαRI führt zusätzlich zu einer Freisetzung von Leukotrien B₄ (LTB₄) seitens der Neutrophilen, was wiederum weitere Neutrophile anlockt und die Migration dieser verstärkt (Van der Steen et al. 2009; Valcenko et al. 2024).

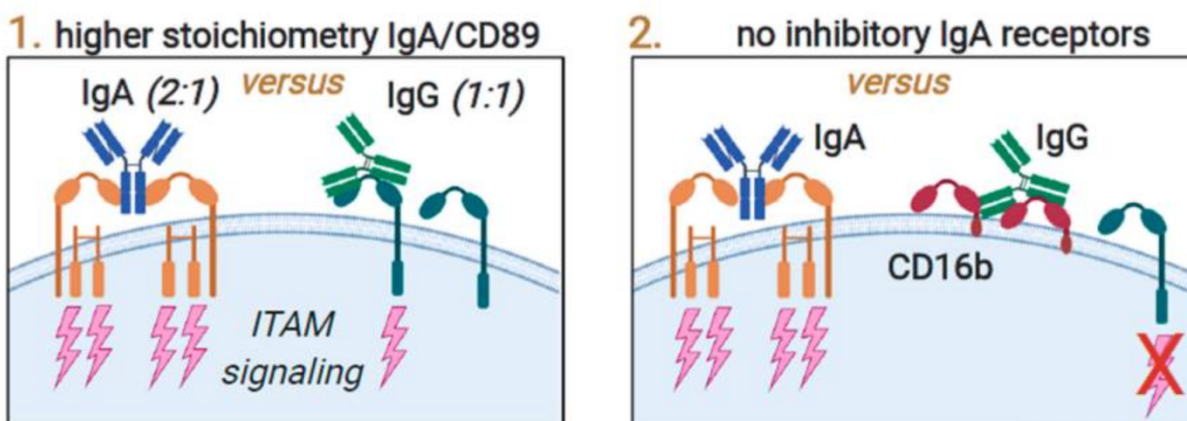


Abbildung 7: Ig-Signaling am Neutrophilen, IgA und IgG im Vergleich (aus Ustyanovska Avtenyuk et al. 2020)

- 1) IgA bindet im 2:1-Verhältnis an CD89, IgG im 1:1-Verhältnis an CD32a. Im Neutrophilen werden IgA-vermittelt vier ITAM-Domains aktiviert, bei IgG nur eine.
- 2) An der Neutrophilenoberfläche sind Proteine, die das IgG-vermittelte Signaling hemmen. Diese gibt es beim IgA-vermittelten Weg nicht.

Für den IgG-vermittelten Weg ist zudem CD16b als inhibitorisches Protein an der Neutrophilenoberfläche bekannt. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass ein Blockieren von CD16b für eine verbesserte IgG-vermittelte ADCC gesorgt hat (Treffers et al. 2018).

Auch innerhalb der Ig-Klassen gibt es Unterschiede. IgA₁ hat eine neunmal höhere Konzentration als IgA₂ im Serum (Ustyanovska Avtenyuk et al. 2020), dafür hat IgA₂ eine höhere Affinität zu CD89 (Steffen et al. 2020) und passend dazu konnte gezeigt werden, dass

IgA₂ besser dazu in der Lage ist, Neutrophile zu aktivieren (Dechant et al. 2007). Weitere Unterschiede innerhalb der Ig-Klassen können der Literatur entnommen werden. Ein wesentlicher Unterschied zwischen IgA und IgG ist die Halbwertszeit im Serum. Diese ist beim IgA signifikant niedriger (Morell et al. 1973).

Zusammengefasst: IgA ist dem IgG bei der Aktivierung der Neutrophilen und somit auch beim Herbeiführen einer ADCC überlegen, hat aber eine geringere Halbwertszeit.

Für die Ausbildung der immunologischen Synapse scheint der bereits erwähnte MAC-1-Komplex von Nöten zu sein. Fehlt MAC-1 oder wird es blockiert, so ist die Zytotoxizität der Neutrophilen gegen Tumorzellen herabgesetzt (Spriel et al. 2001). Eine Verbindung zwischen MAC-1 und CD177 scheint wie bereits erwähnt auch zu bestehen. So besteht zwischen diesen eine räumliche Assoziation und ein Signaling, wobei noch nicht abschließend geklärt ist, wie genau dieses abläuft. Erwähnenswert ist hierbei, dass CD177 kein Transmembranprotein ist, selbst nur an der Neutrophilenoberfläche vorhanden ist und somit keine direkte Verbindung ins Innere der Neutrophilen hat. Außerdem ist nicht zu vergessen, dass CD177 ein Anker für Proteinase-3 ist (Jerke et al. 2011). In dieser Interaktion zwischen dem F_C-Rezeptor und dem MAC-1-Komplex und in der Interaktion zwischen dem MAC-1-Komplex und CD177 stecken möglicherweise Erklärungsansätze dafür, dass CD177 bei Karzinomen mit einer besseren Prognose in Verbindung steht.

2.3.3 CD147

Ein weiteres Protein, das Einfluss auf Karzinome nimmt und sich unter anderem auf der Neutrophilenoberfläche finden lässt, ist CD147. Es wird auch Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) genannt, weil es unter anderem Matrix-Metallo-Proteasen stimuliert (Biswas et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass CD147 Einfluss auf das TME hat. Die Aktivierung von MMPs scheint hierbei bedeutend für die Zerstörung von Extrazellulärmatrix und somit für die Tumorzellinvasion und Metastasierung zu sein (Landras et al. 2019). So konnten Liu et al. im Jahr 2013 zeigen, dass sowohl die Expression von CD147 als auch von MMP9 mit der Prognose von Brustkrebs in Verbindung gesetzt werden konnten. Neben der Expression von MMPs beeinflusst CD147 auch die Expression von VEGF in TMEs, was die Angiogenese fördert (Tang et al. 2005).

Für Tumorzellen ist die Glukoseaufnahme und die Glykolyse von großer Bedeutung, was in PET-Scans ersichtlich wird, in welchen diese besonders viel Glucose aufnehmen (Hanahan et al. 2011). Bei der anaeroben Glykolyse fällt Laktat an, welches dann von Laktat-Transportern, sogenannten MCTs, aus der Zelle in den Extrazellulärraum transportiert wird. CD147 beeinflusst die Faltstruktur bestimmter MCTs, vor allem MCT1 und MCT4 (Kirk et al. 2000), und beeinflusst somit den Abtransport von Laktat, das bei der anaeroben Glykolyse anfällt (Le

Floch et al. 2011), was von Bedeutung für das Tumorstadium und für die Entstehung eines sauren Milieus im TME ist (Walters et al. 2013).

Dieses für das TME bedeutsame CD147 lässt sich auf der Oberfläche von Neutrophilen finden (Wang et al. 2011), kann aber auch in seiner löslichen Form von Zellen sezerniert werden. Auch die lösliche Form von CD147 scheint den Verlauf von Krebserkrankungen negativ beeinflussen zu können und ist möglicherweise ein prognostischer Marker bei Brust- und Leberkarzinomen (Kuang et al. 2018; Lee et al. 2016).

2.3.4 Don't eat me und SIRP α

Tumorzellen können wie bereits erwähnt von Neutrophilen aus dem Verkehr gezogen werden, sind aber auch dazu in der Lage, sich dem Immunsystem zu entziehen. Hierfür exprimieren sie unter anderem CD47 (nicht zu verwechseln mit CD147/EMMPRIN). Dieses lässt sich sowohl in gesundem Gewebe als auch in Tumorgewebe finden, in letzterem mit einer verstärkten Expression (Majeti et al. 2009). Der Interaktionspartner ist das SIRP α , auch CD172a genannt. Dieses lässt sich unter anderem auf Makrophagen und Neutrophilen finden (Logtenberg et al. 2020).

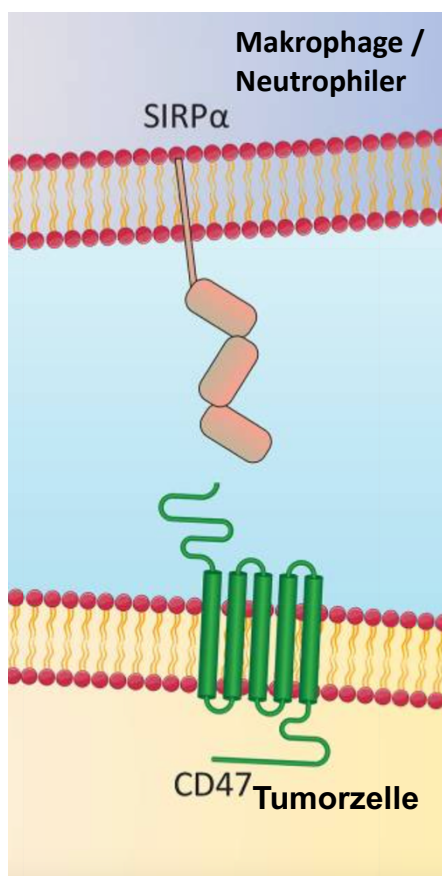


Abbildung 8: “Don’t eat me”-Interaktion zwischen einer Immun- und Tumorzelle (modifiziert nach Khalaji et al. 2023)

Bindet CD47 der Tumorzelle an das SIRP-Alpha der Makrophage/des Neutrophilen, so wird eine Abwehr der Tumorzelle durch die Immunzelle verhindert.

Durch die CD47-SIRP α -Achse (Abb. 7) wird verhindert, dass zuvor bereits erklärte Abwehrmechanismen des Neutrophilen zum Greifen kommen, sodass die Tumorzelle nicht aus dem Verkehr gezogen wird. Tumorzellen sind unter Umständen also dazu in der Lage, Immunzellen „auszuschalten“. Dies könnte als Ansatzpunkt für neue Therapien dienen mit Medikamenten, die als Checkpoint-Inhibitoren diese Interaktion verhindern. Hierbei gibt es sogar Anhaltspunkte dafür, dass eine Blockade dieser Interaktion sogar positive Einflüsse auf T-Zell-vermitteltes Tumor-Killing hat (Matlung et al. 2017). Offenbar wird die Funktion der Neutrophilen maßgeblich durch den Kontakt mit Tumorzellen, aber auch mit dem TME beeinflusst.

2.3.5 Neutrophile im TME

Wie bereits erwähnt, können Neutrophile als N1-Neutrophile mit Tumor-hemmender oder als N2-Neutrophile mit immunsuppressiver und Tumor-fördernder Wirkung vorliegen. Doch bevor es zu dieser Polarisation kommen kann, müssen die Neutrophilen das TME erstmal erreichen. Hierfür sind fast alle Tumorarten dazu in der Lage, chemotaktisch wirksame Chemokine zu bilden, darunter zum Beispiel IL-8 (Schaidler et al. 2003), welches *in vitro* auch als wichtiger Faktor für das Tumorstadium und die Angiogenese ausfindig gemacht werden konnte (De Larco et al. 2004).

Beim HNSCC konnte diese Tumordinfiltration mit dem Tumorstadium korreliert werden. Tumoren mit T4 haben eine mittlere bis hohe Infiltration mit Neutrophilen, wohingegen in kleineren Tumoren eine geringere Infiltration erfolgt. Das Ausmaß der Infiltration konnte mit schlechterer Prognose in Verbindung gesetzt werden, und stellt somit einen negativen prognostischen Marker dar. *In vitro* konnte zudem gezeigt werden, dass die Neutrophilen, die Kontakt zum HNSCC hatten, stärker und vergleichsweise unkoordiniert migrieren, in Gegenwart des HNSCCs eine längere Überlebensdauer haben und verstärkt Lactoferrin und MMP9 freisetzen (Trellakis et al. 2011). Für bakterielle Entzündungen förderliche, ältere CXCR4^{high}CD62L^{low}-Neutrophile fördern die Tumorausbreitung und die Metastasierung insbesondere durch verstärkte NETose, aber auch durch die Freisetzung von ROS und Metalloproteasen (insbesondere MMP9). Metastasen von Brustkrebs und vom Melanom in die Leber werden durch gealterte Neutrophile und insbesondere durch die NETose dieser begünstigt (Peng et al. 2021).

Neutrophilen-Proteasen sind bedeutsam für das TME durch Veränderung der Extrazellulärmatrix für die Tumormigration, Angiogenese und Metastasierung. Auf der Neutrophilenoberfläche lässt sich ADAM8 finden (Gomez-Gavero et al. 2007). Auch auf HNSCC wird ADAM8 exprimiert, wobei höhere Expressionen mit einer schlechteren Prognose korreliert werden konnten (Zielinski et al. 2012). Bei ADAM10 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es zumindest auf OSCC verstärkt exprimiert wird (Jones et al. 2013). ADAM10 wird

zudem auf Endothel exprimiert, wo es durch die Spaltung von ICAM-1 die transendotheliale Migration von Neutrophilen beeinflusst (Morsing et al. 2021). In der Literatur finden sich somit zunehmend Hinweise für eine kritische Beteiligung der ADAM-Proteasen am Migrationsverhalten neutrophiler Granulozyten ins TME.

Welche Polarisation der Neutrophilen dann erfolgt, scheint dann von den Zytokinen abzuhängen, die auf die Neutrophilen einwirken. TGF-Beta und INF-Beta haben hierbei gegenteilige Wirkungen (siehe Abb. 9).

Vermittelt durch IFN-Beta werden die Neutrophilen zu N1 polarisiert. Diese sind dann dazu in der Lage, wie bereits erwähnt, über direkte Wege die Tumorzellen zu töten (Yan et al. 2014) und beeinflussen zudem andere Bestandteile des Immunsystems, darunter NK-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen sowie B- und T-Zellen (Mantovani et al. 2011). Singhal et al. konnten 2017 zeigen, dass in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen Neutrophile im TME unter dem Einfluss von IFN- γ und GM-CSF zu Hybridzellen reifen können, welche zusätzlich Antigene präsentieren und somit Lymphozyten aktivieren können. Der Anteil dieser Hybridzellen an der Neutrophilenpopulation schien in größeren Tumoren kleiner zu sein, was zum Verdacht führte, dass eine Hypoxie hemmende Effekte auf die Entwicklung der Hybridzellen haben könnte. *In vitro* konnte tatsächlich gezeigt werden, dass sich unter Sauerstoffmangel weniger Neutrophile zu solchen Hybridzellen entwickeln. Auch konnte gezeigt werden, dass bei sehr hohen Konzentrationen an IFN- γ (> 1ng/ml) die Neutrophilen PD-L1 exprimieren und dadurch eine T-Zell-hemmende Wirkung bekamen.

Bei kleinen Tumoren und dem Einfluss bestimmter Chemokine in moderaten Konzentrationen wird zumindest *in vitro* die Entstehung eines Tumorzell-abwehrenden Phänotyps gefördert, bei großen Tumoren mit daraus folgender Hypoxie und hohen Konzentrationen bestimmter Chemokine supprimieren die Neutrophilen eher das Immunsystem. Dies lässt verlauten, dass mit zunehmendem Tumorstadium möglicherweise ein Wechsel der Neutrophilenfunktion erfolgt.

Die Hemmung von Lymphozyten erfolgt nicht nur über die PD-1/PD-L1-Achse, sondern auch dadurch, dass N2 Arginase 1 freisetzen können, welches die Lymphozytenproliferation hemmt (Masucci et al. 2019).

Neben der Arginase 1 konnte auch dem Protein LOX1 eine immunsupprimierende Wirkung nachgewiesen werden. Dieses lässt sich bei gesunden Spendern auf den Neutrophilen kaum nachweisen, bei Krebspatienten hingegen schon, und das insbesondere auf den Neutrophilen im Tumorgewebe (bis zu 50% aller Neutrophilen) (Condamine et al. 2016), was ebenfalls daran denken lässt, dass erst durch den Kontakt mit dem Tumor die Neutrophilen ihren Phänotyp ändern und immunsupprimierende Fähigkeiten erlangen.

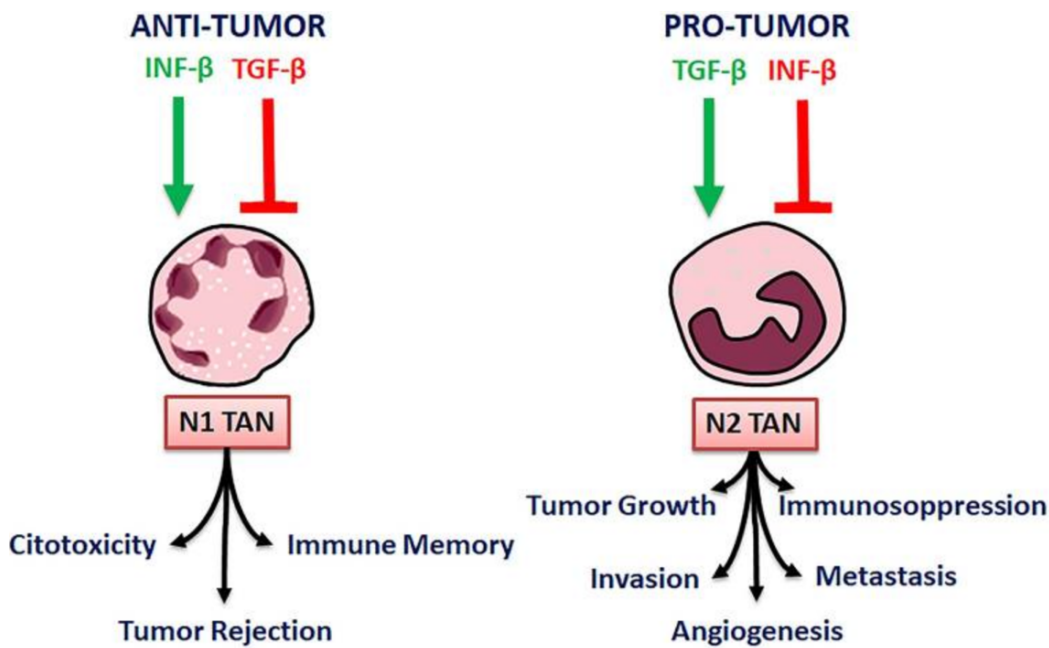


Abbildung 9: Einfluss der Zytokine INF-Beta und TGF-Beta auf die Polarisation von Neutrophilen (aus Masucci et al. 2019)

INF-Beta fördert die N1-Entstehung und hemmt die N2-Entstehung. Für TGF-Beta verhält es sich umgekehrt.

Neben einer immunsupprimierenden Wirkung können N2 auch Einfluss auf das Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung nehmen. So konnte festgestellt werden, dass das Wachstum des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms durch eine direkte Interaktion der Tumorzellen mit Neutrophilen vorangetrieben wird (Hattar et al. 2014). Die Freisetzung von Matrix-Metalloproteasen, insbesondere MMP9, durch die Neutrophilen in die Extrazellulärmatrix des TME ist ein Stimulus für die Angiogenese (Ardi et al. 2007). Das Fehlen der Neutrophilen und somit auch des MMP9 führt in Mausmodellen zu einer verminderten Aktivierung des VEGF-Rezeptors durch VEGF, was die Bedeutung von Neutrophilen für die Angiogenese unterstreicht (Nozawa et al. 2006). Durch die Zerstörung der Extrazellulärmatrix fördern die Neutrophilen zudem die Gewebsinvasion der Tumorzellen und somit auch die Metastasierung dieser (Liang et al. 2016).

Neutrophile können also das Tumorwachstum direkt inhibieren und das Immunsystem bei der Tumorabwehr unterstützen, aber auch das Tumorwachstum fördern und das Immunsystem supprimieren. Diese Ambivalenz und daraus folgende Therapieansätze könnten ein Schlüssel für die Immuntherapie bei Karzinomen und insbesondere HNSCCs sein.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war ein besseres Verständnis von Neutrophilen im Kontext von HNSCCs und der Bedeutung der Neutrophilen für die Therapie dieser. Hierfür wurde Blut von HNSCC-Spendern entnommen und die peripheren Neutrophilen ohne Zeitverzögerung direkt aus dem Blut isoliert. Als Isolationsmethode wurde die MACS-Methode verwendet, welche ermöglichte, dass möglichst alle im Blut vorhandenen Neutrophilen isoliert wurden, unabhängig von unter anderem der Dichte und somit kein Isolations- und Aufreinigungs-bedingter Subset-Bias entstand und die Funktion der Neutrophilen möglichst unbeeinflusst blieb.

Der Fokus der Arbeit lag dabei darauf, erstmalig die ADCC-Fähigkeit dieser möglichst durch die Isolation und Aufreinigung unbeeinflussten Neutrophilen von HNSCC-Spendern zu untersuchen, nicht nur mit dem bereits klinisch erprobten IgG Panitumumab, sondern auch mit einem neu entwickeltem IgA2.0. Zudem sollte ein Augenmerk auf potenzielle Änderungen der Expression bestimmter Proteine an der Neutrophilenoberfläche geworfen werden.

In Hinblick auf den Phänotyp der Neutrophilen sollte eine differenzierte Betrachtung der CD177-positiven und -negativen Neutrophilen erfolgen, sowohl bei kranken als auch bei gesunden Spendern.

Folgende Fragestellungen wurden in dieser Arbeit beleuchtet:

1. Unterscheidet sich die Fähigkeit der Neutrophilen von HNSCC-Spendern und gesunden Spendern ADCC zu vermitteln? Welche Patienten-Charakteristika und Krankheitsstadien beeinflussen dies?
2. Lässt sich die bei neutrophilen Granulozyten gesunder Spender nachgewiesene Überlegenheit der IgA-vermittelten ADCC gegenüber Panitumumab auch bei neutrophilen Granulozyten von Patienten mit HNSCC beobachten? Welche Rolle spielt der eingesetzte Antikörpertyp für das Ausmaß der durch Neutrophile vermittelten ADCC?
3. Gibt es innerhalb der HNSCC-Kohorte Zusammenhänge zwischen der ADCC und weiteren Faktoren, darunter Geschlecht, Alter, Tumorstadium, Lymphknotenstatus?

4. Unterscheiden sich die Neutrophilen der kranken Spender von denen der gesunden in Hinblick auf die Expression der untersuchten Proteine? Gibt es Unterschiede zwischen den CD177-Subsets? Lassen sich bei den HNSCC-Patienten Unterschiede der Expression feststellen abhängig vom Geschlecht, Alter, Tumorstadium, Lymphknotenstadium?

3. Materialien und Methoden

3.1 Material- und Chemikalienliste

Tabelle 1: Material- und Chemikalienliste

Material	Hersteller
MACSxpress® Whole Blood Neutrophil Isolation Kit human	Milteny Biotec, Düsseldorf
Natrium-Citrat-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Ficolite-H, sterile filtered density 1.0770g/mL	Linaris Manfred Decker
Falcons 50ml und 15ml	PerkinElmer
Pipettenspitzen 1µl, 10µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen 5ml	Sarstedt, Nümbrecht
96-well Platte mit V-Boden	SigmaTM-Aldrich, Steinheim
E-Plate® mit 96 wells	Agilent, Waldbronn
A431 (humane Plattenepithelkarzinomzelllinie)	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH (DSMZ), 2018
BSA	SigmaTM-Aldrich, Steinheim
dH ₂ O	B. Braun, Melsungen
EtOH	Carl Roth, Karlsruhe
Ficoll (density: 1,077 g/ml, PANcoll)	PAN-Biotech, Aidenbach
FCS/FKS	GibcoTM, Karlsruhe
IgG from human serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
KCl	Grüssing GmbH, Filsum
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaAzid	Merck, Darmstadt
NaCl	VWR, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	J.T. Baker Chemiclax B.V., Niederlande
Natriumpyruvat (100 nM)	SigmaTM-Aldrich, Steinheim
1x PBS (DPBS = Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	PAN-Biotech, Aidenbach
Penicillin-Streptomycin (1000 U/ml, 10 mg/ml)	SigmaTM-Aldrich, Steinheim
PFA	SigmaTM-Aldrich, Steinheim
RPMI-1640 Medium	SigmaTM-Aldrich, Steinheim

Triton®X-100	formolucularbiology AppliChem, Darmstadt
Trypanblau	Sigma™-Aldrich, Steinheim
TrypLE™ Express (1x Trypsin)	Gibco™, Karlsruhe
Tween® 20 (Polysorbat)	Carl Roth, Karlsruhe

3.2 Lösungen

10x PBS (pH 7,2)

- 80g NaCl
- 2g KCl
- 18,7g NaH₂PO₄
- 2g KH₂PO₄
- auffüllen auf 1000ml mit dest. H₂O

FACS-Puffer

- 500ml 1x PBS
- 5g (1%) BSA
- 500mg (0,1%) NaAzid

FACS-FIX

- 1% PFA in 1x PBS

R10+/+ Medium

- 10 % FCS (inaktiviert durch Hitzeeinwirkung von 56 °C für 30 min)
- 1% Natriumpyruvatlösung (100mM)
- 1% Penicillin-Streptomycin (1000U/ml, 10mg/ml)
- RPMI-1640 Medium

Poly-IgG

- 20% Poly-IgG
- 80% DPBS

Antikörper-Lösungen fürs FACS

- 1 zu 10 Verdünnung der Antikörper, z.B. jeweils 10µl der Fluoreszenz-Antikörper auffüllen auf 100µl mit 1x PBS (siehe Kap. 2.7)

3.3 Antikörper

Tabelle 2: Primäre monoklonale Antikörper fürs FACS (entnommen aus Valcenko et al. 2024)

Antigen	Alias	Fluoreszenzkanal	Hersteller	Hersteller-ID	RRID
Isotyp-Kontrolle	-	PE	BD Biosciences	555,749	AB_396091
Isotyp-Kontrolle	-	APC	BD Biosciences	555,751	AB_398613
Isotyp-Kontrolle	-	BV421	Biolegend	400,259	AB_10895919
CD66b	CECAM8	BV421	Biolegend	392,916	-
CD177	NB1	APC	Biolegend	315,808	AB_2565214
CD177	NB1	PE	Biolegend	315,805	AB_2564280
CD89	FcαRI	PerCPCy5.5	Biolegend	354,109	AB_2565474
CD147	EMMPRI N	PE	Biolegend	306,211	AB_2750167
CD172a	SIRPα	PE	Biolegend	372,105	AB_2650862
CD18	MAC-1	PE	Biolegend	373,407	AB_2716023
CD11b	MAC-1	PerCPCy5.5	Biolegend	101,227	AB_893233
CD156a	ADAM8	PE	Miltenyi	130–131-086	-
CD156c	ADAM10	APC	Biolegend	352,705	AB_2563172
CD54	ICAM1	APC	Biolegend	353,111	AB_10917389
CD184	CXCR4	PE	Biolegend	306,505	AB_314611
CD62L	L-Selekin	APC	Biolegend	385,105	AB_3097359

Antikörper für ADCC

- IgA2.0 als optimierter monomerer EGFR-spezifischer IgA2m1 Antikörper (Lohse et al. 2016); die Herstellung erfolgt in der Arbeitsgruppe mit Hilfe des ExpiCHO-Produktionssystems (Lohse et al. 2011)
- IgA Standard: ChromPure Human SerumIgA, IgA2.0 isotype control: ChromPure Human Serum IgA, whole Molecule (Code 009- 000-011 RRID: B_2337047)
- Panitumumab / Vectibix Amgen (PZN: 06078606)
- IgG Standard human myelome IgG1 (Meridian life science Catnr: A50183H)

3.4 Geräteliste

Tabelle 3: Geräteliste

Gerät	Hersteller
FACSCanto™II	BD Biosciences, Heidelberg
Heraeus Megafuge 16R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubator Heracell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer IKAMAG® RET	IKA-Labortechnik, Staufen
Mehrfachdispenser	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Leica DM 6000 B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Kolbenhubpipetten Pipetman	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences, Biebertal
Sicherheitswerkbank Heraeus LaminAir® HLB 2448 GS	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortexer Vortexgenie 2	Scientific Industries, Bohemia USA
Waage SI-2002	Denver Instrument, Göttingen

3.5 verwendete Software

Tabelle 4: verwendete Software

Software	Hersteller
BD FACSDivaTM 8.4.3	BD Biosciences, Heidelberg
RTCA Software Pro	Agilent, Waldbronn
Excel 2016	Microsoft Corporation, USA
GraphPad Prism 10.1.1	GraphPadSoftware, La Jolla ,USA

3.6 Isolation der neutrophilen Granulozyten

Als Spender wurden sowohl Patienten mit einem HNSCC als auch gesunde Spender hinzugezogen.

Die Verwendung des Blutes sowohl der erkrankten als auch der gesunden Probanden wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt (Ethikvotum 280/10). Die erkrankten Patienten waren in der HNO-Ambulanz am UKS Homburg vorstellig und bei der Blutentnahme wurden zwei Citrat-Röhrchen zusätzlich abgenommen, welche dann mittels Rohrpost ins Labor der Virologie geschickt wurden. So konnte ohne Verzögerung direkt das Blut genutzt werden, um daraus die Neutrophilen zu isolieren. Bei gesunden Spendern wurden deshalb ebenfalls zwei Citrat-Röhrchen abgenommen, sodass pro Spender ca. fünf bis sechs Milliliter Blut vorhanden waren.

Isolation mittels MACS-Methode

Für die Isolation der Neutrophilen wurde unter der Sterilbank, welche zuvor UV-desinfiziert wurde, das MACSxpress® Whole Blood Neutrophil Isolation Kit human benutzt. In diesem befanden sich zwei Lösungen, Lösung A und B sowie fünf Glasfläschchen mit Antikörper-Pellets.

Zu einem der Pellets wurden 2ml von Lösung A hinzugegeben und drei bis vier Mal auf- und abpipettiert. Zudem wurde in ein 15ml-Falcon das Blut des Spenders gegeben und die Menge abgelesen. Die Menge der hinzuzugebenden Lösungen musste ein Viertel des Blutvolumens

sein. Bei meist ca. 5ml Blut wurden also 1,25ml von Lösung A mit dem Pellet und 1,25ml von Lösung B benötigt. Lösung B wurde dabei zuerst in ein anderes 15ml-Falcon gegeben und anschließend Lösung A mit Pellet hinzugegeben. Das Gemisch aus beidem wurde dem Blut addiert und schließlich 5min langsam mit einem Überkopfschüttler gedreht. Nach 5min konnte das Gemisch aus Blut und den beiden Lösungen für 15min in den Magneten gestellt werden. Dabei wurde ersichtlich, wie die Erythrozyten sich absetzen. Außerdem wurden durch magnetische Antikörper des Pellets aus Lösung A die anderen Zellen, welche keine neutrophilen Granulozyten waren, durch den Magneten an den Rand des Falcons gezogen, sodass ein klarer Überstand dablief, welcher dann vorsichtig mittels Pipette in ein 50ml-Falcon überführt werden konnte. Das Volumen des Überstandes, das dabei gewonnen wurde, entsprach dabei ungefähr dem zuvor eingesetzten Blutvolumen, also meistens an die 5ml.

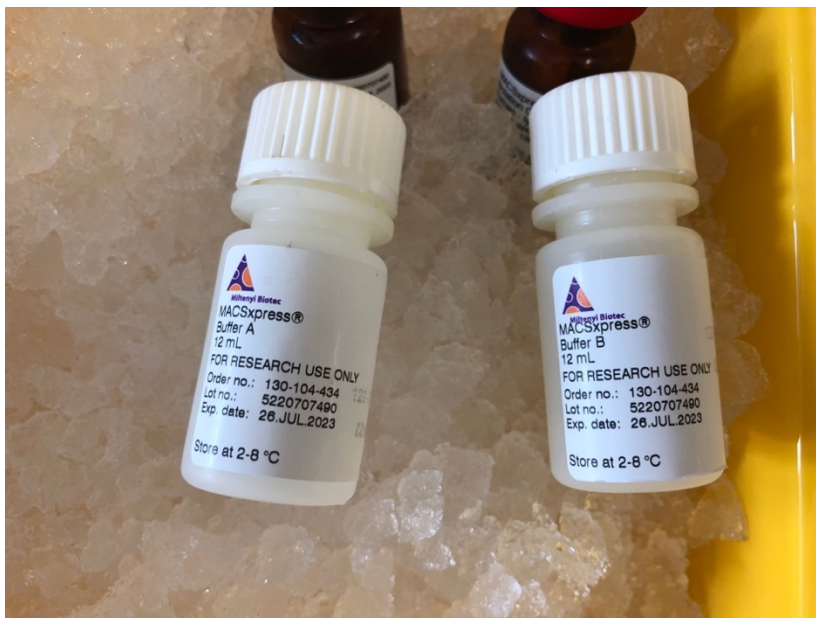


Abbildung 10: Lösung A und B und in den abgedunkelten Fläschchen die Pellets, welche mit Lösung A gelöst werden

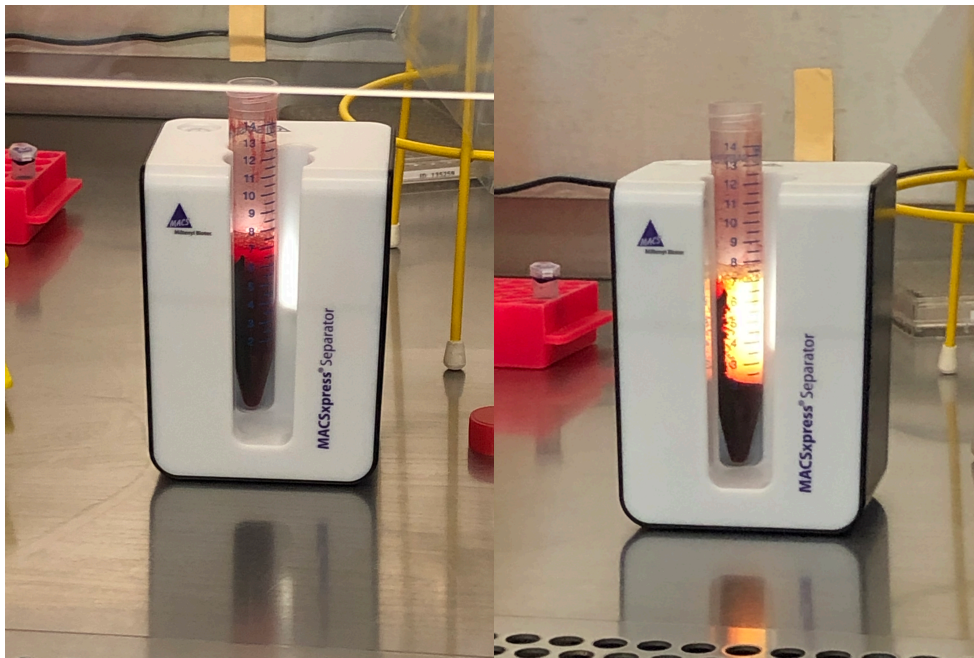


Abbildung 11: Gemisch aus Blut und Lösung A und B vor und nach 15min im Magneten

Links erkennbar ist das Gemisch aus Blut und Lösung A und B direkt nach dem Reinstellen in den Magneten. 15min später ist der Zustand rechts im Bild erreicht. Ein klarer Überstand ist vorhanden, die Erythrozyten haben sich am Boden des Falcons abgesetzt und die Zellen, die keine neutrophilen Granulozyten sind, sind durch die magnetischen Antikörper des Pellets gebunden worden und befinden sich an der Wand des Falcons.

Lyse der Erythrozyten

Nichtsdestotrotz war bei genauerem Blick auf den abpipettierten Überstand eine Trübung mit Rotstich erkennbar, was daran lag, dass immer noch – wenn auch wenig – Erythrozyten enthalten waren. Um diese zu entfernen, wurde als nächstes ein bis zwei Mal eine Erythrozyten-Lyse vollzogen. Für diese benötigte man gekühltes, destilliertes Wasser und 10xPBS (beides steril). Unter dem Abzug gab man dem Falcon, das die 5ml des Überstandes mit den Neutrophilen enthielt, das kalte, destillierte Wasser hinzu und füllte dabei auf ca. 45ml auf. Dann wartete man ganz genau 30s, und gab, sobald diese 30s vorüber waren, 5ml des 10xPBS hinzu und verschloss und invertierte den Falcon zügig. Das Aqua dest. war hypoosmotisch im Vergleich zum Innenleben der Zellen und strömte dementsprechend in die Zellen, insbesondere in die Erythrozyten hinein, welche dadurch zerstört wurden. Ähnliches geschah auch mit den anderen, in der Lösung vorhandenen Zellen, aber in geringerem Ausmaß und insbesondere die roten Blutkörperchen gingen daran zugrunde. Das 10xPBS beendete die Erythrozyten-Lyse.

