Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Professor Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. M. Reincke

Immuntherapie von Tumoren mit den Pattern-Recognition-Rezeptor-Liganden CpG und poly(I:C) hemmt die Funktion myeloischer Suppressorzellen

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilans-Universität

zu München

vorgelegt von

Philipp Max Bittner

aus Erlangen

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. med. S. Endres
Mitberichterstatter:	Professor Dr. rer. nat. W. Zimmermann
	Professor Dr. rer. nat. H. Schmetzer
Promovierte Mitbetreuerinnen:	Professor Dr. med. Dr. rer. nat. C. Bourquin
	Dr. rer. nat. C. Zoglmeier
Dekan:	Professor Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Mündliche Prüfung:	15.11.2012

Meinem

Großvater

Franz Xaver Eller
(1929 – 2009)

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

1.1. Geschichte und Prinzipien der immunologischen Therapie 1
1.1.1. Immuntherapie zur Behandlung von Infektionskrankheiten 1
1.1.2. Entwicklung immunologischer Ansätze für die Therapie von Tumorerkrankungen 1
1.1.3. Behinderung der Immuntherapie durch tumorale Escape-Mechanismen 2

1.2. Therapeutische Nutzung des angeborenen Immunsystems durch Stimulation von Pattern-Recognition-Rezeptoren 3
1.2.1. Stimulation von *Toll-like*-Rezeptoren als therapeutischer Ansatz 4
1.2.2. Stimulation intrazellulärer RIG-I-verwandter Rezeptoren als therapeutischer Ansatz 8

1.3. Eigenschaften, Vorkommen und therapeutische Nutzung myeloischer Suppressorzellen (MDSCs) 10
1.3.1. Definition von MDSCs über Phänotyp und Funktion 10
1.3.2. Expansion und Aktivierung von MDSCs als Folge pathophysiologischer Prozesse 11
1.3.3. Mechanismen der T-Zell-Hemmung im Rahmen der MDSC-vermittelten Immunsuppression 12

2. ZIEL DER VORLIEGENDEN DISSERTATION 14

3. MATERIAL UND METHODEN 15

3.1. Material 15
3.1.1. Geräte 15
3.1.2. Chemikalien und Reagenzien 15
3.1.3. Puffer und Lösungen 17

3.2. Zellulär-immunologische Methoden 18
3.2.1. Zellkultur 18
3.2.2. C26-Zellkultivierung 18
3.2.3. Durchflusszytometrie (FACS) 19
3.2.4. Magnetische Zellseparation (MACS) 21
3.2.5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 23
3.2.6. BrdU-Proliferationsassay 25

3.3. Tierversuche 26
3.3.1. Ethische und gesetzliche Grundlagen 26

3.3.2. Subkutanes C26-Tumormodell und Tumortherapie 27
3.4. Statistische Analyse und Darstellung.....28

4. ERGEBNISSE 29

4.1. Expansion der MDSC-Subpopulationen im C26-Tumormodell 29
4.1.1. Nachweis von PMN-MDSC und MO-MDSCs im C26-Tumormodell.....29
4.1.2. Expansion beider MDSC-Subpopulationen nach C26-Tumorinduktion 31

4.2. Verstärkte Immunsuppressivität der MDSC-Subpopulationen im C26-Tumormodell 32
4.2.1. Entwicklung eines dreischrittigen MACS-Protokolls zur Isolation von PMN-MDSCs und MO-MDSCs aus Splenozyten.....32
4.2.2. Etablierung von Suppressionsassays zum Nachweis der suppressiven Funktion der MDSC-Subpopulationen.....35
4.2.3. Stärkere Suppression von T-Zellen durch PMN-iMCs als durch MO-iMCs.....38
4.2.4. Verstärkung der hemmenden Funktion der MDSC-Subpopulationen durch C26-Tumorinduktion.....41
4.2.5. Stärkere Hemmung durch PMN-MDSCs als durch MO-MDSCs 44

4.3. Hemmender Effekt der Immuntherapie auf die suppressive Funktion der MDSC-Subpopulationen.....46
4.3.1. Experimenteller Ansatz zur Untersuchung der Immuntherapie 46
4.3.2. Rückgang des C26-Tumorwachstum unter PRR-Therapie 48
4.3.3. Einschränkung der hemmenden Funktion von PMN-MDSCs und MO-MDSCs durch Immuntherapie 49

5. DISKUSSION 55

5.1. Unterscheidung der Subpopulationen der PMN-MDSCs und MO-MDSCs 55
5.1.1. Differenzierte Betrachtung der MDSC-Subpopulationen als Voraussetzung einer gezielteren Tumortherapie.....55
5.1.2. Problem der Unterteilung der MDSCs an Hand von Oberflächenmarkern.....55
5.1.3. Vorteile der Einteilung von MDSCs in die Subpopulationen der PMN-MDSCs und MO-MDSCs.....57
5.1.4. Aufreinigungsvarianten als möglicher Grund für abweichende Angaben zur Suppressivität der MDSC-Subpopulationen.....59

5.2. Verringerte Immunsuppressivität der MDSC-Subpopulationen durch Therapie mit CpG und poly(I:C).....61

5.2.1. MDSC-Subpopulationen als möglicher Teil des Funktionsmechanismus der antitumoralen PRR-Therapie 61

5.2.2. Möglicher Einfluss unterschiedlicher Therapieschemata auf die Immunsuppressivität der MDSC-Subpopulationen 63

5.3. MDSCs als Ansatzpunkt einer verbesserten Immuntherapie von Tumorerkrankungen 64

5.4. Einordnung und Bewertung der Ergebnisse 66

6. ZUSAMMENFASSUNG 67

7. LITERATURVERZEICHNIS 68

8. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME 83

9. DANKSAGUNG 86

10. VERÖFFENTLICHUNGEN 87

11. LEBENSLAUF 88

1. Einleitung

1.1. Geschichte und Prinzipien der immunologischen Therapie

1.1.1. Immuntherapie zur Behandlung von Infektionskrankheiten

Die antiinfektiöse Immuntherapie blickt auf eine über zweihundertjährige Geschichte zurück. Der mutige Versuch des britischen Arztes EDWARD JENNER aus dem Jahr 1796 gilt als ihre Geburtsstunde. JENNER erkannte, dass Patienten, die eine Erkrankung an den für den Menschen harmlosen Kuhpocken erlitten, meist nicht an den weitaus gefährlicheren Pocken (Variola) erkrankten. Folgerichtig unternahm er die Inokulation von infektiösem Material aus Kuhpockenpusteln an Versuchspersonen, die im weiteren Verlauf tatsächlich von Variola verschont blieben. JENNER ermöglichte dem Immunsystem, einen lang andauernden Schutz gegen den Erreger der Kuhpockenpusteln (*Orthopoxvirus vaccinia*) zu etablieren, der kreuzreaktiv auch gegen den Erreger der Variola (*Orthopoxvirus variola*) wirksam war (Riedel 2005; Davies 2007). Diesem Vorgehen, das noch heute die Grundlage jeder aktiven Immunisierung (Impfung) bildet, steht im Rahmen der klinischen Immuntherapie die passive Immunisierung zur Seite. Sie basiert auf dem Prinzip, das Immunsystem eines erkrankten Patienten durch die Gabe von spezifischen Antikörpern und anderen Bestandteilen des Immunsystems kurzfristig zu unterstützen. Die aktive Immunisierung ermöglicht hingegen ein präventives Vorgehen gegenüber Krankheiten, die vormals oft nur symptomatisch behandelt werden konnten. Der Erfolg der aktiven Immunisierung gipfelte nach von der WHO (World Health Organization) weltweit durchgeführten langjährigen Impfkampagnen in der Ausrottung der Pocken (letzter beschriebener Fall 1977 in Somalia) (Breman et al. 1980; Bhattacharya 2008). Auch gegenüber Masern und Poliomyelitis verfolgt die WHO dieses ambitionierte Ziel (Kew et al. 2005; Moss 2009). Impfstoffe gegen Erreger wie HIV (humanes Immundefizienz-Virus) und Plasmodien (Malaria) sind hingegen noch immer ein Desiderat (Appay 2009; Todryk et al. 2009).

1.1.2. Entwicklung immunologischer Ansätze für die Therapie von Tumorerkrankungen

Basierend auf dem Erfolg der Immuntherapie bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten stellte sich die Frage, ob sie auch in der Behandlung von Tumoren wirksam ist. Erneut diente ein physiologischer Vorgang als Inspiration für einen therapeutischen Ansatz: Ende des 19. Jahrhunderts beobachtete WILLIAM COLEY, dass sich das Sarkom eines Patienten im Bereich einer bakteriellen Entzündung zurückbildete. Mit der Gabe von bakteriellen Lysaten führte er

daraufhin im Jahr 1891 die erste gegen einen Tumor gerichtete Immuntherapie durch (Coley 1991; Bickels et al. 2002). Sie wies befriedigende Resultate auf, konnte jedoch von anderen Medizinern kaum reproduziert werden. Auch aufgrund der aufkommenden und sehr effektiven antitumoralen Strahlentherapie fand die Arbeit COLEYS nicht die verdiente Beachtung. Dies trifft ebenso auf die von PAUL EHRLICH schon früh formulierten Überlegungen zur Verwendung spezifischer Antiseren gegenüber maligne entartete Zellen zu (Schwartz 2004).

Erst in den achtziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts geriet die immmunologische Therapie von Tumorerkrankungen in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Ursache war die Beschreibung eines immuntherapeutischen Ansatzes für die Behandlung des Urothelkarzinoms der Blase. Hierbei wurde das traditionell als Tuberkulose-Impfstoff verwendete BCG (Bacillus Calmette-Guérin) intravesikal installiert, was eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes bewirkte (Morales et al. 1976). Heute wird dieses Vorgehen standardmäßig in der Patientenversorgung beim Urothelkarzinom der Blase angewandt (De Jager et al. 1991; Williams et al. 2010). Die Verwendung von BCG demonstriert das Prinzip einer Steigerung der Immunantwort gegenüber entartetem Tumorgewebe durch die Aktivierung von angeborenem und erworbenem Immunsystems mit Hilfe von Pathogenen oder ihren Bestandteilen (Bergman 2009). Eine erfolgreiche immunologische Tumortherapie erfolgt in diesem Fall unabhängig vom Einsatz von Tumorantigenen. Präklinische Studien haben gezeigt, dass dieser Wirkmechanismus ein erhebliches therapeutisches Potential für diverse weitere Tumoren aufweist (Blattman et al. 2004).