Als nächstes wurde das Falcon zentrifugiert (5min 1800RPM mit Raumtemperatur; Beschleunigung und Bremse jeweils höchste Stufe) und der Überschuss, also das Aqua dest. samt 10xPBS weggegossen. Am Boden war das Pellet aus Neutrophilen erkennbar. War dieses weiß, so sprach das für das weitgehende Fehlen von roten Blutkörperchen und die Reinheit der Neutrophilen. War das Pellet noch sehr rot, so konnte das Durchführen eines weiteren Lyse-Vorgangs erwogen werden. Meist war dies jedoch nicht nötig und jede Lyse zerstörte auch Neutrophile, weshalb meist davon abgesehen werden konnte.

Isolation mittels Ficoll-Methode

Sowohl mit dem Blut der kranken als auch mit dem der gesunden Probanden wurde so verfahren. Teilweise wurden von gesunden Spendern größere Mengen Blut entnommen, um deren Neutrophile zu isolieren, welche dann für mehrere Forschungsprojekte benutzt werden und teils auch im Rahmen von Kooperationen an andere Institutionen gegeben werden konnten. Die Mengen des hier verwendeten Blutes erforderten eine andere Methode, um die Neutrophilen zu isolieren, und zwar die Ficoll-Variante.

Hierfür wurde das Blut im Verhältnis 1:2 mit DPBS verdünnt und anschließend je 25ml in 50ml-Falcons langsam auf 12,5ml Ficoll 1.0770g/mL gegeben, ohne dass sich die beiden Flüssigkeiten vermischten. Anschließend wurden diese Falcons zentrifugiert (20min bei 800g und RT mit Beschleunigung 7 und Bremse 1). Die Einstellungen an der Zentrifuge, insbesondere das langsame Abbremsen, verhinderten, dass die verschiedenen Schichten, die dabei entstanden (siehe Abb. 12), sich wieder vermischen.

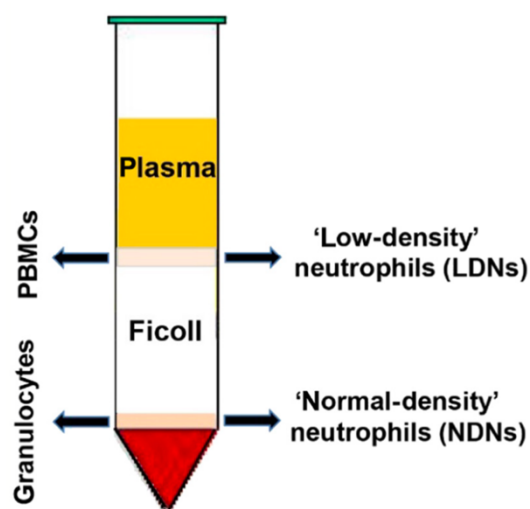


Abbildung 12 (aus Silvestre-Roig et al. 2019): Schematische Darstellung der verschiedenen Schichten des Blutes nach Zentrifugation im Rahmen der Ficoll-Methode

Die Erythrozyten und die Neutrophilen (mit Ausnahme der Low-Density-Neutrophils) sammeln sich unterhalb des Ficolls, die anderen Bestandteile, unter anderem die Monozyten (hier als PBMCs bezeichnet), sammeln sich oberhalb des Ficolls.

Schließlich konnte man mittels Pipette die einzelnen Schichten entfernen, sodass nur die Neutrophilen und die Erythrozyten übrigblieben. Beim Pipettieren war es dabei wichtig, dass man den Ring mit den Monozyten (PBMC in Abb. 12) entfernt, da ansonsten die Monozyten die Reinheit des Neutrophilen-Isolats minderten.

Die übriggebliebenen Neutrophilen und roten Blutkörperchen wurden dann auf mehrere 50ml-Falcons verteilt, sodass 5ml je Falcon vorhanden waren. Anschließend konnte, wie oben bereits beschrieben, die Lyse der Erythrozyten erfolgen. Hier musste diese mehrmals durchgeführt werden, bis ein klares Pellet übrigblieb, da mehr Erythrozyten beigemischt waren als mit der MACS-Methode.

Zählen der Neutrophilen

Als nächstes wurde das Pellet in 1ml DPBS oder R10++ suspendiert, 10µl entnommen und 90µl Trypanblau zugegeben und vorsichtig auf- und abpipettiert, sodass sich die Neutrophilen gleichmäßig verteilten. Anschließend wurden 10µl in die Neubauer-Zählkammer gegeben und die 4 Quadranten der Zählkammer ausgezählt. Der Wert wurde durch Vier geteilt und anschließend mit dem Faktor der Verdünnung multipliziert, also zuerst mit 10, da 10µl der Suspension auf 100µl aufgefüllt wurden (Faktor 10 Verdünnung) und anschließend noch mit 10000, da ein Quadrant der Zählkammer einem Zehntausendstel eines Milliliters, also 0,1µl entsprach, das Volumen des suspendierten Pellets jedoch 1ml betrug ($0,1\mu\text{l} \times 10000 = 1\text{ml}$).

Zellen in Suspension = Zellen in Neubauer-Zählkammer : $4 \times 10 \times 10000$

Meist waren in den 5-6ml Blut, die mittels MACS-Methode bearbeitet wurden, ca. 15 - 20 Mio. Neutrophile enthalten. Diese wurden zum einen für den Impedanz-Assay, zum anderen für das FACS verwendet.

3.7 Durchflusszytometrische Färbung und Analyse der Immunzellen

Färbung der Zellen

Für die Charakterisierung der Neutrophilen wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) ein Blick auf die Oberflächenproteine geworfen. Welche Proteine untersucht wurden und was deren Bedeutung ist, wird in Kapitel 2 beschrieben.

Hierfür wurden ca. 2 Mio. Neutrophile von der Suspension entnommen und mit DPBS verdünnt auf eine Konzentration von 1,5Mio Zellen/ml. Dann wurde stets auf Eis gearbeitet und in eine 96-Well-Plate mit V-Bottom wurden für jede Blutprobe jeweils 100µl in 11 benachbarte Wells (jeweils Well 1 bis 11) gegeben, sodass in jedem Well 150000 Neutrophile enthalten waren.

Anschließend wurde die Platte für 3min bei 4 Grad Celsius zentrifugiert (Beschleunigung und Bremse maximal) und schließlich der Überstand verworfen, sodass sich nur noch die Zellen am Boden der Wells befanden. Diese wurden anschließend zuerst mit 10µl Poly-IgG und dann mit 10µl der jeweiligen Antikörper-Lösung resuspendiert. Dabei wurde jedem Röhrchen eine andere Antikörper-Lösung zugegeben. Das Poly-IgG lagerte sich an jegliche Bindungsstellen der Zelloberfläche an, jedoch mit einer eher geringen Bindungsaffinität. Es diente zur Verhinderung des Kurlander-Effekts. Bei diesem lagern sich Antikörper zum einen mit ihrem F_{ab} -Teil an ein Antigen auf der Zelloberfläche und zum anderen mit ihrem F_c -Teil an einen F_c -Rezeptor (Kurlander 1983). Nach Zugabe der jeweiligen Antikörperlösung konnten diese, sofern die passenden Proteine an der Oberfläche der Neutrophilen vorhanden waren, diese binden. Dabei war es wichtig, weiterhin auf Eis zu arbeiten, da die Zellen ansonsten bei zu warmer Temperatur die Antikörper internalisieren würden.

Anschließend inkubierten die Zellen für 30min weiterhin gekühlt und abgedunkelt. In Zwischenzeit wurde das FACS-Gerät gestartet und für jedes Well ein FACS-Röhrchen mit 400µl FACS-Fix gefüllt. Die Röhrchen wurden dabei von 1 bis 11 durchnummeriert, und jedem Röhrchen wurde ein zugehöriges Well auf der Platte zugeordnet.

Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, also jeweils 100µl wurden jedem Well hinzugefügt, leicht auf- und abpipettiert, erneut für drei Minuten zentrifugiert wie zuvor und der Überstand verworfen. Dadurch wurden Antikörper, die nicht gebunden waren, entfernt. Zuguterletzt wurden die Pellets in FACS-Fix resuspendiert und in die FACS-Röhrchen mit der passenden Nummer gegeben, sodass in jedem Röhrchen 500µl FACS-Fix mit jeweils 150000 Neutrophilen enthalten waren.

Messung am FACS-Gerät

Am FACS-Gerät fanden pro Blutprobe Messungen mit zehn verschiedenen Färbungen und eine ungefärbte Kontrollfärbung statt.

Dabei wurden für jede Färbung die Zellen zum einen mittels Laser auf Granularität und Größe untersucht, zum anderen wurden Fluoreszenzsignale der zugegebenen Antikörper detektiert, wodurch ermittelt werden konnte, ob die Zellen ein bestimmtes Protein auf der Oberfläche trugen, und wenn das Protein da war, wie stark das Protein an der Oberfläche der Zelle exprimiert worden ist. Die Durchflusszytometrie ermöglichte also nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Messungen. Pro Röhrchen wurden 10000 Messereignisse aufgezeichnet.

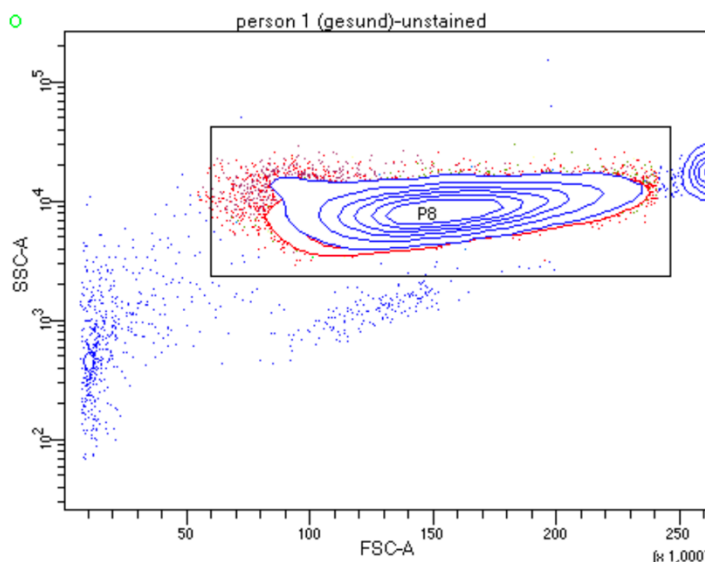


Abbildung 13: Gating-Strategie zur Bestimmung Neutrophiler

Mittels Laser werden die enthaltenen Zellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) geordnet und so die potenziellen neutrophilen Granulozyten (Feld P8) als solche ausfindig gemacht. Im Feld P8 befinden sich große, granulierte Zellen. Das sind die neutrophilen Granulozyten.

Im ersten Schritt wurden neutrophile Granulozyten auf Basis ihrer typischen physikalischen Eigenschaften – Zellgröße (Forward Scatter) und Granularität (Side Scatter) – identifiziert (Gate P8 in Abb. 13). In einem zweiten Schritt erfolgte die Auswertung spezifischer Fluoreszenzsignale, um die Zielpopulation weiter zu charakterisieren bzw. funktionelle Marker zu analysieren. Dafür hatte man für jeden Blutspender einen Fluoreszenz-Antikörper, der CD66b an der Zelloberfläche band (CD66b-BV421) und dessen Signale über den Pacific-Blue-Kanal detektiert wurden. CD66b als Neutrophilen-Marker ermöglichte eine zweifellose Charakterisierung der Zellen als Neutrophile. Eine Verschiebung entlang der Achse im Pacific-Blue-Kanal, also entlang der X-Achse bestätigte dies (Abb. 14).

Dann erfolgte die Aufteilung der Neutrophilen in ihre Subsets danach, ob sie CD177-positiv oder CD177-negativ waren. Dafür war ein Fluoreszenz-Antikörper gegen CD177 enthalten, entweder CD177-APC oder CD177-PE. Ein Teil der Neutrophilen ist entlang der APC-Achse, also entlang der Y-Achse verschoben worden (Abb. 14). Das waren die CD177-positiven Neutrophilen. Der andere Teil, der sich nicht verschob, waren die CD177-negativen Neutrophilen. Im Anschluss konnte dann sowohl von der Gesamtpopulation als auch CD177-Subset-spezifisch die Expression von Proteinen in anderen Fluoreszenzkanälen bestimmt werden.

Für jeden Spender gab es zudem eine Negativkontrolle ohne Färbung und eine Isotypenkontrolle zur Einschätzung der Autofluoreszenz.

Die endgültigen Werte für die Fluoreszenz ergaben sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenz des gefärbten Proteins und der Autofluoreszenz der Isotypenkontrolle, also handelte es sich um relative Fluoreszenzintensitäten (RFI).

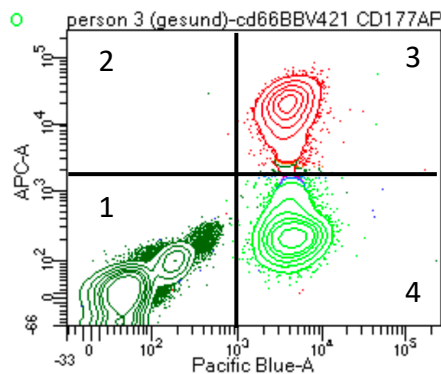


Abbildung 14: Gating-Strategie zur Analyse neutrophiler Untergruppen mittels Durchflusszytometrie

Quadrant 1 zeigt die ungefärbte Negativ-Kontrolle. Quadrant 3 und 4 zeigen die CD66-positiven Neutrophilen mit einer Aufteilung in das CD177-positive Subset (Quadrant 3) und das CD177-negative Subset (Quadrant 4).

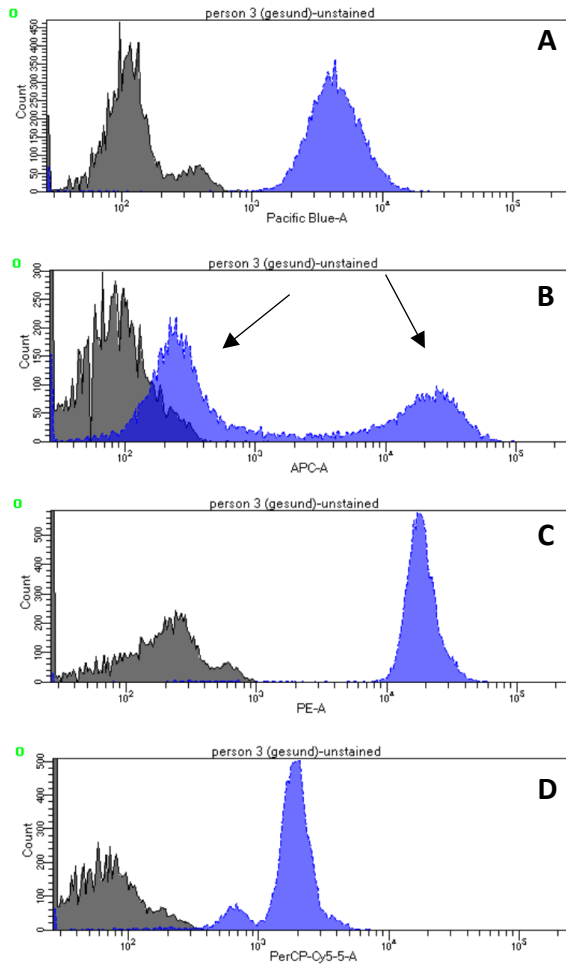
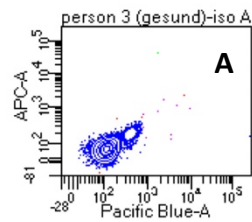


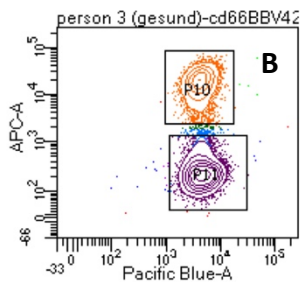
Abbildung 15: Gating-Strategie für die verschiedenen Fluoreszenzkanäle

Gefärbte Zellen (blau) zeigen in allen vier Fluoreszenzkanälen eine deutliche Signalverschiebung im Vergleich zur ungefärbten Negativkontrolle (grau), was eine erfolgreiche Färbung bestätigt. Die Abbildungen stellen auf der X-Achse die Intensität der Fluoreszenzsignale und auf der Y-Achse die Anzahl der detektierten Ereignisse dar. In Abbildung 15B ist die Ausbildung von zwei distinkten Peaks innerhalb der gefärbten Population (blau) zu erkennen: Der linke Peak entspricht den CD177-negativen, der rechte den CD177-positiven Zellen.

So wurden 45 Blutproben von kranken Spendern mit einem HNSCC und 50 Blutproben von gesunden Spendern untersucht. Jeweils 11 dieser wurden zusätzlich für den Impedanz-Assay verwendet.



Population	#Events	%Parent	PE-A Mean	PerCP... Mean	APC-A Pacific... Mean	APC-A Pacific... Mean
P1	8,870	88.7	213	69	95	164



Population	#Events	%Parent	PE-A Mean	PerCP... Mean	APC-A Pacific... Mean	APC-A Pacific... Mean
P1	8,838	88.4	18,589	1,794	7,944	4,606
P10	3,177	35.9	17,341	2,017	21,425	4,244
P11	5,481	62.0	19,281	1,655	302	4,758

Abbildung 16: Quantifizierung der Neutrophilen-Subsets samt deren Fluoreszenzintensitäten in den verschiedenen Fluoreszenzkanälen

Rohdaten von einem gesunden Spender der Isotypen-Kontrolle (16A) und der eigentlichen Färbung (16B).

Die relative Fluoreszenzintensität (RFI) berechnet sich wie folgt:

$$RFI = \frac{\text{Fluoreszenz der gefärbten Zellen}}{\text{Fluoreszenz der Isotypenkontrolle im gleichen Fluoreszenzkanal}}$$

Zudem lässt sich aus den Rohdaten in 16B entnehmen, dass bei diesem Spender 35,9% der Neutrophilen CD177-positiv und 62% CD177-negativ sind.

3.8 Impedanz-Assay

Mit dem Impedanz-Assay wurden die Neutrophilen Antikörper-abhängig auf ihre Kompetenz geprüft, ADCC zu betreiben. Hierfür benötigte man Tumorzellen, sowie Neutrophile und Antikörperlösungen.

Vorbereitung der Tumorzellen

Als Tumorzelle diente die humane Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 (Vulvakarzinom). Diese eignete sich hervorragend aufgrund ihrer hohen Expression des EGFR. Bevor das eigentliche Experiment stattfinden konnte, wurden die Tumorzellen in einer 200ml Zellkulturflasche kultiviert mit R10+/+ bei 37 Grad Celsius und 5% CO₂. Einmal pro Monat wurden die Zellkulturflaschen mittels PCR auf Mycoplasmen untersucht (Valcenko et al. 2024). Außerdem wurde regelmäßig im Mikroskop überprüft, wie viel des Flaschenbodens von den sich vermehrenden Zellen den Flaschenboden bedeckten. Sobald dies 70 bis 80% waren, wurden die Zellen gesplittet und das alte Medium durch neues ersetzt. Dies erfolgte zwei bis dreimal pro Woche.

Für das Splitting wurde zuerst das enthaltene R10+/+ entfernt und die Zellen wurden mindestens zweimal mit 5ml DPBS gewaschen. Anschließend wurde das DPBS ebenfalls entfernt, 1ml TrypLE™ Express hinzugegeben und ca. 5min inkubiert (erneut bei 37 Grad und 5% CO₂). Danach wurde mikroskopisch geprüft, ob sich die Zellen vom Flaschenboden und voneinander gelöst haben. Ist dies nicht der Fall gewesen, so wurde die Inkubation um eine bis zwei Minuten verlängert.

Anschließend wurde der Flasche mit den Zellen und dem Trypsin ca. 5 - 7ml R10+/+ addiert und der Flascheninhalt in ein 50ml-Falcon gegeben. Schließlich wurde das Falcon zentrifugiert (1500RPM mit RT und Beschleunigung und Bremse max.) und der Überstand verworfen. Sofern kein Experiment mit den Zellen anstand, wurde das Pellet mit 4ml R10+/+ gelöst und 1ml davon mit 10ml R10+/+ in die Zellkulturflasche gegeben und zurück in den Inkubator gestellt. Die anderen 3ml des suspendierten Pellets wurden verworfen. Sofern ein Experiment anstand, wurden die Zellen gezählt wie auch schon die Neutrophilen (Pellet mit 1ml R10+/+ suspendieren, dann 10µl davon mit 90µl Trypanblau auffüllen, 10µl vom Gemisch in der Neubauerzählkammer zählen und die Zellzahl auf 1ml Lösung hochrechnen).

Impedanz-Assay

Nachdem die Tumorzellen gezählt wurden, wurden 2,2 Mio. von ihnen mit R10+/+ auf ein Volumen von 11ml aufgefüllt. Die Konzentration betrug somit 200.000 Zellen pro Milliliter.

In die E-Plate® wurden in jedes Well zuerst 50µl R10+/+ gegeben und anschließend eine erste Hintergrundmessung vollzogen und es wurde überprüft, ob jedes Well funktionstüchtig war und vom Gerät erkannt wurde.

Als nächstes wurde in jedes Well mit Ausnahme der Wells A1 bis A3 100µl der Tumorzelllösung gegeben, sodass in jedem Well 20000 Tumorzellen enthalten waren. In die Wells A1 bis A3 wurden stattdessen 100µl R10+/+ addiert. Die Platte wurde dann für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine zweite Messung mit der Platte gestartet. Von da an wurde alle 15min die Veränderung der Impedanz gemessen, bis 24h vorbei waren und die Konfluenz der Tumorzellen am Boden der Wells erreicht wurde.

Sobald die 24h vergangen waren, wurde die Messung pausiert und die Platte aus dem Inkubator genommen. Anschließend folgte die Zugabe von Neutrophilen und Antikörpern unter der Sterilbank.

Die Neutrophilen der Spender wurden hierbei auf eine Konzentration von 16 Mio. /ml gebracht. Jedem Well, dem laut Protokoll Neutrophile zugefügt wurden, wurden 50µl der Lösung addiert. Dies entsprach 800.000 Neutrophilen. Da in jedem Well 20.000 Tumorzellen enthalten waren, entsprach dies einem Verhältnis von 40:1.

Es wurden 4 verschiedene Antikörper-Lösungen verwendet. Diese wurden mit einer Konzentration von 200µg/ml angesetzt. Zwei Lösungen enthielten Standard-Antikörper, also entweder IgA-Standard oder IgG-Standard. Diese dienten als Kontrollen. Die anderen beiden Antikörper-Lösungen enthielten entweder den IgA2.0 oder Panitumumab. Von ihnen wurden den Wells jeweils nach Protokoll 2µl hinzugegeben. Diese enthielten bereits ein Volumen von 200µl, sodass in den Wells nach Zugabe eine Antikörperkonzentration von 2µg/ml vorlag.

In drei Wells wurde zu den Tumorzellen 1 % TritonX-100 als Lysekontrolle zugegeben. Zudem wurden für jeden Spender als weitere Kontrolle Wells nur mit Neutrophilen aufgefüllt. Für jede Kombination aus Antikörper und Neutrophilen wurden pro Spender stets drei Wells gefüllt, welche dann miteinander verrechnet werden konnten.

Nach Zugabe der Neutrophilen und Antikörpern wurde die Platte erneut 24h inkubiert und die Impedanz jedes einzelnen Wells automatisiert alle 15min gemessen. Nach Ablauf der 24h konnten die Daten aus der RTCA-Software entnommen und analysiert werden. Die Impedanz-Änderung wurde hierbei als dimensionslose Größe, als Zellindex (CI), angegeben, welcher von der Software zur weiteren Verrechnung mit Impedanz-Daten anderer Spender normiert wurde (nCI).

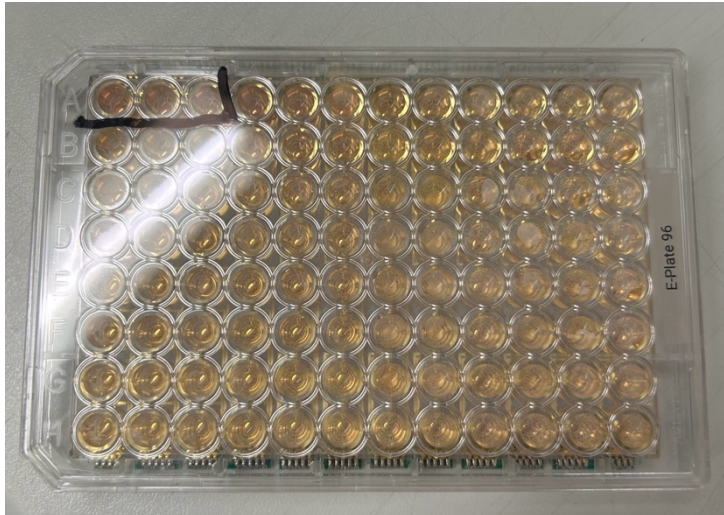


Abbildung 17: E-Plate® nach vollzogener Messung

In den Spalten 7 bis 12 wurden in den Zeilen C bis G Neutrophile hinzugegeben. Bei genauerem Hinsehen fällt eine Trübung dieser auf. Diese deutet auf eine stattgefundene ADCC hin.

Damit die E-Plate® wiederverwendet werden konnte, wurde sie anschließend zweimal mit DPBS gewaschen, jedes Well mit 100µl Trypsin gefüllt und über Nacht bei 37 Grad Celsius inkubiert. Frühestens am nächsten Tag wurde das Trypsin verworfen und die Platte mit Triton®X-100 in Aqua-dest., dann nur in Aqua-dest. und zuguterletzt einmal in 70%EtOH gewaschen und anschließend unter die Sterilbank gestellt und hier für mindestens 20min UV-desinfiziert. Sobald das EtOH verdunstet war, konnte die Platte erneut verwendet werden. Dies konnte so fünf bis sechs Mal erfolgen, oder bis die Wells der Platte nicht mehr richtig vom Gerät erkannt wurden. Dann wurde die alte durch eine neue ersetzt.

Am Boden jedes Wells befand sich ein Plus- und ein Minuspol, und es fand ein Elektronenfluss statt. Nach der Aussaat der Tumorzellen und durch die Konfluenz dieser wurde der Elektronenfluss erschwert, der Widerstand, also die Impedanz stieg an. Nach Zugabe der Neutrophilen und Antikörper kam es, je nachdem welche Antikörper zugesetzt waren, zur ADCC und Tumorzellen wurden lysiert, der Elektronenfluss wurde mehr und die Impedanz dementsprechend weniger (siehe Abb. 19).

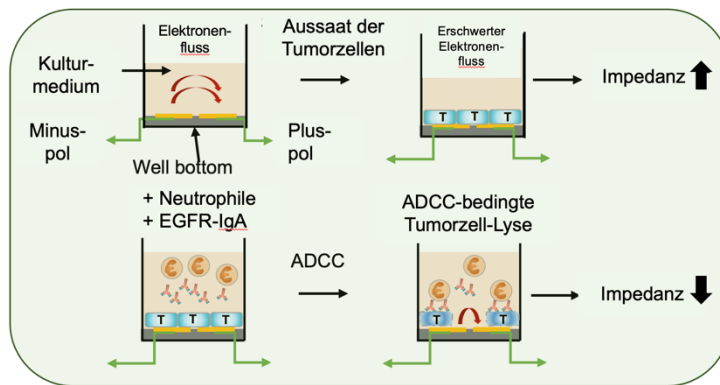


Abbildung 18: schematische Darstellung des Ablaufs des Impedanz-basierten ADCC-Assays

3.9 Statistische Auswertung

Die graphische Darstellung sowie statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mithilfe der Software GraphPad Prism Version 10.1.1 durchgeführt. Für den Vergleich von zwei unabhängigen Probenreihen wurde ein ungepaarter t-Test, für zusammengehörige Probenreihen ein gepaarter t-Test verwendet. nCI-Werte wurden aus Dosis-Wirkungs-Kurven berechnet, und als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben, um signifikante Unterschiede zwischen den angegebenen Datengruppen zu bestimmen. Ein Unterschied wurde als signifikant angesehen, wenn die p -Werte kleiner als 0,05 waren. Das Signifikanzniveau α wurde für alle durchgeführten Tests auf 0,05 festgelegt. p -Werte, die größer als 0,05 waren, zeigten an, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben bestand. Signifikante Ergebnisse wurden in den Grafiken durch Sternchen dargestellt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$) (Valcenko et al. 2024).

4. Ergebnisse

4.1 Patienten- und Spenderdaten der durchflusszytometrisch untersuchten Neutrophilen

Im Rahmen der Doktorarbeit erfolgte nach der Isolation neutrophiler Granulozyten aus peripherem Blut eine detaillierte phänotypische Charakterisierung von Neutrophilen gesunder Spender (n=50) und HNSCC-Patienten (n=45) mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie. Detaillierte klinische und tumorspezifische Informationen – einschließlich Tumorlokalisation, TNM-Klassifikation, sowie epidemiologische Daten dieser, darunter Alter und Geschlecht, wurden für die jeweiligen Kohorten tabellarisch zusammengefasst (Tab. 5).

Tabelle 5: Klinische Daten zu allen durchflusszytometrisch untersuchten gesunden sowie HNSCC-Spendern

Eigenschaften	N	Anteil
Spender	95	-
HNSCC	45	47%
Gesund	50	53%
Geschlecht		
Männlich HNSCC	31	33%
Weiblich HNSCC	14	15%
Männlich gesund	22	23%
Weiblich gesund	28	29%
Alter		
Alter HNSCC: Mittelwert ; Median	69 ; 68	
Alter HNSCC Mann: Mittelwert ; Median	69 ; 70	
Alter HNSCC Frau: Mittelwert; Median	69 ; 67	
Alter Healthy: Mittelwert; Median	35 ; 30	
Alter Healthy Mann: Mittelwert; Median	33 ; 29	
Alter Healthy Frau: Mittelwert; Median	36 ; 30,5	

Eigenschaften HNSCC	N	Anteil
Gesamt	45	100%
> 70 Jahre	22	49%
< 70 Jahre	23	51%
> 70 männlich	16	36%
> 70 weiblich	6	13%
< 70 männlich	15	33%
< 70 weiblich	8	18%
Tumorart		
Kehlkopf	17	38%
Zungengrund	9	20%
Oropharynx samt Tonsille	9	20%
Hypopharynx	6	13%
Hypo- und Oropharynx	1	2%
Mundboden	1	2%
Nasopharynx	1	2%
CUP	1	2%
T-Stadium		
T1	11	29%
T1 männlich	8	18%
T1 weiblich	3	7%
T1 > 70 Jahre	4	9%
T1 < 70 Jahre	7	16%
T2	13	29%
T2 männlich	9	20%
T2 weiblich	4	9%
T2 > 70 Jahre	9	20%
T2 < 70 Jahre	4	9%

T3	7	15%
T3 männlich	5	11%
T3 weiblich	2	4%
T3 > 70 Jahre	4	9%
T3 < 70 Jahre	3	6%

T4	13	29%
T4 männlich	8	18%
T4 weiblich	5	11%
T4 > 70 Jahre	5	11%
T4 < 70 Jahre	8	18%

N-Stadien

N0	18	40%
N0 männlich	11	24%
N0 weiblich	7	16%
N0 > 70	12	27%
N0 < 70	6	13%

N > 0	27	60%
N > 0 männlich	20	44%
N > 0 weiblich	7	16%
N > 0 älter als 70 Jahre	9	20%
N > 0 jünger als 70 Jahre	18	40%

N1	3	7%
N1 männlich	1	2%
N1 weiblich	2	5%
N1 > 70	2	2%
N1 < 70	1	5%

N2	18	40%
N2 männlich	15	33%

N2 weiblich	3	7%
N2 > 70	4	9%
N2 < 70	14	31%

N3	6	13%
N3 männlich	4	9%
N3 weiblich	2	5%
N3 > 70	4	9%
N3 < 70	2	5%

M-Stadien

M0	44	98%
M1	1	2%

(übersetzt und entnommen aus Valcenko et al. 2024)

4.2 Unterschiede bei der Expression verschiedener Oberflächenproteine der Neutrophilen aller Spender

Im Rahmen der Doktorarbeit erfolgte eine detaillierte phänotypische Charakterisierung von Neutrophilen gesunder Spender (n=50) und von HNSCC Patienten (n=45) mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie. Dabei ist anzumerken, dass die Ergebnisse nicht ohne weiteres mit denen des Impedanz-Assay in Verbindung gebracht werden können, da nur für elf von 45 kranken, bzw. für elf von 50 gesunden Spender Impedanz-Daten vorhanden sind.

4.2.1 Unterschiede zwischen HNSCC- und gesunden Spendern

Bei der prozentualen Verteilung der CD177-positiven und -negativen Neutrophilen sowie auch bei der Expression von CD177 auf den -positiven ließ sich zwischen HNSCC- und gesunden Spendern kein signifikanter Unterschied feststellen. Auffällig war die große Spannweite bei der prozentualen Verteilung des CD177-Subsets. Die beobachtete interindividuelle Heterogenität der CD177-Expression – mit Extrema von nahezu vollständig CD177-positiven bzw. -negativen Neutrophilen – entspricht den in der Literatur beschriebenen natürlichen Expressionsmustern (Matsuo et al. 2000; Eulenberg-Gustavus et al. 2017; Dahlstrand Rudin et al. 2021).

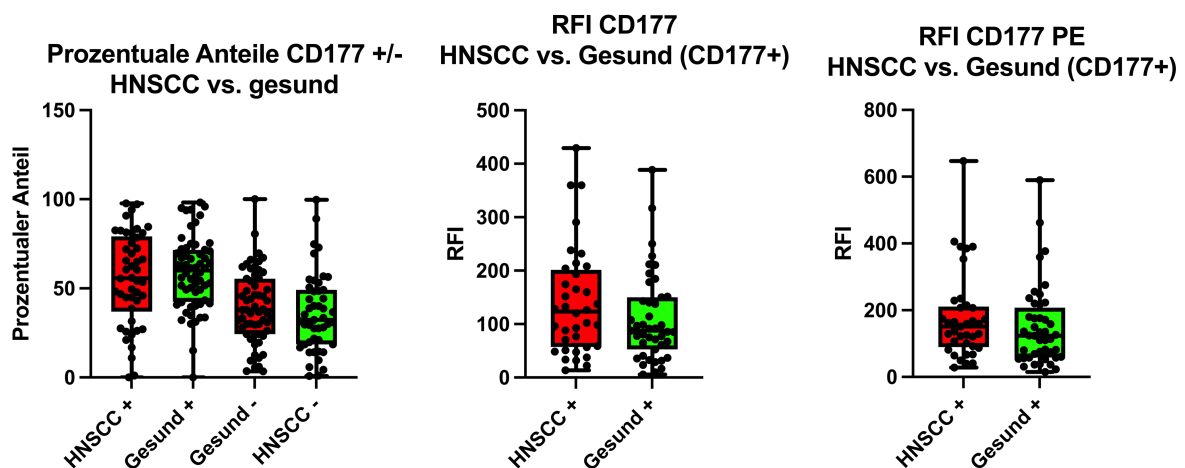


Abbildung 19: kranke und gesunde Spender unterscheiden sich weder bei der prozentualen Verteilung des CD177-Subsets, noch bei der CD177-Expression auf den positiven Zellen

Neutrophile von HNSCC-Patienten (n=45) und gesunden Spendern (n=50) wurden aus peripherem Blut isoliert und mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Anteile sowie als "RFI" als Box und Whisker Blot mit allen Datenpunkten. Signifikanzen wurden berechnet mittels ungepaartem t-Test und angegeben mit * für $p < 0.05$

Schon bei der Aufbereitung der Rohdaten ist aufgefallen, dass manche Spender nicht nur eine, sondern zwei CD177-positive, eine hoch- und eine niedrig-positive Population besaßen.

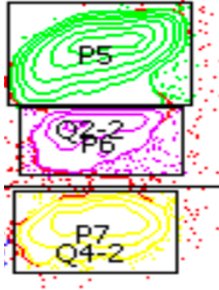


Abbildung 20: Aufnahme eines Spenders mit drei verschiedenen Neutrophilen-Populationen

P7 (gelb) zeigt das negative CD177-Subset, P6 (lila) eine niedrig positive CD177-Population und P5 (grüne) eine hoch-positive.

Dies erklärt, wieso in Abb. 19 nur 34 kranke und 43 gesunde Patienten bzw. Probanden in Hinblick auf ihre CD177-Expression verglichen wurden. Denn 11 von 45 kranken Spendern, 24,4 Prozent, und 7 von 50 gesunden Spendern, 14 Prozent, verfügten nicht nur über die eine, sondern über eine hoch- und eine niedrig-positive, also zwei CD177-positive Populationen. Spender mit zwei unterschiedlich positiven CD177-Populationen wurden von der weiteren phänotypischen Untersuchung ausgeschlossen.

Nichtsdestotrotz soll zuerst Subset-unabhängig der Vergleich zwischen der kranken und gesunden Gruppe erfolgen (Abb. 21).

Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Expression von CD147 ($p = 0.0306$) und CD62L ($p = 0.0253$) seitens der HNSCC-Gruppe. Im Gegenzug exprimierten die Neutrophilen der gesunden Spender signifikant mehr CD11b ($p = 0.0261$) und CD172a ($p = 0.0445$). Auch LOX1 wurde seitens der gesunden Spender signifikant mehr exprimiert ($p = 0.0494$), wobei anzumerken ist, dass die relativen Fluoreszenzintensitäten sehr niedrig und somit die Aussagekraft dieser Signifikanz zu hinterfragen ist.

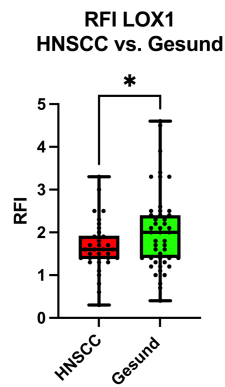
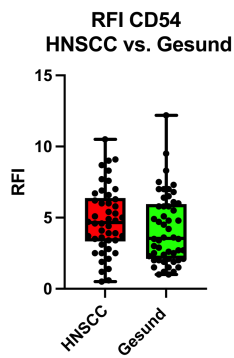
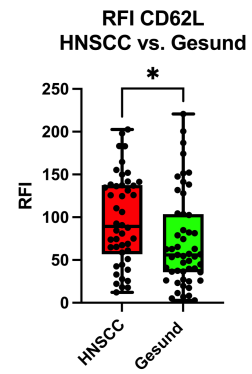
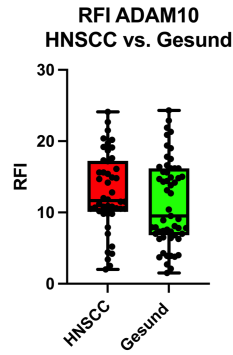
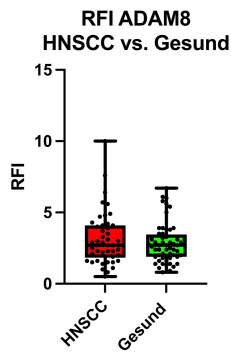
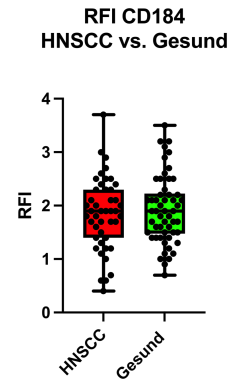
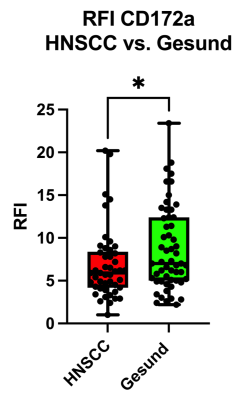
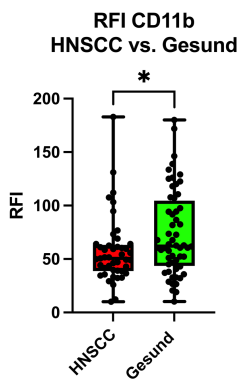
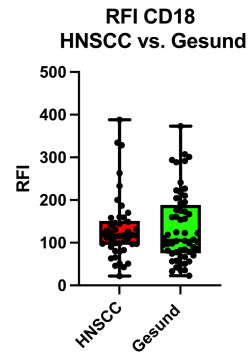
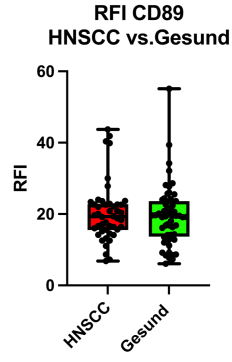
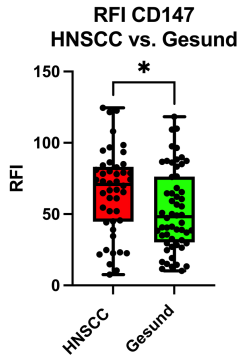


Abbildung 21: Vergleich der RFI für ausgewählte Proteine zwischen 45 kranken und 50 gesunden Spendern

Neutrophile von HNSCC-Patienten (n=45) und gesunden Spendern (n=50) wurden aus peripherem Blut isoliert und mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind dargestellt als "RFI" als Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten. Signifikanzen wurden berechnet mittels ungepaartem t-Test und angegeben mit * für $p < 0.05$.

Abb. 22 zeigt den CD177-Subset-abhängigen Vergleich zwischen der HNSCC- und der gesunden Gruppe.

Für CD147 ließ sich bei den gesunden Spendern hochsignifikant eine erhöhte Expression dessen auf den CD177-negativen im Vergleich zu den CD177-positiven feststellen ($p < 0.0001$). Innerhalb der Neutrophilen der HNSCC-Spender fehlte dieser Unterschied.

Für CD89 ($p_{\text{HNSCC}} < 0.0001$; $p_{\text{gesund}} < 0.0001$) sowie für die Bestandteile des MAC-1-Komplex, also CD18 ($p_{\text{HNSCC}} = 0.0231$; $p_{\text{gesund}} < 0.0001$) und CD11b ($p_{\text{HNSCC}} = 0.0029$; $p_{\text{gesund}} < 0.0001$) exprimierten sowohl bei den kranken als auch bei den gesunden Spendern die CD177-positiven Neutrophilen mehr der vorgenannten Proteine. Zwischen den kranken und den gesunden Spendern ließ sich hier jedoch kein Unterschied feststellen, genauso wenig wie bei CD147.

Auch bei CD172a fand sich ebenfalls sowohl bei kranken als auch bei gesunden Spendern bei den CD177-positiven Neutrophilen eine signifikant erhöhte Expression ($p_{\text{HNSCC}} = 0.0206$; $p_{\text{gesund}} = 0.0172$). Zudem schien es, als hätten die gesunden stets eine höhere CD172a-Expression, welche jedoch nur bei den CD177-positiven Neutrophilen signifikant war ($p = 0.0216$). Darüber hinaus fiel auf, dass die CD172a-Expression in allen Gruppen um einiges kleiner war als die von CD147, CD89 sowie CD18 und CD11b.

Bei CD184 ($p < 0.0001$), ADAM8 ($p = 0.0430$) und ADAM10 ($p = 0.0022$) exprimierten die CD177-negativen der gesunden Spender stets mehr als die CD177-positiven. Diesen Unterschied gab es innerhalb der HNSCC-Gruppe nicht. Auch zwischen krank und gesund fanden sich bei diesen drei Proteinen keine signifikanten Unterschiede. Die RFIs dieser drei Proteine waren zudem im Vergleich zu z.B. CD18 sehr gering. Bei CD184 gab es keine RFI-Werte über 5, bei ADAM8 keine über 10. Bei diesen ohnehin kleinen Werten schienen die signifikanten Unterschiede ebenfalls sehr klein.

Bei CD62L fanden sich sowohl beim Vergleich zwischen krank und gesund als auch beim Vergleich der Subsets untereinander signifikante Unterschiede, und zwar hatten die Neutrophilen der HNSCC-Spender stets eine höhere Expression als die der gesunden Spender, sowohl beim Vergleich der CD177-positiven als auch bei den CD177-negativen. Zudem exprimierten die CD177-positiven stets mehr CD62L als die CD177-negativen. Dieser Unterschied ließ sich sowohl bei den kranken als auch bei den gesunden Spendern finden.

Bei CD54 zeigte sich auf den CD177-negativen Neutrophilen der gesunden Spender eine höhere Expression als auf den CD177-positiven. Dieser Unterschied fehlte bei der HNSCC-Gruppe. Hier waren zudem alle RFI-Werte niedrig in einem Bereich von zwei bis zehn. Bei LOX1 gab es keinerlei signifikanten Unterschiede und die RFIs waren allesamt sehr niedrig.

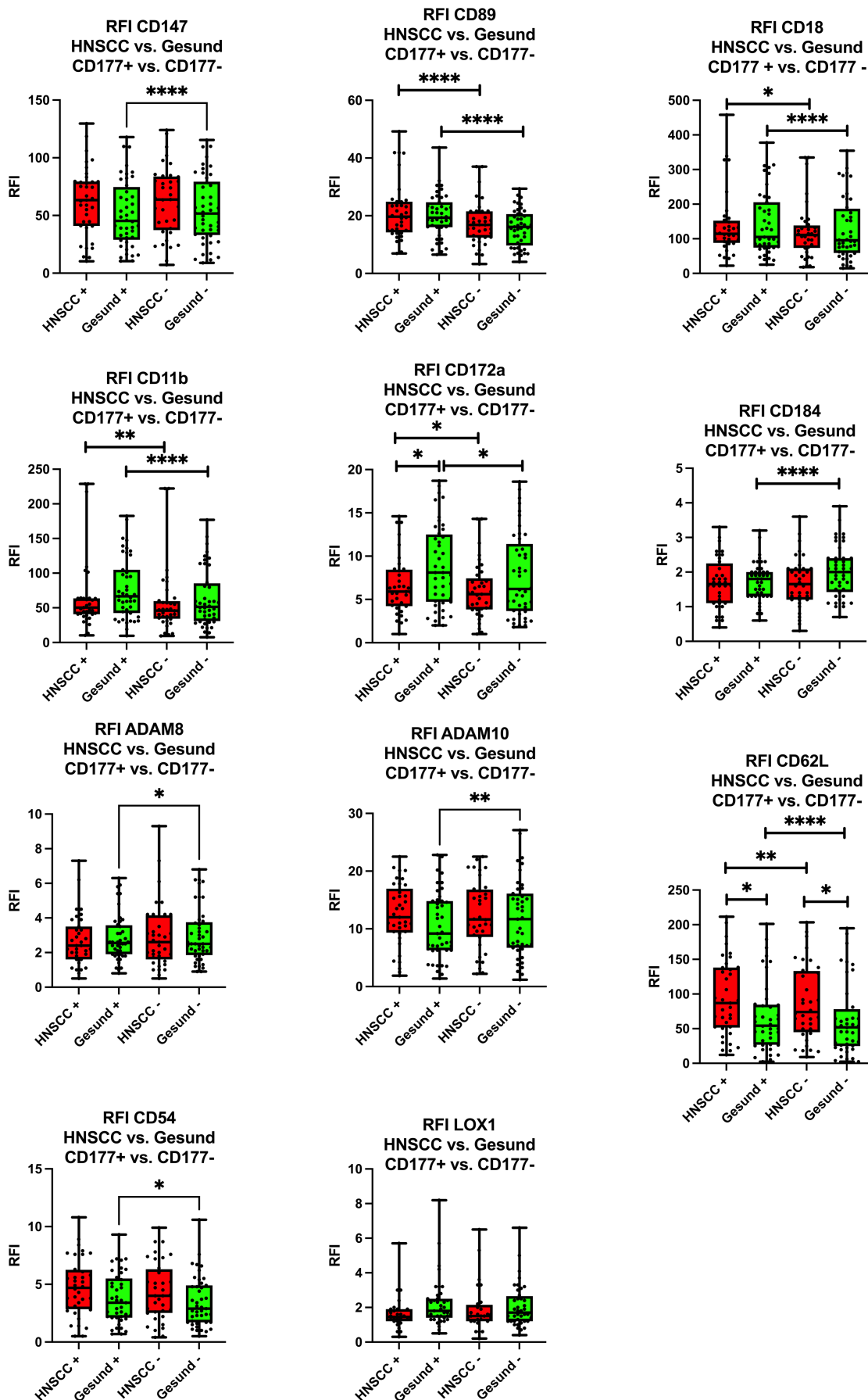


Abbildung 22: Subset-abhängiger Vergleich der RFIs für ausgewählte Proteine zwischen HNSCC- und gesunden Spendern

Neutrophile von HNSCC-Patienten und gesunden Spendern wurden aus peripherem Blut isoliert und mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Für die phänotypische Charakterisierung erfolgte die Aufteilung der Neutrophilen der HNSCC-Patienten (n=34) und der gesunden Spender (n=43) in das CD177-positive und -negative Subset. Die Ergebnisse sind dargestellt als "RFI" als Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten. Signifikanzen wurden berechnet mittels ungepaartem t-Test und angegeben mit * für $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Es ließen sich also innerhalb der Subsets der gesunden Spender mehrere Unterschiede finden, die es bei den kranken Spendern nicht gab (CD147, CD184, ADAM8, ADAM10, CD54). Für CD89, CD18, CD11b, CD172a und CD62L waren die Subset-spezifischen Unterschiede sowohl bei den kranken als auch bei den gesunden Spendern zu finden. Unterschiede zwischen krank und gesund gab es nur bei den CD177-positiven Neutrophilen von CD172a und bei den CD177-positiven und -negativen für CD62L.

4.2.2 Neutrophile von HNSCC-Patienten unterscheiden sich phänotypisch

Die Analyse der Expression spezifischer Oberflächenproteine auf neutrophilen Granulozyten bietet wertvolle Einblicke in deren funktionelle Heterogenität und potenzielle immunologische Relevanz im Kontext von HNSCC. Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit sich die Expression dieser Marker in Abhängigkeit von Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Alter innerhalb der HNSCC-Kohorte unterscheidet.

Als erstes wurden die phänotypischen Eigenschaften der Neutrophilen von HNSCC-Patienten in Abhängigkeit des Tumorstadiums verglichen. Beim Vergleich zwischen $<T4$ und $T4$ (siehe Abb. 23) fiel auf den ersten Blick nicht so viel ins Auge. Nur die CD177-Expression auf den positiven Neutrophilen der $T4$ -Spender war erhöht ($p=0.0129$), sowie die CD62L-Expression ($p=0.0413$). Letzteres ist ein Unterschied, der auch in der kleineren Kohorte der Spender für den Impedanz-Assay auftrat.

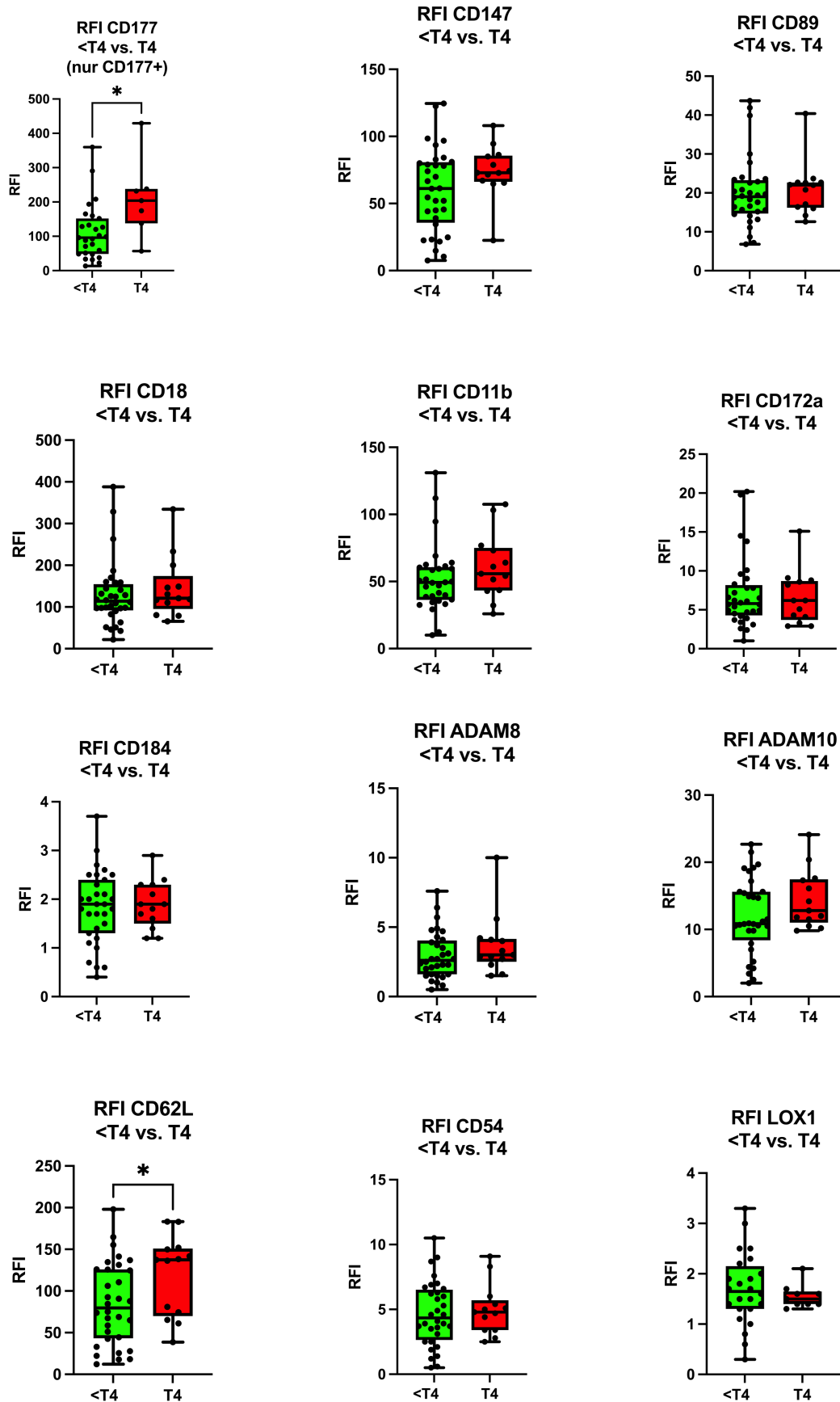


Abbildung 23: Der Vergleich der RFI zwischen HNSCC-Spendern mit T<4 gegen T4 zeigt eine erhöhte Expression von CD177 auf den CD177-positiven Neutrophilen von T4-Spendern und eine erhöhte Expression von CD62L

Neutrophile von HNSCC-Patienten wurden aus peripherem Blut isoliert und mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Für die phänotypische Charakterisierung erfolgte eine Einteilung nach Tumorstadium mit T4 Patienten (n=13) und nicht T4-Patienten (<T4, n=31). Die Ergebnisse sind dargestellt als "RFI" als Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten. Signifikanzen wurden berechnet mittels ungepaartem t-Test und angegeben mit * für $p < 0.05$.

Wurde die Kohorte der Spender unter Berücksichtigung des Tumorstadiums weiter stratifiziert und nicht alle Tumoren <T4, sondern ausschließlich der Neutrophilen von Patienten mit den kleinsten T1-Tumoren, mit denen der größten T4-Tumoren verglichen (siehe Abb. 24), so zeigte sich, dass Neutrophile von HNSCC-Patienten mit dem Tumorstadium T4 eine erhöhte Expression bei sieben von zwölf Proteinen aufwiesen.

Der Unterschied der CD177-Expression war hier noch stärker signifikant als im zuvor dargestellten Vergleich ($p=0.0067$). Zudem waren auch der F_c -Rezeptor CD89 ($p=0.0297$), die Bestandteile des MAC1-Komplex CD18 ($p=0.0411$) und CD11b ($p=0.0175$), sowie die Matrixmetalloproteasen ADAM8 ($p=0.0351$) und ADAM10 ($p=0.0435$), und auch CD62L ($p=0.0192$) signifikant seitens der T4-Spender erhöht. Die Expression von CD147, CD184, CD54 und LOX1 war im Mittel ebenfalls auf Neutrophilen von T4-Patienten im Vergleich zu Neutrophilen von T1-Patienten deutlich erhöht, wobei der Unterschied nicht signifikant war.

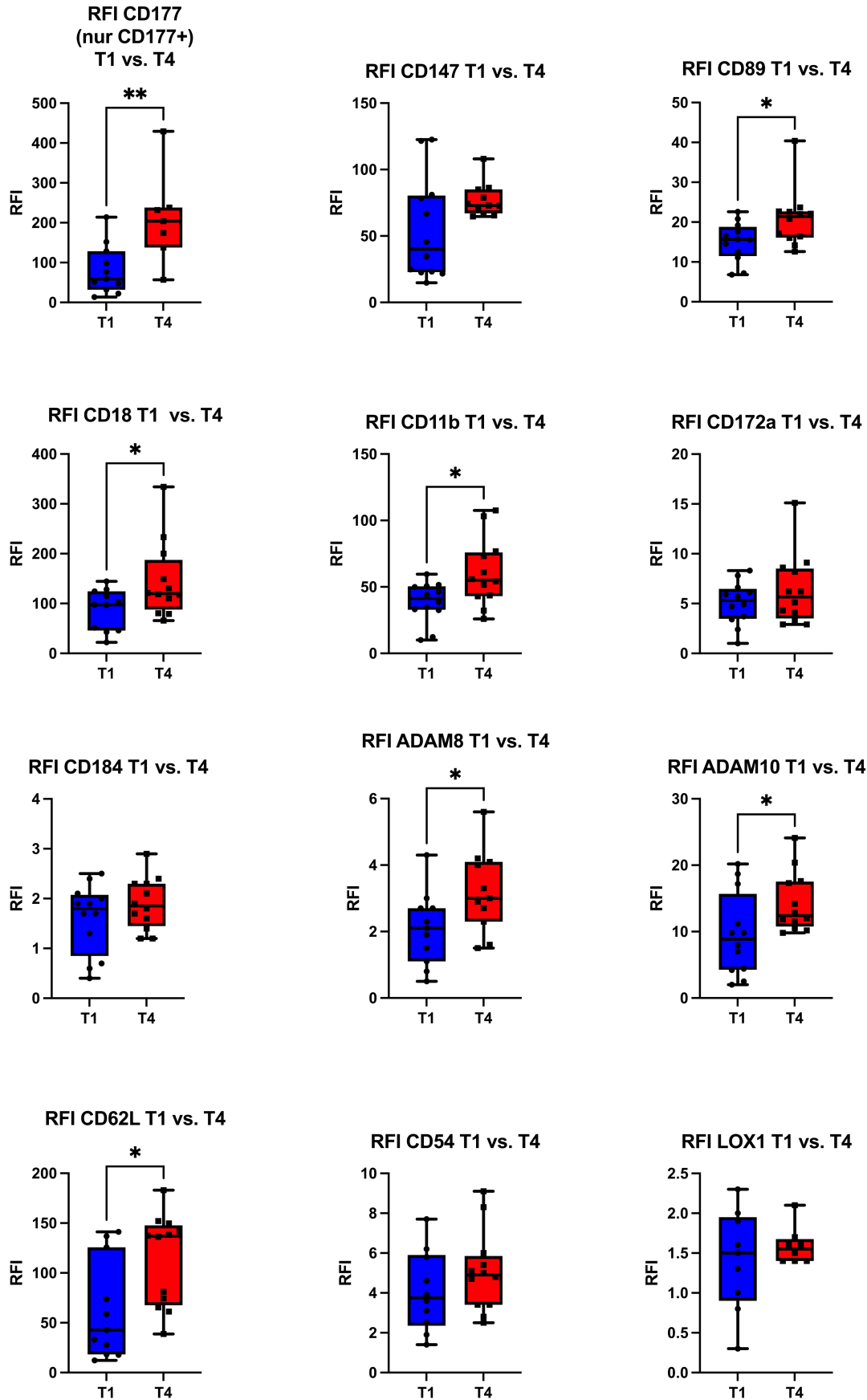


Abbildung 24: Vergleich der RFI der Neutrophilen von T1- gegen T4-Spender zeigt signifikant erhöhte Expressionen von CD177, CD89, CD18, CD11b, ADAM8, ADAM10 und CD62L

Die Neutrophilen von HNSCC-Patienten wurden aus peripherem Blut isoliert und mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Für die phänotypische Charakterisierung erfolgte eine Einteilung nach Tumorstadium mit T1-Patienten (n=11) und T4-Patienten (n=13). Die Ergebnisse sind dargestellt als "RFI" als Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten. Signifikanzen wurden berechnet mittels ungepaartem t-Test und angegeben mit * für $p < 0.05$, ** für $p < 0.01$.

Es gab keinen erkennbaren Trend beim Vergleich der Neutrophilen von HNSCC-Patienten bezüglich des N-Stadiums (Abb. 25).

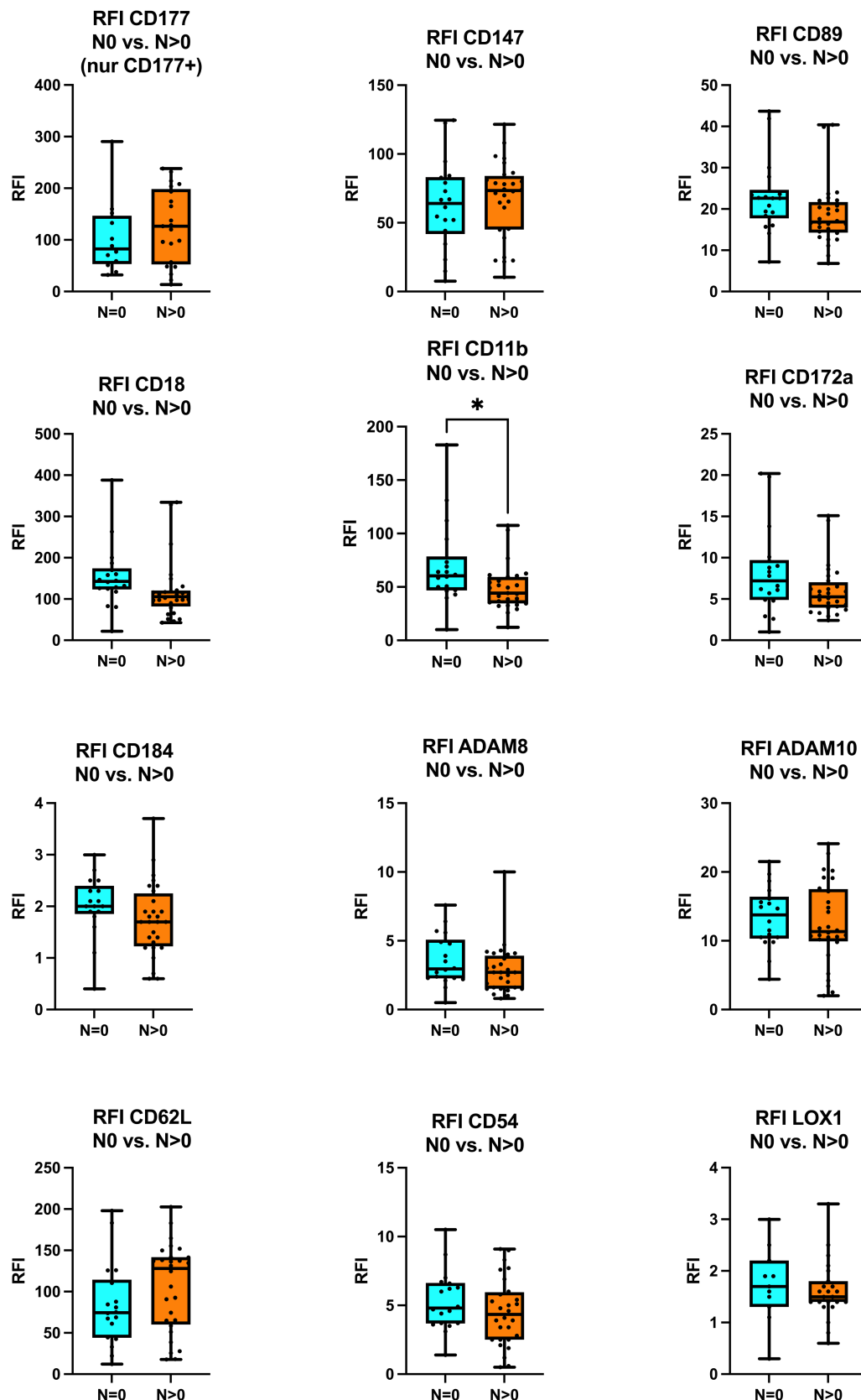


Abbildung 25: Die Neutrophilen der HNSCC-Spender mit N0 exprimieren lediglich mehr CD11b, ansonsten gibt es keine signifikanten Unterschiede

Die Neutrophilen von HNSCC-Patienten wurden aus peripherem Blut isoliert und mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Für die phänotypische Charakterisierung erfolgte eine Einteilung nach Tumorstadium mit N0-Patienten (n=18) und Patienten mit N>0 (n = 27). Die Ergebnisse sind dargestellt als "RFI" als Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten. Signifikanzen wurden berechnet mittels ungepaartem t-Test und angegeben mit * für $p < 0.05$.

Dies war beim altersabhängigen Vergleich anders (siehe Abb. 26). Die HNSCC-Spender über 70 Jahre exprimierten verschiedene Proteine signifikant höher, darunter erneut CD177 ($p=0.0419$), aber auch CD89 ($p=0.0357$), CD172a ($p=0.0434$) und CD54 ($p=0.0185$). Auch ADAM10 und CD62L waren im Trend bei den über 70 Jahre alten Patienten verstärkt exprimiert, jedoch ohne Signifikanz. Die anderen Proteine, darunter CD147, CD18, CD11b, CD184, ADAM8 und LOX1, wurden allesamt gleich stark in beiden Gruppen exprimiert. Bei keinem der untersuchten Marker fiel die Expression bei den älteren Spendern niedriger als auf den Neutrophilen der Spender unter 70 Jahren aus.

Bei keinem der Vergleiche gab es signifikante Unterschiede in Hinblick auf die CD177-Subset-Verteilung, weshalb auf die graphische Darstellung dieser verzichtet wurde.

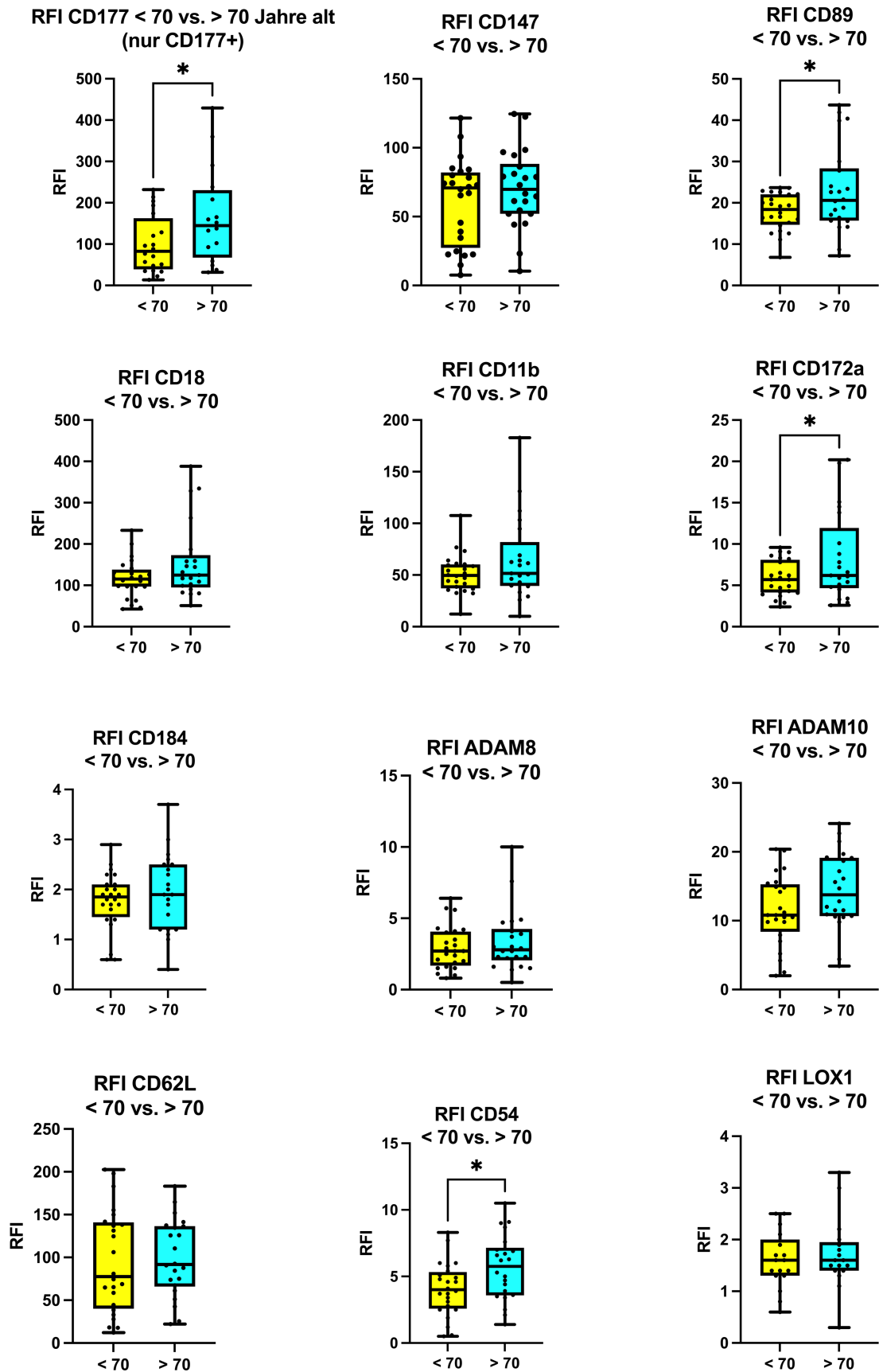


Abbildung 26: Der Vergleich der RFI verschiedener Proteine auf Neutrophilen von unter und über 70-jährigen HNSCC-Patienten zeigt eine erhöhte Expression von CD177, CD89, CD172a und CD54 bei den über 70-jährigen

Neutrophile von HNSCC-Patienten wurden aus peripherem Blut isoliert und mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Für die phänotypische Charakterisierung erfolgte eine Einteilung nach Alter mit Patienten < 70 (n=22) und Patienten > 70 (n=23). Die Ergebnisse sind dargestellt als "RFI" als Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten. Signifikanzen wurden berechnet mittels ungepaartem t-Test und angegeben mit * für $p < 0.05$.

Es ließ sich somit folgern, dass sich kaum ein Zusammenhang zwischen dem Lymphknotenstatus und dem Phänotyp der Patienten-Neutrophilen herstellen ließ. Dies war beim Vergleich abhängig vom Tumorstadium und vom Alter anders. Die CD177-Expression war bei T4-Spendern und bei über 70-jährigen höher. Zudem wurde eine Vielzahl an Proteinen bei diesen beiden Gruppen signifikant stärker exprimiert und es schien die Tendenz zu sein, dass mit hohem Alter und fortgeschrittenen Tumor nahezu alle Proteine verstärkt auf der Oberfläche exprimiert wurden, wenn auch nicht signifikant. Diesen Trend fand man beim N-abhängigen Vergleich nicht und hier war es auch das einzige Mal der Fall, dass die Spender mit der geringeren Tumorausbreitung, also mit dem N0, ein Protein signifikant höher exprimierten.

4.2.3 Geschlechtsabhängiger Vergleich des Neutrophilen-Phänotyps zwischen HNSCC-Patienten und gesunden Probanden

Es konnte gezeigt werden, dass die Neutrophilen von Frauen und von Männern sich bei einer Vielzahl verschiedener mRNAs, Proteine und Phosphorylierung dieser unterscheiden (Pilling et al. 2024).

Im Folgenden wurden in Abhängigkeit des Geschlechts der Phänotyp der Neutrophilen zwischen HNSCC- und gesunden Spenderinnen und Spendern verglichen. Hierbei ist erneut anzumerken, dass die dargestellten Ergebnisse der Durchflusszytometrie nicht ohne weiteres mit den Ergebnissen des Impedanz-Assays in Verbindung gesetzt werden konnten, da hier Spenderinnen und Spender miteinbezogen wurden, mit deren Neutrophilen nur die Durchflusszytometrie, nicht jedoch der Impedanz-Assay vollzogen wurde.

Erneut gab es sowohl beim Vergleich der kranken mit den gesunden Frauen, sowie auch beim Vergleich bei den kranken mit den gesunden Männern keinen Unterschied in Hinblick auf die CD177-Subset-Verteilung, weshalb erneut auf die Darstellung dessen verzichtet wurde.

Beim Vergleich zwischen den kranken und gesunden Frauen (siehe Abb. 27) gab es keinerlei signifikanten Unterschiede. Zudem ließen sich keine Tendenzen feststellen. Der Phänotyp der Neutrophilen schien sich nicht verändert zu haben.