1.1.3. Behinderung der Immuntherapie durch tumorale Escape-Mechanismen

Der Wirksamkeit der antitumoralen Immuntherapie steht die Fähigkeit von Tumorzellen entgegen, sich dem Zugriff immunologischer Prozesse zu entziehen (Sadun et al. 2007; Bronte et al. 2009). Die sogenannten tumoralen Escape-Mechanismen basieren auf dem Umstand, dass Tumoren den zellulären und humoralen Aufbau umliegenden Gewebes im Sinne einer verminderten immunologischen Tumorabwehr beeinflussen können. Zwar ist auch ein vermehrtes Auftreten immunologischer Effektorzellen in der Tumorumgebung zu beobachten. Diese sind jedoch in Reaktion auf vom Tumor ausgehende Signale in ihrer Wirksamkeit meist eingeschränkt (Whiteside 2009).

Die Rekrutierung immunsuppressiver Zellen wie regulatorische T-Zellen (T_{regs}) (Elkord et al. 2010) und regulatorische DCs (dendritischen Zellen) (Norian et al. 2009) in die

Tumorumgebung stellt einen wichtigen Bestandteil des tumoralen Escapes dar. Über die immunsuppressiven Eigenschaften dieser Zellen bewirkt der Tumor eine indirekte Hemmung der Immunantwort (Gabrilovich 2004; Linehan et al. 2005). Auch myeloische Suppressorzellen (MDSCs) werden durch Tumoren rekrutiert und stellen aufgrund ihrer immunsuppressiven Aktivität einen Bestandteil des tumoralen Escapes dar (Finke et al. 2011; Ostrand-Rosenberg et al. 2012).

Die immunsuppressive Wirkung von in der Tumorumgebung verstärkt sezernierten löslichen Faktoren wie TGF β (tumor growth factor β) und VEGF (vascular endothelial growth factor) ist ebenfalls Bestandteil des tumoralen Escapes. Diese Faktoren stammen direkt aus den Tumorzellen oder aus tumorinfiltrierenden Zellen wie Granulozyten (Gabrilovich et al. 1999; Li et al. 2006). Auch Enzyme, beispielsweise die in verschiedenen Tumorzellen stark exprimierte Cyclooxygenase-2 (COX-2), spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der tumorinduzierten Immunsuppression. Im Falle von COX-2 erfolgt über das Reaktionsprodukt PGE_2 (Prostaglandin E_2) eine verstärkte Aktivierung von T_{regs} (Baratelli et al. 2005). Der Stoffwechsel der Tumorzellen selbst kann der Tumorumgebung wichtige Bauteile immunologischer Effektorzellen entziehen (Singer et al. 2011).

Unabhängig von den verschiedenen Wirkweisen ist das tumorale Escape dafür verantwortlich, dass sich Tumoren im Organismus etablieren können, ohne in einem frühen Stadium durch das Immunsystem unschädlich gemacht zu werden. Auf dem Weg hin zu einer klinisch anwendbaren immunologischen Tumortherapie ist eine Überwindung der tumoralen Escape-Mechanismen somit ein zwingend notwendiger Schritt, wobei ihre Vielfältigkeit verschiedene Angriffspunkte offeriert (Stewart et al. 2011).

1.2. Therapeutische Nutzung des angeborenen Immunsystems durch Stimulation von Pattern-Recognition-Rezeptoren

Grundlegend wird zwischen einem phylogenetisch älteren, angeborenen Immunsystem und einem phylogenetisch jüngeren, erworbenen Immunsystem unterschieden, die sich in ihrer Funktion jedoch ergänzen. Das erworbene Immunsystem baut nach dem Kontakt mit fremden Antigenen eine komplexe antigenspezifische Immunantwort auf. Dies geschieht vor allem mit Hilfe von T-Zellen und B-Zellen, deren Rezeptoren (T-Zellrezeptor bzw. Antikörper) eine enorme Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Antigenstrukturen entwickeln können. Die Komplexität der Anpassung an das spezifische Antigen limitiert jedoch die Geschwindigkeit der Reaktion des erworbenen Immunsystems.

Das angeborene Immunsystem zeichnet sich hingegen durch eine schnelle Abwehrreaktion auf eine Vielzahl unterschiedlicher Reize aus, die charakteristisch für das Eindringen von Erregern sind. Die Zellen des angeborenen Immunsystems (v.a. DCs, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen) erkennen sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs). Diese umfassen eine sehr vielfältige Gruppe von Strukturen, die in der Regel eine essentielle Bedeutung für den Erreger aufweisen und deshalb phylogenetisch konserviert sind (Mogensen 2009). Wichtige PAMPs sind unter anderem Lipopolysaccharid (Gram-negative Keime), Lipoteichonsäure (Gram-positive Keime), bestimmte Peptide (z.B. Flagellin-Protein von Bakterien) oder spezielle Nukleinsäure-Varianten (z.B. dsRNA (doppelsträngige Ribonukleinsäure)). PAMPs werden im Rahmen der angeborenen Immunität durch verschiedene Rezeptoren (Pattern-Recognition-Rezeptoren; PRRs) gebunden, zu denen u.a. die Familien der Scavenger-Rezeptoren, *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) oder RIG-I-verwandten Moleküle (retinoic acid-inducible protein I) gehören (Gordon 2002; Areschoug et al. 2008).

1.2.1. Stimulation von *Toll-like*-Rezeptoren als therapeutischer Ansatz

Die Familie der *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) spielt im Rahmen der angeborenen Immunität eine entscheidende Rolle als Pattern-Recognition-Rezeptor (Takeda et al. 2003; Pasare et al. 2004). In Menschen und Mäusen wurden bisher 13 verschiedene Mitglieder dieser Familie nachgewiesen, die in Tab. 1 in der Übersicht dargestellt sind. TLRs erkennen als PAMP definierte Strukturen, die typisch für verschiedene Krankheitserreger sind (Viren, Bakterien, Protozoen). Die Bindung eines Liganden an einen *Toll-like*-Rezeptor führt hauptsächlich über das Adaptorprotein MyD88 zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB und zur Initiierung einer proinflammatorischen Signalkaskade, in deren Verlauf neben dem angeborenen auch das erworbene Immunsystem aktiviert wird (Takeda et al. 2005).

TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 erkennen verschiedene Nukleinsäure-Muster (Takeda and Akira 2005): So bindet TLR3 unter anderem dsRNA, die aus mindestens 30 Nukleotiden besteht (Alexopoulou et al. 2001), TLR7 und TLR8 hingegen erkennen virale einzelsträngige RNA (Diebold et al. 2004; Heil et al. 2004). TLR9 wiederum bindet an sogenannte CpG-Motive (Hemmi et al. 2000). Dies sind nicht-methylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide, die gehäuft in bakterieller DNA auftreten und in Wirbeltier-DNA nur äußerst selten und meist im methylierten Zustand vorkommen (Heeg et al. 2008).

Rezeptor	PAMP	therapeutische Nutzung
TLR1 + TLR2 + TLR6 (funktionelle Einheit)	Bakterielle Lipoproteine (Takeuchi et al. 1999) Zymosan (*Saccharomyces*) (Ozinsky et al. 2000) LAM (*Mycobacteriae*) (Underhill et al. 1999) MALP-2 (Mycoplasmen) (Takeuchi et al. 2000) Lipoteichonsäure (LTA) (Schwandner et al. 1999) Hämagglutinin (Masernvirus) (Bieback et al. 2002) GPI-Anker (*Trypanosoma. cruzi*) (Tarleton 2007)	Lipoprotein-basierte Vakzine (Eriksson et al. 2007)
TLR3	doppelsträngige virale RNA (Alexopoulou et al. 2001)	poly(I:C) (Matsumoto et al. 2008)
TLR4	bakterielles LPS (Poltorak et al. 1998) Protein F (RSV) (Kurt-Jones et al. 2000)	Monophosphoryl lipid A (Cluff 2010) Uromodulin (Ishii et al. 2006)
TLR5	Bakterielles Flagellin (Hayashi et al. 2001)	PEI-basierte Nanopartikel (Cubillos-Ruiz et al. 2009)
TLR7	einzelsträngige virale RNA (Diebold et al. 2004)	Synthet.Guanosinanaloga (Imiquimod, Resiquimod) (Hemmi et al. 2002)
TLR8	einzelsträngige virale RNA (Heil et al. 2004)	Synthet.Guanosinanaloga (Jurk et al. 2002) (Gorden et al. 2006)
TLR9	CpG-Motive (bakteriell o. viral) (Hemmi et al. 2000)	CpG (Krieg 2001)
TLR10 (nur human)	nicht bekannt	–
TLR11 (nur murin)	bakterielles Profilin (Zhang et al. 2004; Yarovinsky et al. 2005)	Profilin-like protein (Hedhli et al. 2009)
TLR12, TLR13 (nur murin)	nicht bekannt	–

Tabelle 1: Die Familie der *Toll-like*-Rezeptoren

Als Übersicht zusammengefasst sind die Mitglieder der TLR-Familie und ihre wichtigsten biologischen Liganden (soweit bekannt) sowie beschriebene therapeutisch genutzte Agonisten. Bei TLR10 bis TLR13 ist jeweils angegeben, ob der entsprechende Rezeptor ausschließlich im murinen oder humanen Organismus funktionell auftritt. Die im Rahmen dieser Arbeit zur Immuntherapie unter Verwendung von poly(I:C) bzw. CpG stimulierten Rezeptoren TLR3 und TLR9 sind hervorgehoben.

CpG-Motive werden im menschlichen Körper durch TLR9 exprimierende plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) und B-Zellen erkannt. Über die daraufhin erfolgende Sekretion insbesondere von Interleukin 12 (IL-12) und Interferon-α/ -β (IFNα, IFNβ) sowie die Produktion von Antikörpern kommt es zur Reifung und Proliferation verschiedener immunologischer Zelltypen (Klinman et al. 2010). Die sekretorische Aktivität dieser Zellen wiederum bildet die Grundlage einer Immunantwort, die als proinflammatorisch (IL-1, IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF)) und T_H1-basiert (IFNγ, IL-12) charakterisierbar ist (Halpern et al. 1996; Klinman et al. 1996).

TLR-Liganden besitzen ein erhebliches therapeutisches Potential. Dieses basiert auf ihrem immunstimulierenden Effekt sowohl auf das angeborene als auch auf das erworbene Immunsystem. Auf der einen Seite ist eine Begrenzung dieses Effektes bei der Therapie von Autoimmunkrankheiten, Allergien und entzündlichen Krankheiten ein gangbarer Weg. Andererseits stellt die Nutzbarmachung der immunstimulierenden Aktivität von TLRs einen Therapieansatz in der Tumortherapie, als Adjuvanz bei Impfungen und bei der Behandlung von Infektionskrankheiten dar (Gomariz et al. 2010).

Für die experimentelle Aktivierung von *Toll-like*-Rezeptoren genutzte, synthetisch erzeugte immunstimulierende Oligonukleotide führen durch die Imitation der entsprechenden PAMP zu einer analogen Immunantwort (siehe Tab. 1). Sie sind deshalb als potentielle Wirkungsträger einer zu etablierenden Immuntherapie von großem Interesse. TLR7 und TLR8 können beispielsweise durch die synthetischen Guanosinanaloga Imiquimod und Resiquimod aktiviert werden (Hemmi et al. 2002; Jurk et al. 2002).

Ein vielversprechender therapeutischer Ansatz gegenüber Tumor- und Infektionskrankheiten besteht in der Aktivierung des Immunsystems über TLR9. Als Ligand dienen hierbei CpG-Motive (Weiner et al. 1997; Weiner 2000; Jurk et al. 2007). Es werden drei Gruppen von CpG-Oligonukleotiden verwendet, die unterschiedliche aktivierende Eigenschaften besitzen (Krieg 2001; Krieg 2002). So bewirkt CpG-A analog einer Virusinfektion die Produktion großer Mengen von IFN-α und IFN–β. CpG-B hingegen ruft primär eine Aktivierung von B-

Zellen hervor, während CpG-C beide Wirkmechanismen miteinander vereint (Yi et al. 1998; Sivori et al. 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit CpG1826 ein CpG-B-Oligonukleotid zur Aktivierung von TLR9 verwendet.

CpG zeigt einen starken Effekt als Adjuvans bei Immunisierungen (Lipford et al. 1997; Miconnet et al. 2002). In einer klinischen Studie wurde CpG-B als Impfadjuvans bei der Immunisierung gesunder Probanden mit Hepatitis B Oberflächen-Antigen (HBsAg) erprobt. Bei insgesamt guter Verträglichkeit der Impfung war im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant bessere Wirkung bei Verabreichung von CpG als Adjuvans nachzuweisen (Cooper et al. 2004). Als Adjuvans einer experimentellen Malariaimpfung verwendet, zeigte CpG in einer klinischen Studie einen deutlichen Effekt, indem es die Bildung von *Plasmodium-falciparum* –spezifischen Gedächtniszellen verstärkte (Crompton et al. 2009).

CpG weist darüber hinaus ein erhebliches Potential als onkologisches Therapeutikum auf (Ballas et al. 2001). So haben therapeutische Ansätze mit CpG in Tiermodellen verschiedener Tumoren ihre Wirkung gezeigt, insbesondere bei Lymphomen (Weiner et al. 1997).

Im murinen Modell wurden bei Tieren mit soliden subkutanen C26-Kolonkarzinomen durch eine tumornahe Injektion von CpG eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems sowie eine starke tumorspezifische T-Zellantwort hervorgerufen. Dies führte in der Summe zu einer Regression der etablierten Tumore (Heckelsmiller et al. 2002). In einem weiteren experimentellen Ansatz im gleichen Mausmodell wurden, zusammen mit abgetöteten Tumorzellen als Antigenquelle, DCs geimpft. Dies führte zu einer Tumorreduktion, die allerdings in ihrer Effektivität limitiert und auf kleine etablierte Tumore beschränkt war. Bei tumornaher Koapplikation von CpG konnte die tumorspezifische T-Zellantwort jedoch deutlich verstärkt werden. Auf diese Weise war selbst eine Rückbildung großer Tumoren möglich, die sich herkömmlichen chemotherapeutischen Ansätzen entziehen (Heckelsmiller et al. 2002; Bourquin et al. 2006). Bemerkenswerterweise wurde auch eine Kombination aus CpG-basierter Immuntherapie und etablierten Chemotherapieprotokollen gut vertragen. Dies stellte eine wichtige Voraussetzung für die Initiierung klinischer Studien dar, da dadurch eine Add-on-Therapie mit etablierten Therapieformen möglich ist.

Klinische Studien zeigen einerseits erfolgsversprechende Ergebnisse. In einem klinischen Ansatz (Phase II) wurde CpG in Kombination mit einer Taxan plus Cisplatin-Chemotherapie bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom angewandt. Im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie konnte die Überlebensrate der Patienten gesteigert werden, jedoch wurden als Nebenwirkungen Neutropenie, Thrombozytopenie und Anämie beobachtet (Manegold et al. 2008). Eine Phase III-Studie, bei der CpG in Kombination mit einer Gemcitabin plus

Cisplatin-Chemotherapie verabreicht wurde, musste aufgrund des Ausmaßes dieser Nebenwirkungen abgebrochen werden (Readett et al. 2007). In einer jüngst veröffentlichten Phase I-Studie zur Therapie der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) wurde das verwendete CpG hingegen problemlos toleriert (Zent et al. 2012).

1.2.2. Stimulation intrazellulärer RIG-I-verwandter Rezeptoren als therapeutischer Ansatz

Unabhängig von *Toll-like*-Rezeptoren umfasst die angeborene Immunität die intrazelluläre Detektion einzelsträngiger viraler RNA durch die Helikase RIG-I. Konkret handelt es sich bei dem Liganden von RIG-I um eine durch virale Polymerasen erzeugte 5‘-Triphosphat-RNA (3P-RNA). 3P-RNA wird aufgrund seiner Fähigkeit zur Stimulation RIG-I-verwandter Rezeptoren auch als immunstimulierende RNA (isRNA) bezeichnet. Eukaryotische RNA unterliegt im Rahmen der posttranskriptionellen Prozessierung am 5‘-Ende zwingend einer als Capping bezeichneten Modifikation. Das Capping verhindert das Auftreten von eukaryotischer 3P-RNA im Zytoplasma (Hornung et al. 2006).

Wie Tab. 2 zu entnehmen, weisen die mit RIG-I strukturell verwandten Rezeptoren MDA-5 (melanoma differentation-associated gene 5) und LGP2 (laboratory of genetics and physiology-2) hingegen doppelsträngige virale RNA als biologische Liganden auf. (Katze et al. 1991; Kato et al. 2006). RIG-I und besonders MDA-5 spielen darüber hinaus eine Rolle bei der intrazellulären Detektion von poly(I:C) (Polyinosin-polycytidyl-Säure) (Kang et al. 2002; Yoneyama et al. 2005). Die synthetische doppelsträngige RNA poly(I:C) findet auch in experimentellen Ansätzen zur Aktivierung des extrazellulären Rezeptors TLR3 Verwendung (Fortier et al. 2004).

Unabhängig von den beschriebenen Nebenwirkungen stellt die beim Menschen im Vergleich zum murinen Modell eingeschränkte Expression von TRL9 ein Hindernis für eine erfolgreiche klinische Anwendung der TLR-Therapie mit CpG dar (Hornung et al. 2002). Deshalb ist die Suche nach alternativen therapeutischen Zielstrukturen im Kontext der angeborenen Immunität von großem Interesse.

Durch die Aktivierung von RIG-I-verwandten Rezeptoren konnte versuchsweise eine immunologische Antwort erzeugt werden, an deren Ende der apoptotische Untergang von Tumorzellen steht (Besch et al. 2009; Alonso-Curbelo et al. 2010). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass 3P-RNA als Ligand von RIG-I im murinen Tumormodell sowohl das angeborene Immunsystem über dendritische Zellen aktiviert, als auch eine antigenspezifische Antwort über die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und B-Zellen

hervorruft (Bourquin et al. 2007). Außerdem wurde festgestellt, dass isRNA eine starke antigenspezifische Antwort durch zytotoxische T-Zellen bei Infektion mit Bakterien auslöst (Hamm et al. 2007).

Rezeptor	PAMP	Effekt
RIG-I	3P-RNA (Hornung et al. 2006) poly(I:C) (Yoneyama et al. 2005)	Apoptose in Melanomazellen (Besch et al. 2009)
MDA-5	Doppelsträngige virale RNA (Kang et al. 2002) poly(I:C) (Yoneyama et al. 2005)	Apoptose in Melanomazellen (Alonso-Curbelo and Soengas 2010)
LGP2	Doppelsträngige virale RNA (Murali et al. 2008)	Unterstützung von RIG-I und MDA-5 (Satoh et al. 2010)

Tabelle 2: Die Familie der intrazellulären RIG-I-verwandten Rezeptoren

Die drei bekannten intrazellulären Rezeptoren des angeborenen Immunsystems sind mit den als zugehörig erkannten PAMP aufgeführt. Außerdem sind für die Tumorimmunologie wichtige Erkenntnisse über die Wirkung der aktivierten Rezeptoren dargestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit zur Immuntherapie unter Verwendung von poly(I:C) und 3P-RNA stimulierten Rezeptoren RIG-I und MDA-5 sind hervorgehoben.

1.3. Eigenschaften, Vorkommen und therapeutische Nutzung myeloischer Suppressorzellen (MDSCs)

1.3.1. Definition von MDSCs über Phänotyp und Funktion

Als myeloische Suppressorzellen (myeloid-derived suppressor cells; MDSCs) wird eine heterogene Zellpopulation bezeichnet, die aus unreifen Zellen myeloischen Ursprungs wie unreifen Granulozyten, unreifen Makrophagen und unreifen DCs besteht (Gabrilovich et al. 2007). MDSCs zeichnen sich stets durch ihre immunsupprimierenden Eigenschaften, vor allem gegenüber der Aktivität von T-Zellen, aus (Bronte et al. 2000). Myeloischer Ursprung, unreifer Status und die Fähigkeit, T-Zellantworten negativ zu beeinflussen, sind somit Merkmale, die alle MDSCs unabhängig von ihrem spezifischen Phänotyp aufweisen (Gabrilovich et al. 2009). Lange vor ihrer Klassifikation als MDSCs wurden Ende der 70er Jahre entsprechende Zellen erstmals beschrieben (Roder et al. 1978; Slavin et al. 1979). Da sich Hinweise mehrten, dass sie eine wichtige Funktion in verschiedenen pathophysiologischen Prozessen wie der Pathogenese von Tumoren und Autoimmunerkrankungen oder im Rahmen traumatischer Ereignisse spielen, gerieten sie schließlich als MDSCs in den Blickpunkt wissenschaftlichen Interesses (Makarenkova et al. 2006; Zhu et al. 2007).