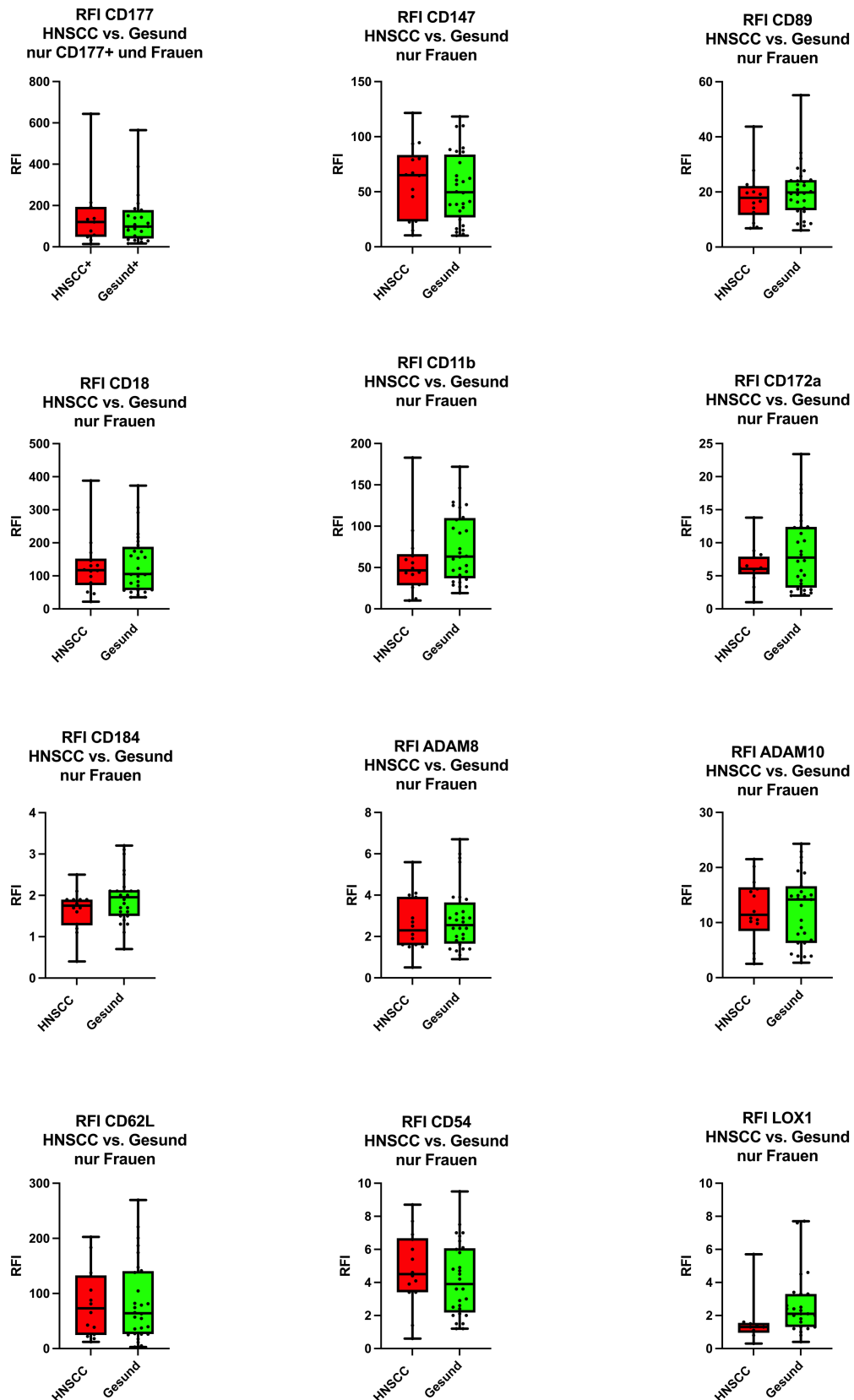


Abbildung 27: Es gibt keinerlei signifikante Unterschiede bei der Expression der untersuchten Proteine zwischen den kranken und gesunden Frauen

Die Neutrophilen von HNSCC-Patientinnen und gesunden Spenderinnen wurden aus peripherem Blut isoliert und mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Für die phänotypische Charakterisierung erfolgte eine Einteilung je nach Vorliegen einer Erkrankung mit 14 HNSCC-Patientinnen und 28 gesunden Vergleichsspenderinnen. Die Ergebnisse sind dargestellt als "RFI" als Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten. Signifikanzen wurden berechnet mittels ungepaartem t-Test und angegeben mit * für $p < 0.05$.

Anders sah es bei den Männern aus (siehe Abb. 28). Hier hatten die kranken Spender signifikant mehr CD177 ($p=0.0293$) auf ihren CD177-positiven Neutrophilen. Außerdem exprimierten die Neutrophilen signifikant mehr CD147 ($p=0.0242$), ADAM10 ($p=0.0435$) und CD62L ($p=0.0014$), dafür weniger CD11b ($p=0.0215$) als bei den männlichen gesunden Spendern.

Die erhöhte Expression von CD177 und von ADAM10 gab es beim Vergleich aller kranken mit allen gesunden Spendern nicht und hat sich erst durch die Stratifizierung anhand des Geschlechts herausgestellt. Die erhöhte Expression von CD147 und CD62L, sowie die erniedrigte Expression von CD11b seitens der HNSCC-Gruppe waren dagegen schon beim geschlechtsunabhängigen Vergleich gegeben (siehe Abb. 21).

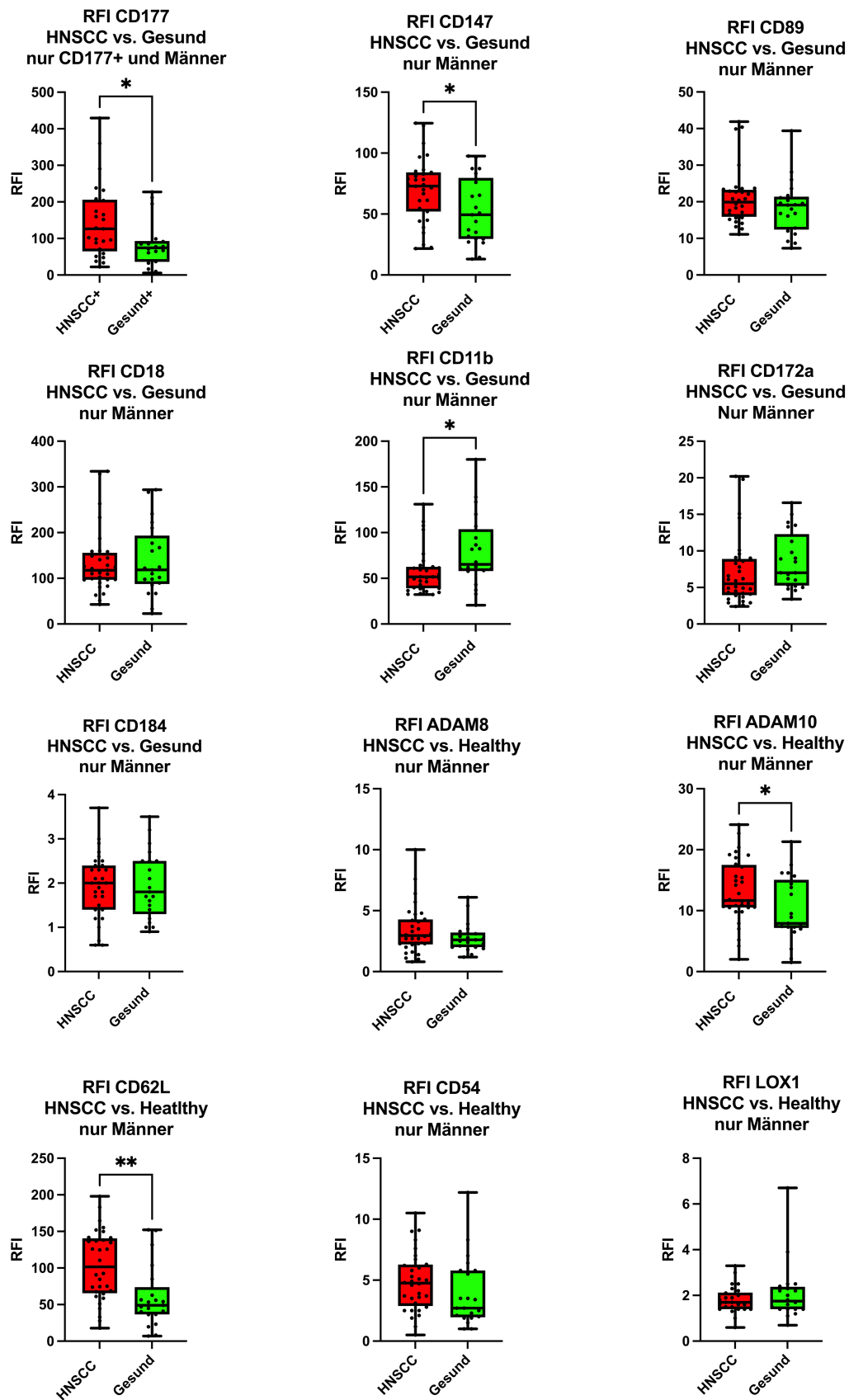


Abbildung 28: die Neutrophilen der kranken Männer exprimieren mehr CD177, CD147, CD11b, ADAM10 und CD62L

Die Neutrophilen von HNSCC-Patienten und gesunden Spendern wurden aus peripherem Blut isoliert und mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Für die phänotypische Charakterisierung erfolgte eine Einteilung je nach Vorliegen einer Erkrankung mit 31 HNSCC-Patienten und 22 gesunden Vergleichsspendern. Die Ergebnisse sind dargestellt als "RFI" als Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten. Signifikanzen wurden berechnet mittels ungepaartem t-Test und angegeben mit * für $p < 0.05$.

4.3 Patienten- und Spenderdaten zum Impedanz-Assay

Von jeweils 11 HNSCC-Patienten und 11 gesunden Spendern aus der großen Kohorte (siehe Tabelle 5) wurden Neutrophile aus peripherem Blut isoliert und nicht nur für die Durchflusszytometrie, sondern auch für den Impedanz-Assay verwendet. Detaillierte klinische und tumorspezifische Informationen – einschließlich Tumorlokalisierung, TNM-Klassifikation, sowie epidemiologische Daten aller Spender, darunter Alter und Geschlecht, wurden für die jeweiligen Kohorten tabellarisch zusammengefasst (Tab. 6).

Tabelle 6: Tumordaten sowie epidemiologische Daten zu den Spendern des Impedanz-Assays

Eigenschaften	N	Anteil
Spender	22	100%
HNSCC	11	50%
Gesund	11	50%

Geschlecht

Männlich HNSCC	6	27%
Weiblich HNSCC	5	23%
Männlich gesund	7	32%
Weiblich gesund	4	18%

Alter

Alter HNSCC: Mittelwert ; Median	71 ; 72
Alter HNSCC Mann: Mittelwert ; Median	70 ; 69
Alter HNSCC Frau: Mittelwert; Median	72 ; 73
Alter gesund: Mittelwert; Median	48 ; 54
Alter gesund Mann: Mittelwert; Median	42 ; 35

Alter gesund Frau: Mittelwert; Median 51 ; 56

Eigenschaften HNSCC	N	Anteil
Gesamt	11	100%
> 70 Jahre	6	55%
< 70 Jahre	5	45%
> 70 männlich	3	27%
> 70 weiblich	3	27%
< 70 männlich	3	27%
< 70 weiblich	2	18%
Tumorart		
Kehlkopf	6	55%
Zungengrund	3	27%
Tonsille	1	9%
Hypopharynx	1	9%
T-Stadien		
T1	3	27%
T1 männlich	2	18%
T1 weiblich	1	9%
T1 > 70	2	18%
T1 < 70	1	9%
T2	2	18%
T2 männlich	1	9%
T2 weiblich	1	9%
T2 > 70	1	9%
T2 < 70	1	9%
T3	2	18%
T3 männlich	1	9%
T3 weiblich	1	9%
T3 > 70	1	9%
T3 < 70	1	9%

T4	4	36%
T4 männlich	2	18%
T4 weiblich	2	18%
T4 > 70	2	18%
T4 < 70	2	18%

N-Stadien

N0	4	36%
N0 männlich	2	18%
N0 weiblich	2	18%
N0 > 70	4	36%
N0 < 70	0	0%

N > 0	7	63%
N > 0 männlich	4	36%
N > 0 weiblich	3	27%
N > 0 älter als 70 Jahre	2	18%
N > 0 jünger als 70 Jahre	5	35%

N1	2	18%
N1 männlich	0	0%
N1 weiblich	2	18%
N1 > 70	1	9%
N1 < 70	1	9%

N2	4	36%
N2 männlich	3	27%
N2 weiblich	1	9%
N2 > 70	0	0%
N2 < 70	4	36%

N3	1	9%
N3 männlich	1	9%
N3 weiblich	0	0%
N3 > 70	1	9%

N3 < 70	0	0%
M-Stadien		
M0	11	100%

(übersetzt und entnommen aus Valcenko et al. 2024)

4.4 Unterschiede bei der IgA2.0-vermittelten ADCC in Abhängigkeit der Spender

Neutrophile Granulozyten von Patienten mit HNSCC können je nach dem, welche Chemokine in welcher Konzentration und weitere Faktoren, darunter Hypoxie, auf sie einwirken, direkt oder indirekt Tumor-hemmend und entzündungsfördernd sein oder gar das Tumorwachstum, die Angiogenese und die Metastasierung fördern (Masucci et al. 2019; Singhal et al. 2017)

Im Folgenden wurde erstmalig untersucht, ob die bereits erwiesene Kompetenz der Neutrophilen gesunder Spender, IgA2.0-vermittelt ADCC zu betreiben, auf die Neutrophilen von HNSCC-Spendern übertragen werden kann (Abb. 29).

Die Kurvenverläufe der Negativkontrollen – sowohl der Ansatz mit Standardantikörper in Kombination mit Neutrophilen als auch der Ansatz mit Neutrophilen ohne Antikörper – zeigten lediglich einen transienten, leichten Abfall der normalisierten Zellindexwerte (nCI), gefolgt von einem erneuten Anstieg auf das Ausgangsniveau bzw. leicht darüber hinaus. Dieses Daten sprachen gegen das Vorliegen einer antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC).

Zwei Kurven in Abb. 29A hoben sich hier von klar ab, und zwar die Kurve für IgA2.0 mit den Neutrophilen der HNSCC-Patienten (rot) und mit Neutrophilen der gesunden Spender (blau). Diese zeigten beide innerhalb der ersten 6h einen starken nCI-Abfall, der sich im weiteren Verlauf kaum änderte. Dies ließ folgern, dass bei beiden eine ADCC stattfand, Tumorzellen lysiert und somit zerstört worden sind. Dabei überlagerten sich die Kurven, was darauf hindeutete, dass die ADCC im gleichen Ausmaß stattfand und die ADCC der kranken Spender der gesunden gleichwertig war. Hier gab es keine signifikanten Unterschiede für vier, sechs und 24h nach Zell- und Antikörper-Zugabe (Abb 29B). Im direkten Vergleich zeigte sich somit zwischen Neutrophilen gesunder Spender und von HNSCC-Patienten kein Unterschied in ihrer ADCC-Kompetenz. Dabei fiel jedoch auf, dass vor allem 24h nach dieser Zugabe die Spannweite der Zellindices für HNSCC-Spender sehr groß war und teilweise Werte wie bei

den Kontrollen erreicht wurden. Es deutete sich also an, dass das Ausmaß der ADCC der kranken Spender sehr heterogen und ein weiteres Differenzieren innerhalb dieser Gruppe vonnöten war.

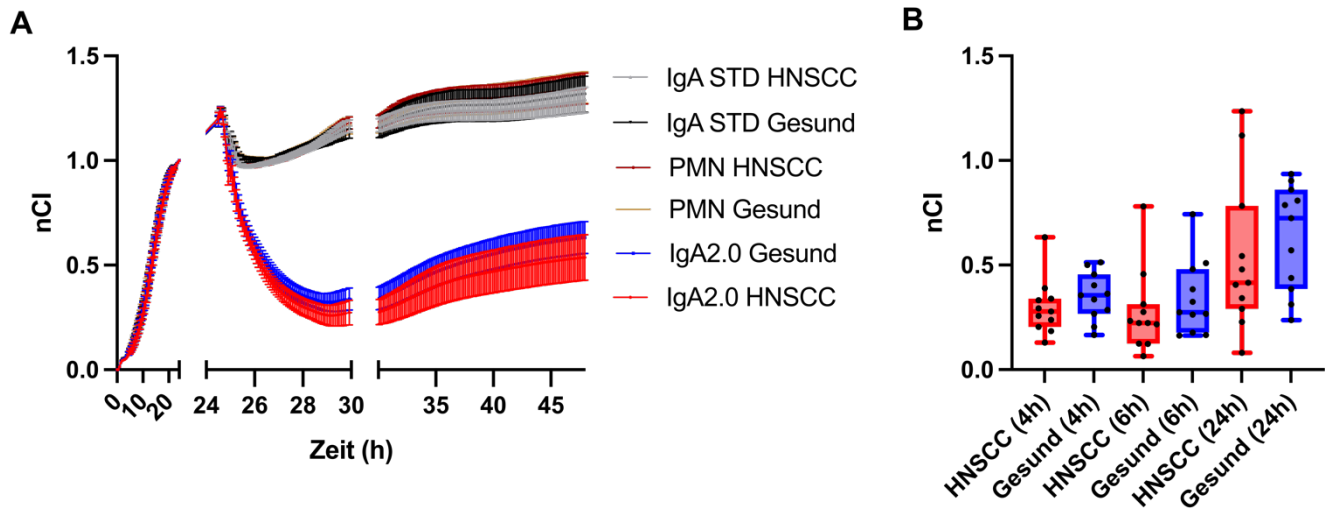


Abbildung 29: Der Vergleich der IgA2.0-abhängigen ADCC der Neutrophilen zwischen kranken und gesunden Spendern zeigt keinen Unterschied

Die Fähigkeit des EGFR-spezifischen IgA2.0 Neutrophile zu ADCC von A431 (800000 Neutrophile, 20000 Tumorzellen, E.T Ratio 40:1) zu aktivieren, wurde mittels Impedanz-Assay untersucht. Neutrophile wurden mittels MACS aus dem peripheren Blut gesunder Spender (blau) und HNSCC Patienten (rot) isoliert. Dargestellt sind die Ergebnisse von je elf kranken und gesunden Spendern jeweils mit Triplikaten (A) (+/- SEM als "normalized Cell Index") und 4, 6 und 24 h nach Behandlung (B) als Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten (Vergleich mittels ungepaartem t-Test) (modifiziert aus Valcenko et al. 2024).

Nach dem Differenzieren in verschiedene Tumorstadien zeigte sich je nach T-Stadium ein unterschiedliches ADCC-Ausmaß (Abb. 30). Die ADCC für T4 war dabei den der kleineren Tumorstadien stets unterlegen und die Kurve für T4 sank in den ersten 6h nach Antikörper- und Zellzugabe zwar ähnlich stark wie bei T1 bis T3 ab, gefolgt von einem Anstieg auf Ausgangswerte der nCI, was auf kaum stattfindende ADCC hindeutete.

Beim Vergleich von T4 und <T4 (siehe Abb. 30 A) blieb die Kurve von <T4 im Verlauf niedrig und der Anstieg auf Ausgangswerte wie bei T4 blieb aus. Passend dazu konnten in Abb. 30 B für T4 stets höhere nCI-Werte und sogar eine Signifikanz für 24h nach Zell- und Antikörper-Zugabe abgelesen werden ($p=0.0118$). Auch beim Vergleich T2 gegen T4 und T3 gegen T4 (Abb. 30 C und D) zeigte sich das gleiche Bild. Vor allem die nCI-Kurve für T2 waren hierbei sehr schmal und kaum ansteigend. Da sowohl für T2 als auch T3 nur zwei Spender vorhanden

waren, wurde an dieser Stelle auf eine Gegenüberstellung der Impedanzen mit T4 nach 4, 6, und 24h verzichtet.

Auch der Vergleich T1 gegen T4 (Abb. 30 E und F) zeigte das gleiche Bild. Vor allem nach 6 (p=0.0032) und 24h (p=0.0005) war der normierte Zellindex für T1 hochsignifikant niedriger und somit die ADCC für T1 ausgeprägter.

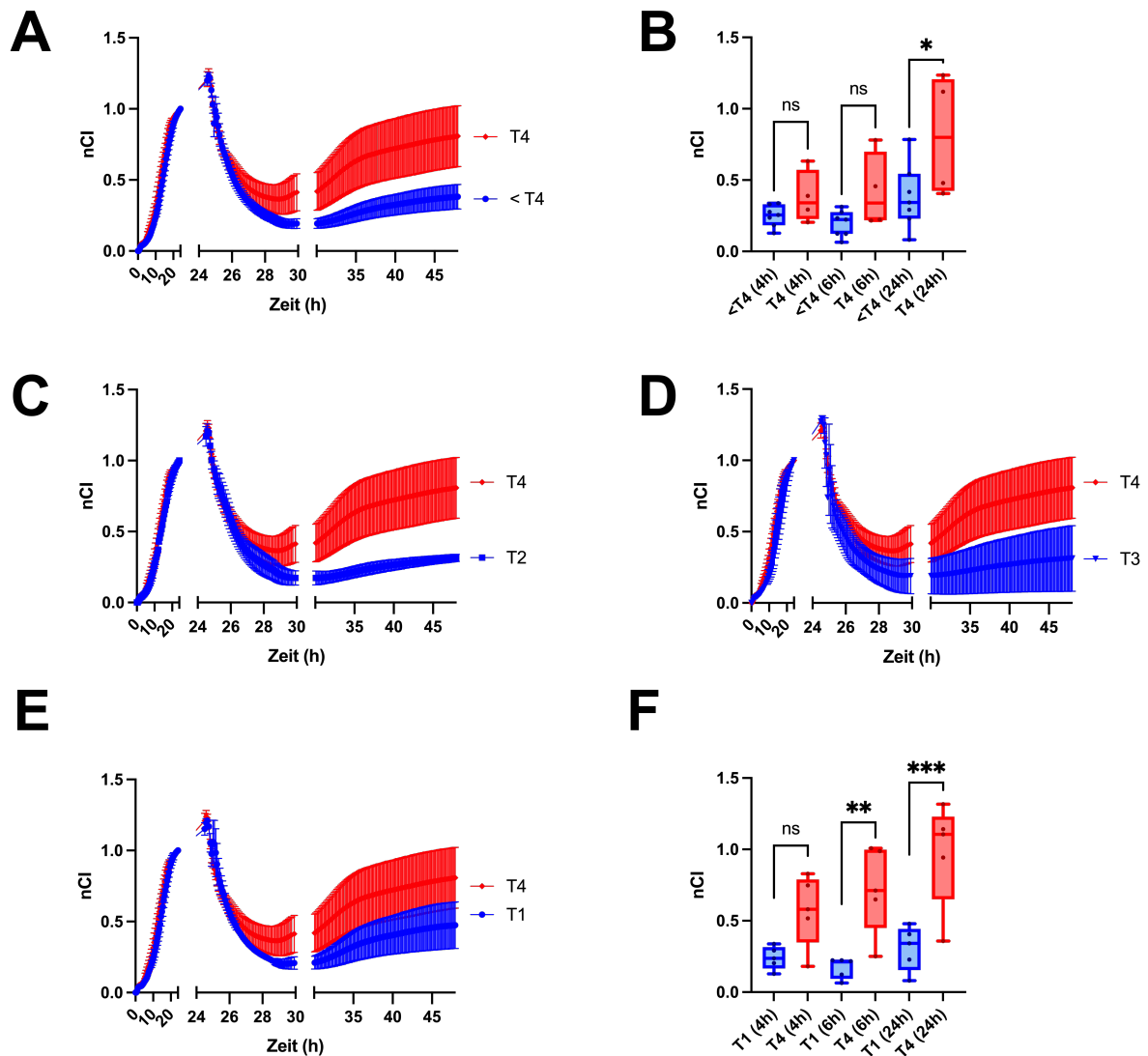


Abbildung 30: Vergleich der ADCC-Fähigkeit mit IgA2.0 und Neutrophilen für die Tumorstadien T4 gegen <T4 (A und B), T2 gegen T4 (C), T3 gegen T4 (D) und T1 gegen T4 (E und F)

T4 (n=4) zeigt eine schlechtere ADCC als <T4 (n=7), T1 (n=3), T2 (n=2) und T3 (n=2) mit statistischer Signifikanz beim Vergleich T1 gegen T4 und <T4 gegen T4; Ergebnisse von insgesamt elf kranken Spendern jeweils mit Triplikaten (A, C, D, E) (+/- SEM als "normalized Cell Index"); Vergleich der nCI, dargestellt als Box und Whisker Blot mit allen Datenpunkten nach 4, 6 und 24h nach Antikörper-Zugabe mittels ungepaartem t-Test (B, F) (* für p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001) (modifiziert nach aus Valcenko et al. 2024).

Auch in Abhängigkeit des N-Stadiums ließen sich innerhalb der HNSCC-Spender beim IgA2.0-abhängigen ADCC Unterschiede feststellen (Abb. 31). Dabei fiel bei den Patienten mit Lymphknotenmetastasen erneut eine große Spannweite bei den normierten Zellindices auf. Eine Signifikanz für vier, sechs, und 24h nach Zell- und Antikörperzugabe gab es jedoch nicht.

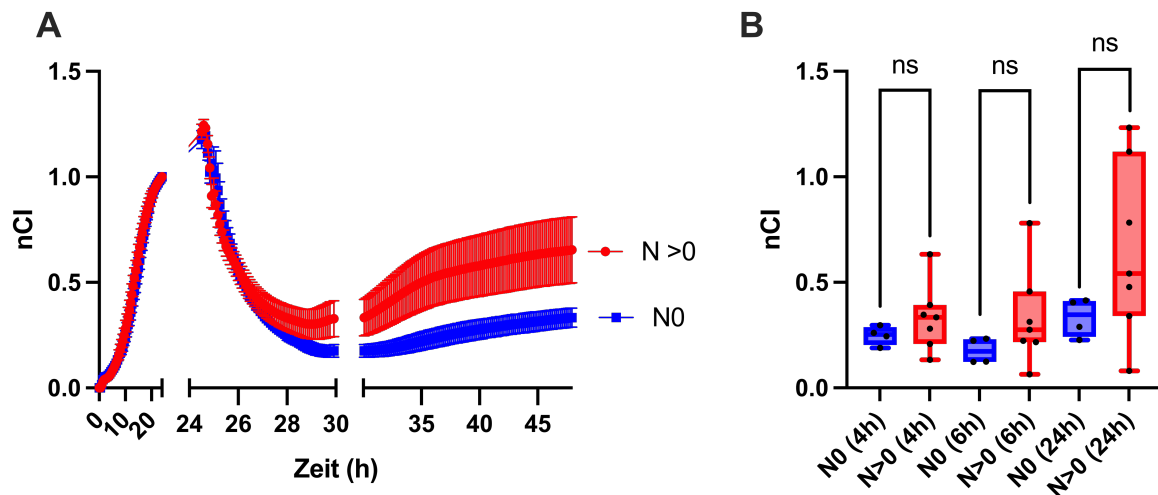


Abbildung 31: Vergleich des IgA2.0-abhängigen ADCC zwischen N0 (n=4) und N>0 (n=7)

Die Impedanz-Kurve der N0-Spender ist schmaler und flacherbleibend (A) (+/- SEM als "normalized Cell Index). Es zeigt sich nach 4, 6, und 24h nach Zell- und Antikörper-Zugabe kein signifikanter Unterschied zwischen den Impedanzen (B) (Darstellung der nCI nach 4, 6 und 24h nach Antikörper-Zugabe mit Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten mittels ungepaartem t-Test)

In Vitro schien sich somit mit einem höher werdendem Tumorstadium die IgA2.0-vermittelte ADCC mit Neutrophilen aus dem Blut der HNSCC-Patienten zu verschlechtern. Bei den Patienten mit Lymphknotenmetastasen zeigte sich eine stärkere Streuung der Impedanz-Werte.

4.5 Unterschiede bei der Expression verschiedener Oberflächenproteine der Neutrophilen vom Impedanz-Assay

Eingangs wurde auf die Bedeutung einer Vielzahl verschiedener Proteine auf der Oberfläche von Neutrophilen eingegangen, deren relative Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie gemessen wurde. Im Folgenden wurde in Bezug auf die Spender, mit deren Neutrophilen der Impedanz-Assay vollzogen wurde, untersucht, ob sich die Expression dieser je nach Spender-Gruppe unterschied.

Beim IgA2.0-abhängigen Impedanz-Assay konnte kein Unterschied zwischen den kranken und gesunden Spendern gefunden werden. Die Subset-Verteilung sowie die Expression der verschiedenen untersuchten Proteine zeigten passend dazu jeweils gleiche Ausprägungen (Abb. 32). Viele der untersuchten Proteine wurden in beiden Gruppen nur wenig exprimiert, insbesondere LOX1, CD184, ADAM8 und CD54 ließen sich kaum finden. Auch fiel eine breite Streuung der einzelnen Werte für verschiedene Proteine auf und es ließ sich vor allem bei den Bestandteilen des MAC-1-Komplexes (CD18 sowie CD11b), aber auch für CD147, CD177 und CD62L eine große Spannweite feststellen.

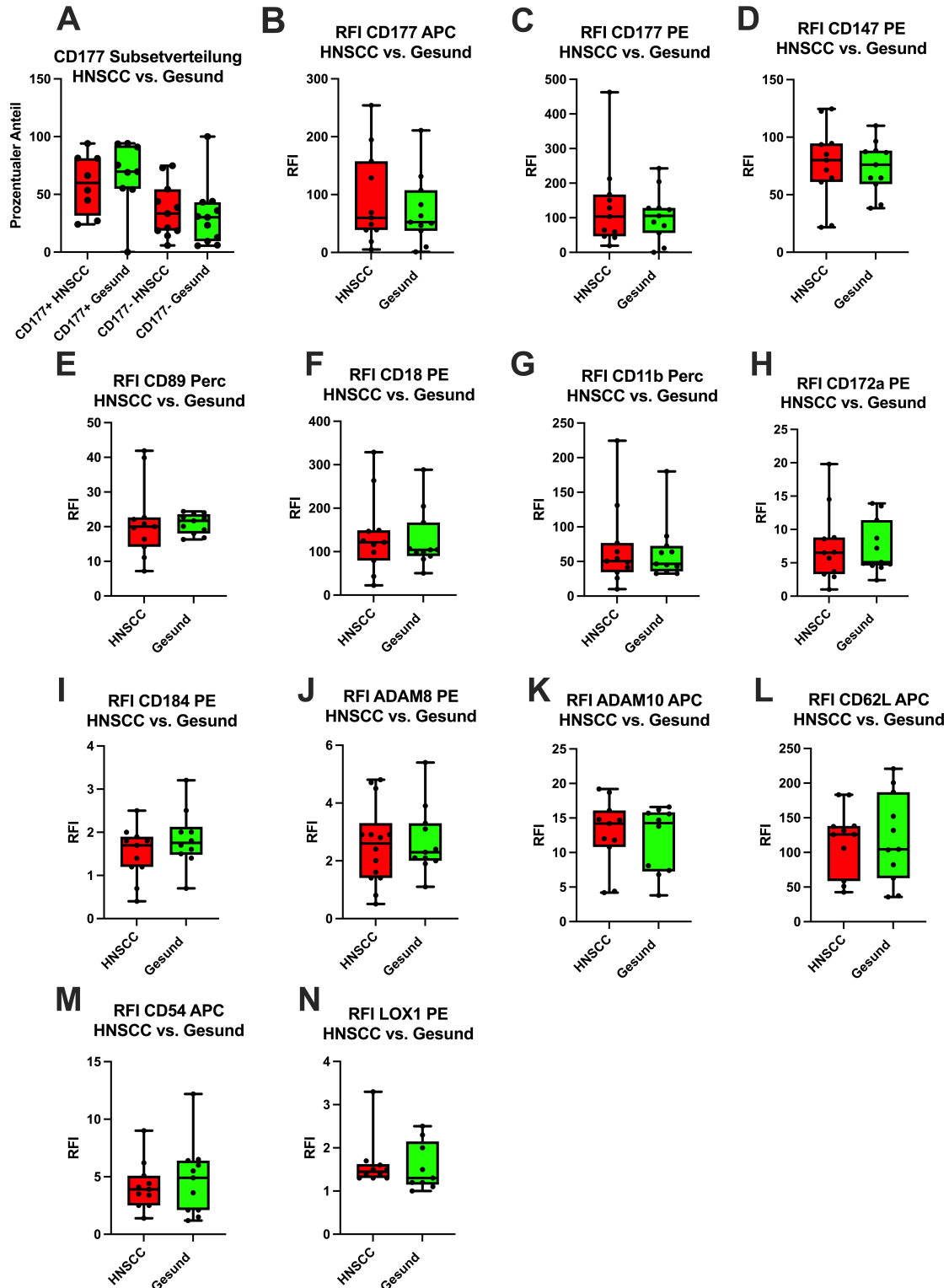


Abbildung 32: Der Vergleich der prozentualen Verteilung für das CD177-positive- und negative Subset (A) sowie für die Expression verschiedener Oberflächenproteine (B – N) der kranken und gesunden ADCC-Spender zeigt keinerlei signifikante Unterschiede

Neutrophile von HNSCC-Patienten (n=11) und gesunden Spendern (n=11) wurden aus peripherem Blut isoliert und mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind dargestellt als "RFI" als Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten. Signifikanzen wurden berechnet mittels ungepaartem t-Test und angegeben mit * für $p < 0.05$

Eingangs wurde auf einen möglichen positiven Einfluss des CD177-positiven Subsets verwiesen, und tatsächlich konnte beim Differenzieren in die CD177-Subsets (Abb. 33) sowohl bei den Neutrophilen der kranken ($p=0.0045$) als auch der gesunden Spender ($p=0.0003$) auf den positiven Neutrophilen eine höhere Expression an CD89 festgestellt werden. Das positive Subset hatte offenbar mehr von dem Protein, das für die Ausbildung der IgA-vermittelten immunologischen Synapse unentbehrlich ist. Auch die Bestandteile des MAC-1-Komplexes, CD18 (nur bei den gesunden Spendern) ($p=0.0084$) und CD11b ($p_{\text{HNSCC}}=0.0028$; $p_{\text{gesund}}=0.0042$), sowie CD62L ($p_{\text{HNSCC}}=0.0483$; $p_{\text{gesund}}=0.0306$) waren auf den CD177-positiven Neutrophilen stärker exprimiert. Diese Unterschiede waren hochsignifikant, aber gering ausgeprägt. Schlussfolgerungen aufgrund dieser Unterschiede für die ADCC-Fähigkeit ließen sich nicht ableiten, da im Impedanz-Versuch keine Trennung zwischen positiven und negativen Subsets stattfand. Dabei ist anzumerken, dass es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei der Subsetverteilung gab und sowohl kranke als auch gesunde Spender ungefähr gleiche Anteile CD177-positive und -negative Neutrophile besaßen. Auch hier war die Spannweite passend zur Literatur sehr groß (Matsuo et al. 2000; Eulenberg-Gustavus et al. 2017; Dahlstrand Rudin et al. 2021).