Obwohl MDSCs eine phänotypisch heterogene Zellpopulation darstellen, weisen sie gemeinsame Oberflächenmarker auf. In Mäusen werden MDSCs durch eine Koexpression des Differenzierungsmarkers der myeloischen Zellreihe Gr-1 (granulocyte-differentiation antigen 1) und von CD11b definiert (Kusmartsev et al. 2004). Bei CD11b handelt es sich um eine Untereinheit des Integrins CR 3 (Mac-1 Antigen) (Corbi et al. 1988).

Humane MDSCs hingegen werden entweder als $CD14^{-}CD11b^{+}$ oder als $CD33^{+}LIN^{low}HLA\text{-}DR^{low}$ Zellen definiert, da menschliche Zellen kein Gr-1 exprimieren (Almand et al. 2001; Ochoa et al. 2007). S100A9 wurde in jüngster Zeit als hilfreicher Oberflächenmarker zur Beschreibung humaner MDSCs vorgeschlagen (Zhao et al. 2012).

Der Oberflächenmarker Gr-1 umfasst die Bestandteile Ly6G und Ly6C. Vor dem Hintergrund der unterschiedlich starken Expression dieser beiden Proteine und Unterschieden in der Morphologie wurde eine Unterscheidung der Subpopulationen der PMN-MDSCs (polymorphonuclear MDSCs) und MO-MDSCs (Monocyte-like MDSCs) vorgeschlagen (Dietlin et al. 2007; Youn et al. 2008).

1.3.2. Expansion und Aktivierung von MDSCs als Folge pathophysiologischer Prozesse

Unreife myeloische Zellen (immature myeloid cells; iMCs) differenzieren sich größtenteils in ihrem Zielgewebe in reife Granulozyten, Makrophagen oder dendritische Zellen. Diverse pathophysiologische Prozesse wie Tumorerkrankungen oder Sepsis verhindern jedoch eine endgültige Differenzierung der Zellen. Sie führen vielmehr zu einer verstärkten Proliferation und Aktivierung der dann MDSCs genannten unreifen Zellen (Gabrilovich et al. 2001; Delano et al. 2007).

Im murinen Modell können dem Phänotyp von MDSCs entsprechende iMCs in gesunden Tieren in nennenswerten Anzahl nur im Knochenmark (20-30%) nachgewiesen werden, während in Milz und peripherem Blut nur eine geringe Anzahl (<4 %) dieser Zellen vorliegt (Serafini et al. 2006). In Tumormodellen wurde eine deutliche Anstieg der MDSCs in der Peripherie und eine nachweisbare Akkumulation in Lymphknoten und Tumorumgebung beobachtet (Gabrilovich and Nagaraj 2009). So stieg beispielsweise in einem murinen Modell des Mammakarzinoms der Prozentsatz der MDSCs in der Milz auf >30% und im peripheren Blut auf >50% (Melani et al. 2003). Diese Erkenntnisse werden durch Beobachtungen an Patienten ergänzt. So liegen im peripheren Blut von gesunden Menschen ungefähr 0,5% iMCs vor, während Tumorpatienten signifikant höhere Werte an MDSCs aufweisen (Almand et al. 2001). Interessanterweise korreliert die Zahl der MDSCs im peripheren Blut mit Tumorprogression, Metastasierung und einem chemotherapeutisch bedingtem Rückgang der Tumormasse (Diaz-Montero et al. 2009).

Eine Expansion der MDSC-Zellpopulation konnte unter dem Einfluss der Zytokine PGE_2 (Sinha et al. 2007), SCF (Pan et al. 2008), M-CSF (Menetrier-Caux et al. 1998), IL-6 (Bunt et al. 2007), GM-CSF (Serafini et al. 2004) sowie VEGF (Gabrilovich et al. 1998) nachgewiesen werden. Diese Faktoren, die im Rahmen von Tumorgeschehen und anderen pathologischen Prozessen verstärkt sezerniert werden, wirken vor allem über eine Signalkaskade, die JAK-Proteine und den Transkriptionsfaktor STAT3 umfasst (Kortylewski et al. 2005; Nefedova et al. 2005).

Neben der Expansion der MDSCs kommt es bei pathophysiologischen Prozessen zu ihrer Aktivierung: IFNγ (Gallina et al. 2006), IL-4 (Bronte et al. 2003), IL-13 (Sinha et al. 2005) und TGF-ß (Terabe et al. 2003; Yang et al. 2008) sind humorale Faktoren, die von Tumorzellen sezerniert werden oder im Rahmen der Apoptose von Tumorzellen auftreten und für die Aktivierung der immunsuppressiven Funktion der MDSCs verantwortlich sind. Diese erfolgt über Signalkaskaden, die JAK-Proteine (Januskinase) sowie die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT6 umfassen (Kusmartsev et al. 2005).

1.3.3. Mechanismen der T-Zell-Hemmung im Rahmen der MDSC-vermittelten Immunsuppression

Für die Hemmung der T-Zell-Aktivität durch MDSCs sind verschiedene Mechanismen verantwortlich, die meist einen direkten Zell-Zell-Kontakt erfordern (Vaknin et al. 2008; Nagaraj et al. 2012) (Abb. 1). Die Aminosäure L-Arginin spielt in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle (Bronte et al. 2005; Rodriguez et al. 2008). L-Arginin ist für den Aufbau der ζ-Kette des CD3-Antigens und somit für die Funktion des T-Zell-Rezeptors unerlässlich (Rodriguez et al. 2002). Gleichzeitig ist L-Arginin Substrat von iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase) und ARG1 (Arginase 1), zwei Enzymen, die in MDSCs verstärkt aktiviert werden (Rodriguez et al. 2005; Rodriguez et al. 2007). MDSCs treten dadurch mit den T-Zellen in Konkurrenz um das lokal vefügbare L-Arginin (Bronte and Zanovello 2005).

Der als Produkt von iNOS entstehende Stickstoff (NO) unterdrückt außerdem die T-Zell-Funktion über verschiedene Mechanismen wie die Hemmung intrazellulärer Signalwege und der MHC-II Expression (Bingisser et al. 1998; Harari et al. 2004), sowie die Einleitung der Apoptose (Rivoltini et al. 2002). Auch das durch Reaktion von NO mit Superoxid-Anionen entstehende Produkt Peroxynitrit ist an der immunsuppressiven Wirkung von MDSCs beteiligt (Nagaraj et al. 2007). Durch die Nitrierung des T-Zell-Rezeptors und des CD-80 Oberflächenmarkers führt Peroxynitrit zu einem Funktionsverlust von T-Zellen gegenüber antigenspezifischen Stimuli (Kusmartsev et al. 2005).

Sowohl im murinen Modell als auch in Patienten wurde im Rahmen von Tumorerkrankungen eine verstärkte Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) durch MDSCs nachgewiesen (Kusmartsev et al. 2003; Szuster-Ciesielska et al. 2004). Angriffspunkt der ROS ist ebenfalls der T–Zell-Rezeptor, aber auch die Zytokinproduktion durch T-Zellen (Schmielau et al. 2001; Agostinelli et al. 2006). Während die Wirkung von NO und Peroxynitrit als nitrosativer Stress bezeichnet wird, ist oxidativer Stress der analog für die Wirkung von ROS verwendete Begriff.

Neue *in vitro* Untersuchungen weisen darauf hin, dass MDSCs in großem Maße die Aminosäure Cystein aufnehmen und speichern (Srivastava et al. 2010). Dadurch wird T-Zellen analog zu L-Arginin auch diese für sie essentielle Aminosäure entzogen (Bannai 1984). Außerdem wurde nachgewiesen, dass MDSCs eine verminderte Expression von L-Selektin auf T-Zellen verursachen und dadurch deren Homing in lymphatisches Gewebe erschweren (Hanson et al. 2009).

MDSCs scheinen auch in der Lage zu sein, die Entwicklung von T_{regs} zu induzieren (Huang et al. 2006; Yang et al. 2006). Diese spezialisierten T-Zellen verfügen über ein erhebliches immunsuppressives Potential (Cools et al. 2007; Curiel 2008).

Bezüglich der Mechanismen der MDSC-vermittelten Immunsuppression überwiegen aus *in vitro* Experimenten stammende Befunde. Jedoch ist für MDSCs, die aus tumorumgebendem oder entzündlich veränderten Gewebe stammen, eine Immunsuppression auch *in vivo* nachgewiesen (Condamine et al. 2011). Die Expansion und Aktivierung von MDSCs führt als Bestandteil des tumoralen Escapes zu einer Hemmung der Immunantwort und somit zu einer leichteren Etablierung und einem schnelleren Wachstum von Tumoren (Haverkamp et al. 2011).