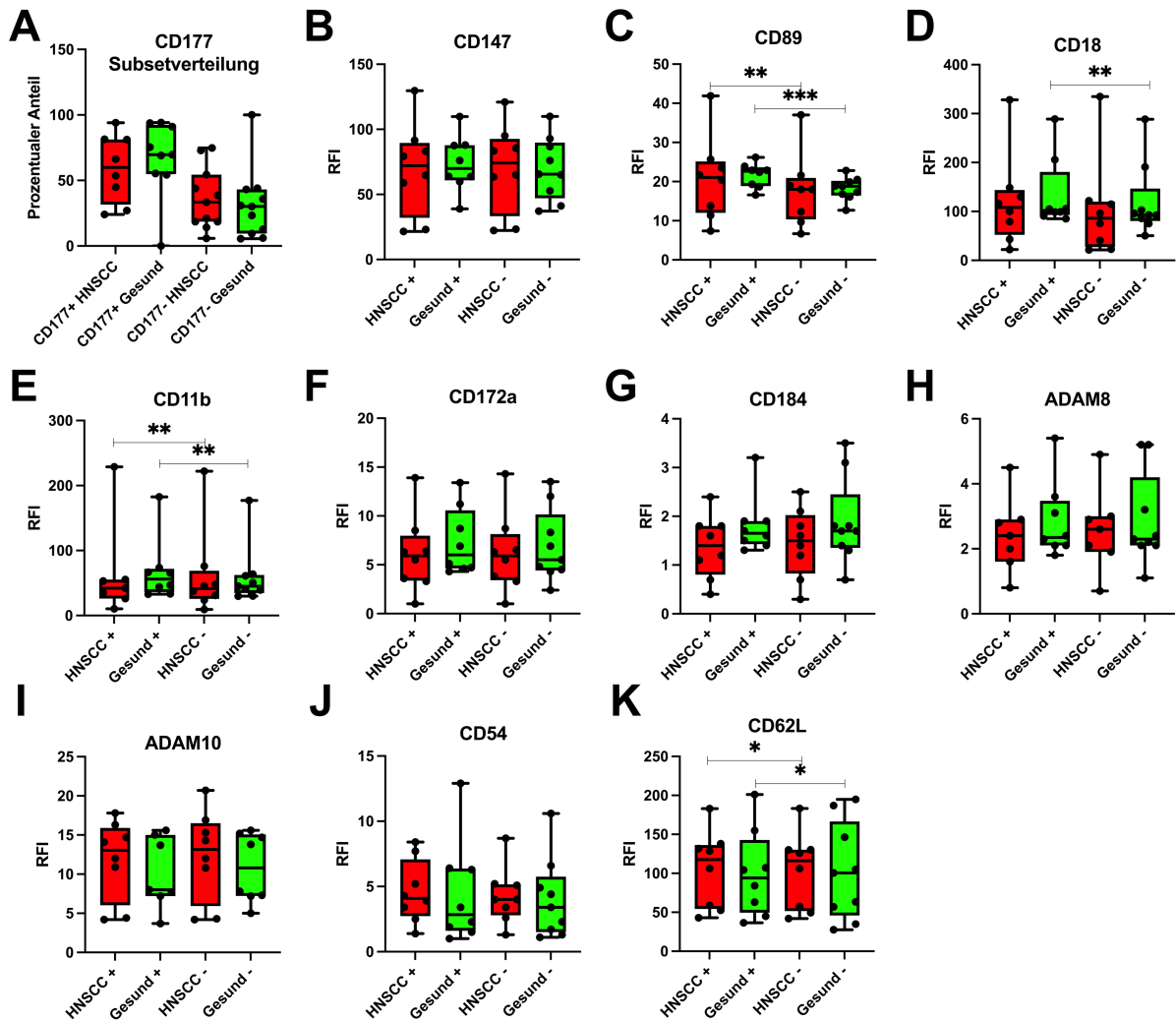


Abbildung 33: Vergleich der Expression der Proteine zwischen kranken und gesunden Spendern mit Fokus auf die CD177-Subsets

Neutrophile von HNSCC-Patienten (n=11) und gesunden Spendern (n=11) wurden aus peripherem Blut isoliert und mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Für die phänotypische Charakterisierung erfolgte die Aufteilung der Neutrophilen in das CD177-positive und -negative Subset. Die Ergebnisse sind dargestellt als "RFI" als Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten. Signifikanzen wurden berechnet mittels ungepaartem t-Test und angegeben mit * für $p < 0.05$, ** für $p < 0.01$, *** für $p < 0.001$ (aus Valcenko et al. 2024).

Passend zum Vergleich der Impedanz zwischen T4 und < T4 wurde die Expression der verschiedenen untersuchten Proteine ebenfalls zwischen diesen beiden Gruppen verglichen (Abb. 34). Dabei war lediglich die Expression von CD62L auf den Neutrophilen der Spender mit T4-Tumoren signifikant im Vergleich zu denen mit <T4 erhöht ($p=0.0128$). Wie im Kapitel 2 erwähnt, wird dieses erst im Verlauf des Lebens eines Neutrophilen von der Zelloberfläche entfernt und das vermehrte Vorhandensein spricht somit für ein jüngeres Alter und möglicherweise für eine Unreife der Neutrophilen. Damit könnte auch die verschlechterte ADCC in Einklang gebracht werden.

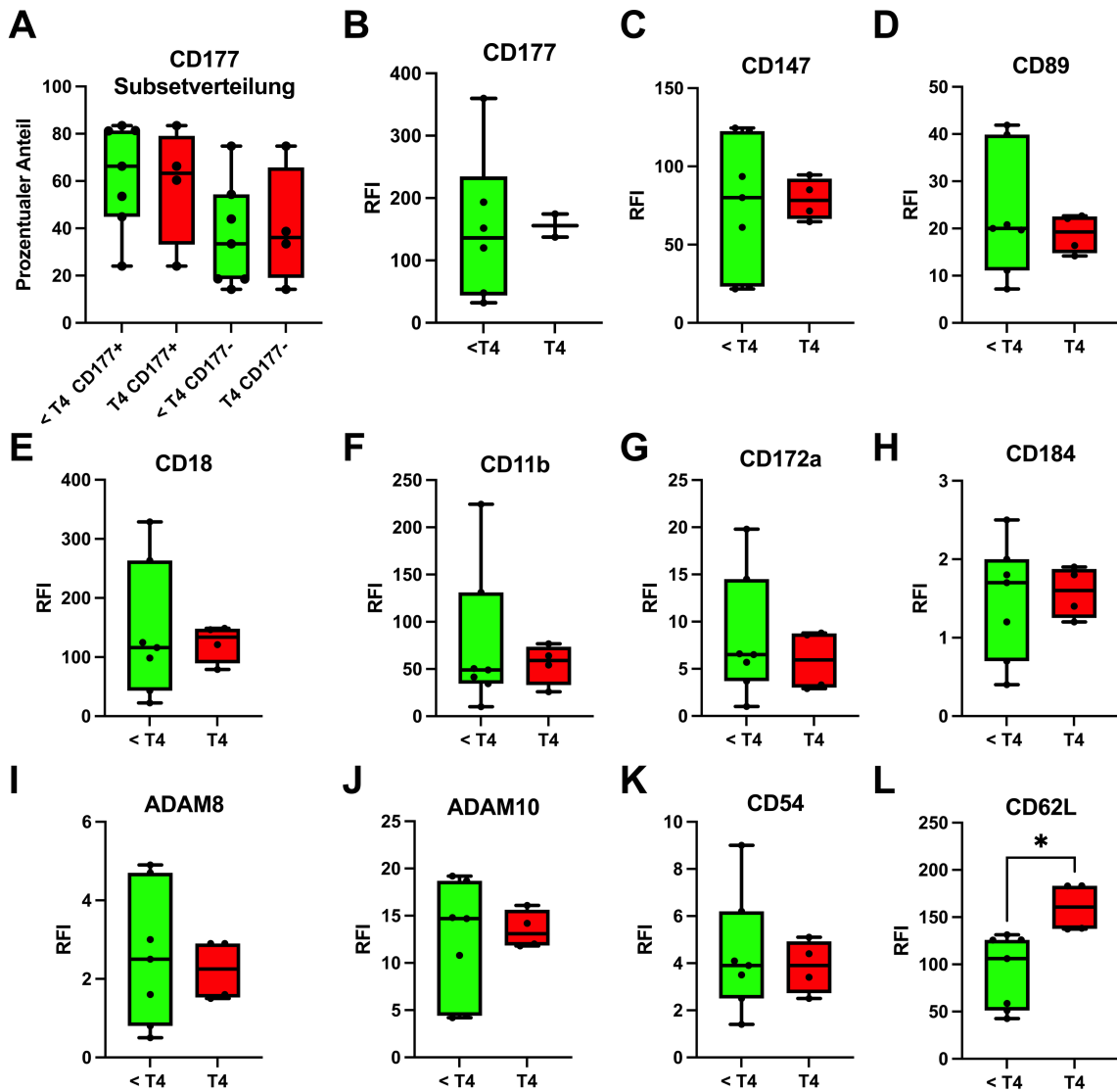


Abbildung 34: Die Neutrophilen der Spender mit T4-Tumoren exprimieren mehr CD62L als die mit T1 bis T3

Die Neutrophilen von HNSCC-Patienten wurden aus peripherem Blut isoliert und mittels direkter Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie analysiert. Für die phänotypische Charakterisierung erfolgte eine Einteilung nach Tumorstadium mit T4 Patienten (n=4) und nicht T4-Patienten (<T4, n=7). Die Ergebnisse sind dargestellt als "RFI" als Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten. Signifikanzen wurden berechnet mittels ungepaartem t-Test und angegeben mit * für $p < 0.05$ (aus Valcenko et al. 2024).

4.6 Unterschiede bei der ADCC in Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers

Eingangs wurde Panitumumab erwähnt als klinisch etablierter, EGFR-bindender IgG₂, der zusätzlich zur Chemotherapie bei metastasierten HNSCC oder beim Rezidiv die Progression der Tumorerkrankung hemmen, aber nicht das Überleben verlängern kann. Dieser ist jedoch nicht für die Therapie von HNSCCs zugelassen, sondern findet nur bei der Therapie metastasierter kolorektaler Karzinome Einsatz (Vermorken et al. 2013; Musch 2008). Die ADCC-Kompetenz dieses klinisch bereits etablierten Antikörpers wurde im Folgenden mit der des IgA2.0 innerhalb verschiedener Gruppen verglichen.

In Abb. 35A und B wurde die IgA2.0-abhängige (rot) mit der Panitumumab-abhängigen ADCC (grün) für HNSCC-Spender miteinander verglichen. Dabei fiel direkt auf, dass die Panitumumab-Kurve kaum und nur transient abfiel, und dann wieder ein Anstieg auf nahezu initiale Werte wie vor der Zell- und Antikörper-Zugabe zu verzeichnen war. Offensichtlich fand hier wenig Panitumumab-abhängiges Tumorzell-Killing statt und höchstens ein Teil der Tumorzellen wurde lysiert, der Rest wurde aufgewirbelt, hat sich dann erneut an den Boden des Wells abgesetzt und ist konfluiert. Gleiches galt für die Kurve von Panitumumab (grün) in Abb. 35 C, E, G, I, K, M und O. Egal, welche Gruppe man also betrachtet, HNSCC- oder gesunde Spender, Tumor kleiner oder gleich T4, ohne oder mit Lymphknotenmetasasen, männliche oder weibliche HNSCC-Spender: Es fand wenig Panitumumab-abhängige ADCC statt.

Anders sah es bei der IgA2.0-vermittelten ADCC aus. In Abb. 35 A zeigte sich für die HNSCC-Spender für IgA2.0 ein Abfall und mit kaum vorhandenem erneutem Ansteigen der Kurve (rot) ohne Überschneidung mit der Kurve für Panitumumab (grün). Sowohl für vier, sechs, und 24h nach Antikörper- und Zellzugabe (35 B) war die nCI für die IgA2.0-abhängige ADCC hochsignifikant niedriger und somit der IgA2.0 überlegen ($p_{4h} < 0.0001$; $p_{6h} < 0.0001$; $p_{24h} < 0.0001$). Bei den gesunden Spendern zeigte sich Ähnliches (Abb. 35 C und D), mit dem Unterschied, dass hier erst nach sechs und nicht schon nach vier Stunden ein signifikanter Unterschied der nCI vorhanden war ($p_{6h} = 0.0015$; $p_{24h} < 0.0001$).

Auch innerhalb der Gruppe der HNSCC-Spender mit T<4 (Abb. 35 E und F) ($p_{6h} = 0.0185$; $p_{24h} = 0.0019$) sowie bei denen mit N0 (Abb. I und J) ($p_{6h} = 0.0028$; $p_{24h} < 0.0001$) zeigte sich klar die Überlegenheit des IgA2.0 mit schmaler, stark abfallender und kaum erneut ansteigender Kurve für IgA2.0. Insbesondere die IgA2.0-Kurve für N0 war sehr schmal. Anders sah es bei den HNSCC-Spendern mit T4 und N>0 aus. Bei den HNSCC-Spendern mit T4 (Abb. 35 G und H) zeigte sich nicht nur für Panitumumab kaum ADCC, sondern auch mit dem IgA2.0. Ausdruck dieser Tatsache war das erneute starke Ansteigen beider Kurven nach dem transienten Abfall

auf Ausgangswerte. Signifikante Unterschiede für vier, sechs und 24h nach Zell- und Antikörperzugabe waren ebenfalls nicht vorhanden. Auch bei den HNSCC-Spendern mit $N>0$ (Abb. 35 K und L) war die IgA2.0-Kurve nach transientem Abfall wieder ansteigend, was auf nur im geringen Ausmaß stattfindende ADCC hindeutete. Ab Stunde 35 schienen die Kurven sich sogar zu überschneiden. Hier gab es jedoch zumindest für sechs und 24h nach Antikörper- und Zellzugabe signifikante Unterschiede bei den nCIs ($p_{6h}=0.0397$; $p_{24h}=0.0073$). In Abb. 35 M und N fand sich der ADCC-Vergleich für die männlichen HNSCC-Spender und in Abb. 35 O und P für die weiblichen. Bei den männlichen schien IgA2.0-abhängig kaum ADCC stattzufinden. Die IgA2.0-Kurve stieg nach Stunde 30 stark an und schnitt die Panitumumab-Kurve. Nichtsdestotrotz gab es einen signifikanten Unterschied der nCI, jedoch nur 24h nach Antikörper- und Zellzugabe ($p_{24h}=0.0065$). Ganz anders sah es bei den weiblichen HNSCC-Spenderinnen aus. Bei keiner anderen Gruppe war der Unterschied zwischen der IgA2.0- und Panitumumab-Kurve so deutlich wie hier. Während die Panitumumab-Kurve nur kurz schwach abfiel und wieder Ausgangswerte erreichte, fiel die IgA2.0-Kurve sehr stark ab bis Stunde 30, um dann nahezu unverändert niedrig weiter zu verlaufen. Dabei war die Kurve sehr schmal, auch im Vergleich zu den anderen IgA2.0-Kurven. Passend dazu fanden sich sowohl für vier, sechs und 24h nach Zell- und Antikörperzugabe signifikant niedrigere nCI-Werte ($p_{4h}=0.025$; $p_{6h}=0.002$; $p_{24h}=0.0003$).

Abb. 35 verdeutlicht somit die Überlegenheit des IgA2.0 im Vergleich zu Panitumumab in Hinblick auf die ADCC-Kompetenz. Diese ließ sich am stärksten bei den weiblichen HNSCC-Spenderinnen sehen, aber auch bei der Gesamtheit aus HNSCC- und gesunden Spendern, sowie bei denen mit $T<4$ und $N0$. Bei den HNSCC-Spendern mit $N>0$ und $T4$ schien diese Überlegenheit weniger zu werden bzw. gänzlich zu verschwinden. Zudem fiel auf, dass bei den weiblichen HNSCC-Spenderinnen der Unterschied zwischen IgA2.0 und Panitumumab viel klarer war als bei den männlichen, wo kaum mehr ein Unterschied festzustellen war.

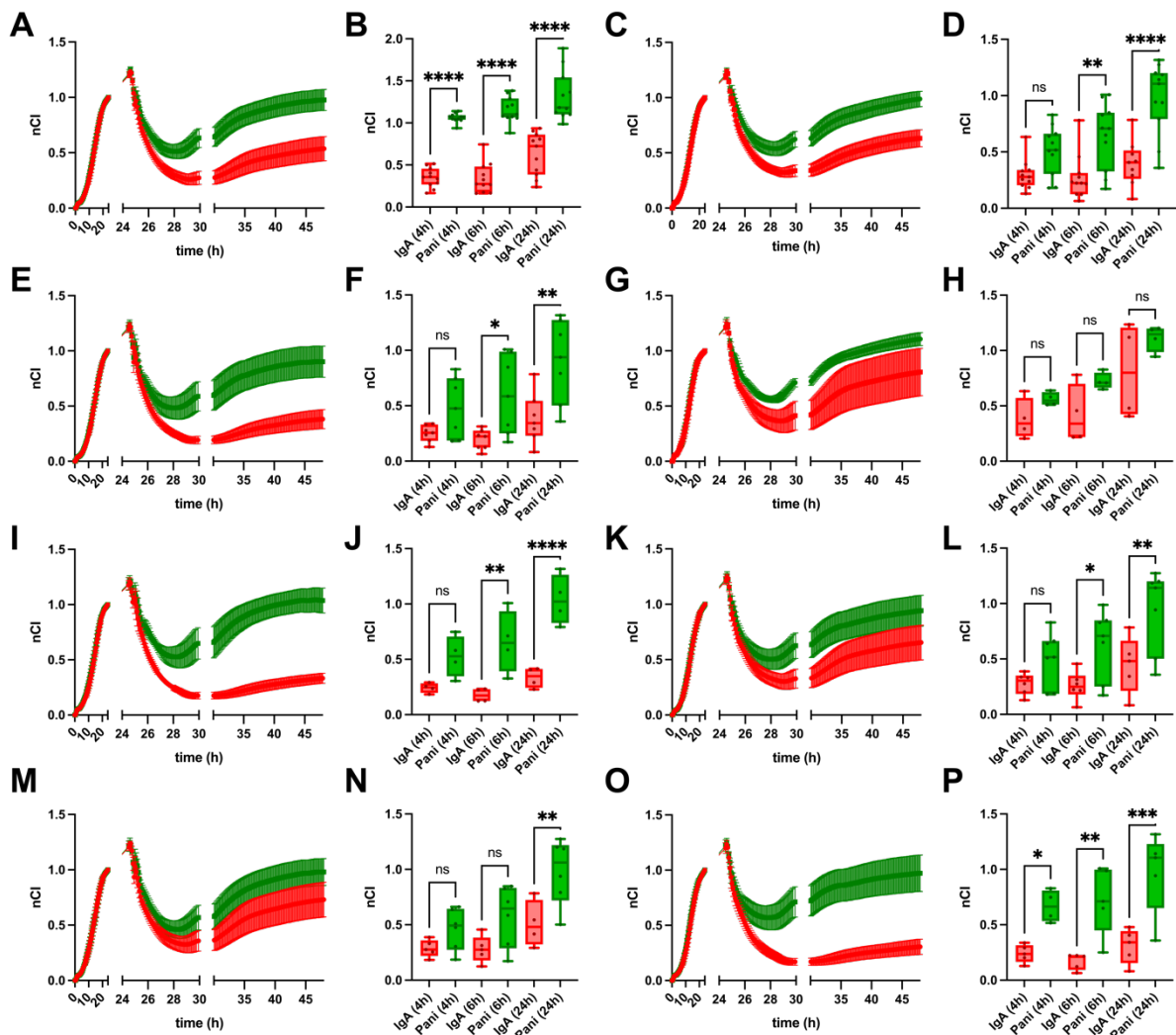


Abbildung 35: Vergleich der IgA2.0- und Panitumumab-abhängigen ADCC zeigt die Überlegenheit des IgA2.0

Die Kurven in A, C, E, G, I, K, M und O zeigen die mittels SEM miteinander verrechneten Kurven der Triplets der verschiedenen Spender, Abbildungen B, D, F, H, J, L, N und O die zugehörigen nCIs für 4, 6, und 24h nach Zell- und Antikörperzugabe und sind mit Box und Whisker Blot mit allen Datenpunkten dargestellt und mittels ungepaartem t-Test verglichen (IgA2.0 ist rot, Panitumumab ist grün).

A und B zeigt das Ausmaß der ADCC für die HNSCC-Spender (n=11) und C und D für die gesunden (n=11). E und F zeigt die HNSCC-Spender mit T<4 (n=7) und G und H die HNSCC Spender mit T=4 (n=4). I und J zeigt die HNSCC-Spender mit N0 (n=4) und K und L mit N>0 (n=7). M und N zeigt die männlichen HNSCC-Spender (n=6) und O und P die weiblichen (n=5) (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001) (aus Valcenko et al. 2024).

4.4 ADCC in Abhängigkeit des CD177-Subsets

Tumor-assoziierte Fibroblasten exprimieren PDPN, dessen Aktivierung zu einer Fibroblasten-Proliferation führt, das Tumorstadium fördert und die Infiltration durch Leukozyten hemmt.

CD177 ist ein funktioneller Antagonist des PDPNs und könnte auf die Fibroblasten-Proliferation und die Ausbildung des TMEs Einfluss nehmen (Astarita et al. 2020). Ein positiver Einfluss des Subsets konnte schon beim Mamma-Karzinom gezeigt werden; CD177 steht in Verbindung mit einer besseren Prognose, geringerem Rezidivrisiko und seltenerer Metastasierung. Dabei hemmt das CD177-Subset die Transkription von Beta-Catenin, welches selbst Einfluss auf die Proliferation von Epithelzellen nimmt (Kluz et al. 2020). Das Fehlen von CD177 in Magen-, Kolon-, und Cervixkarzinomen steht im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose (Dalerba et al. 2011; Toyoda et al. 2013; Liao et al. 2023). Kaneko et al. konnten im Jahr 2022 zeigen, dass sich bei HPV-positiven HNSCC das TME der Rezidive von dem der Primärtumoren unterscheidet. Im TME der Rezidive konnten mehr Tumor-assoziierte Fibroblasten, Extrazellulärmatrix sowie Neutrophile gefunden werden. Gleichzeitig konnten in den Rezidiven mehr CD177-positive Neutrophile gefunden werden.

Zentral ist nun die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem Anteil CD177-positiver Neutrophilen und deren ADCC-Kompetenz einer antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) besteht (Abb. 36). Nur bei den Neutrophilen der gesunden, nicht jedoch bei denen der HNSCC-Spender gab es einen Unterschied bei der IgA2.0-abhängigen ADCC. Bei diesen war die Gruppe mit einem Anteil von CD177-positiven Neutrophilen kleiner 40% denen mit mehr als 75% überlegen (Abb. 36 A und B). Die Kurve mit dem CD177-Subset kleiner 40% fiel bis Stunde 30 stärker ab und stieg dann schwächer an. Die beiden Kurven überschritten sich nahezu gar nicht (Abb. 36A). Dies zeigte sich zudem mit signifikanten Unterschieden der nCI nach 4 und 6 Stunden nach Antikörper- und Zellzugaben ($p_{4h}=0.0473$; $p_{6h}=0.0419$). Nach 24h Stunden fehlte diese Signifikanz (Abb. 36B). Einen solchen Unterschied gab es bei den Neutrophilen der HNSCC-Spender nicht (Abb. 36 C und D). Hier gab es keinerlei signifikante Unterschiede und das CD177-Subset schien keine Rolle zu spielen. Bei den HNSCC-Spendern wurde das IgA2.0-abhängige und das Panitumumab-vermittelte ADCC zum einen bei den hoch-positiven Neutrophilen (CD177-Subset größer als 75%; Abb. 36 E und F) und bei den niedrig-positiven Neutrophilen (CD177-Subset kleiner als 40%; Abb. 36 G und H) verglichen. Hier zeigte sich in beiden Gruppen weiterhin die Überlegenheit des IgA2.0. Der IgA2.0 war unabhängig vom untersuchten Subset signifikant effektiver darin Neutrophile für ADCC zu aktivieren als Panitumumab. Die nCI war in beiden Gruppen für IgA2.0 nach 6 und 24h signifikant niedriger. Bei der niedrig-positiven Gruppe war die Signifikanz nach 24h größer als bei der hoch-positiven. (CD177-negativ $p_{6h}=0.0245$; $p_{24h}=0.0032$; CD177-positiv $p_{6h}=0.0277$; $p_{24h}=0.0159$).

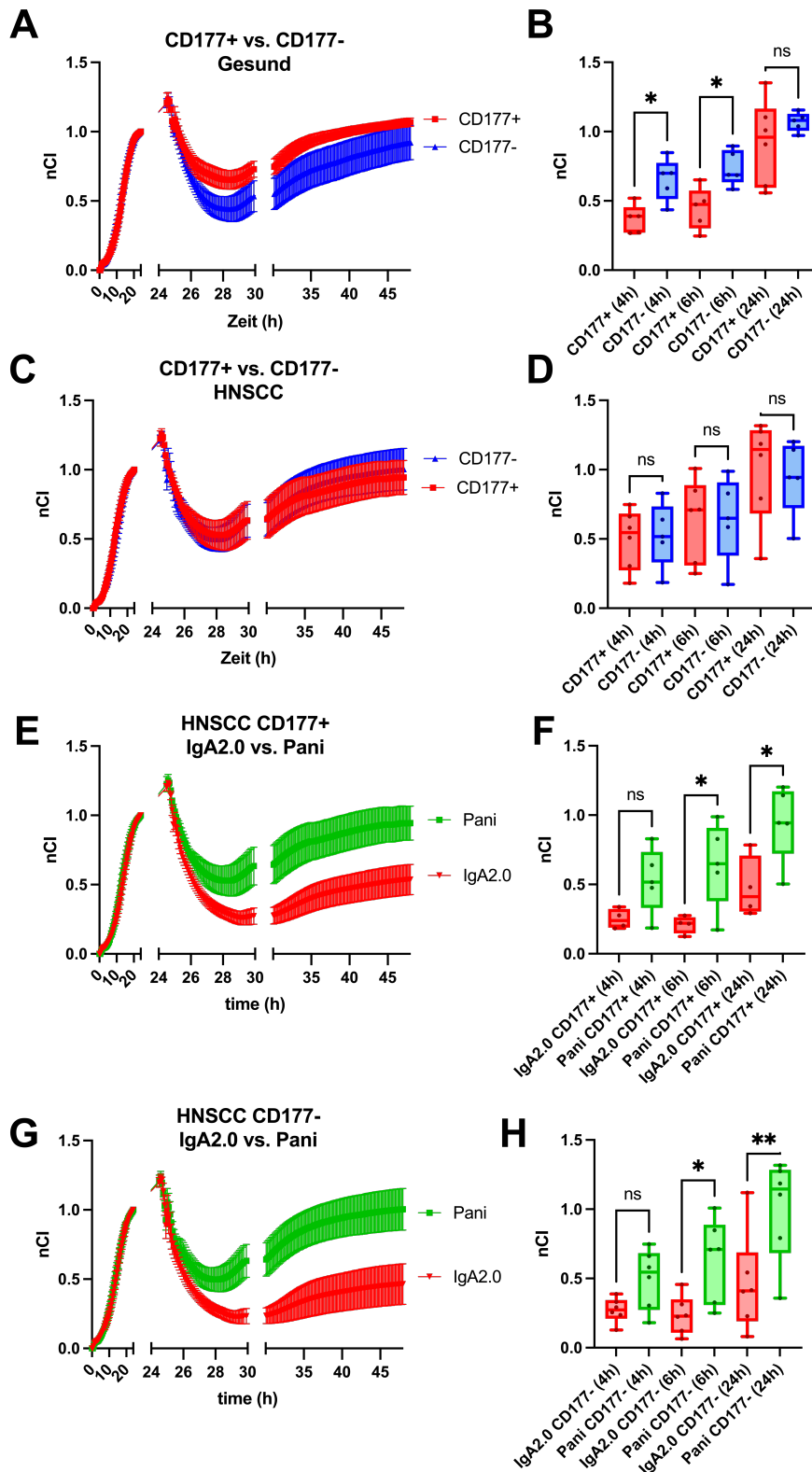


Abbildung 36: Vergleich der ADCC in Abhängigkeit des CD177-Subsets

A und B zeigen die IgA2.0-abhängige ADCC der gesunden Spender mit CD177-Subset > 75% (n=5) und < 40% (n=5). C und D zeigen die IgA2.0-abhängige ADCC der HNSCC-Spender mit CD177-Subset > 75% (n=5) und < 40% (n=6). E und F sowie G und H die ADCC in

Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers, also IgA2.0 oder Panitumumab bei den HNSCC-Spendern mit CD177 > 75% (E und F; n=5) sowie CD177 < 40% (G und H; n=6). Die Kurven in A, C, E, und G zeigen die mittels SEM miteinander verrechneten Kurven der Triplets der verschiedenen Spender. Abbildungen B, D, F, H zeigen die zugehörigen nCIs für 4, 6, und 24h nach Zell- und Antikörperzugabe und sind als mit Box und Whisker Plot mit allen Datenpunkten dargestellt (Vergleich mittels ungepaartem t-Test; (* p < 0.05, ** p < 0.01). (aus Valcenko et al. 2024)

5. Diskussion

Neutrophile sind für die angeborene Abwehr von bakteriellen Erregern essenziell und beeinflussen maßgeblich andere Zellen des Immunsystems. Lactoferrin, das von Neutrophilen freigesetzt wird, hat eine chemotaktische Wirkung auf dendritische Zellen, welche dann als Antigen-präsentierende Zellen fungieren. Zudem fördern Neutrophile die Reifung von natürlichen Killerzellen, die Phagozytose und Interleukinfreisetzung seitens Makrophagen, die Reifung und Aktivierung von B-Zellen sowie die Differenzierung bestimmter T_H-Zellen (Yang et al. 2009; Mantovani et al. 2011; Soehnlein et al. 2009; Jaeger et al. 2012; Scapini et al. 2007; Abdallah et al. 2011).

Darüber hinaus sind sie wesentlicher Bestandteil des TMEs von epithelialen Kopf-Hals-Tumoren und können hier entweder als N1 Tumor-hemmend oder als N2 Tumor-fördernd und immunsuppressiv vorliegen (Masucci et al. 2019). Zhu et al. konnten 2024 zeigen, dass eine hohe N2-Infiltration des HNSCCs mit einer fortgeschrittenen Erkrankung, einem größeren T-Stadium und einer schlechteren Prognose einhergeht. Für die Infiltration mit N1 zeigten sich umgekehrte Verhältnisse. Es stellt sich somit die Frage, wie die Entstehung und der Progress der Tumorerkrankung und das dabei entstehende TME die Neutrophilen, deren ADCC-Kompetenz und deren Phänotyp beeinflusst und wie man sich deren Tumor-supprimierenden Fähigkeiten am besten zunutze machen könnte.

Die Verwendung eines IgA-Antikörpers, seine höhere Affinität zum FcαRI, die gleichzeitige Bindung an zwei Fc-Rezeptoren, das daraus resultierende verstärkte Signaling in den Neutrophilen sowie das Fehlen inhibitorischer Fc-Rezeptoren in der IgA-vermittelten ADCC könnten entscheidend dafür sein, die ADCC-Funktion neutrophiler Granulozyten optimal zu nutzen und damit die Prognose von Patienten mit HNSCC zu verbessern und neue therapeutische Ansätze zu entwickeln (Mazengera et al. 1990; Bruhns et al. 2009; Herr et al. 2003; Ustyanovska Avtenyuk et al. 2020; Treffers et al. 2019).

5.1 Kernaussagen und Limitationen

Die wesentlichen Aussagen dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Zum ersten Mal wurde gezeigt, dass der IgA2.0 nicht nur mit den Neutrophilen von gesunden, sondern auch von HNSCC-Spendern in gleichem Ausmaß ADCC betrieb, und dabei dem klinisch etablierten Panitumumab in allen Gruppen überlegen war. Signifikante Unterschiede des Phänotyps zwischen krank und gesund gab es in der ADCC-Kohorte nicht. Beim CD177-Subset-abhängigen Vergleich zeigten sich sowohl bei kranken als auch bei gesunden Spendern innerhalb der CD177-Subsets, aber auch zwischen der gesunden und kranken

Gruppe signifikante phänotypische Unterschiede. Die stadienbezogene Auswertung der IgA2.0-vermittelten ADCC innerhalb der HNSCC-Gruppe offenbarte eine eingeschränkte ADCC-Kompetenz bei T4-Patienten mit signifikant erhöhter CD62L-Expression.

Einen CD177-Subset-abhängigen Unterschied der IgA2.0-abhängigen ADCC zeigte sich nur bei den gesunden, nicht jedoch bei den kranken Spendern. Die CD177-Expression war bei Spendern mit T4-Tumoren, bei den über 70 Jahre alten und bei den männlichen Patienten signifikant erhöht. Ein höheres Tumorstadium und ein höheres Patientenalter gingen mit der Tendenz höherer Protein-Expressionen einher und wiesen zahlreiche signifikante Unterschiede auf, darunter erneut eine höhere CD62L-Expression. Beim geschlechterspezifischen Vergleich zwischen krank und gesund gab es nur bei den Männern zahlreiche signifikante Unterschiede.

Was die Aussagekraft der ADCC-Daten schmälert, ist die geringe Fallzahl. Leider wurden nicht von allen Spendern, mit deren Neutrophilen eine Durchflusszytometrie vollzogen wurde, ein Impedanz-Assay vollzogen, was die Zweiteilung des Ergebnis-Teils begründet. Nichtsdestotrotz konnten signifikante Unterschiede bei der ADCC und dem Phänotyp herausgearbeitet und miteinander in Verbindung gesetzt werden. Die ADCC-Unterschiede haben sich besonders gut gezeigt, weil der Impedanz-Assay mit 24h eine lange Beobachtung ermöglicht, bei welcher auch ersichtlich ist, wenn die Tumorzellen wieder konfluieren und auswachsen. In dieser Arbeit wurde nicht nur der Phänotyp der Neutrophilen, sondern allem voran die Funktionalität der Neutrophilen untersucht. Dabei wurden Isolations- und Aufreinigungsmethoden so gewählt, dass kein Bias besteht und die Neutrophilenpopulationen in ihrer Gänze erfasst wurden.

5.2 Zusammenhang zwischen Tumorprogression und Neutrophilenfunktion

Das Epithel stellt eine essenzielle physikalische und immunologische Barriere gegenüber der Umwelt dar. Kommt es zu einer Läsion, etwa durch mechanische Reizung, Infektion oder Tumordinfiltration, wird eine schnelle Immunantwort initiiert. In diesem Rahmen werden verschiedene Immunzellen, darunter neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und insbesondere Makrophagen, an die geschädigte Stelle rekrutiert. Makrophagen übernehmen dabei nicht nur phagozytische Funktionen, sondern tragen auch aktiv zur temporären Wiederherstellung der Barrierefunktion bei, indem sie die Läsion abdecken und so das unkontrollierte Eindringen von Pathogenen verhindern. Dieser frühe Schutzmechanismus ist entscheidend, um eine systemische Ausbreitung von Mikroorganismen zu vermeiden und gleichzeitig die Voraussetzungen für eine geordnete Wundheilung zu schaffen. Dies wird vermittelt über verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren (Zhou et al. 2018; Greten et al. 2019). Bei einer Entartung von Epithelzellen passiert im Wesentlichen das gleiche. Ist die

Epithelläsion eine kleine und die Hypoxie vor Ort schwach ausgeprägt, so können Gewebsmakrophagen migrieren und sich vor Ort vermehren (Loyher et al. 2018, Zhu et al. 2017). Die Progression des Tumorwachstums verstärkt durch lokalen Zelltod und Stress die Entzündung und es werden zunehmend inflammatorische Zellen, darunter Monozyten und Neutrophile aus Blut und dem Knochenmark rekrutiert. Die Vermehrung der Gewebsmakrophagen vor Ort wird eher durch Wachstumsfaktoren, darunter CSF-1 beeinflusst, wohingegen die Vermehrung der aus dem Blut und Knochenmark stammenden Zellen vor allem durch Zytokine beeinflusst wird (Greten et al. 2019). Kleine kanzeröse Läsionen führen möglicherweise nur zu lokalen, größere maligne Tumoren gar zu systemischen Entzündungsreaktionen. Dieser Wechsel von lokal zu systemisch könnte die Funktion der peripheren Neutrophilen beeinflussen. In Plattenepithelkarzinomen konnte bereits eine Produktion von G-CSF durch den Tumor festgestellt werden. Dieses Tumor-derived G-CSF fördert die Tumorprogression und Metastasierung, unter anderem durch einen Anstieg der peripheren Neutrophilen und Förderung der Tumorzellproliferation (Kemuriyama et al. 2023). Der G-CSF-vermittelte Neutrophilenanstieg in der Peripherie entspricht einer Notfall-Granulopoese wie im Rahmen einer schweren systemischen Infektion (Manz et al. 2014; Quail et al. 2022). Solche im Rahmen einer Notfall-Granulopoese entstehenden Neutrophilen können die Aktivierung und Proliferation von CD4-positiven Helferzellen mindern und haben somit immunsupprimierende Eigenschaften (Kwok et al. 2023). Auch die Produktion von ROS seitens dieser Neutrophilen ist beeinträchtigt (Stephan et al. 2025). Passend dazu konnten Gutschalk et al. bereits im Jahr 2006 zeigen, dass in HNSCCs unter dem Einfluss von G-CSF und GM-CSF verstärkt eine Angiogenese vonstattengeht und eine stärkere Infiltration des Tumors mit Immunzellen vorliegt. Die Abwesenheit von G-CSF und GM-CSF führt hierbei nicht direkt zu einem langsameren Tumorwachstum, aber zu geringerer Infiltration mit Immunzellen, geringerer Angiogenese und somit zur Entstehung nekrotischer Tumorareale. Die Entstehung eines malignen Tumors fördert nicht nur eine Entzündungsreaktion, sondern die Entzündung auch das Tumorwachstum. Dieses wird unter anderem durch IL6, IL1, IL8, IL17, TNFa und TNFy vermittelt (Xia et al. 2015).