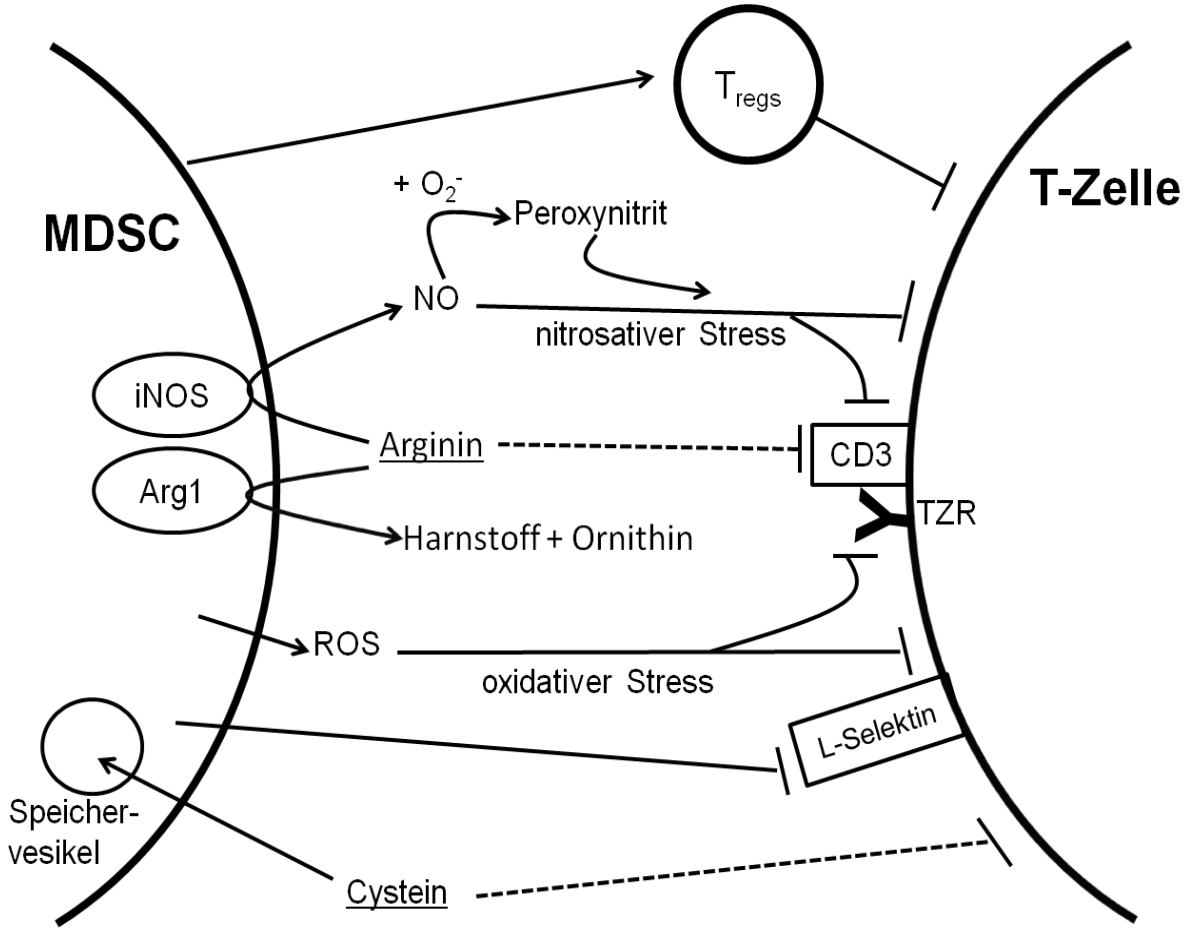


Abbildung 1: MDSCs hemmen T-Zellen durch vielfältige Mechanismen

Die verschiedenen bekannten immunsuppressiven Mechanismen, über die MDSCs hemmend auf T-Zellen wirken, sind in der Übersicht dargestellt. Durchgezogene Linien stellen einen direkten Einfluss dar. Unterbrochene Linien stehen für den hemmenden Effekt, der auf dem Entzug der Aminosäuren Arginin und Cystein beruht.

2. Ziel der vorliegenden Dissertation

Nach der repetitiven Gabe von Liganden des angeborenen Immunsystems (darunter poly(I:C) und CpG) an tumorfreie Mäuse konnte in den Milzen der Tiere eine zahlenmäßige Zunahme von myeloischen Suppressorzellen beobachtet werden. Diese zeigten im Kokultivierungsversuch hemmende Eigenschaften gegenüber T-Zellen (Vaknin et al. 2008). CpG und poly(I:C) führen demnach in nicht tumortragenden Tieren zum vermehrten Auftreten von MDSCs. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde untersucht, ob der von VAKNIN beschriebene zahlenmäßige Anstieg von MDSCs nach Gabe von poly(I:C) und GpG auch für C26-tumortragende Mäuse nachweisbar ist. Das grundsätzliche Vorliegen von MDSCs in diesem Tumormodell ist beschrieben (Gallina et al. 2006; Youn et al. 2008).

Die Wirksamkeit der Immuntherapie mit den PRR-Liganden poly(I:C) und CpG im C26-Tumormodell beruht auf einer Stimulation des angeborenen Immunsystems (Ballas et al. 2001). Sollten diese Liganden analog zu den Beobachtungen in tumorfreien Mäusen gleichzeitig zu einer Zunahme myeloischer Suppressorzellen führen, würde sich die Frage nach einer Vereinbarkeit dieser beiden Beobachtungen stellen. Von einem vermehrten Auftreten definitionsgemäß immunsuppressiver MDSCs wäre primär ein der Wirksamkeit der Immuntherapie gegenläufiger Effekt zu erwarten.

Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob durch die Tumortherapie mit poly(I:C) und CpG auch eine Beeinflussung der Immunsuppressivität der MDSCs stattfindet. Ein erstmaliger Nachweis der Hemmung der immunsuppressiven Eigenschaften myeloischer Suppressorzellen durch eine Therapie mit Liganden des angeborenen Immunsystems wäre ein wichtiger Beitrag zum besseren Verständnis des Wirkmechanismus dieser Therapie.

Von besonderem Interesse ist darüber hinaus die Frage, ob die beschriebenen Subpopulationen der myeloischen Suppressorzellen (Movahedi et al. 2008) im Rahmen der durchgeführten Versuche ein unterschiedliches Verhalten aufweisen. Sowohl im Hinblick auf eine eventuelle zahlenmäßige Veränderung als auch in Betrachtung der Auswirkungen der antitumoralen Immuntherapie mit CpG und poly(I:C) auf die suppressiven Eigenschaften der Zellen sollte in der vorliegenden Doktorarbeit zwischen PMN-MDSCs und MO-MDSCs differenziert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Durchflusszytometer (FACSCanto II)	Fa. BD Biosciences (San Diego, USA)
ELISA-Reader	Fa. Dynatech Laboratories (Guernesey, GB)
Luminometer (Mithras LB 940)	Fa. Berthold Technologies (Bad Wildbach, D)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)

3.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Aqua ad iniectabilia	Fa. B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
DMEM	Fa. PAA (Pasching, A)
EDTA	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACS Flow Solution	Fa. BD Biosciences (San Diego, USA)
FACS Clean Solution	Fa. BD Biosciences (San Diego, USA)
Fötales Kälberserum (FCS)	Fa. Gibco (Paisley, GB)
Isofluran (Forene®)	Fa. Abbott (Wiesbaden, D)
L-Glutamin	Fa. PAA (Pasching, A)
MEM-NEAA	Fa. Gibco (Paisley, GB)
Natriumchlorid (NaCl 0,9%)	Fa. Baxter S.A. (Lessines, B)
Natriumkarbonat (pH 9,5)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Natriumpyruvat	Fa. Biochrom (Berlin, D)
PBS	Fa. PAA (Pasching, A)
PFA	Fa. Sigma-Aldreich (Steinheim, D)
Penicillin	Fa. PAA (Pasching, A)
PharmLyse Lysereagenz	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
RPMI VLE	Fa. PAA (Pasching, A)
RPMI	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Streptomycin	Fa. PAA (Pasching, A)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin (10x)	Fa. PAA (Pasching, A)
Tween 20 (pH 7,0)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

β-Mercaptoethanol	Fa. Gibco (Paisley, GB)

Als TLR-Liganden vewendete Oligonukleotide

poly(I:C)	Fa. Invivogen (San Diego, USA)
CpG-B-ODN (1826) (5‘-TCCATGACGTTCCTGACGTT-3‘)	Fa. Coley Pharmaceutical Group (Langenfeld, D)
3P-RNA (RNA 9.2s) (5‘-pppAGCUUAACCUGUCCUUCAA-3‘)	im eigenen Labor synthetisiert unter Verwendung des Silencer si construction kit der Fa. Ambion (Huntingdon, UK) (Hornung et al. 2006)

Zytokinbestimmung mittels ELISA (Set)

Murines IFNγ ELISA Kit (OptEIA™)	Fa. BD Biosciences (San Diego, USA)

Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU-Inkorporation (Set)

Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)	Fa. Roche Diagnostics (Penzberg, D)

Zellaufreinigung mittels MACS

CD19 Microbeads	Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
CD11c Microbeads	Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
Anti-Biotin Microbeads	Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
Anti-Ly6G-Biotin	Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
Anti-Gr-1-Biotin	Fa. Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
Anti-CD3/CD28-Microbeads	Fa. Invitrogen (Carlsbad, USA)

In der Durchlusszytometrie verwendete Antikörper

Anti-Gr1 (PE-Cy7; Klon RB6-8C5)	Fa. BD Biosciences (San Diego, USA)
Anti-CD11b (PerCP; Klon M1/70)	Fa. BD Biosciences (San Diego, USA)
Anti-Ly6C (FITC; Klon AL-21)	Fa. BD Biosciences (San Diego, USA)
Anti-Ly6G (PE; Klon 1A8)	Fa. BD Biosciences (San Diego, USA)

3.1.3. Puffer und Lösungen

In der Zellkultur verwendete Medien und Puffer

MACS-Puffer
10% FCS
2 mM EDTA
} in PBS

Erythrozyten-Lysepuffer
10% Pharmlyse → in PBS

T-Zell-Medium
10% FCS
1% Penicillin-Streptomycin
1% L-Glutamin
1% Natriumpyruvat
1% MEM-NEAA
0,0001% ß-Mercaptoethanol
} in RPMI VLE

C26-Medium
10% FCS
1% L-Glutamin
1% Penicillin-Streptomycin
} in DMEM

Für ELISA verwendete Medien und Puffer

Coating buffer (ELISA)
0,1 M Natriumkarbonat (pH 9,5) → in Wasser

Block buffer (ELISA)/ Assay diluent (ELISA)
10% FCS (pH 7,0) → in PBS

Washing buffer (ELISA)
0,05% Tween 20 (pH 7,0) → in PBS

In der Durchflusszytometrie verwendete Medien und Puffer

Fixierungspuffer (FACS)
2% PFA (pH 7,0) → in PBS

3.2. Zellulär-immunologische Methoden

3.2.1. Zellkultur

Die Kultivierung der verwendeten Zellen fand stets im Begasungsbrutschrank statt. Eine Temperatur von 37°C und ein Gemisch von 95% Raumluft und 5% CO_2 wurden als Kultivierungsbedingungen konstant gehalten. Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen, mit Ausnahme von FACS-Färbungen unmittelbar vor Durchführung der Durchflusszytometrie, erfolgten unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank.

In regelmäßigen Abständen bestimmten wir mit Hilfe eines TrypanBlau-Ausschlusstestes die Zellzahl und beurteilten die Vitalität der Zellen. Wirkprinzip des TrypanBlau-Ausschlusstestes ist der Umstand, dass tote Zellen Trypan-Blau aufnehmen, während die Zellmembranen vitaler Zellen für den Farbstoff nicht permeabel sind. Die Zellzahl wurde nach 1 zu 10 Verdünnung in Trypan-Blau mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bei zehnfacher Vergrößerung bestimmt.

3.2.2. C26-Zellkultivierung

In der vorliegenden Arbeit wurde die murine Kolonkarzinomzellline C26 im BALB/c-Mausmodell verwendet (Brunner et al. 2000). Die Zellen wurden ursprünglich von der Fa. Cell Lines Service (Eppenheim, D) bezogen und wurden in unserem Labor in flüssigem Stickstoff bei sehr niedrigen Temperaturen aufbewahrt.

Zur Kultivierung wurden die C26-Tumorzellen in T-175-Kulturflaschen in C26-Medium gegeben. Eine Kontrolle auf Vitalität der Zellen und mikrobielle Besiedelung erfolgte in regelmäßigen Abständen. Jeden zweiten Tag wurden die Zellen passagiert, wobei 3 ml Trypsin-EDTA zum Ablösen der adhärent am Flaschenboden wachsenden Zellen zugegeben wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 2 min. Nachdem die Aktivität des Trypsin-EDTA durch die Zugabe von C26-Medium gestoppt wurde, erfolgte die Abzentrifugation bei 400 G (20°C, 7 min). Schließlich wurden die Zellen mit Hilfe einer 20G-Kanüle in C26-Medium vereinzelt und im Verhältnis 1:2 neu in T-175-Kulturflaschen ausgesät.

Bei der letzten Passage vor Tumorinduktion verzichteten wir auf die Verwendung von Trypsin-EDTA, um die adhärenten Eigenschaften der C26-Zellen nicht zu beeinträchtigen. Stattdessen wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturflasche gelöst und anschließend mit Hilfe einer 20G-Kanüle in PBS vereinzelt.

3.2.3. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie unter Verwendung eines Fluorescence-activated cell sorters (FACS) ermöglicht die Bestimmung der Größe und Granularität von Zellen. Das Akronym FACS ist missverständlich, da eine Sortierung von Zellen nicht mit jedem Durchflusszytometer standardmäßig möglich ist.

Wie in Abb. 2 dargestellt, passieren die in PBS suspendierten Zellen im Durchflusszytometer einzeln einen Laserstrahl, dessen Licht sie, abhängig von ihrer Größe und Granularität, unterschiedlich streuen. Durch Detektoren wird das gestreute Licht aufgenommen. Das resultierende Vorwärtsstreulicht (FSC) hängt von der Größe der Zellen ab, das Seitwärtsstreulicht (SSC) lässt hingegen auf die Granularität der Zellen schließen.

Durch die Markierung von Zellen mit Farbstoffen, die durch den Laser im Durchflusszytometer dazu angeregt werden, Licht definierter Wellenlänge zu emittieren („FACS-Färbung“), kann die Aussagekraft der FACS-Analyse weiter gesteigert werden.

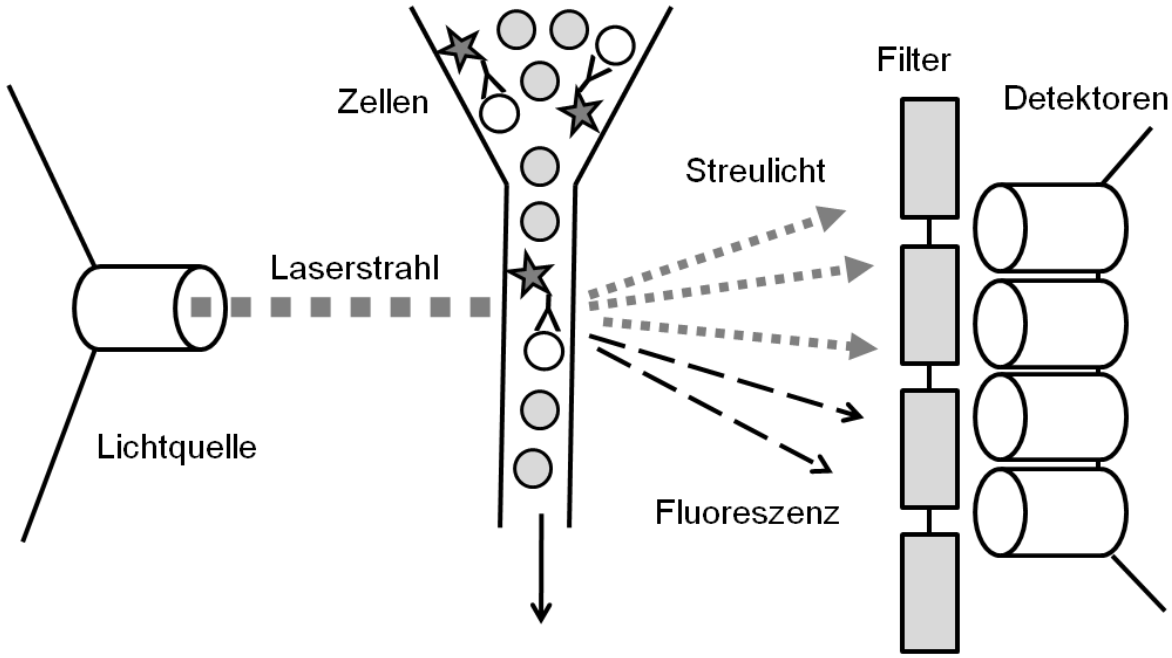


Abbildung 2: Das Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS)

Die sich in einem laminaren Strom befindlichen Zellen passieren einzeln einen Laserstrahl. Sie können aufgrund ihrer Größe, Granularität und gegebenenfalls auch der Bindung Fluoreszensfarbstoff-gekoppelter Antikörper (Stern) analysiert werden. Die Verwendung mehrerer Laser verschiedener Wellenlänge und der Einsatz unterschiedlicher fluoreszenz-markierter Antikörper lieferen Informationen zu mehreren potentiell vorhandenen Antigenen für jede untersuchte Zelle.

Eine Aussage zur Expression unterschiedlicher Antigene auf jeder einzelnen untersuchten Zelle lässt sich treffen, wenn verschiedene Fluoreszensfarbstoff-gekoppelte Antikörper mit unterschiedlichen Exzitations- und Emissionsspektren sowie Laser verschiedener Wellenlänge genutzt werden (Tab. 3). Durch die Detektion des Streulichts (FSC und SSC) und die Auswertung der Fluoreszensmuster (fluoreszenmarkierte Antikörper) können unterschiedliche Zellpopulationen in einem Zellgemisch somit sicher nachgewiesen werden.

Für die FACS-Färbungen resuspendierten wir 2 x 10^5 - 1 x 10^6 Zellen in 200 µl FACS-Puffer. Die Färbung selbst findet statt, indem die Zellen 30 min unter Lichtausschluss auf Eis mit FITC-, PE-, PerCP-, APC- oder PE-Cy-gekoppelten Antikörpern inkubiert wurden. Zur Messung im Durchflusszytometer wurden die Zellen schließlich in 500 µl PBS aufgenommen.

Die Auswertung der gewonnen Messwerte (Triplikate) erfolgte unter Benutzung der FlowJo Software (Fa. TreeStar, Ashland, USA). Wurden Zellen nach FACS-Färbung nicht direkt der Untersuchung mittels Durchflusszytometrie unterzogen, so erfolgte vor der FACS-Messung eine Lagerung bis zu 24 h bei 4°C unter Zugabe von Fixierungspuffer. Dies beeinflusste die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchtung nicht.

A

Farbstoff	Exzitation	Emission
FITC	495 nm	519 nm
PE	565 nm	575 nm
APC	650 nm	660 nm
PerCP	490 nm	675 nm
PE-Cy7	480 nm 565 nm 743 nm	767 nm

B

Laser	Wellenlänge λ	Farbstoff
blau	488 nm	FITC PE PerCP PE-Cy7
rot	633 nm	APC
violett	405 nm	PacBlue

Tabelle 3: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe und Laser

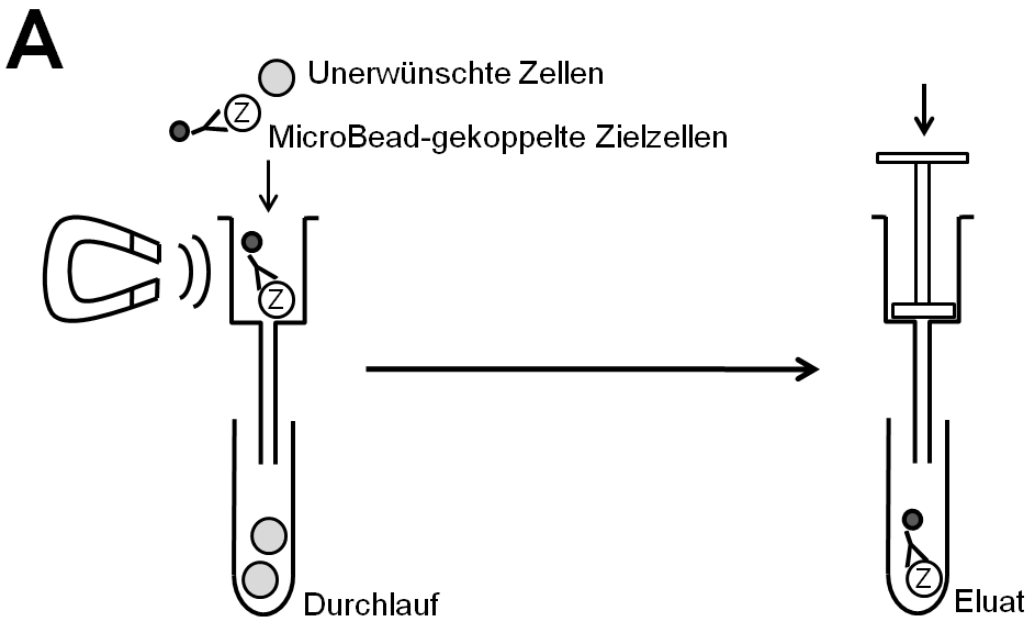
A) Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sind mit den jeweiligen Werten für die maximale Exzitations- und Emissionswellenlänge dargestellt. Der Exzitationswert bezeichnet die Wellenlänge, durch die der Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt wird. Der Emissionswert bezeichnet die Wellenlänge der entsprechend verursachten Fluoreszenz. PE-Cy7 weist als Konjugat mehr als einen Exzitationswert auf. **B)** Die drei verschiedenen Laser, mit denen das genutzte Durchflusszytometer (FACSCanto II) ausgestattet ist, sind in der Übersicht dargestellt. Ihre jeweilige Wellenlänge sowie eine Auswahl dadurch angeregter Farbstoffe sind ebenfalls angegeben.