Zytokine können gegensätzliche Wirkungen auf Neutrophile haben je nach Zytokin und aktiviertem Rezeptor des Neutrophilen. Eingangs wurde TGF-beta erwähnt, welches eine Differenzierung Neutrophiler zu N2, also zu pro-Tumor-Neutrophilen bewirken kann (siehe Kap. 2.3.5). Im gesunden Epithel bewirkt TGF-Beta Zellzyklusarrest und Apoptose. Dies gilt auch für HNSCCs in frühen Stadien (Pang et al. 2018; White et al. 2014). In Tumorzellen von HNSCC sowie im umliegenden Epithel ist es verstärkt exprimiert und bewirkt im Verlauf eine gegenteilige, die Proliferation des Tumors fördernde und chemotaktische Wirkung auf Immunzellen (Lu et al. 2004). Im Einflussfeld von N2-polarisierten Neutrophilen kommt es zur Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), was mit einem Verlust epithelialer

Merkmale wie Zellpolarität und Zell-Zell-Adhäsion sowie dem Erwerb mesenchymaler Eigenschaften einhergeht. Dieser Phänotypwechsel fördert die Invasivität und Metastasierung der Tumorzellen und mindert die Prognose (Liu et al. 2015). Ein größer werdender Tumor sowie die in seiner Umgebung liegenden Fibroblasten bilden zunehmend TGF-Beta und es entsteht ein Circulus vitiosus, welcher das Tumorwachstum, die Angiogenese, die Metastasierung und immunsuppressive Effekte mit sich bringt (Pang et al. 2018). Der Progress des HNSCC stimuliert sich selbst und lockt dabei Neutrophile an, die dann Tumor-fördernd sind und ihre Tumorzell-supprimierende Wirkung nicht entfalten können (Fridlender et al. 2009). Auch für IL8 konnte eine Wachstums-fördernder Effekt für HNSCCs gezeigt werden. Eine Inhibition von IL8 hat gegenteilige Effekte (Chan et al. 2016). Auch die Neutrophilen werden von IL8 angelockt und betreiben verstärkte NETose (Teijeira et al. 2021), welche wiederum den Wechsel Neutrophiler zu N2, zu den Pro-Tumor-Neutrophilen, auslösen kann und Angiogenese-fördernd ist (Guglietta et al. 2016; Masucci et al. 2019). Entzündung fördert somit das Tumorwachstum, die Bildung und Chemotaxis von Neutrophilen sowie die Polarisation letzterer zu N2.

Passend dazu hat sich der Neutrophilen-Lymphozyten-Quotient (NLR) im peripheren Blut als möglicher prognostischer Marker für HNSCCs herausgestellt. Ein erhöhter NLR vor Behandlung ging mit einer schlechteren Prognose einher (Yu et al. 2018). Bedenkt man, dass sich Tumorgröße und -progress sowie Neutrophile über verschiedene Zytokine vermittelt gegenseitig beeinflussen, könnte der NLR gar ein Maß für diese Wechselwirkung sein.

Vielerlei Rezeptoren auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, darunter CXCR4, auch CD184 genannt, welches maßgeblich an der Freisetzung Neutrophiler aus dem Knochenmark ins Blut beteiligt ist (Nevins et al. 2018; De Filippo et al. 2018). Im Knochenmark kann freigesetztes CXCL12 das CXCR4 auf der Neutrophilen-Oberfläche binden und so eine Retention im Knochenmark bewirken. Die Neutrophilen internalisieren jedoch den CXCR4 nach der Bindung von CXCL12. Es konnte gezeigt werden, dass Neutrophile in einem Umfeld ohne CXCL12 den CXCR4 wieder hochregulieren (Martin et al. 2003). Es findet also eine homologe Desensibilisierung statt, bei welcher die Aktivierung eines Rezeptors seine Internalisierung nach sich zieht. Im Gegensatz dazu gibt es auch eine heterologe Desensibilisierung, bei welcher nach Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors auf der Zelloberfläche befindlichen Rezeptoren für andere Zytokine internalisiert werden. Diese gegenseitige Beeinflussung wird heterologe Desensibilisierung genannt (Lämmermann et al. 2019). Es konnte gezeigt werden, dass die IL8-vermittelte Chemotaxis einer heterologen Desensibilisierung unterliegt. Diese erfolgt jedoch nicht durch Internalisierung, sondern durch Phosphorylierung von CXCR1 (Stanton et al. 1999).

In der Literatur wird die Wirkung einzelner Zytokine beschrieben, teils *in vitro*, teils in Mausversuchen. Diese können jedoch kein Tumormikromilieu in seiner Gänze erfassen mit

der Vielzahl seiner verschiedenen Zellen des Tumors samt seiner Umgebung und des Immunsystems sowie mit einer Vielzahl verschiedener Botenstoffe, die das Verhalten der Neutrophilen beeinflussen. Sobald mehrere Einflüsse, z.B. verschiedene Zytokine auf Neutrophile wirken, stellt sich die Frage, welcher dieser überwiegt und wie sich die Aktivierung verschiedener Rezeptoren untereinander auswirkt.

Der Einfluss des TMEs, die Freisetzung von G-CSF und GM-CSF sowie anderer Interleukine und deren Einfluss auf die peripheren Neutrophilen, vor allem im Rahmen der Notfall-Granulopoese könnten eine Erklärung für die verschlechterte ADCC mit den Neutrophilen der T4-Spender sein. Was sich zusätzlich zur schlechteren IgA2.0-vermittelten ADCC der Neutrophilen dieser gezeigt hat, ist eine höhere Expression von CD62L, auch L-Selektin genannt. Dieses wird im Verlauf des Rollings zunehmend von der Neutrophilenoberfläche gespalten (Kuhns et al. 1995). Eine geringere Expression deutet also auf einen älteren, möglicherweise reiferen Neutrophilen hin, der eine längere Zeit in der Blutzirkulation verbracht hat (Casanova-Acebes et al. 2013), im Umkehrschluss könnten die Neutrophilen mit einer erhöhten Expression unreifer sein, was auch ihre ADCC-Fähigkeit beeinflussen könnte. Dies ist kohärent mit der Freisetzung Neutrophiler im Rahmen der Notfall-Granulopoese. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass auch unreife, frisch aus dem Knochenmark freigesetzte Neutrophile IgA-vermittelt dazu in der Lage sind, Tumorzellen zu lysieren. Für IgG konnte dies nicht gezeigt werden (Otten et al. 2005). Die hier angenommene Unreife der Neutrophilen erklärt also nicht zweifelsfrei die schlechtere ADCC.

Derzeit scheint es, als würden sich das Tumorwachstum und Entzündungsprozesse gegenseitig befeuern, wobei das Immunsystem, darunter auch die Neutrophilen, im Verlauf immer unreifer werden und immer weniger Gebrauch ihrer Fähigkeiten machen, die entarteten Zellen aus dem Verkehr zu ziehen, und zunehmend die Vermehrung der Tumorzellen, den Übergang von epithelialen zu mesenchymalen Tumorzellen, die Angiogenese sowie die Metastasierung fördern. Damit könnte auch in Einklang gebracht werden, wieso die ADCC bei den Patienten mit einem T4-Stadium signifikant schlechter verläuft als bei den Spendern mit einem T-Stadium < 4 .

Bei einer klinischen Anwendung könnte es also sein, dass die Patienten mit kleineren Tumoren mehr von einer Neutrophilen-abhängigen Immuntherapie profitieren. Es stellt sich hierbei die Frage, ob es möglich wäre, die Neutrophilen der T4-Patienten auf ein Niveau der Patienten mit T1 bis T3 zu heben. Die Neutrophilen selbst bilden und setzen verschiedene Zytokine frei, darunter die bereits erwähnten IL8 und TGF-Beta (Fujishima et al. 1993; Grotendorst et al. 1989). Sogar innerhalb diese Zellgruppe scheint es also *Ciruci vitiosi* zu geben. Ein Ansatz, diese Wechselwirkungen zwischen Neutrophilen und Tumor sowie innerhalb der Gruppe der Neutrophilen zu unterbinden, die den Progress der Tumorerkrankung fördern, wäre die gezielte Blockade bestimmter Interleukin-Signalwege oder bestimmter Rezeptoren auf der

Neutrophilen-Oberfläche. Auch eine Hemmung der NETose könnte positiven Einfluss auf das Ansprechen der Therapie haben. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass NETose mittels Anakinra, einem IL1-Rezeptor-Blocker, vermindert werden konnte. (Wadehn et al. 2021). Dies könnte dem Teufelskreis aus NETose und der Polarisation Neutrophiler zu N2 entgegenwirken. Erhöhte IL1-Spiegel konnten bei HNSCC-Patienten festgestellt werden. Dies war zurückzuführen auf das NLRP3-Inflammasom im Tumorgewebe der HNSCCs. Eine höhere Expression dessen konnte mit erhöhten IL1-Spiegeln im Blut korreliert werden, eine Blockade des NLRP3-Inflammasoms mit niedrigeren IL1-Spiegeln (Chen et al. 2017). Diese NLRP3-IL1-Achse könnte ebenfalls einen möglichen Ansatzpunkt für eine Verbesserung der ADCC darstellen. In klinischen Studien wurde bereits Dapansutril als NLRP3-Hemmer getestet, jedoch im Kontext von unter anderem Gicht und Gicht-Arthritis (Cao et al. 2022). Ein Einsatz im Kontext maligner Erkrankungen ist noch nicht erprobt. Auch für TGF-Beta gibt es bereits Ansätze zur Blockade. Der tumor-targeting TGF- β -Rezeptor-Blocker, TTB, ist im Wesentlichen ein IgG₁ kombiniert mit der extrazellulären Domäne des TGF-Beta-II-Rezeptors. Für diesen gibt es bereits Hinweise einer Inhibition der Metastasierung sowie der epithelial-mesenchymalen Transition (Zhou et al. 2018). Ein positiver Effekt der TGF-Beta-Blockade auf die Neutrophilen und eine Hemmung des Wechsels dieser zu N2 liegt nahe.

Auch für die Blockade von CXCR1 und CXCR2 auf der Neutrophilen-Oberfläche gibt es Hinweise, dass dies die Polarisation zu N2 mindert. Die CXCR2-Blockade mindert das Tumorstadium, jedoch nicht die Migration der Neutrophilen ins Tumorgewebe. Zudem bleibt die Fähigkeit der Neutrophilen, Bakterien zu phagozytieren und zu töten, möglicherweise erhalten (Kwak et al. 2024).

Beide erwähnten Medikamente, sowohl Dapansutril als auch der TTB sind nicht klinisch bei der Krebs-Therapie erprobt, Medikamente für die Blockade von CXCR1 und CXCR2 genauso wenig. Um einen positiven Effekt dieser auf die ADCC zu zeigen, bräuchte man, sobald eine klinische Zulassung solcher Medikamente gegeben wäre, weitere ADCC-Versuche mit dem IgA2.0 mit Neutrophilen von HNSCC-Spendern mit T4 unter Einnahme dieser noch nicht dafür zugelassenen bzw. existenten Medikamente im Vergleich zu T4-Spendern ohne diese Medikamente. Dies ist jedoch sehr spekulativ. Auch Einflüsse der Hemmung von CXCR1 oder 2, sowie TGF-Beta und der IL1-Achse auf das Immunsystem sind nicht zu unterschätzen. Marker der NETose zum Beispiel konnten zwar mit einer schlechteren Prognose bei einer Sepsis in Verbindung gesetzt werden (Chen et al. 2021), dennoch ist ihre Bedeutung für die Abwehr von Bakterien, z.B. *Staphylococcus aureus* nicht zu unterschätzen (Pilszcek et al. 2010). Ein Eingreifen in die IL1-Achse und dadurch verminderte NETose oder eine Hemmung der anderen erwähnten Zytokine und Rezeptoren könnte eine erhöhte Gefahr für Infektionen mit sich bringen. Auf der anderen Seite könnte durch die verminderte Polarisation zu N2 die Abwehr von Infektionen begünstigt werden.

Es bedarf weiterer Untersuchungen zum Einfluss des TMEs auf die Neutrophilen sowie die Erprobung von Medikamenten, die präzise die beteiligten Signalwege inhibieren, darunter TGF-Beta durch den TTB, das NLRP3-Inflammasom durch Dapansutril im Tumorgewebe, CXCR1 und CXCR2 auf den Neutrophilen oder die NETose-Aktivität durch IL1-Blockade mittels Anakinra, um so die T4-Neutrophilen auf das Niveau der Neutrophilen der HNSCC-Spender mit T1 bis T3 zu heben. Die Freisetzung von Interleukinen im Tumor selbst, deren Vorhandensein im Blut und deren Wirkung an den Neutrophilen könnten somit als Stellschrauben dienen.

5.3 Unterschiede im Immunsystem zwischen weiblichen und männlichen Spendern und ihre Auswirkungen auf die ADCC

In der Vergangenheit wurden in Studien Frauen oftmals ausgeschlossen, nur mit männlichen Probanden gearbeitet und die Ergebnisse auf Frauen übertragen (Holdcroft 2007). Dies beeinflusst teils bis heute die medizinische Versorgung von Frauen. In dieser Arbeit halten sich kranke Frauen und Männer beim Impedanz-Assay ungefähr die Waage (fünf Frauen und sechs Männer). Beim Blick auf alle HNSCC-Spender der Durchflusszytometrie sind ungefähr doppelt so viel Männer wie Frauen inbegriffen. Dies passt zur Epidemiologie der HNSCCs, welche Männer häufiger betreffen als Frauen. Selbst wenn man in Follow-Up-Studien nur die nicht-rauchenden und nicht-trinkenden Männer und Frauen vergleicht, haben die Männer ein ungefähr dreimal höheres Risiko für ein HNSCC (Park et al. 2022). In dieser Arbeit wurden Unterschiede zwischen Frau und Mann bei der ADCC und bei der Expression verschiedener Proteine auf ihren Neutrophilen herausgearbeitet, die nicht zu vernachlässigen sind. Innerhalb aller analysierter Subgruppen war der Unterschied zugunsten der IgA2.0-vermittelten ADCC gegenüber Panitumumab am deutlichsten bei den weiblichen HNSCC-Patientinnen ausgeprägt. Bei den kranken Männern lässt sich bei diesem Vergleich kaum eine Signifikanz nachweisen. Bei der Expression von Proteinen auf den Neutrophilen gibt es zwischen kranken und gesunden Männern mehrere signifikante Unterschiede, bei den gesunden und kranken Frauen gibt es keinerlei Veränderungen bei diesem Vergleich. Das Alter stellt keinen relevanten Confounder in Bezug auf die ADCC-Aktivität dar, da sowohl die weiblichen als auch die männlichen HNSCC-Patienten im Median ein vergleichbares Alter von etwa 70 Jahren aufweisen. Auch der Menstruationszyklus und dadurch entstandene hormonelle Schwankungen als Einflussfaktor fallen bei einem Alter von 70 Jahren weg.

Es konnte gezeigt werden, dass die Neutrophilen von Frauen und von Männern sich bei einer Vielzahl verschiedener mRNAs, Proteine und Phosphorylierung dieser unterscheiden. In Neutrophilen von Männern konnten 132 Proteine in höherer Konzentration gefunden werden,

darunter vor allem solche, die an Signalwegen beteiligt waren. Bei Frauen waren 30 Proteine im Vergleich zu denen der Männer erhöht. Diese waren vor allem Proteine für Lysosomen und Proteasomen, also eher Proteine für den Proteinabbau. Bei den Männern waren 32 Proteine stärker phosphoryliert als bei Frauen (Pilling et al. 2024). Phosphorylierung und Signalwege fanden zuvor bereits als maßgebliche Bestandteile der heterologen Desensibilisierung Erwähnung. Aber nur das Vorhandensein dieser Proteine und Phosphorylierungen allein sind bedingt aussagekräftig. Was letzten Endes zählt, ist die Reaktion auf einwirkende Einflüsse, zum Beispiel die des TMEs, oder die der Zytokine. Passend dazu konnten Pilling et al. im Jahr 2024 zeigen, dass die Neutrophilen männlicher Spender schneller auf bestimmte Einflüsse mit Phosphorylierung reagieren als die der weiblichen, was eine schnellere Anpassungsfähigkeit seitens der männlichen Neutrophilen nahelegt. Dies passt zur Erkenntnis dieser Arbeit, dass nur bei den männlichen, nicht jedoch bei den weiblichen HNSCC-Spenderinnen Unterschiede bei der Expression untersuchter Proteine im Vergleich mit gesunden Spendern besteht. Dies passt ebenfalls zur Erkenntnis, dass die IgA2.0-abhängige ADCC bei den kranken Männern sich weniger gut von der Panitumumab-abhängigen ADCC abgrenzt als bei den kranken Frauen, weil die Neutrophilen der kranken Männer möglicherweise stärker auf die immunsuppressiven Einflüsse des TME und eine systemische Entzündungsreaktion reagieren als die der Frauen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Frauen ein stärkeres unspezifisches und spezifisches Immunsystem haben als Männer, weniger anfällig für Infekte sind, seien diese viral, bakteriell oder durch Pilze verursacht, dafür aber auch häufiger unter Autoimmunerkrankungen leiden (Jaillon et al. 2019). Diese Unterschiede sind durch hormonelle Unterschiede zu erklären (Klein 2004; Moulton 2018) sowie durch die Tatsache, dass das X-Chromosom eine Vielzahl an Genen trägt, die Einfluss auf das Immunsystem nehmen und so nicht auf dem Y-Chromosom zu finden sind (Klein et al. 2016).

Dabei ist jedoch anzumerken, dass die Unterschiede des Immunsystems zwischen Frau und Mann auch altersabhängig sind. So konnte bei Frauen nach der Menopause unter anderem ein Abfall von T_H-Zellen und B-Zellen festgestellt werden (Gameiro et al. 2010). Nichtsdestotrotz ist bei Frauen nach der Menopause die Fähigkeit der T-Zellen, sich zu vermehren dennoch besser als bei alten Männern (Hirokawa et al. 2013).

Auch im Alter und nach der Menopause scheint es also, als wäre das Immunsystem der Frau dem des Mannes weiterhin überlegen. Die genauen Unterschiede zwischen dem männlichen und weiblichen Immunsystem sind weiterhin Gegenstand der Forschung und werden an anderer Stelle genauer eruiert. Der aktuelle Stand der Forschung sowie die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen, dass auch in Zukunft bei weiterer Forschung zu Neutrophilen-vermittelter Immuntherapie unbedingt auf eine Geschlechts-spezifische Betrachtung geachtet werden muss. Denn es scheint, als würden die Neutrophilen weiblicher Spenderinnen besser

IgA₂.0-vermittelt ADCC betreiben und weniger durch den Einfluss des TMEs und den Einfluss erhöhter Zytokine in ihrer Fähigkeit ADCC zu betreiben, eingeschränkt zu werden.

5.4 ADCC in Abhängigkeit des verwendeten Antikörper-Typs

Diese Arbeit zeigt die Überlegenheit des IgA₂.0 bei der Neutrophilen-vermittelten ADCC. Im klinischen Alltag gibt es bislang keine zugelassenen IgAs, die zur Therapie von Krankheiten eingesetzt werden, jedoch eine Vielzahl an IgGs, darunter die oben erwähnten Cetuximab, ein IgG₁, und Panitumumab, ein IgG₂ (siehe Kap. 2) (Cottignies-Calamarte et al. 2023). Man könnte kritisch anmerken, dass nur ein IgG₂ und kein IgG₁ in dieser Arbeit mit dem IgA₂.0 in Hinblick auf seine Fähigkeit, ADCC zu triggern, verglichen wurde. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Panitumumab als IgG₂ genauso gut dazu in der Lage ist, mit Neutrophilen eine ADCC zu vermitteln, wie Vertreter der IgG₁-Klasse (Schneider-Merck et al. 2010).

Der IgG ist der am häufigsten im menschlichen Körper vorhandene Antikörper, der mit der höchsten Konzentration im Serum und der mit der längsten Halbwertszeit. Der IgA ist im Serum am zweithäufigsten vertreten und liegt hier als Monomer vor. In den Schleimhäuten verhält es sich umgekehrt. Die Anwendung eines dimeren IgA-Antikörpers erscheint besonders vielversprechend, da IgA in Schleimhäuten physiologisch vorherrscht und Tumoren, die aus mukosalen Geweben hervorgehen, direkt an der Eintrittsstelle des Antikörpers exponiert sind. Bisherige Arbeiten der Arbeitsgruppe verweisen auf eine effizientere Bindung des dimeren IgAs an den FcαRI, welche in Teilen zu einer verbesserten ADCC führte (Schroeder et al. 2010; Lohse et al. 2012; Boross et al. 2013; Zwick et al. 2024).

Sowohl IgG als auch IgA sind gleichwertig, wenn es darum geht, den EGFR zu binden und seine Phosphorylierung zu hemmen (Dechant et al. 2007). Dies allein reicht jedoch nicht, um die Tumorzelle vollends aus dem Verkehr zu ziehen. Neben der Bindung der Tumorzelle ist auch die Bindung zwischen Neutrophilen und Antikörper ausschlaggebend. Der IgA bindet an CD89, der IgG an unter anderem CD32b, CD16b und CD32a. Letzteres ist tatsächlich doppelt so häufig auf der Neutrophilenoberfläche zu finden, was isoliert betrachtet nicht für den IgA spricht. Der IgA hat dafür eine höhere Rezeptoraffinität zu CD89 als IgG zu CD32a (Mazengera et al. 1990; Bruhns et al. 2009). Dabei gibt es sogar innerhalb der IgA-Gruppe Unterschiede der Affinität. Der IgA₂ hat eine höhere Affinität zum CD89 als der IgA₁ bedingt durch Unterschiede in ihrer Gelenk-Region und durch eine verschiedene Anzahl an Glykosylierungen (van Egmond et al. 2001). Passend dazu ist der IgA₂ dem IgA₁ beim Vermitteln der ADCC überlegen (Dechant et al. 2007). Es konnte zudem gezeigt werden, dass IgA₂-vermittelt bei Neutrophilen eine stärkere NETose ausgelöst wird. Der IgA₁ ist mit mehr Sialinsäuren versehen. Werden diese entfernt, wird die pro-inflammatorische Wirkung des IgA₁ erhöht und erreicht ein Niveau des IgA₂ (Steffen et al. 2020). Hier deutet sich die Relevanz von

Seitenkettenmodifikationen der Antikörper sowie das Potential von Glykoengineering an. Dieses könnte auch bei der Verbesserung der Halbwertszeit des IgA eine Rolle spielen.

Es spricht vieles für eine Überlegenheit des IgAs, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurde. Der IgA bindet den CD89 mit einer höheren Affinität als der IgG den CD32a (Mazengera et al. 1990; Bruhns et al. 2009). Zudem bindet der IgA nicht nur einen, sondern zwei F_c -Rezeptoren an der Neutrophilenoberfläche gleichzeitig (Herr et al. 2003). Die Stöchiometrie ist offenbar eine andere. Aus dieser bivalenten Bindung folgt die Aktivierung von vier ITAM-Domains im Zellinneren, wohingegen es bei der Bindung eines IgG nur eine ist (Ustyanovska Avtenyuk et al. 2020). Eine IgA-vermittelte immunologische Synapse führt so zu einem viel stärkeren intrazellulären Signal. Was es für die IgA-vermittelte ADCC nicht gibt, für die IgG-vermittelte hingegen schon, ist eine Hemmung durch andere an der Neutrophilen-Oberfläche exprimierte Proteine. Für IgG ist dies CD16b, dessen Blockade die IgG-vermittelte ADCC verbessert (Treffers et al. 2019).

Der IgA hat somit den Vorteil der überlegenen ADCC, der IgG dafür eine längere Halbwertszeit. Letzteres muss jedoch nicht zwingend ein Vorteil seitens des IgG sein. Beim Cetuximab zeigte sich bereits eine Korrelation zwischen seiner Wirkung und dem Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen, allem voran Hautschäden. Patienten ohne Hautschäden hatten ein höheres Progressrisiko. Diese unerwünschte Nebenwirkung ist ein guter Indikator für die Wirksamkeit des Cetuximab (Orditura et al. 2009), könnte aber darauf hindeuten, dass die längere Halbwertszeit seitens des IgG nicht zwingend ein Vorteil sein muss, und es stellt sich die Frage, ob durch eine kürzere Halbwertszeit des Cetuximab seine Nebenwirkungen minimiert werden könnten.

Für die Optimierung der Eigenschaften eines Antikörpers ist das Glykoengineering von Bedeutung. Eine Möglichkeit wäre es, einen IgG im Bereich seines F_c -Teiles so zu modifizieren, dass seine Fähigkeit ADCC zu triggern, verbessert wird. Dies könnte man durch die Addition von Galactosyl- oder Sialinsäure-Gruppen erreichen. Durch die Addition der Sialinsäure-Gruppen konnte bereits eine höhere Bindungsaffinität von IgG₁ zu CD32a gezeigt werden, jedoch keine verbesserte ADCC. Galactosyl-Gruppen konnten die Bindungsaffinität zu CD32a und das Ausmaß der stattfindenden ADCC verbessern (Thomann et al. 2015). Auch CD177 als IgG-Rezeptor könnte in Zukunft eine vermehrte Rolle spielen, denn CD177 ist dazu in der Lage, alle IgG-Klassen gleichermaßen mit einer geringen Affinität zu binden, je höher die Expression von CD177, desto höher die IgG-Bindungskapazität. Über diese Bindung kann tatsächlich auch die ADCC modifiziert werden (Li et al. 2024). Eine Verbesserung dieser CD177-modifizierten ADCC birgt ebenfalls Potential, vor allem bei Patienten über 70 Jahren, männlichen Patienten und solchen mit einem T4-Stadium, da all diese Gruppen verstärkt CD177 auf ihren Neutrophilen exprimieren.

Nichtsdestotrotz ist die Überlegenheit des IgA2.0 in dieser Arbeit so eindeutig, dass es naheliegend ist, diesen zu verbessern und seinen Einsatz in klinischen Studien zu erproben. Die Herstellung und Aufreinigung sowie die Halbwertszeit sind hier Ansatzpunkte. Ein Problem bei der Aufreinigung von IgAs ist ihre Fähigkeit, Dimere oder gar Oligomere zu bilden (Beyer et al. 2009). Sie tragen am C-terminalen Ende eine Sequenz aus 18 Aminosäuren mit freiem Cystein an Stelle 471. Durch die Deletion des Cysteins am C-terminalen Ende konnte diese Dimerisierung und die Bildung von Aggregaten unterbunden werden (Brunke et al. 2013). Durch das Verhindern dieser Dimerisierung oder gar Aggregation wird die Produktion und Herstellung vereinfacht (Brunke et al. 2013; van Tetering et al. 2020). Die Halbwertszeit von Antikörpern vom Typ IgA wird maßgeblich durch ihre Glykosylierung beeinflusst. Diese ist beim IgA um einiges variabler als beim IgG, was die Halbwertszeit mindert (Mattu et al. 1998). Am Abbau des IgA sind Asialoglykoprotein-Rezeptoren beteiligt, deren Hemmung die Halbwertszeit verlängert (Boross et al. 2013). Die Entfernung N-terminaler Glykosylierungen und eine stärkere Sialylierung verlängern die Halbwertszeit ebenfalls und haben keine negativen Auswirkungen auf die ADCC (Lohse et al. 2016; Rouwendal 2015). Es wurde bereits das Vorliegen von IgA als Dimer in Schleimhäuten besprochen. Eine Dimerisierung des in dieser Studie verwendeten IgA2.0 führte zu einer verbesserten Fc-Rezeptor-Interaktion und Langzeit-ADCC-Effektivität. Die Tetravalenz des Dimers bezüglich Antigen und Fc-Rezeptor zusammen mit seiner Eigenschaft sich epithelial anzureichern machen dieses Format attraktiv für eine klinische Anwendung bei malignen Erkrankungen an Körpergrenzflächen (Zwick et al. 2024).

Eine Kombination aus IgG und IgA wurde auch bereits erprobt. Hybrid-Antikörper aus IgA₂ und IgG₁ hatten eine nahezu identische Halbwertszeit im Serum wie ein einfacher IgG₁ (Borrok et al. 2015; Li et al. 2017). *In vitro* konnte mit einem Hybrid aus IgG und IgA, der Sowohl CD32a als auch CD89 bindet, mit Effektorzellen von Mäusen ein besseres Tumor Killing gezeigt werden als ausschließlich durch den IgG, was darauf hindeutet, dass die Eibringung des IgAs und seine Aktivierung des CD89 maßgeblich für die höhere Effektivität ist. Der Hybrid-Ig erzielte zudem eine bessere Tumorregression als der IgG oder der IgA (Li et al. 2017). In diesem Versuch hat sich ebenfalls die Bedeutung der Hinzunahme der IgA-CD89-Achse herausgestellt.

Bereits gewonnene Erkenntnisse in Hinblick auf die F_c-Rezeptor-Biologie von IgA und IgG lassen sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Einklang bringen und bestärken weitere Bestrebungen, den hier genutzten IgA weiterhin zu prüfen, auch in Hinblick auf einen Einsatz in klinischen Studien.

5.5 ADCC in Abhängigkeit des CD177-Subsets

Eine Vielzahl an CD177-Subset-abhängigen Unterschieden des Phänotyps konnten herausgestellt werden. Bei der Betrachtung aller Spender hat sich sowohl bei den kranken als auch bei den gesunden Spendern auf den CD177-positiven Neutrophilen eine erhöhte Expression von CD89, dem F_c-Rezeptor für den IgA, CD18, CD11b, CD172a und CD62L gezeigt. Der gleiche Unterschied der Expression von CD89 und CD62L hat sich auch bei der ADCC-Kohorte, bei den kranken und gesunden Spendern gleichermaßen, gezeigt. Die CD177-positiven Neutrophilen exprimieren den F_c-Rezeptor stärker, dessen Bindung durch den IgA2.0 für die Auslösung der ADCC benötigt wird (Mazengera et al. 1990). Dies ist ein Umstand, der bekanntermaßen die ADCC verstärkt. Bei den kranken Spendern mit einem hohen CD177-Anteil hat sich dies jedoch nicht in einer besseren ADCC widerspiegelt, bei den gesunden Spendern war sogar die Gruppe mit einem niedrigen CD177-Subset-Anteil besser. Diese Ergebnisse lassen sich nicht gut in Einklang bringen. Die Expression des F_c-Rezeptors allein ist offenbar nicht ausschlaggebend.

Zudem sind die CD177-positiven Neutrophilen mit höherer CD62L-Expression bei den kranken und gesunden Spendern möglicherweise unreifer, bzw. kürzer in der Blutbahn zirkuliert (Casanova-Acebes et al. 2013). Dies lässt sich bei den gesunden Spendern mit der ADCC in Verbindung setzen. Hier war die Gruppe mit dem niedrigen CD177-Subset-Anteil, also die Gruppe mit einem höheren Anteil an reifen Neutrophilen, überlegen. In der kranken Gruppe lässt sich dieser Unterschied nicht finden. Es scheint, dass die Reife der Neutrophilen tatsächlich keine so große Rolle spielt und auch unreife Neutrophile genauso gut zur IgA-abhängigen ADCC in der Lage sind wie in der Literatur beschrieben (Otten et al. 2005).

Es stellt sich die Frage, wieso nur bei den gesunden und nicht bei den kranken Spendern ein Subset-abgängiger Unterschied der ADCC festgestellt wurde. Bei den HNSCC-Spendern könnten die CD177-negativen Neutrophilen durch das chronisch proinflammatorische Milieu aktivierend auf das Niveau der CD177-positiven Neutrophilen angehoben werden, wodurch sich Unterschiede im ursprünglichen Aktivierungszustand ausgleichen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass drei der vier Patienten mit einem T4-Tumor einen CD177-Anteil von über 75 % aufwiesen, der zuvor bereits mit einer signifikant reduzierten ADCC in Verbindung gebracht wurde. Das Tumorstadium könnte in diesem Zusammenhang als Cofounder wirken. Für die Subset-Verteilung gab es keine HNSCC-abhängigen Veränderungen. Diese Arbeit unterstreicht, dass die Subset-Verteilung in der Tat nur von der Person abhängt und angeboren ist (Matsuo et al. 2000). Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei Polycyemia vera und bei Schwangeren die Expression von CD177 erhöht ist (Göhring et al. 2004; Caruccio et al. 2003). In dieser Arbeit konnte kein genereller Unterschied bei der Expression zwischen den gesunden und den HNSCC-Spendern herausgestellt werden. Nur bei den kranken Männern sowie

innerhalb der kranken Kohorte bei den T4-Spendern und bei den über 70-jährigen mit HNSCC ist die Expression erhöht. Die Tumorerkrankung und das Fortschreiten dieser scheinen teilweise mit der CD177-Expression in Verbindung zu stehen. Eine erhöhte Expression von CD177 erhöht die Bindungskapazität für IgG (Li et al. 2024). CD177 könnte möglicherweise als ein Cofaktor für die Bindung von IgG von Bedeutung sein. Patienten mit fortgeschrittenem Tumor, älter als 70 Jahre und Männer könnten möglicherweise mehr davon profitieren. In Rezidiven von HNSCCs konnten bereits mehr Neutrophilen mit einer höheren CD177-Expression gefunden werden (Kaneko et al. 2022). Dies bestärkt die Bedeutung von CD177 als Marker eines fortgeschrittenen Verlaufs bei HNSCCs.

Eine detailliertere Betrachtung der Subset-spezifischen ADCC-Kompetenz von Neutrophilen erfordert eine isolierte und parallele Untersuchung beider Subtypen. Hierfür sind größere Volumina bei der Blutabnahme erforderlich sowie eine MACS-basierte Separation der Neutrophilen.

Diese Arbeit zeigt funktionelle Unterschiede zwischen den Subsets mit einem nennenswerten Einfluss von Antikörper-Isotyp und pro-inflammatorischem lokalem und peripherem Milieu auf die ADCC. CD177 scheint ein Marker für fortgeschrittene Erkrankung und fortgeschrittenes Alter der HNSCC-Patienten zu sein.

5.6 Ausblick

Was zunehmende Bedeutung bei der Regulation des Immunsystems sowie der Neutrophilen erlangt, sind Einflüsse des Darm-Mikrobioms auf die Neutrophilen. In Mausversuchen führte eine Antibiotika-Gabe zur fast vollständigen Eradikation des Darmmikrobioms und zu einer verringerten Granulopoese, obwohl das eingesetzte Antibiotikum nur im Darm war und nicht in den Blutkreislauf gelangte (Tada et al. 1996). Das Altern der Neutrophilen wird durch das Mikrobiom beeinflusst und es entstehen Neutrophile, die schwach CD62L und stark CD184 exprimieren. Das gealterte Subset migriert besser, betreibt besser NETose und Phagozytose. Die Anzahl dieser gealterten Neutrophilen kann durch Eradikation des Mikrobioms vermindert werden (Zhang et al. 2016; Uhl et al. 2016). Eine wichtige Gruppe an Molekülen sind hierbei kurzkettige Fettsäuren, welche durch Fermentation von Kohlenhydraten durch Darmbakterien entstehen. Ein dezimiertes Mikrobiom konnte mit geringeren Spiegeln dieser in Verbindung gebracht werden (Ruppin et al. 1980; Høverstad et al. 1986). Sie können bei Neutrophilen eine Apoptose auslösen und haben eine entzündungshemmende Wirkung (Aoyama et al. 2010). Auf der einen Seite führt das Mikrobiom zu einer verbesserten Neutrophilen-Funktion, auf der anderen Seite hemmt es überschießende Entzündungsreaktionen und trägt somit zu einem Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Hemmung des Immunsystems bei, was wie bereits beschrieben bei HNSCCs und bei bösartigen Erkrankungen generell durch Freisetzung von

Zytokinen und durch den Einfluss des TMEs aus den Fugen gerät (siehe Kap. 2.3.5). Bei Patienten mit Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinom konnten bestimmte Bakterienstämme als Prognose-fördernd, andere als Prognose-verslechternd herausgestellt werden (Dou et al. 2022).

Ob Neutrophile im TME nun Prognose-fördernd oder Prognose-mindernd für HNSCCs sind, lässt sich zum derzeitigen Stand nicht zweifelsfrei klären. Das Ausmaß der Neutrophilen-Invasion allein scheint dabei nicht ausschlaggebend zu sein, sondern auch die Polarisation dieser. N2-Neutrophile sind hierbei Progress-fördernd und prognosehemmend, N1-Neutrophile bewirken gegenteiliges (Zhu et al. 2024). Durch die Infiltration des Tumors durch Neutrophile bietet der IgA2.0 eine effektive Möglichkeit, diese für die ADCC zu aktivieren. Sobald dies geschieht, geben die lokal aktivierten Neutrophilen Leukotrien B4 ab, welches wiederum eine chemotaktische Wirkung auf weitere Neutrophile hat (Van der Steen et al. 2009; Valcenko et al. 2024).