3.2.4. Magnetische Zellseparation (MACS)

Zur Isolierung von MDSCs aus murinen Splenozyten wurde die Methode der Magnetischen Zellseparation (MACS) angewendet (Miltenyi et al. 1990). Dieser liegt das Prinzip zugrunde, dass bestimmte Zellen eines Zellgemisches von mit paramagnetischen Nanopartikeln gekoppelten Antikörpern gebunden werden und so extrahiert werden können. Die als MicroBeads bezeichneten Magnetpartikel bestehen aus mit Polysacchariden ummanteltem Eisenoxid und haben einen Durchmesser von ca. 50 nm.

Nach der Inkubation einer Zellsuspension mit MicroBead-gekoppelten Antikörpern wird diese auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Die Trennsäule ist einem starken Magnetfeld ausgesetzt, so dass die an die MicroBeads gebundenen Zellen beim Durchlaufen der Säule in der Matrix zurückgehalten werden. Der Durchlauf, der durch das dreimalige Zufügen von MACS-Puffer ausgewaschen wird, enthält nur die unmarkierten Zellen aus der Zellsuspension. Nach Entfernen der Trennsäule aus dem Magnetfeld können die gebundenen Zellen schließlich mithilfe eines Stempels als Eluat gewonnen werden.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte MACS-Aufreinigung wurde das Prinzip der positiven Selektion sowie der Depletion angewendet. Bei der positiven Selektion werden die gesuchten Zellen direkt an MicroBeads-gekoppelte Antikörper gebunden und somit in der Trennsäule zurückgehalten (Abb. 2A). Bei der Depletion hingegen befinden sich die interessierenden Zellen im Durchlauf, während in der Trennsäule nicht gewünschte Zellen zurückgehalten werden (Abb. 2B).



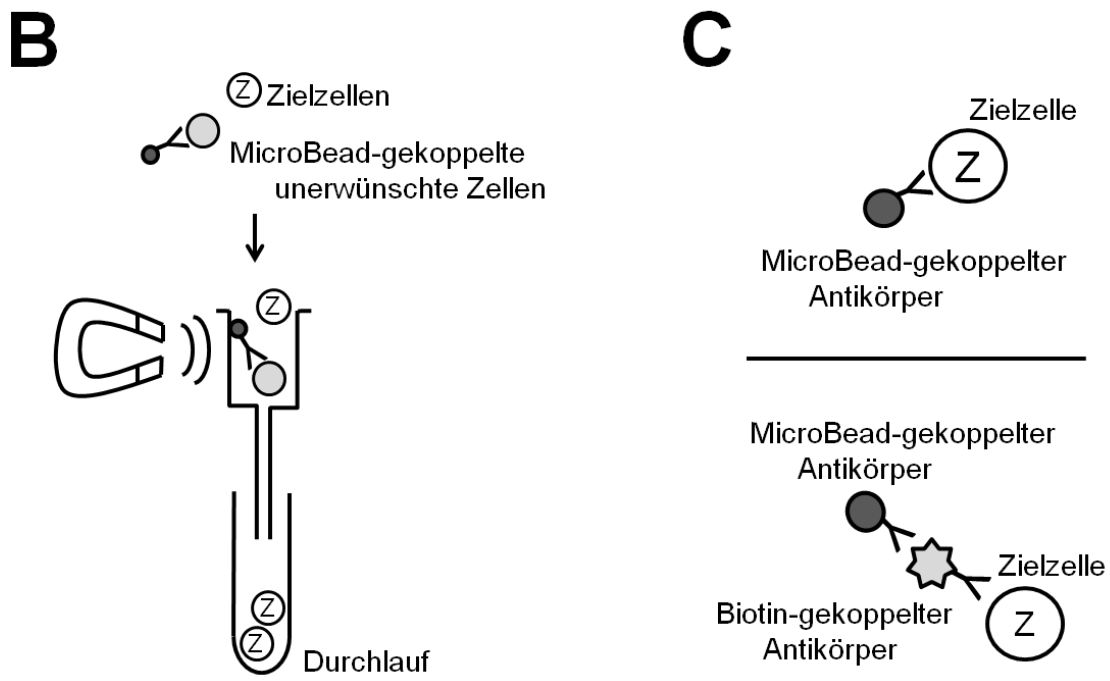


Abbildung 3: Das Prinzip der Magnetischen Zellseparation (MACS)

A) Positive Selektion: Interessierende Zellen werden direkt an magnetgekoppelte Antikörper gebunden. Sie bleiben in der Säule zurück und können in einem weiteren Schritt eluiert werden. **B) Depletion**: Mit Hilfe MicroBeads-gekoppelter Antikörper werden unerwünschte Zellen in der Magnetsäule zurückgehalten. Die interessierenden Zellen befinden sich hingegen im Durchlauf. **C) Direkte und indirekte Markierung**: Zellen können einerseits direkt mit Bead-gekoppelten Antikörpern markiert werden (oberer Bildteil). Andererseits ist eine indirekte Markierung über biotinylierte Antikörper und sekundäre Anti-Biotin-Antikörper möglich (unterer Bildteil).

In einigen Experimenten wurde auf die indirekte magnetische Zellseparation zurückgegriffen. Dabei kommen biotinylierte Antikörper zur Verwendung, die erst in einem zweiten Schritt von MicroBead-gekoppelten Anti-Biotin Antikörpern gebunden werden (Abb. 2C).

Zur Gewinnung von PMN-MDSCs und MO-MDSCs verwendeten wir Reagenziensätze der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) nach dem entsprechenden Hersteller-Protokoll. Zunächst vereinzelten wir murine Milzen unter Zuhilfenahme eines 40 µm Zellsiebes in PBS. Mit Hilfe von Erylyse-Lösung wurde das gewonnene Splenozytengemisch von Erythrozyten befreit (3 ml Erylyse, Abstoppen der Reaktion durch Verdünnung mit PBS). Nach Abzentrifugation (400 G, 7 min) folgte die Einstellung der Splenozyten auf 1x 10^8 Zellen/ 200 µl MACS-Puffer. Als nächster Schritt wurde das Zellgemisch zunächst einer Depletion auf

CD19- und CD11c-positive Zellen unterzogen (Inkubation von 15 min, 4°C). Anschließend erfolgten nacheinander positive Selektionen auf Ly6G-positive (PMN-MDSCs) und Gr-1-positive Zellen (MO-MDSCs). Der Inkubation mit den biotinylierten Primärantikörpern (10 min, 4°C) schloss sich jeweils die Zugabe von MicroBead-gekoppelten Anti-Biotin Antikörpern an (Inkubation von 15 Min, 4°C). Die Reinheit der gewonnen Zellfraktionen der PMN-MDSCs und MO-MDSCs wurde routinemäßig im FACS überprüft (siehe Abb. 9).

3.2.5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Der enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ist ein immunologisches Verfahren, das den Nachweis von Proteinen über die Quantifizierung einer enzymatischen Farbreaktion ermöglicht. Das Enzym, das die Reaktion katalysiert, ist an den F_c-Teil eines Antikörpers gekoppelt, der das gesuchte Protein bindet.

Für die Durchführung des ELISA wird eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit dem entsprechenden Antikörper (capture antibody) beschichtet, indem dieser in coating buffer gelöst auf die Platte gegeben wird (Inkubation über Nacht bei 4°C). Nach der Entfernung nicht gebundenen capture antibodies unter Verwendung von washing buffer wird die Platte mit einer proteinhaltigen Lösung (assay diluent) geblockt, um im weiteren Verlauf eine unspezifische Bindung des gesuchten Proteins an die Platte zu vermeiden (1 h Inkubation auf Schüttler bei 20°C, anschließend mehrmaliges Waschen).

Die Proteine in der nun zugegebenen Probe binden an den capture antibody (2 h Inkubation auf Schüttler bei 20°C, anschließend mehrmaliges Waschen). Für die zu untersuchenden Proben verwendeten wir den Überstand von T-Zellen, die für 78h in T-Zell-Medium kultiviert worden waren. Teilweise waren diesem Ansatz auch von Beginn an myeloische Suppressorzellen in den Verhältnissen 8:1, 4:1, 2:1 und 1:1 beigegeben, um deren hemmende Wirkung auf die T-Zellen zu quantifizieren.

Es erfolgt die Zugabe eines weiteren Antikörpers (detection antibody). Der detection antibody bindet an ein anderes Epitop des gesuchten Proteins als der capture antibody, worauf die oft verwendete Bezeichnung „Sandwich-ELISA“ zurückzuführen ist (Abb. 4). Der detection antibody ist biotinyliert. Dies erlaubt einem zugleich zugegebenen Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, über eine Biotin-Streptavidin-Bindung an den detection antibody zu binden (1 h Inkubation auf Schüttler bei 20°C, anschließend mehrmaliges Waschen). Jedes Biotin-Molekül bildet mehrere Biotin-Streptavidin-Bindungen aus, wodurch die Sensitivität des ELISA erhöht wird.

Ein anschließend zugegebener Farbstoff wird durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase aktiviert. Diese Reaktion wird nach erfolgter Inkubation (ca. 30 min bei 20°C, unter Lichtausschluss) durch Zugabe von Schwefelsäure (H_2SO_4) abgestoppt. Die Farbintensität der Reaktion wird mit Hilfe eines ELISA-Readers bestimmt. Eine auf der Mikrotitierplatte parallel zu den Proben angelegte Verdünnungsreihe des gesuchten Proteins in bekannter, abnehmender Konzentration erlaubt mittels einer Standardkurve die Quantifizierung des in der Probe vorhandenen Proteins.

Wir verwendeten einen Reagenziensatz der Fa. BD Biosciences (San Diego, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers. In der siebenstufigen Verdünnungsreihe betrug die Konzentration des Proteins im Standard mit der höchsten Konzentration 2 ng/ml. Die Werte der Proteinkonzentrationen der sukzessiven Standards beliefen sich auf die Hälfte der jeweils vorangehenden Stufe. Die zu untersuchenden Proben wurden in 1:2 Verdünnung in assay diluent als Triplikate eingesetzt.