Im Hinblick auf zukünftige Forschung erscheint eine vertiefte Auseinandersetzung mit der Entstehung und Progression von Tumoren unabdingbar – insbesondere unter Berücksichtigung des Tumormikromilieus (TME) und dessen Einfluss auf das Immunsystem sowie die Funktion neutrophiler Granulozyten. Dabei sollten vor allem die unterschiedlichen Subsets dieser Zellen und deren teils gegensätzliche pro- und anti-tumorale Eigenschaften weiter charakterisiert werden. Auch die Rolle der IgA-vermittelten ADCC als therapeutisches Werkzeug verdient verstärkte Aufmerksamkeit. Zahlreiche Proof-of-Concept-Studien belegen die prinzipielle Wirksamkeit von IgA als monoklonalem Antikörper – sowohl *in vitro* als auch in präklinischen Tiermodellen, für verschiedene Zielstrukturen und Tumorentitäten, und über mehrere unabhängige Forschungsgruppen hinweg. Dennoch bleibt die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse in den klinischen Kontext ein zentrales Ziel künftiger Untersuchungen. Darüber hinaus sollte das Mikrobiom als weiterer bedeutender Einflussfaktor stärker in den Fokus rücken, da es mit nahezu allen genannten Bereichen in direkter oder indirekter Wechselwirkung steht und damit ein potenzieller Schlüsselmechanismus in der Tumorummunologie sein könnte

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum besseren Verständnis des Phänotyps und der Funktionalität Neutrophiler im Kontext von HNSCCs und unterstreicht das Potential eines IgAs als neuen Ansatz für eine Immuntherapie im klinischen Alltag.

6. Literaturverzeichnis

1. Abi Abdallah DS, Egan CE, Butcher BA, Denkers EY. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol*. 2011 May;23(5):317-26. doi: 10.1093/intimm/dxr007. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21422151; PMCID: PMC3082529.
2. Alarcón B, Mestre D, Martínez-Martín N. The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology*. 2011 Aug;133(4):420-5. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03458.x. Epub 2011 Jun 2. PMID: 21631496; PMCID: PMC3143353.
3. Alder MN, Mallela J, Opoka AM, Lahni P, Hildeman DA, Wong HR. Olfactomedin 4 marks a subset of neutrophils in mice. *Innate Immun*. 2019 Jan;25(1):22-33. doi: 10.1177/1753425918817611. Epub 2018 Dec 11. PMID: 30537894; PMCID: PMC6661892.
4. Aoyama M, Kotani J, Usami M. Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. *Nutrition*. 2010 Jun;26(6):653-61. doi: 10.1016/j.nut.2009.07.006. Epub 2009 Dec 8. PMID: 20004081.
5. Appelgren D, Dahle C, Knopf J, Bilyy R, Vovk V, Sundgren PC, Bengtsson AA, Wetterö J, Muñoz LE, Herrmann M, Höög A, Sjöwall C. Active NET formation in Libman-Sacks endocarditis without antiphospholipid antibodies: A dramatic onset of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2018 Sep;51(6):310-318. doi: 10.1080/08916934.2018.1514496. Epub 2018 Oct 28. PMID: 30369267.
6. Ardi VC, Kupriyanova TA, Deryugina EI, Quigley JP. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 18;104(51):20262-7. doi: 10.1073/pnas.0706438104. Epub 2007 Dec 11. PMID: 18077379; PMCID: PMC2154419.
7. Astarita JL, Keerthivasan S, Husain B, Şenbabaoğlu Y, Verschueren E, Gierke S, Pham VC, Peterson SM, Chalouni C, Pierce AA, Lill JR, Gonzalez LC, Martinez-Martin N, Turley SJ. The neutrophil protein CD177 is a novel PDPN receptor that regulates human cancer-associated fibroblast physiology. *PLoS One*. 2021 Dec 8;16(12):e0260800. doi: 10.1371/journal.pone.0260800. PMID: 34879110; PMCID: PMC8654239.
8. Bai M, Grieshaber-Bouyer R, Wang J, Schmider AB, Wilson ZS, Zeng L, Halyabar O, Godin MD, Nguyen HN, Levescot A, Cunin P, Lefort CT, Soberman RJ, Nigrovic PA. CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation. *Blood*. 2017 Nov 9;130(19):2092-2100. doi: 10.1182/blood-2017-03-768507. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28807980; PMCID: PMC5680608.
9. Bauer S, Abdgawad M, Gunnarsson L, Segelmark M, Tapper H, Hellmark T. Proteinase 3 and CD177 are expressed on the plasma membrane of the same subset of neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2007 Feb;81(2):458-64. doi: 10.1189/jlb.0806514. Epub 2006 Oct 31. PMID: 17077162.

10. Beyer T, Lohse S, Berger S, Peipp M, Valerius T, Dechant M. Serum-free production and purification of chimeric IgA antibodies. *J Immunol Methods*. 2009 Jul 31;346(1-2):26-37. doi: 10.1016/j.jim.2009.05.002. Epub 2009 May 7. PMID: 19427867.
11. Beyrau M, Bodkin JV, Nourshargh S. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol*. 2012 Nov;2(11):120134. doi: 10.1098/rsob.120134. PMID: 23226600; PMCID: PMC3513838.
12. Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, Guo H, Nakamura T, Kataoka H, Nabeshima K. The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res*. 1995 Jan 15;55(2):434-9. PMID: 7812975.
13. Bonaventura A, Montecucco F, Dallegri F, Carbone F, Lüscher TF, Camici GG, Liberale L. Novel findings in neutrophil biology and their impact on cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. 2019 Jul 1;115(8):1266-1285. doi: 10.1093/cvr/cvz084. PMID: 30918936.
14. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010 Nov 24;33(5):657-70. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011. PMID: 21094463.
15. Borrok MJ, Luheshi NM, Beyaz N, Davies GC, Legg JW, Wu H, Dall'Acqua WF, Tsui P. Enhancement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by endowing IgG with FcαRI (CD89) binding. *MAbs*. 2015;7(4):743-51. doi: 10.1080/19420862.2015.1047570. PMID: 25970007; PMCID: PMC4623516.
16. Boross P, Lohse S, Nederend M, Jansen JH, van Tetering G, Dechant M, Peipp M, Royle L, Liew LP, Boon L, van Rooijen N, Bleeker WK, Parren PW, van de Winkel JG, Valerius T, Leusen JH. IgA EGFR antibodies mediate tumour killing *in vivo*. *EMBO Mol Med*. 2013 Aug;5(8):1213-26. doi: 10.1002/emmm.201201929. PMID: 23918228; PMCID: PMC3944462.
17. Brandsma AM, Bondza S, Evers M, Koutstaal R, Nederend M, Jansen JHM, Rösner T, Valerius T, Leusen JHW, Ten Broeke T. Potent Fc Receptor Signaling by IgA Leads to Superior Killing of Cancer Cells by Neutrophils Compared to IgG. *Front Immunol*. 2019 Apr 11;10:704. doi: 10.3389/fimmu.2019.00704. PMID: 31031746; PMCID: PMC6470253.
18. Brubaker AL, Rendon JL, Ramirez L, Choudhry MA, Kovacs EJ. Reduced neutrophil chemotaxis and infiltration contributes to delayed resolution of cutaneous wound infection with advanced age. *J Immunol*. 2013 Feb 15;190(4):1746-57. doi: 10.4049/jimmunol.1201213. Epub 2013 Jan 14. PMID: 23319733; PMCID: PMC3563860.
19. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daëron M. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009 Apr 16;113(16):3716-25. doi: 10.1182/blood-2008-09-179754. Epub 2008 Nov 18. PMID: 19018092.
20. Brunke C, Lohse S, Derer S, Peipp M, Boross P, Kellner C, Beyer T, Dechant M, Royle L, Liew LP, Leusen JH, Valerius T. Effect of a tail piece cysteine deletion on biochemical and functional properties of an epidermal growth factor receptor-directed IgA2m(1) antibody. *MAbs*. 2013 Nov-Dec;5(6):936-45. doi: 10.4161/mabs.26396. PMID: 24492345; PMCID: PMC3896607.

21. Brunkhorst H, Schnellhardt S, Büttner-Herold M, Daniel C, Fietkau R, Distel LV. Neutrophils in HNSCC Can Be Associated with Both a Worse or Favorable Prognosis. *Biomolecules*. 2024 Feb 9;14(2):205. doi: 10.3390/biom14020205. PMID: 38397442; PMCID: PMC10886850.
22. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G Jr, Psyrri A, Basté N, Neupane P, Bratland Å, Fuereder T, Hughes BGM, Mesía R, Ngamphaiboon N, Rordorf T, Wan Ishak WZ, Hong RL, González Mendoza R, Roy A, Zhang Y, Gumuscu B, Cheng JD, Jin F, Rischin D; KEYNOTE-048 Investigators. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019 Nov 23;394(10212):1915-1928. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32591-7. Epub 2019 Nov 1. Erratum in: *Lancet*. 2020 Jan 25;395(10220):272. Erratum in: *Lancet*. 2020 Feb 22;395(10224):564. Erratum in: *Lancet*. 2021 Jun 12;397(10291):2252. PMID: 31679945.
23. Cao JF, Xingyu Yang, Li Xiong, Wu M, Chen S, Xu H, Gong Y, Zhang L, Zhang Q, Zhang X. Exploring the mechanism of action of dapansutride in the treatment of gouty arthritis based on molecular docking and molecular dynamics. *Front Physiol*. 2022 Aug 29;13:990469. doi: 10.3389/fphys.2022.990469. PMID: 36105284; PMCID: PMC9465377.
24. Caruccio L, Bettinotti M, Matsuo K, Sharon V, Stroncek D. Expression of human neutrophil antigen-2a (NB1) is increased in pregnancy. *Transfusion*. 2003 Mar;43(3):357-63. doi: 10.1046/j.1537-2995.2003.00320.x. PMID: 12675722.
25. Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chèvre R, A-González N, Kunisaki Y, Zhang D, van Rooijen N, Silberstein LE, Weber C, Nagasawa T, Frenette PS, Castrillo A, Hidalgo A. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*. 2013 May 23;153(5):1025-35. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.040. PMID: 23706740; PMCID: PMC4128329.
26. Chen L, Huang CF, Li YC, Deng WW, Mao L, Wu L, Zhang WF, Zhang L, Sun ZJ. Blockage of the NLRP3 inflammasome by MCC950 improves anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Mol Life Sci*. 2018 Jun;75(11):2045-2058. doi: 10.1007/s00018-017-2720-9. Epub 2017 Nov 28. PMID: 29184980; PMCID: PMC11105265.
27. Chan LP, Wang LF, Chiang FY, Lee KW, Kuo PL, Liang CH. IL-8 promotes HNSCC progression on CXCR1/2-mediated NOD1/RIP2 signaling pathway. *Oncotarget*. 2016 Sep 20;7(38):61820-61831. doi: 10.18632/oncotarget.11445. PMID: 27557518; PMCID: PMC5308693.
28. Chatta GS, Andrews RG, Rodger E, Schrag M, Hammond WP, Dale DC. Hematopoietic progenitors and aging: alterations in granulocytic precursors and responsiveness to recombinant human G-CSF, GM-CSF, and IL-3. *J Gerontol*. 1993 Sep;48(5):M207-12. doi: 10.1093/geronj/48.5.m207. PMID: 7690056.
29. Chen Z, Zhang H, Qu M, Nan K, Cao H, Cata JP, Chen W, Miao C. Review: The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis and Sepsis-Associated Thrombosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Mar 17;11:653228. doi: 10.3389/fcimb.2021.653228. PMID: 33816356; PMCID: PMC8010653.

30. Clemmensen SN, Bohr CT, Rørvig S, Glenthøj A, Mora-Jensen H, Cramer EP, Jacobsen LC, Larsen MT, Cowland JB, Tanassi JT, Heegaard NH, Wren JD, Silahtaroglu AN, Borregaard N. Olfactomedin 4 defines a subset of human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2012 Mar;91(3):495-500. doi: 10.1189/jlb.0811417. Epub 2011 Dec 20. PMID: 22187488; PMCID: PMC3289394.
31. Cohen EEW, Soulières D, Le Tourneau C, Dinis J, Licitra L, Ahn MJ, Soria A, Machiels JP, Mach N, Mehra R, Burtneess B, Zhang P, Cheng J, Swaby RF, Harrington KJ; KEYNOTE-040 investigators. Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2019 Jan 12;393(10167):156-167. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31999-8. Epub 2018 Nov 30. Erratum in: *Lancet.* 2019 Jan 12;393(10167):132. doi: 10.1016/S0140-6736(18)33261-6. PMID: 30509740.
32. Condamine T, Dominguez GA, Youn JI, Kossenkova AV, Mony S, Alicea-Torres K, Tcyganov E, Hashimoto A, Nefedova Y, Lin C, Partlova S, Garfall A, Vogl DT, Xu X, Knight SC, Malietzis G, Lee GH, Eruslanov E, Albelda SM, Wang X, Mehta JL, Bewtra M, Rustgi A, Hockstein N, Witt R, Masters G, Nam B, Smirnov D, Sepulveda MA, Gabrilovich DI. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol.* 2016 Aug;1(2):aaf8943. doi: 10.1126/sciimmunol.aaf8943. Epub 2016 Aug 5. PMID: 28417112; PMCID: PMC5391495.
33. Cottignies-Calamarte A, Tudor D, Bomsel M. Antibody Fc-chimerism and effector functions: When IgG takes advantage of IgA. *Front Immunol.* 2023 Feb 2;14:1037033. doi: 10.3389/fimmu.2023.1037033. PMID: 36817447; PMCID: PMC9933243.
34. Crooke SN, Ovsyannikova IG, Poland GA, Kennedy RB. Immunosenescence: A systems-level overview of immune cell biology and strategies for improving vaccine responses. *Exp Gerontol.* 2019 Sep;124:110632. doi: 10.1016/j.exger.2019.110632. Epub 2019 Jun 13. PMID: 31201918; PMCID: PMC6849399.
35. Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, Tuluc M. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol.* 2014 Apr;41(2):217-34. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.03.003. Epub 2014 Mar 5. PMID: 24787294.
36. Dahlstrand Rudin, A., Amirbeagi, F., Davidsson, L., Khamzeh, A., Thorbert Mros, S., Thulin, P., Welin, A., Björkman, L., Christenson, K., & Bylund, J. (2021). The neutrophil subset defined by CD177 expression is preferentially recruited to gingival crevicular fluid in periodontitis. *Journal of Leukocyte Biology*, 109(2), 349–362.
<https://doi.org/10.1002/JLB.3A0520-081RR>
37. Dalerba P, Kalisky T, Sahoo D, Rajendran PS, Rothenberg ME, Leyrat AA, Sim S, Okamoto J, Johnston DM, Qian D, Zabala M, Bueno J, Neff NF, Wang J, Shelton AA, Visser B, Hisamori S, Shimono Y, van de Wetering M, Clevers H, Clarke MF, Quake SR. Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors. *Nat Biotechnol.* 2011 Nov 13;29(12):1120-7. doi: 10.1038/nbt.2038. PMID: 22081019; PMCID: PMC3237928.

38. Dechant M, Beyer T, Schneider-Merck T, Weisner W, Peipp M, van de Winkel JG, Valerius T. Effector mechanisms of recombinant IgA antibodies against epidermal growth factor receptor. *J Immunol*. 2007 Sep 1;179(5):2936-43. doi: 10.4049/jimmunol.179.5.2936. PMID: 17709508.
39. De Filippo K, Rankin SM. CXCR4, the master regulator of neutrophil trafficking in homeostasis and disease. *Eur J Clin Invest*. 2018 Nov;48 Suppl 2(Suppl Suppl 2):e12949. doi: 10.1111/eci.12949. Epub 2018 May 23. PMID: 29734477; PMCID: PMC6767022.
40. De Larco JE, Wuertz BR, Furcht LT. The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 1;10(15):4895-900. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0760. PMID: 15297389.
41. Domon H, Oda M, Maekawa T, Nagai K, Takeda W, Terao Y. Streptococcus pneumoniae disrupts pulmonary immune defence via elastase release following pneumolysin-dependent neutrophil lysis. *Sci Rep*. 2016 Nov 28;6:38013. doi: 10.1038/srep38013. PMID: 27892542; PMCID: PMC5125098.
42. Dou Y, Ma C, Wang K, Liu S, Sun J, Tan W, Neckenig M, Wang Q, Dong Z, Gao W, Chen A, Zhang D, Wang B, Shi L, Nan Z, Ai D, Yu W, Liu J, Song B, Zhao L, Shao Q, Zhu Y, Wang T, Wang J, Hu W, Wei F, Xu X, Qu X. Dysbiotic tumor microbiota associates with head and neck squamous cell carcinoma outcomes. *Oral Oncol*. 2022 Jan;124:105657. doi: 10.1016/j.oraloncology.2021.105657. Epub 2021 Dec 13. PMID: 34915261.
43. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest*. 2010 Jul;120(7):2423-31. doi: 10.1172/JCI41649. PMID: 20516641; PMCID: PMC2898597.
44. Ebrahimi F, Giaglis S, Hahn S, Blum CA, Baumgartner C, Kutz A, van Breda SV, Mueller B, Schuetz P, Christ-Crain M, Hasler P. Markers of neutrophil extracellular traps predict adverse outcome in community-acquired pneumonia: secondary analysis of a randomised controlled trial. *Eur Respir J*. 2018 Apr 26;51(4):1701389. doi: 10.1183/13993003.01389-2017. PMID: 29519921.
45. Eulenberg-Gustavus C, Bähring S, Maass PG, Luft FC, Kettritz R. Genesilencing and a novel monoallelic expression pattern in distinct CD177 neutrophil subsets. *J Exp Med* 2017;214:2089–101. <https://doi.org/10.1084/jem.20161093>.
46. Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, Guralnik JM, Longo DL. The origins of age-related proinflammatory state. *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2294-9. doi: 10.1182/blood-2004-07-2599. Epub 2004 Nov 30. PMID: 15572589; PMCID: PMC9828256.
47. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, Worthen GS, Albelda SM. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009 Sep 8;16(3):183-94. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017. PMID: 19732719; PMCID: PMC2754404.
48. Fujishima S, Hoffman AR, Vu T, Kim KJ, Zheng H, Daniel D, Kim Y, Wallace EF, Larrick JW, Raffin TA. Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by

LPS, TNF-alpha, and IL-1 beta. *J Cell Physiol.* 1993 Mar;154(3):478-85. doi: 10.1002/jcp.1041540305. PMID: 8436597.

49. Gameiro CM, Romão F, Castelo-Branco C. Menopause and aging: changes in the immune system--a review. *Maturitas.* 2010 Dec;67(4):316-20. doi: 10.1016/j.maturitas.2010.08.003. Epub 2010 Sep 1. PMID: 20813470.

50. Goel B, Tiwari AK, Pandey RK, Singh AP, Kumar S, Sinha A, Jain SK, Khattri A. Therapeutic approaches for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma-An update on clinical trials. *Transl Oncol.* 2022 Jul;21:101426. doi: 10.1016/j.tranon.2022.101426. Epub 2022 Apr 20. PMID: 35460943; PMCID: PMC9046875.

51. Goedert JJ, Jones G, Hua X, Xu X, Yu G, Flores R, Falk RT, Gail MH, Shi J, Ravel J, Feigelson HS. Investigation of the association between the fecal microbiota and breast cancer in postmenopausal women: a population-based case-control pilot study. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Jun 1;107(8):djv147. doi: 10.1093/jnci/djv147. PMID: 26032724; PMCID: PMC4554191.

52. Göhring K, Wolff J, Doppl W, Schmidt KL, Fenchel K, Pralle H, Sibelius U, Bux J. Neutrophil CD177 (NB1 gp, HNA-2a) expression is increased in severe bacterial infections and polycythaemia vera. *Br J Haematol.* 2004 Jul;126(2):252-4. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05027.x. PMID: 15238147.

53. Gómez-Gaviro M, Domínguez-Luis M, Canchado J, Calafat J, Janssen H, Lara-Pezzi E, Fourie A, Tugores A, Valenzuela-Fernández A, Mollinedo F, Sánchez-Madrid F, Díaz-González F. Expression and regulation of the metalloproteinase ADAM-8 during human neutrophil pathophysiological activation and its catalytic activity on L-selectin shedding. *J Immunol.* 2007 Jun 15;178(12):8053-63. doi: 10.4049/jimmunol.178.12.8053. PMID: 17548643.

54. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, Prieto PA, Vicente D, Hoffman K, Wei SC, Cogdill AP, Zhao L, Hudgens CW, Hutchinson DS, Manzo T, Petaccia de Macedo M, Cotechini T, Kumar T, Chen WS, Reddy SM, Szczepaniak Sloane R, Galloway-Pena J, Jiang H, Chen PL, Shpall EJ, Rezvani K, Alousi AM, Chemaly RF, Shelburne S, Vence LM, Okhuysen PC, Jensen VB, Swennes AG, McAllister F, Marcelo Riquelme Sanchez E, Zhang Y, Le Chatelier E, Zitvogel L, Pons N, Austin-Breneman JL, Haydu LE, Burton EM, Gardner JM, Sirmans E, Hu J, Lazar AJ, Tsujikawa T, Diab A, Tawbi H, Glitza IC, Hwu WJ, Patel SP, Woodman SE, Amaria RN, Davies MA, Gershenwald JE, Hwu P, Lee JE, Zhang J, Coussens LM, Cooper ZA, Futreal PA, Daniel CR, Ajami NJ, Petrosino JF, Tetzlaff MT, Sharma P, Allison JP, Jenq RR, Wargo JA. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science.* 2018 Jan 5;359(6371):97-103. doi: 10.1126/science.aan4236. Epub 2017 Nov 2. PMID: 29097493; PMCID: PMC5827966.

55. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity.* 2019 Jul 16;51(1):27-41. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.025. PMID: 31315034; PMCID: PMC6831096.

56. Grotendorst GR, Smale G, Pancev D. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J Cell Physiol.* 1989 Aug;140(2):396-402. doi: 10.1002/jcp.1041400226. PMID: 2745570.

57. Guglietta S, Chiavelli A, Zagato E, Krieg C, Gandini S, Ravenda PS, Bazolli B, Lu B, Penna G, Rescigno M. Coagulation induced by C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis. *Nat Commun*. 2016 Mar 21;7:11037. doi: 10.1038/ncomms11037. PMID: 26996437; PMCID: PMC4802169.
58. Gutschalk CM, Herold-Mende CC, Fusenig NE, Mueller MM. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promote malignant growth of cells from head and neck squamous cell carcinomas *in vivo*. *Cancer Res*. 2006 Aug 15;66(16):8026-36. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0158. PMID: 16912178.
59. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.
60. Harrington KJ, Burtress B, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G Jr, Psyrri A, Brana I, Basté N, Neupane P, Bratland Å, Fuehrer T, Hughes BGM, Mesia R, Ngamphaiboon N, Rordorf T, Wan Ishak WZ, Lin J, Gumuscu B, Swaby RF, Rischin D. Pembrolizumab With or Without Chemotherapy in Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Updated Results of the Phase III KEYNOTE-048 Study. *J Clin Oncol*. 2023 Feb 1;41(4):790-802. doi: 10.1200/JCO.21.02508. Epub 2022 Oct 11. PMID: 36219809; PMCID: PMC9902012.
61. Hattar K, Franz K, Ludwig M, Sibelius U, Wilhelm J, Lohmeyer J, Savai R, Subtil FS, Dahlem G, Eul B, Seeger W, Grimminger F, Grandel U. Interactions between neutrophils and non-small cell lung cancer cells: enhancement of tumor proliferation and inflammatory mediator synthesis. *Cancer Immunol Immunother*. 2014 Dec;63(12):1297-306. doi: 10.1007/s00262-014-1606-z. Epub 2014 Sep 4. PMID: 25186613; PMCID: PMC4255085.
62. Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res*. 2009 Apr;88(4):300-6. doi: 10.1177/0022034509333371. PMID: 19407148; PMCID: PMC3317947.
63. Herr AB, White CL, Milburn C, Wu C, Bjorkman PJ. Bivalent binding of IgA1 to FcαRI suggests a mechanism for cytokine activation of IgA phagocytosis. *J Mol Biol*. 2003 Mar 28;327(3):645-57. doi: 10.1016/s0022-2836(03)00149-9. PMID: 12634059.
64. Herrero-Cervera A, Soehnlein O, Kenne E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol*. 2022 Feb;19(2):177-191. doi: 10.1038/s41423-021-00832-3. Epub 2022 Jan 17. PMID: 35039631; PMCID: PMC8803838.
65. Hirokawa K, Utsuyama M, Hayashi Y, Kitagawa M, Makinodan T, Fulop T. Slower immune system aging in women versus men in the Japanese population. *Immun Ageing*. 2013 May 15;10(1):19. doi: 10.1186/1742-4933-10-19. PMID: 23675689; PMCID: PMC3663722.
66. Holdcroft A. Gender bias in research: how does it affect evidence based medicine? *J R Soc Med*. 2007 Jan;100(1):2-3. doi: 10.1177/014107680710000102. PMID: 17197669; PMCID: PMC1761670.
67. Høverstad T, Midtvedt T. Short-chain fatty acids in germfree mice and rats. *J Nutr*. 1986 Sep;116(9):1772-6. doi: 10.1093/jn/116.9.1772. PMID: 3761032.

68. Hurst JK. What really happens in the neutrophil phagosome? *Free Radic Biol Med*. 2012 Aug 1;53(3):508-20. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.008. Epub 2012 May 15. PMID: 22609248; PMCID: PMC4382085.
69. Jaeger BN, Donadieu J, Cognet C, Bernat C, Ordoñez-Rueda D, Barlogis V, Mahlaoui N, Fenis A, Narni-Mancinelli E, Beaupain B, Bellanné-Chantelot C, Bajénoff M, Malissen B, Malissen M, Vivier E, Ugolini S. Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med*. 2012 Mar 12;209(3):565-80. doi: 10.1084/jem.20111908. Epub 2012 Mar 5. PMID: 22393124; PMCID: PMC3302230.
70. Jaillon S, Berthenet K, Garlanda C. Sexual Dimorphism in Innate Immunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019 Jun;56(3):308-321. doi: 10.1007/s12016-017-8648-x. PMID: 28963611.
71. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Nov 26;6(1):92. doi: 10.1038/s41572-020-00224-3. Erratum in: *Nat Rev Dis Primers*. 2023 Jan 19;9(1):4. PMID: 33243986; PMCID: PMC7944998.
72. Adam V. Jones, Daniel W. Lambert, Paul M. Speight, Simon A. Whawell, ADAM 10 is over expressed in oral squamous cell carcinoma and contributes to invasive behaviour through a functional association with $\alpha\beta 6$ integrin, *FEBS Letters*, Volume 587, Issue 21, 2013, Pages 3529-3534, ISSN 0014 5793, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.09.010>.
73. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 10;24(17):2666-72. doi: 10.1200/JCO.2005.04.8306. PMID: 16763281.
74. Kamohara H, Matsuyama W, Shimozaoto O, Abe K, Galligan C, Hashimoto S, Matsushima K, Yoshimura T. Regulation of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptor expression in human neutrophils. *Immunology*. 2004 Feb;111(2):186-94. doi: 10.1111/j.0019-2805.2003.01794.x. PMID: 15027904; PMCID: PMC1782413.
75. Kaneko T, Zeng PYF, Liu X, Abdo R, Barrett JW, Zhang Q, Nichols AC, Li SS. Proteome and phosphoproteome signatures of recurrence for HPV⁺ head and neck squamous cell carcinoma. *Commun Med (Lond)*. 2022 Jul 30;2:95. doi: 10.1038/s43856-022-00159-8. PMID: 35919862; PMCID: PMC9338924.
76. Khalaji A, Yancheshmeh FB, Farham F, Khorram A, Sheshbolouki S, Zokaei M, Vatankhah F, Soleymani-Goloujeh M. Don't eat me/eat me signals as a novel strategy in cancer immunotherapy. *Heliyon*. 2023 Sep 29;9(10):e20507. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e20507. PMID: 37822610; PMCID: PMC10562801.
77. Kemuriyama K, An J, Motoyama S, Nagaki Y, Yamaguchi T, Sato Y, Wakita A, Minamiya Y, Kuba K. Squamous cell carcinoma-derived G-CSF promotes tumor growth and metastasis in mice through neutrophil recruitment and tumor cell proliferation, associated with poor prognosis of the patients. *Genes Cells*. 2023 Aug;28(8):573-584. doi: 10.1111/gtc.13051. Epub 2023 May 29. PMID: 37248626.

78. Khan E, Brieger D, Amerena J, Atherton JJ, Chew DP, Farshid A, Ilton M, Juergens CP, Kangaharan N, Rajaratnam R, Sweeny A, Walters DL, Chow CK. Differences in management and outcomes for men and women with ST-elevation myocardial infarction. *Med J Aust*. 2018 Aug 6;209(3):118-123. doi: 10.5694/mja17.01109. Epub 2018 Jul 23. PMID: 30025513.
79. Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J*. 2000 Aug 1;19(15):3896-904. doi: 10.1093/emboj/19.15.3896. PMID: 10921872; PMCID: PMC306613.
80. Kirkwood TB. Human senescence. *Bioessays*. 1996 Dec;18(12):1009-16. doi: 10.1002/bies.950181211. PMID: 8976158.
81. Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol*. 2004 Jun-Jul;26(6-7):247-64. doi: 10.1111/j.0141-9838.2004.00710.x. PMID: 15541029.
82. Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2016 Oct;16(10):626-38. doi: 10.1038/nri.2016.90. Epub 2016 Aug 22. PMID: 27546235.
83. Kluz PN, Kolb R, Xie Q, Borchering N, Liu Q, Luo Y, Kim MC, Wang L, Zhang Y, Li W, Stipp C, Gibson-Corley KN, Zhao C, Qi HH, Bellizzi A, Tao AW, Sugg S, Weigel RJ, Zhou D, Shen X, Zhang W. Cancer cell-intrinsic function of CD177 in attenuating β -catenin signaling. *Oncogene*. 2020 Apr;39(14):2877-2889. doi: 10.1038/s41388-020-1203-x. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32042113; PMCID: PMC7127950.
84. Krishnamurthy S, Ahmed I, Bhise R, Mohanti BK, Sharma A, Rieckmann T, Paterson C, Bonomo P. The dogma of Cetuximab and Radiotherapy in head and neck cancer - A dawn to dusk journey. *Clin Transl Radiat Oncol*. 2022 Mar 23;34:75-81. doi: 10.1016/j.ctro.2022.03.009. PMID: 35356388; PMCID: PMC8958314.
85. Kuang YH, Liu YJ, Tang LL, Wang SM, Yan GJ, Liao LQ. Plasma soluble cluster of differentiation 147 levels are increased in breast cancer patients and associated with lymph node metastasis and chemoresistance. *Hong Kong Med J*. 2018 Jun;24(3):252-260. doi: 10.12809/hkmj176865. Epub 2018 May 25. PMID: 29807951.
86. Kulkarni U, Zemans RL, Smith CA, Wood SC, Deng JC, Goldstein DR. Excessive neutrophil levels in the lung underlie the age-associated increase in influenza mortality. *Mucosal Immunol*. 2019 Mar;12(2):545-554. doi: 10.1038/s41385-018-0115-3. Epub 2019 Jan 7. PMID: 30617300; PMCID: PMC6375784.
87. Kuhns DB, Long Priel DA, Gallin JI. Loss of L-selectin (CD62L) on human neutrophils following exudation *in vivo*. *Cell Immunol*. 1995 Sep;164(2):306-10. doi: 10.1006/cimm.1995.1174. PMID: 7544694.
88. Kurlander RJ. Blockade of Fc receptor-mediated binding to U-937 cells by murine monoclonal antibodies directed against a variety of surface antigens. *J Immunol*. 1983 Jul;131(1):140-7. PMID: 6223069.

89. Kwak JW, Nguyen HQ, Camai A, Huffman GM, Mekvanich S, Kenney NN, Zhu X, Randolph TW, Houghton AM. CXCR1/2 antagonism inhibits neutrophil function and not recruitment in cancer. *Oncoimmunology*. 2024 Jul 26;13(1):2384674. doi: 10.1080/2162402X.2024.2384674. PMID: 39076249; PMCID: PMC11285219.
90. Kwok AJ, Allcock A, Ferreira RC, Cano-Gamez E, Smee M, Burnham KL, Zurke YX; Emergency Medicine Research Oxford (EMROx); McKechnie S, Mentzer AJ, Monaco C, Udalova IA, Hinds CJ, Todd JA, Davenport EE, Knight JC. Neutrophils and emergency granulopoiesis drive immune suppression and an extreme response endotype during sepsis. *Nat Immunol*. 2023 May;24(5):767-779. doi: 10.1038/s41590-023-01490-5. Epub 2023 Apr 24. PMID: 37095375.
91. Kwon D, Zhang K, Paul KC, Folle AD, Del Rosario I, Jacobs JP, Keener AM, Bronstein JM, Ritz B. Diet and the gut microbiome in patients with Parkinson's disease. *NPJ Parkinsons Dis*. 2024 Apr 22;10(1):89. doi: 10.1038/s41531-024-00681-7. PMID: 38649365; PMCID: PMC11035608.
92. Lämmermann T, Kastenmüller W. Concepts of GPCR-controlled navigation in the immune system. *Immunol Rev*. 2019 May;289(1):205-231. doi: 10.1111/imr.12752. PMID: 30977203; PMCID: PMC6487968.
93. Lalezari P, Murphy GB, Allen FH Jr. NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *J Clin Invest*. 1971 May;50(5):1108-15. doi: 10.1172/JCI106582. PMID: 5552408; PMCID: PMC292033.
94. Landras A, Reger de Moura C, Jouenne F, Lebbe C, Menashi S, Mourah S. CD147 Is a Promising Target of Tumor Progression and a Prognostic Biomarker. *Cancers (Basel)*. 2019 Nov 16;11(11):1803. doi: 10.3390/cancers11111803. PMID: 31744072; PMCID: PMC6896083.
95. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, Naiken T, Ilc K, Murray CM, Critchlow SE, Roux D, Simon MP, Pouysségur J. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Oct 4;108(40):16663-8. doi: 10.1073/pnas.1106123108. Epub 2011 Sep 19. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Dec 4;109(49):20166. Naïken, Tanesha [corrected to Naiken, Tanesha]; Ilk, Karine [corrected to Ilc, Karine]. PMID: 21930917; PMCID: PMC3189052.
96. Lee A, Rode A, Nicoll A, Maczurek AE, Lim L, Lim S, Angus P, Kronborg I, Arachchi N, Gorelik A, Liew D, Warner FJ, McCaughan GW, McLennan SV, Shackel NA. Circulating CD147 predicts mortality in advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016 Feb;31(2):459-66. doi: 10.1111/jgh.13148. PMID: 26312403.
97. Lévy Y, Wiedemann A, Hejblum BP, Durand M, Lefebvre C, Surénaud M, Lacabaratz C, Perreau M, Foucat E, Déchenaud M, Tisserand P, Blengio F, Hivert B, Gauthier M, Cervantes-Gonzalez M, Bachelet D, Laouénan C, Bouadma L, Timsit JF, Yazdanpanah Y, Pantaleo G, Hocini H, Thiébaud R; French COVID cohort study group. CD177, a specific marker of neutrophil activation, is associated with coronavirus disease 2019 severity and death. *iScience*. 2021 Jul 23;24(7):102711. doi: 10.1016/j.isci.2021.102711. Epub 2021 Jun 10. Erratum in: *iScience*. 2022 Dec 24;26(1):105715. PMID: 34127958; PMCID: PMC8189740.

98. Li B, Xu L, Tao F, Xie K, Wu Z, Li Y, Li J, Chen K, Pi C, Mendelsohn A, Larrick JW, Gu H, Fang J. Simultaneous exposure to FcγR and FcαR on monocytes and macrophages enhances antitumor activity *in vivo*. *Oncotarget*. 2017 Jun 13;8(24):39356-39366. doi: 10.18632/oncotarget.17000. PMID: 28454118; PMCID: PMC5503618.
99. Li Y, Wu J. CD177 is a novel IgG Fc receptor and CD177 genetic variants affect IgG-mediated function. *Front Immunol*. 2024 Jul 26;15:1418539. doi: 10.3389/fimmu.2024.1418539. PMID: 39131159; PMCID: PMC11316256.
100. Liang W, Ferrara N. The Complex Role of Neutrophils in Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Cancer Immunol Res*. 2016 Feb;4(2):83-91. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0313. PMID: 26839309.
101. Liao W, Li W, Li Y, Liu T, Wang Y, Feng D, Shen F. Diagnostic, prognostic, and immunological roles of CD177 in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023 Jan;149(1):173-189. doi: 10.1007/s00432-022-04465-5. Epub 2022 Nov 9. PMID: 36352147.
102. Liu S, Ye D, Guo W, Yu W, He Y, Hu J, Wang Y, Zhang L, Liao Y, Song H, Zhong S, Xu D, Yin H, Sun B, Wang X, Liu J, Wu Y, Zhou BP, Zhang Z, Deng J. G9a is essential for EMT-mediated metastasis and maintenance of cancer stem cell-like characters in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Mar 30;6(9):6887-901. doi: 10.18632/oncotarget.3159. PMID: 25749385; PMCID: PMC4466657.
103. Liu W, Yan M, Liu Y, McLeish KR, Coleman WG Jr, Rodgers GP. Olfactomedin 4 inhibits cathepsin C-mediated protease activities, thereby modulating neutrophil killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in mice. *J Immunol*. 2012 Sep 1;189(5):2460-7. doi: 10.4049/jimmunol.1103179. Epub 2012 Jul 27. PMID: 22844115; PMCID: PMC3424379.
104. Liu Y, Xin T, Jiang QY, Huang DY, Shen WX, Li L, Lv YJ, Jin YH, Song XW, Teng C. CD147, MMP9 expression and clinical significance of basal-like breast cancer. *Med Oncol*. 2013 Mar;30(1):366. doi: 10.1007/s12032-012-0366-x. Epub 2013 Jan 6. PMID: 23292863.
105. Logtenberg MEW, Scheeren FA, Schumacher TN. The CD47-SIRPα Immune Checkpoint. *Immunity*. 2020 May 19;52(5):742-752. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.011. PMID: 32433947; PMCID: PMC7340539.
106. Lohse S, Brunke C, Derer S, Peipp M, Boross P, Kellner C, Beyer T, Dechant M, van der Winkel JG, Leusen JH, Valerius T. Characterization of a mutated IgA2 antibody of the m(1) allotype against the epidermal growth factor receptor for the recruitment of monocytes and macrophages. *J Biol Chem*. 2012 Jul 20;287(30):25139-50. doi: 10.1074/jbc.M112.353060. Epub 2012 Jun 7. PMID: 22679018; PMCID: PMC3408157.
107. Lohse S, Meyer S, Meulenbroek LA, Jansen JH, Nederend M, Kretschmer A, Klausz K, Möglinger U, Derer S, Rösner T, Kellner C, Schewe D, Sondermann P, Tiwari S, Kolarich D, Peipp M, Leusen JH, Valerius T. An Anti-EGFR IgA That Displays Improved Pharmacokinetics and Myeloid Effector Cell Engagement *In Vivo*. *Cancer Res*. 2016 Jan 15;76(2):403-17. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1232. Epub 2015 Dec 3. PMID: 26634925.

108. Loyher PL, Hamon P, Laviron M, Meghraoui-Kheddar A, Goncalves E, Deng Z, Torstensson S, Bercovici N, Baudesson de Chanville C, Combadière B, Geissmann F, Savina A, Combadière C, Boissonnas A. Macrophages of distinct origins contribute to tumor development in the lung. *J Exp Med*. 2018 Oct 1;215(10):2536-2553. doi: 10.1084/jem.20180534. Epub 2018 Sep 10. PMID: 30201786; PMCID: PMC6170177.
109. Lu SL, Reh D, Li AG, Woods J, Corless CL, Kulesz-Martin M, Wang XJ. Overexpression of transforming growth factor beta1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. *Cancer Res*. 2004 Jul 1;64(13):4405-10. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1032. PMID: 15231647.
110. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Jul 25;11(8):519-31. doi: 10.1038/nri3024. PMID: 21785456.
111. Manz MG, Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*. 2014 May;14(5):302-14. doi: 10.1038/nri3660. Epub 2014 Apr 22. PMID: 24751955.
112. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD Jr, van Rooijen N, Weissman IL. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*. 2009 Jul 23;138(2):286-99. doi: 10.1016/j.cell.2009.05.045. PMID: 19632179; PMCID: PMC2726837.
113. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*. 2003 Oct;19(4):583-93. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00263-2. PMID: 14563322.
114. Matlung HL, Szilagyi K, Barclay NA, van den Berg TK. The CD47-SIRPα signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer. *Immunol Rev*. 2017 Mar;276(1):145-164. doi: 10.1111/imr.12527. PMID: 28258703.
115. Masucci MT, Minopoli M, Carriero MV. Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Front Oncol*. 2019 Nov 15;9:1146. doi: 10.3389/fonc.2019.01146. PMID: 31799175; PMCID: PMC6874146.
116. Matsuo K, Lin A, Procter JL, Clement L, Stroncek D. Variations in the expression of granulocyte antigen NB1. *Transfusion*. 2000 Jun;40(6):654-62. doi: 10.1046/j.1537-2995.2000.40060654.x. PMID: 10864984.
117. Mattu TS, Pleass RJ, Willis AC, Kilian M, Wormald MR, Lellouch AC, Rudd PM, Woof JM, Dwek RA. The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fcα receptor interactions. *J Biol Chem*. 1998 Jan 23;273(4):2260-72. doi: 10.1074/jbc.273.4.2260. PMID: 9442070.
118. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:181-218. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023. Epub 2013 Sep 16. PMID: 24050624; PMCID: PMC4277181.

119. Mazengera RL, Kerr MA. The specificity of the IgA receptor purified from human neutrophils. *Biochem J.* 1990 Nov 15;272(1):159-65. doi: 10.1042/bj2720159. PMID: 2264821; PMCID: PMC1149671.
120. Menter T, Giefing-Kroell C, Grubeck-Loebenstien B, Tzankov A. Characterization of the inflammatory infiltrate in *Streptococcus pneumoniae* pneumonia in young and elderly patients. *Pathobiology.* 2014;81(3):160-7. doi: 10.1159/000360165. Epub 2014 Apr 15. PMID: 24751977.
121. Molteni A, Brizio-Molteni L, Persky V. *In vitro* hormonal effects of soybean isoflavones. *J Nutr.* 1995 Mar;125(3 Suppl):751S-756S. doi: 10.1093/jn/125.3_Suppl.751S. PMID: 7884561.
122. Morsing SKH, Rademakers T, Brouns SLN, Stalborch ADV, Donners MMPC, van Buul JD. ADAM10-Mediated Cleavage of ICAM-1 Is Involved in Neutrophil Transendothelial Migration. *Cells.* 2021 Jan 25;10(2):232. doi: 10.3390/cells10020232. PMID: 33504031; PMCID: PMC7911467.
123. Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science.* 1996 Jul 5;273(5271):70-4. doi: 10.1126/science.273.5271.70. PMID: 8658199.
124. Mol S, Hafkamp FMJ, Varela L, Simkhada N, Taanman-Kueter EW, Tas SW, Wauben MHM, Groot Kormelink T, de Jong EC. Efficient Neutrophil Activation Requires Two Simultaneous Activating Stimuli. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 18;22(18):10106. doi: 10.3390/ijms221810106. PMID: 34576270; PMCID: PMC8467451
125. Morell A, Skvaril F, Nosedá G, Barandun S. Metabolic properties of human IgA subclasses. *Clin Exp Immunol.* 1973 Apr;13(4):521-8. PMID: 4717094; PMCID: PMC1553728.
126. Morton HC, Brandtzaeg P. CD89: the human myeloid IgA Fc receptor. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2001;49(3):217-29. PMID: 11478396.
127. Moulton VR. Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease. *Front Immunol.* 2018 Oct 4;9:2279. doi: 10.3389/fimmu.2018.02279. PMID: 30337927; PMCID: PMC6180207.
128. Musch A. Panitumumab. Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms [Panitumumab]. *Med Monatsschr Pharm.* 2008 Apr;31(4):122-6. German. PMID: 18497243.
129. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006 Mar;6(3):173-82. doi: 10.1038/nri1785. PMID: 16498448.
130. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol.* 2014 Jul;15(7):602-11. doi: 10.1038/ni.2921. PMID: 24940954.
131. Nevins AM, Marchese A. Detecting Cell Surface Expression of the G Protein-Coupled Receptor CXCR4. *Methods Mol Biol.* 2018;1722:151-164. doi: 10.1007/978-1-4939-7553-2_10. PMID: 29264804; PMCID: PMC6345166.

132. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 15;103(33):12493-8. doi: 10.1073/pnas.0601807103. Epub 2006 Aug 4. PMID: 16891410; PMCID: PMC1531646.
133. Orditura M, De Vita F, Galizia G, Lieto E, Vecchione L, Vitiello F, Martinelli E, Ciardiello F. Correlation between efficacy and skin rash occurrence following treatment with the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab: a single institution retrospective analysis. *Oncol Rep*. 2009 Apr;21(4):1023-8. doi: 10.3892/or_00000319. PMID: 19288004.
134. Othman A, Sekheri M, Filep JG. Roles of neutrophil granule proteins in orchestrating inflammation and immunity. *FEBS J*. 2022 Jul;289(14):3932-3953. doi: 10.1111/febs.15803. Epub 2021 Mar 18. PMID: 33683814; PMCID: PMC9546106.
135. Otten MA, Rudolph E, Dechant M, Tuk CW, Reijmers RM, Beelen RH, van de Winkel JG, van Egmond M. Immature neutrophils mediate tumor cell killing via IgA but not IgG Fc receptors. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5472-80. doi: 10.4049/jimmunol.174.9.5472. PMID: 15843545.
136. Pala V, Sieri S, Berrino F, Vineis P, Sacerdote C, Palli D, Masala G, Panico S, Mattiello A, Tumino R, Giurdanella MC, Agnoli C, Grioni S, Krogh V. Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European prospective investigation into cancer and nutrition cohort. *Int J Cancer*. 2011 Dec 1;129(11):2712-9. doi: 10.1002/ijc.26193. Epub 2011 Aug 5. PMID: 21607947.
137. Pang X, Tang YL, Liang XH. Transforming growth factor- β signaling in head and neck squamous cell carcinoma: Insights into cellular responses. *Oncol Lett*. 2018 Oct;16(4):4799-4806. doi: 10.3892/ol.2018.9319. Epub 2018 Aug 17. PMID: 30250544; PMCID: PMC6144927.
138. Parisi L, Gini E, Baci D, Tremolati M, Fanuli M, Bassani B, Farronato G, Bruno A, Mortara L. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res*. 2018 Jan 14;2018:8917804. doi: 10.1155/2018/8917804. PMID: 29507865; PMCID: PMC5821995.
139. Park JO, Nam IC, Kim CS, Park SJ, Lee DH, Kim HB, Han KD, Joo YH. Sex Differences in the Prevalence of Head and Neck Cancers: A 10-Year Follow-Up Study of 10 Million Healthy People. *Cancers (Basel)*. 2022 May 20;14(10):2521. doi: 10.3390/cancers14102521. PMID: 35626129; PMCID: PMC9139445.
140. Peng Z, Liu C, Victor AR, Cao DY, Veiras LC, Bernstein EA, Khan Z, Giani JF, Cui X, Bernstein KE, Okwan-Duodu D. Tumors exploit CXCR4^{hi}CD62L^{lo} aged neutrophils to facilitate metastatic spread. *Oncoimmunology*. 2021 Jan 20;10(1):1870811. doi: 10.1080/2162402X.2020.1870811. PMID: 33537175; PMCID: PMC7833766.
141. Pignatti P, Ragnoli B, Radaeli A, Moscato G, Malerba M. Age-related increase of airway neutrophils in older healthy nonsmoking subjects. *Rejuvenation Res*. 2011 Aug;14(4):365-70. doi: 10.1089/rej.2010.1150. Epub 2011 May 19. PMID: 21595513.

142. Pilling D, Consalvo KM, Kirolos SA, Gomer RH. Differences between human male and female neutrophils in mRNA, translation efficiency, protein, and phosphoprotein profiles. *Res Sq [Preprint]*. 2024 Apr 23;rs.3.rs-4284171. doi: 10.21203/rs.3.rs-4284171/v1. Update in: *Proteomics*. 2025 Feb 12:e202400232. doi: 10.1002/pmic.202400232. PMID: 38746380; PMCID: PMC11092807.
143. Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2010 Dec 15;185(12):7413-25. doi: 10.4049/jimmunol.1000675. Epub 2010 Nov 22. PMID: 21098229.
144. Pulte D, Brenner H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist*. 2010;15(9):994-1001. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0289. Epub 2010 Aug 26. PMID: 20798198; PMCID: PMC3228039.
145. Quail DF, Amulic B, Aziz M, Barnes BJ, Eruslanov E, Fridlender ZG, Goodridge HS, Granot Z, Hidalgo A, Huttenlocher A, Kaplan MJ, Malanchi I, Merghoub T, Meylan E, Mittal V, Pittet MJ, Rubio-Ponce A, Udalova IA, van den Berg TK, Wagner DD, Wang P, Zychlinsky A, de Visser KE, Egeblad M, Kubes P. Neutrophil phenotypes and functions in cancer: A consensus statement. *J Exp Med*. 2022 Jun 6;219(6):e20220011. doi: 10.1084/jem.20220011. Epub 2022 May 6. PMID: 35522219; PMCID: PMC9086501.
146. Rahman I, Collado Sánchez A, Davies J, Rzeniewicz K, Abukscem S, Joachim J, Hoskins Green HL, Killock D, Sanz MJ, Charras G, Parsons M, Ivetic A. L-selectin regulates human neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci*. 2021 Feb 8;134(3):jcs250340. doi: 10.1242/jcs.250340. Erratum in: *J Cell Sci*. 2022 Oct 15;135(20): PMID: 33408247; PMCID: PMC7888707.
147. Rankin SM. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol*. 2010 Aug;88(2):241-51. doi: 10.1189/jlb.0210112. Epub 2010 May 18. PMID: 20483920.
148. Reyes-Gibby CC, Anderson KO, Merriman KW, Todd KH, Shete SS, Hanna EY. Survival patterns in squamous cell carcinoma of the head and neck: pain as an independent prognostic factor for survival. *J Pain*. 2014 Oct;15(10):1015-22. doi: 10.1016/j.jpain.2014.07.003. Epub 2014 Jul 17. PMID: 25043982; PMCID: PMC4418559.
149. Remijnsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, Noppen S, Delforge M, Willems J, Vandenabeele P. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res*. 2011 Feb;21(2):290-304. doi: 10.1038/cr.2010.150. Epub 2010 Nov 9. PMID: 21060338; PMCID: PMC3193439.
150. Riders A, Oberste M, Abbaspour B, Beule A, Rudack C. Prognosefaktoren für das Gesamtüberleben bei Oropharynxkarzinomen in Abhängigkeit vom HPV-Status [Prognostic factors for overall survival in oropharyngeal carcinoma depending on HPV status]. *HNO*. 2022 Feb;70(2):102-109. German. doi: 10.1007/s00106-021-01076-3. Epub 2021 Jun 25. PMID: 34170339; PMCID: PMC8229264.

151. Rouwendal GJ, van der Lee MM, Meyer S, Reiding KR, Schouten J, de Roo G, Egging DF, Leusen JH, Boross P, Wuhrer M, Verheijden GF, Dokter WH, Timmers M, Ubink R. A comparison of anti-HER2 IgA and IgG1 *in vivo* efficacy is facilitated by high N-glycan sialylation of the IgA. *MAbs*. 2016;8(1):74-86. doi: 10.1080/19420862.2015.1102812. Epub 2015 Oct 6. PMID: 26440530; PMCID: PMC4966520.
152. Ruppin H, Bar-Meir S, Soergel KH, Wood CM, Schmitt MG Jr. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology*. 1980 Jun;78(6):1500-7. PMID: 6768637.
153. Sapey E, Greenwood H, Walton G, Mann E, Love A, Aaronson N, Insall RH, Stockley RA, Lord JM. Phosphoinositide 3-kinase inhibition restores neutrophil accuracy in the elderly: toward targeted treatments for immunosenescence. *Blood*. 2014 Jan 9;123(2):239-48. doi: 10.1182/blood-2013-08-519520. Epub 2013 Nov 4. PMID: 24191150; PMCID: PMC3888290.
154. Saraswathula A, Chen MM, Colevas AD, Divi V. Assessing Care Value for Older Patients Receiving Radiotherapy With or Without Cisplatin or Cetuximab for Locoregionally Advanced Head and Neck Cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019 Dec 1;145(12):1160-1167. doi: 10.1001/jamaoto.2019.2381. PMID: 31621810; PMCID: PMC6802372.
155. Scapini P, Bazzoni F, Cassatella MA. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils. *Immunol Lett*. 2008 Feb 15;116(1):1-6. doi: 10.1016/j.imlet.2007.11.009. Epub 2007 Dec 7. PMID: 18155301.
156. Schaidt H, Oka M, Bogenrieder T, Nesbit M, Satyamoorthy K, Berking C, Matsushima K, Herlyn M. Differential response of primary and metastatic melanomas to neutrophils attracted by IL-8. *Int J Cancer*. 2003 Jan 20;103(3):335-43. doi: 10.1002/ijc.10775. PMID: 12471616.
157. Schneider-Merck T, Lammerts van Bueren JJ, Berger S, Rossen K, van Berkel PH, Derer S, Beyer T, Lohse S, Bleeker WK, Peipp M, Parren PW, van de Winkel JG, Valerius T, Dechant M. Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol*. 2010 Jan 1;184(1):512-20. doi: 10.4049/jimmunol.0900847. Epub 2009 Nov 30. PMID: 19949082.
158. Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S41-52. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046. PMID: 20176268; PMCID: PMC3670108.
159. Sheflin AM, Whitney AK, Weir TL. Cancer-promoting effects of microbial dysbiosis. *Curr Oncol Rep*. 2014 Oct;16(10):406. doi: 10.1007/s11912-014-0406-0. PMID: 25123079; PMCID: PMC4180221.
160. Silbernagl S, Pape HC, Kurtz A (2023) *Physiologie*. Zehnte Edition. Stuttgart.
161. Sinha S, Lin G, Ferenczi K. The skin microbiome and the gut-skin axis. *Clin Dermatol*. 2021 Sep-Oct;39(5):829-839. doi: 10.1016/j.clindermatol.2021.08.021. Epub 2021 Sep 3. PMID: 34785010.

162. Spriel AB, Leusen JH, van Egmond M, Dijkman HB, Assmann KJ, Mayadas TN, van de Winkel JG. Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood*. 2001 Apr 15;97(8):2478-86. doi: 10.1182/blood.v97.8.2478. PMID: 11290613.
163. Stanton KJ, Frewin MB, Gudewicz PW. Heterologous desensitization of IL-8-mediated chemotaxis in human neutrophils by a cell-binding fragment of fibronectin. *J Leukoc Biol*. 1999 Apr;65(4):515-22. doi: 10.1002/jlb.65.4.515. PMID: 10204581.
164. Stark MA, Huo Y, Burcin TL, Morris MA, Olson TS, Ley K. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*. 2005 Mar;22(3):285-94. doi: 10.1016/j.immuni.2005.01.011. PMID: 15780986.
165. Starska-Kowarska K. The Role of Different Immunocompetent Cell Populations in the Pathogenesis of Head and Neck Cancer-Regulatory Mechanisms of Pro- and Anti-Cancer Activity and Their Impact on Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2023 Mar 7;15(6):1642. doi: 10.3390/cancers15061642. PMID: 36980527; PMCID: PMC10046400.
166. Soehnlein O, Weber C, Lindbom L. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol*. 2009 Nov;30(11):538-46. doi: 10.1016/j.it.2009.06.006. Epub 2009 Aug 21. PMID: 19699683.
167. Steffen U, Koeleman CA, Sokolova MV, Bang H, Kleyer A, Rech J, Unterweger H, Schicht M, Garreis F, Hahn J, Andes FT, Hartmann F, Hahn M, Mahajan A, Paulsen F, Hoffmann M, Lochnit G, Muñoz LE, Wuhler M, Falck D, Herrmann M, Schett G. IgA subclasses have different effector functions associated with distinct glycosylation profiles. *Nat Commun*. 2020 Jan 8;11(1):120. doi: 10.1038/s41467-019-13992-8. PMID: 31913287; PMCID: PMC6949214.
168. Stephan JK, Knerr T, Wells CK, Gu Z, Johnson S, Jobe TK, Isaacs WS, Hill BG, Wysoczynski M. G-CSF-Induced Emergency Granulopoiesis Modulates Neutrophil Effector Function in Mice. *Stem Cell Rev Rep*. 2025 May;21(4):1113-1126. doi: 10.1007/s12015-025-10885-w. Epub 2025 Apr 29. PMID: 40299198.
169. Sun B, Qin W, Song M, Liu L, Yu Y, Qi X, Sun H. Neutrophil Suppresses Tumor Cell Proliferation via Fas /Fas Ligand Pathway Mediated Cell Cycle Arrested. *Int J Biol Sci*. 2018 Nov 28;14(14):2103-2113. doi: 10.7150/ijbs.29297. PMID: 30585273; PMCID: PMC6299367.
170. Sun Z, Sun X, Chen Z, Du J, Wu Y. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Risk Factors, Molecular Alterations, Immunology and Peptide Vaccines. *Int J Pept Res Ther*. 2022;28(1):19. doi: 10.1007/s10989-021-10334-5. Epub 2021 Dec 8. PMID: 34903958; PMCID: PMC8653808.
171. Tada T, Yamamura S, Kuwano Y, Abo T. Level of myelopoiesis in the bone marrow is influenced by intestinal flora. *Cell Immunol*. 1996 Oct 10;173(1):155-61. doi: 10.1006/cimm.1996.0261. PMID: 8871611.
172. Tan BH, Meinken C, Bastian M, Bruns H, Legaspi A, Ochoa MT, Krutzik SR, Bloom BR, Ganz T, Modlin RL, Stenger S. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol*. 2006 Aug 1;177(3):1864-71. doi:

10.4049/jimmunol.177.3.1864. Erratum in: J Immunol. 2008 Jan 1;180(1):664. PMID: 16849498.

173. Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, McCabe F, Millar H, Rafferty P, Bugelski P, Yan L. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases. *Cancer Res.* 2005 Apr 15;65(8):3193-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3605. PMID: 15833850.

174. Tay SH, Celhar T, Fairhurst AM. Low-Density Neutrophils in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2020 Oct;72(10):1587-1595. doi: 10.1002/art.41395. Epub 2020 Aug 26. PMID: 32524751; PMCID: PMC7590095.

175. Tanji-Matsuba K, van Eeden SF, Saito Y, Okazawa M, Klut ME, Hayashi S, Hogg JC. Functional changes in aging polymorphonuclear leukocytes. *Circulation.* 1998 Jan 6-13;97(1):91-8. doi: 10.1161/01.cir.97.1.91. PMID: 9443436.

176. Thomann M, Schlothauer T, Dashivets T, Malik S, Avenal C, Bulau P, Rüger P, Reusch D. *In vitro* glycoengineering of IgG1 and its effect on Fc receptor binding and ADCC activity. *PLoS One.* 2015 Aug 12;10(8):e0134949. doi: 10.1371/journal.pone.0134949. PMID: 26266936; PMCID: PMC4534130.

177. Toyoda T, Tsukamoto T, Yamamoto M, Ban H, Saito N, Takasu S, Shi L, Saito A, Ito S, Yamamura Y, Nishikawa A, Ogawa K, Tanaka T, Tatematsu M. Gene expression analysis of a *Helicobacter pylori*-infected and high-salt diet-treated mouse gastric tumor model: identification of CD177 as a novel prognostic factor in patients with gastric cancer. *BMC Gastroenterol.* 2013 Jul 30;13:122. doi: 10.1186/1471-230X-13-122. PMID: 23899160; PMCID: PMC3734037.

178. Treffers LW, van Houdt M, Bruggeman CW, Heineke MH, Zhao XW, van der Heijden J, Nagelkerke SQ, Verkuijden PJH, Geissler J, Lissenberg-Thunnissen S, Valerius T, Peipp M, Franke K, van Bruggen R, Kuijpers TW, van Egmond M, Vidarsson G, Matlung HL, van den Berg TK. FcγRIIIb Restricts Antibody-Dependent Destruction of Cancer Cells by Human Neutrophils. *Front Immunol.* 2019 Jan 30;9:3124. doi: 10.3389/fimmu.2018.03124. PMID: 30761158; PMCID: PMC6363688.

179. Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, Gholaman H, Gu X, Bankfalvi A, Scherag A, Hütte J, Dominas N, Lehnerdt GF, Hoffmann TK, Lang S, Brandau S. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer.* 2011 Nov 1;129(9):2183-93. doi: 10.1002/ijc.25892. Epub 2011 Mar 29. PMID: 21190185.

180. Tsang CM, Lui VWY, Bruce JP, Pugh TJ, Lo KW. Translational genomics of nasopharyngeal cancer. *Semin Cancer Biol.* 2020 Apr;61:84-100. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.006. Epub 2019 Sep 12. PMID: 31521748.

181. Uhl B, Vadlau Y, Zuchtriegel G, Nekolla K, Sharaf K, Gaertner F, Massberg S, Krombach F, Reichel CA. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood.* 2016 Nov 10;128(19):2327-2337. doi: 10.1182/blood-2016-05-718999. Epub 2016 Sep 8. PMID: 27609642; PMCID: PMC5122310.

182. Ustyanovska Avtenyuk N, Visser N, Bremer E, Wiersma VR. The Neutrophil: The Underdog That Packs a Punch in the Fight against Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 22;21(21):7820. doi: 10.3390/ijms21217820. PMID: 33105656; PMCID: PMC7659937.
183. Valcenko A, Zwick A, Schneider L, Linxweiler M, Lohse S. The tumor cell killing capacity of head and neck cancer patient-derived neutrophils depends on tumor stage, gender and the antibody isotype. *Oral Oncol.* 2024 Sep 21;159:107042. doi: 10.1016/j.oraloncology.2024.107042. Epub ahead of print. PMID: 39306937.
Copy
184. Van Avondt K, Strecker JK, Tulotta C, Minnerup J, Schulz C, Soehnlein O. Neutrophils in aging and aging-related pathologies. *Immunol Rev.* 2023 Mar;314(1):357-375. doi: 10.1111/imr.13153. Epub 2022 Oct 31. PMID: 36315403.
185. van der Steen L, Tuk CW, Bakema JE, Kooij G, Reijerkerk A, Vidarsson G, et al. Immunoglobulin A: Fc(alpha)RI interactions induce neutrophil migration through release of leukotriene B4. *Gastroenterology* 2009;137(2018–2029):e2011–3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.06.047>.
186. van Egmond M, Damen CA, van Spriel AB, Vidarsson G, van Garderen E, van de Winkel JG. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol.* 2001 Apr;22(4):205-11. doi: 10.1016/s1471-4906(01)01873-7. PMID: 11274926.
187. van Tetering G, Evers M, Chan C, Stip M, Leusen J. Fc Engineering Strategies to Advance IgA Antibodies as Therapeutic Agents. *Antibodies (Basel).* 2020 Dec 15;9(4):70. doi: 10.3390/antib9040070. PMID: 33333967; PMCID: PMC7768499.
188. Vermorken JB, Stöhlmacher-Williams J, Davidenko I, Licitra L, Winquist E, Villanueva C, Foa P, Rottey S, Skladowski K, Tahara M, Pai VR, Faivre S, Blajman CR, Forastiere AA, Stein BN, Oliner KS, Pan Z, Bach BA; SPECTRUM investigators. Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): an open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2013 Jul;14(8):697-710. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70181-5. Epub 2013 Jun 6. PMID: 23746666.
189. Wadehn H, Raluy LP, Kolman J, Duecker C, Trochimiuk M, Appl B, Boettcher M, Reinshagen K, Trah J. Time- and dose-dependent inhibition of neutrophil extracellular trap formation by blocking of the interleukin-1 receptor. *Cent Eur J Immunol.* 2021;46(4):419-426. doi: 10.5114/ceji.2021.111493. Epub 2021 Dec 12. PMID: 35125939; PMCID: PMC8808312.
190. Waldman AD, Fritz JM, Lenardo MJ. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol.* 2020 Nov;20(11):651-668. doi: 10.1038/s41577-020-0306-5. Epub 2020 May 20. PMID: 32433532; PMCID: PMC7238960.
191. Wang CH, Dai JY, Wang L, Jia JF, Zheng ZH, Ding J, Chen ZN, Zhu P. Expression of CD147 (EMMPRIN) on neutrophils in rheumatoid arthritis enhances chemotaxis, matrix metalloproteinase production and invasiveness of synoviocytes. *J Cell Mol Med.* 2011 Apr;15(4):850-60. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01084.x. PMID: 20455995; PMCID: PMC3922672.

192. Walters DK, Arendt BK, Jelinek DF. CD147 regulates the expression of MCT1 and lactate export in multiple myeloma cells. *Cell Cycle*. 2013 Oct 1;12(19):3175-83. doi: 10.4161/cc.26193. Epub 2013 Sep 3. PMID: 24013424; PMCID: PMC3865013.
193. White RA, Malkoski SP, Wang XJ. TGF β signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 2010 Oct 7;29(40):5437-46. doi: 10.1038/onc.2010.306. Epub 2010 Aug 2. PMID: 20676130; PMCID: PMC3942159.
194. Wojtukiewicz MZ, Rek MM, Karpowicz K, Górski M, Polityńska B, Wojtukiewicz AM, Moniuszko M, Radziwon P, Tucker SC, Honn KV. Inhibitors of immune checkpoints-PD-1, PD-L1, CTLA-4-new opportunities for cancer patients and a new challenge for internists and general practitioners. *Cancer Metastasis Rev*. 2021 Sep;40(3):949-982. doi: 10.1007/s10555-021-09976-0. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34236546; PMCID: PMC8556173.
195. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*. 2014 Sep;2(9):823-30. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0112. PMID: 25187272; PMCID: PMC4155602.
196. Yan J, Kloecker G, Fleming C, Bousamra M 2nd, Hansen R, Hu X, Ding C, Cai Y, Xiang D, Donninger H, Eaton JW, Clark GJ. Human polymorphonuclear neutrophils specifically recognize and kill cancerous cells. *Oncoimmunology*. 2014 Jul 3;3(7):e950163. doi: 10.4161/15384101.2014.950163. PMID: 25610737; PMCID: PMC4292216.
197. Yang D, de la Rosa G, Tewary P, Oppenheim JJ. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol*. 2009 Nov;30(11):531-7. doi: 10.1016/j.it.2009.07.004. Epub 2009 Aug 21. PMID: 19699678; PMCID: PMC2767430.
198. Yang P, Li Y, Xie Y, Liu Y. Different Faces for Different Places: Heterogeneity of Neutrophil Phenotype and Function. *J Immunol Res*. 2019 Feb 28;2019:8016254. doi: 10.1155/2019/8016254. PMID: 30944838; PMCID: PMC6421822.
199. Yu C, Li Q, Zhang Y, Wen ZF, Dong H, Mou Y. Current status and perspective of tumor immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Aug 26;10:941750. doi: 10.3389/fcell.2022.941750. PMID: 36092724; PMCID: PMC9458968.
200. Yu Y, Wang H, Yan A, Wang H, Li X, Liu J, Li W. Pretreatment neutrophil to lymphocyte ratio in determining the prognosis of head and neck cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2018 Apr 4;18(1):383. doi: 10.1186/s12885-018-4230-z. PMID: 29618336; PMCID: PMC5885417.
201. Zhang D, Chen G, Manwani D, Mortha A, Xu C, Faith JJ, Burk RD, Kunisaki Y, Jang JE, Scheiermann C, Merad M, Frenette PS. Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature*. 2015 Sep 24;525(7570):528-32. doi: 10.1038/nature15367. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26374999; PMCID: PMC4712631.
202. Zhou C, Li J, Lin L, Shu R, Dong B, Cao D, Li Q, Wang Z. A targeted transforming growth factor-beta (TGF- β) blocker, TTB, inhibits tumor growth and metastasis. *Oncotarget*. 2018 Feb 24;9(33):23102-23113. doi: 10.18632/oncotarget.24562. PMID: 29796175; PMCID: PMC5955403.

203. Zhou X, Franklin RA, Adler M, Jacox JB, Bailis W, Shyer JA, Flavell RA, Mayo A, Alon U, Medzhitov R. Circuit Design Features of a Stable Two-Cell System. *Cell*. 2018 Feb 8;172(4):744-757.e17. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.015. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29398113; PMCID: PMC7377352.

204. Zhu X, Heng Y, Zhang D, Tang D, Zhou J, Lin H, Ma J, Ding X, Tao L, Lu L. Prognostic significance and immune escape implication of tumor-infiltrating neutrophil plasticity in human head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Cell*. 2024 May;37(3):714-728. doi: 10.1007/s13577-024-01024-7. Epub 2024 Feb 15. PMID: 38358636.

205. Zhu Y, Herndon JM, Sojka DK, Kim KW, Knolhoff BL, Zuo C, Cullinan DR, Luo J, Bearden AR, Lavine KJ, Yokoyama WM, Hawkins WG, Fields RC, Randolph GJ, DeNardo DG. Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity*. 2017 Aug 15;47(2):323-338.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.07.014. Erratum in: *Immunity*. 2017 Sep 19;47(3):597. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.018. PMID: 28813661; PMCID: PMC5578409.

206. Zielinski V, Brunner M, Heiduschka G, Schneider S, Seemann R, Erovic B, Thurnher D. ADAM8 in squamous cell carcinoma of the head and neck: a retrospective study. *BMC Cancer*. 2012 Feb 27;12:76. doi: 10.1186/1471-2407-12-76. PMID: 22369429; PMCID: PMC3305604.

207. Zou S, Fang L, Lee MH. Dysbiosis of gut microbiota in promoting the development of colorectal cancer. *Gastroenterol Rep (Oxf)*. 2018 Feb;6(1):1-12. doi: 10.1093/gastro/gox031. Epub 2017 Oct 11. PMID: 29479437; PMCID: PMC5806407.

208. Zwick A, Braun FL, Weber LJ, Linder M, Linxweiler M, Lohse S. Engineering Dimeric EGFR-directed IgA Antibodies Reveals a Central Role of CD147 during Neutrophil-mediated Tumor Cell Killing of Head and Neck Squamous Cancer Cells. *J Immunol*. 2024 Jul 15;213(2):148-160. doi: 10.4049/jimmunol.2300544. PMID: 38787053.

7. Dank

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Maximilian Linxweiler bedanken für die Möglichkeit, bei Ihm als meinem Doktorvater zu promovieren.

Ich bedanke mich zudem bei PD Dr. rer. nat. Stefan Lohse. Ohne ihn wäre diese Arbeit wohl nicht zustandegekommen. Er hat mich stets unterstützt und ich konnte mich immer an ihn wenden, egal womit. Außerdem ist er derjenige, der mit seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit durch die Entwicklung des IgA2.0 überhaupt erst möglich gemacht hat.

Ich bedanke mich beim Institut für Virologie für die Möglichkeit, bei Ihnen im Haus meine Experimente zu absolvieren.

Zudem bedanke ich mich bei Rico und Felix sowie Islam und Anabel, Katrin, Phillip und Barbara für die Einarbeitung und Betreuung und schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, allem voran bei meiner Mutter und meinem Bruder, aber auch bei meinen Großeltern, meinem Onkel sowie seiner Frau, sowie meinen beiden Cousins, die mich immer unterstützt haben.

8. Publikationen

- Valcenko A, Zwick A, Schneider L, Linxweiler M, Lohse S. The tumor cell killing capacity of head and neck cancer patient-derived neutrophils depends on tumor stage, gender and the antibody isotype. Oral Oncol. 2024 Dec;159:107042. doi: 10.1016/j.oraloncology.2024.107042. Epub 2024 Sep 21. PMID: 39306937.
- Teilnahme mit Vortrag zum Thema "The tumor cell killing capacity of head and neck cancer patient-derived neutrophils depends on tumor stage, gender and the antibody isotype (Permanent-ID 68)" an der 96. Jahrestagung der DGHNO-KHC e.V. in Frankfurt vom 28.05.2025 bis zum 31.05.2025

9. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Kolloquiumsvermerk:

Tag der Promotion: 24.06.2026

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Maximilian Linxweiler

Prof. Dr. med. Sigrun Smola