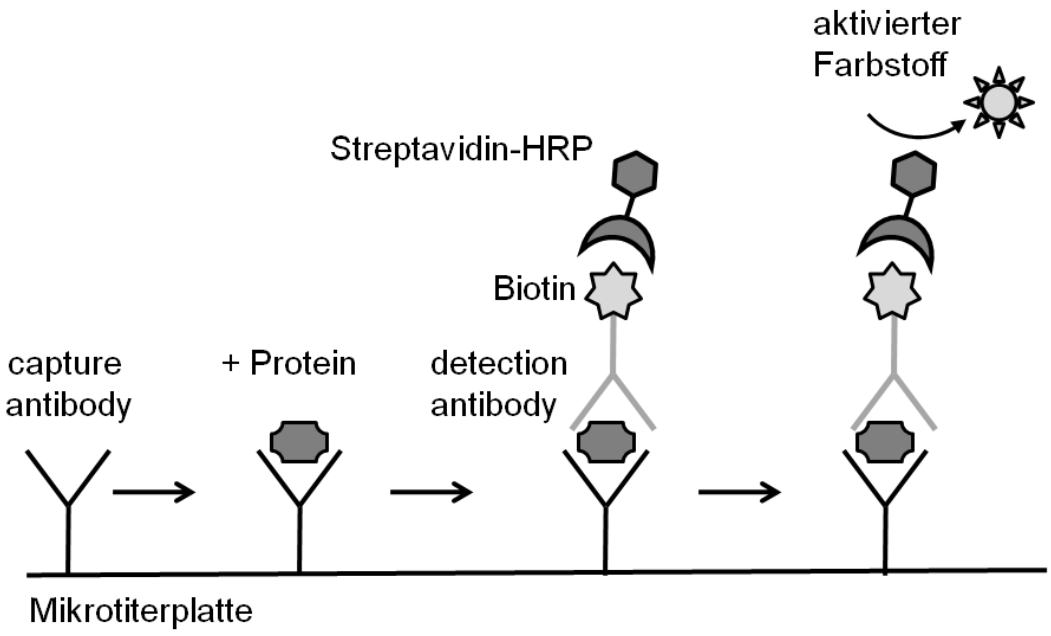


Abbildung 4: Das Prinzip des Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

Ein auf einer Mikrotiterplatte immobilisierter Antikörper (capture antibody) bindet ein spezifisches Protein in der Probe. Dieses wird von einem zweiten Antikörper gebunden (detection antibody), dessen Fc-Teil mit Biotin gekoppelt ist. Streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) bindet wiederum an Biotin und aktiviert auf Grund seiner enzymatischen Aktivität einen zugegebenen Farbstoff. Das dadurch erzeugte Farbsignal kann in einem ELISA-Reader quantifiziert werden. Mit Hilfe einer Standardkurve erfolgt schließlich der Rückschluss auf die Menge des in der Probe vorliegenden interessierenden Proteins.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Enzyme-linked immunosorbent assay zum Nachweis von IFNγ durchgeführt. Dieses Zytokin wird charakteristischerweise von T-Zellen im Rahmen einer Th1-Reaktion gebildet. Der IFNγ-ELISA lässt somit auf die Aktivität stimulierter T Zellen schließen.

3.2.6. BrdU-Proliferationsassay

Das Nukleosidanalogon 5-Brom-2‘-desoxyuridin (BrdU) kann zum Nachweis der Proliferation von Zellen verwendet werden, da die Quantität des in die DNA integrierten BrdU mit der proliferativen Aktivität der untersuchten Zellen korreliert (Abb. 5). BrdU wird als einfacher zu handhabende Alternative zu radioaktivem 3^{H}-Thymidin verwendet. Zur Auswertung wird BrdU nach Denaturierung der DNA immunhistochemisch nachgewiesen (Ormerod 1997).

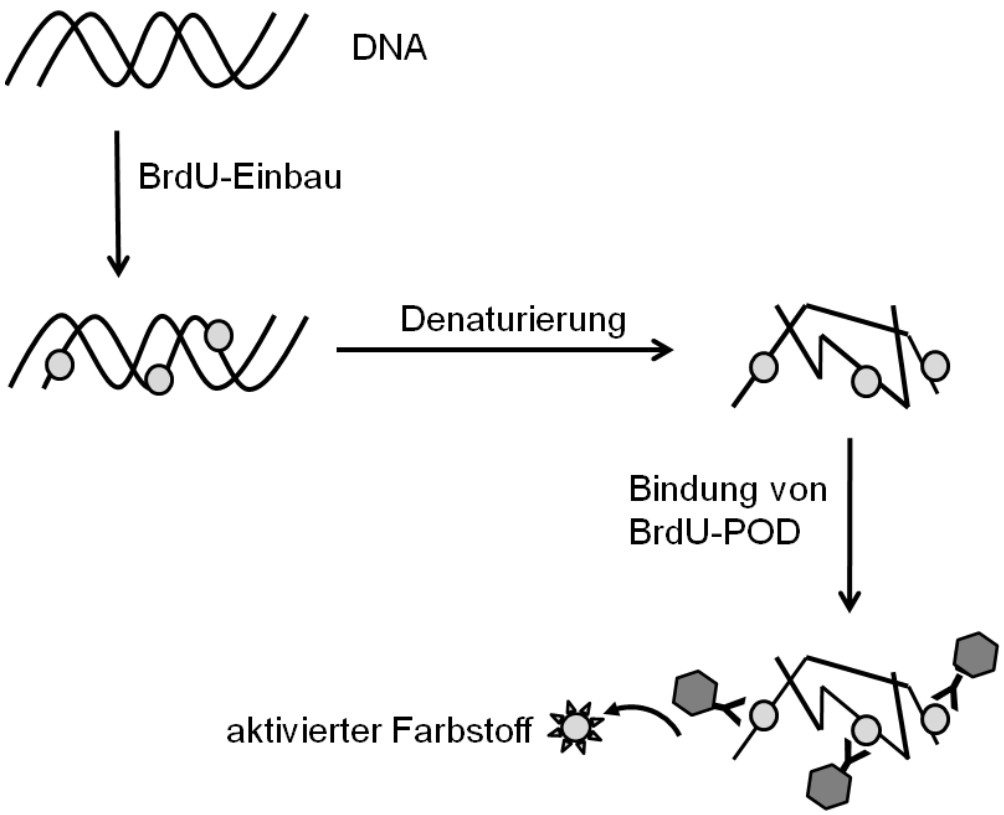


Abbildung 5: Das Prinzip des BrdU-Proliferationsassays

Im Rahmen der Zellproliferation wird BrdU in die DNA der entstehenden Tochterzellen eingebaut. Nach Denaturierung der DNA kann ein BrdU-spezifischer Antikörper an das eingebaute Nukleosidanalogon binden. Der Antikörper liegt als Konjugat mit Peroxidase vor (BrdU-POD), durch deren enzymatische Aktivität ein zugegebener Farbstoff aktiviert wird. Nach Bestimmung der Farbintensität mittels eines Luminometers kann auf die proliferative Aktivität der untersuchten Zellen geschlossen werden.

Der BrdU-Assay wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit verwendet, um die Proliferation von T-Zellen in einer murinen Splenozytenprobe zu quantifizieren und gegebenenfalls die Hemmung der T-Zellen durch MDSCs oder iMCs zu untersuchen. Die Zellen wurden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte in T-Zell-Medium kultiviert (Triplikate), wobei die Proliferation der T-Zellen durch die Zugabe von CD3/CD28-Microbeads angeregt wurde. Zur Untersuchung der suppressiven Aktivität von MDSCs und iMCs wurden diese zusammen mit den T-Zellen in den 96Well-Mikrotiterplatten kultiviert. Hierbei wurden die myeloischen Suppressorzellen in den Verhältnissen 8:1, 4:1, 2:1 und 1:1 gegenüber den T-Zellen verwendet. Nach 48 h erfolgte die Zugabe von BrdU (Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank).

Die Versuchauswertung fand am darauf folgenden Tag statt und begann, nach Abnahme des Mediums, mit der Trocknung der Zellen unter Benutzung eines Föhns. Anschließend sorgte die Zugabe eines Denaturierungspuffers (FixDenat) für die Fixierung und Denaturierung der Zellen (Inkubation bei 20°C für 30 min). Dieser Schritt macht das in die DNA eingebaute BrdU dem im Anschluss zugegebenen Peroxidase-konjugierten Antikörper (BrdU-Pod) zugänglich. Nach erfolgter Inkubation (90 min bei 20°C) wird ungebundener BrdU-POD durch mehrmaliges Waschen entfernt.

Schließlich erfolgt die Zugabe eines Farbstoffes, der durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase aktiviert wird. Die resultierende Farbintensität kann mit Hilfe eines Luminometers bestimmt werden. Sie lässt auf die in die DNA eingebaute Menge an BrdU und somit auf die Proliferationsrate der untersuchten T-Zellen schließen. Für den BrdU-Proliferationsassay wurden von uns Reagenziensätze der Firma Roche Diagnostics (Penzberg, D) gemäß dem Hersteller-Protokoll verwendet.

3.3. Tierversuche

3.3.1. Ethische und gesetzliche Grundlagen

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten ausnahmslos an weiblichen BALB/c-Mäusen, die von der Fa. Harlan-Winkelmann (Borchen, D) erworben wurden. Eine Tierversuchsgenehmigung der Regierung von Oberbayern (München, D) lag für sämtliche durchgeführte Experimente vor.

Es wurde versucht, das Leid der Versuchstiere strikt auf das für die Gewinnung der vorliegenden Ergebnisse nötige Maß zu begrenzen. Manipulationen an den Tieren fanden, mit Ausnahme kleiner und relativ unbelastender Eingriffe wie Tumormessung, unter

Isofloran-Narkose statt. Sämtliche angewandte Injektionen wurden mit Kanülen des Kalibers 27G (0,36 mm) durchgeführt. Eine Tötung der Mäuse erfolgte durch zerebrale Dislokation ebenfalls unter Isofloran-Narkose.

3.3.2. Subkutanes C26-Tumormodell und Tumortherapie

In Vorbereitung der Tumorinduktion wurden die kultivierten C26-Zellen nach Verwerfen des Mediums mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturflaschen gelöst und mit Hilfe einer 20G-Kanüle (0,81 mm) vereinzelt. Anschließend erfolgte die Einstellung der C26-Zellen auf $1x10^6$ Zellen/ ml PBS. 200 µl der so dosierten Zellsuspension (entspricht ca. 200000 C26-Zellen) wurden narkotisierten BALB/c-Mäusen jeweils subkutan in die rechte Flanke injiziert. Der Allgemeinzustand der Tiere und das Tumorwachstum wurden engmaschig überprüft.

Nach sechs Tagen waren die C26-Tumoren soweit gewachsen, dass ein tägliches Bestimmen der Tumorgröße möglich war. Als Maß für die Größe des Tumors diente die als Produkt aus größtem Querdurchmesser (mm) und darauf senkrechtem, maximalen Längsdurchmesser (mm) bestimmte Querschnittfläche (Abb. 6). Bei Versuchsende wurden die Tiere getötet und die Organe und Gewebe zur weiteren Untersuchung entnommen.

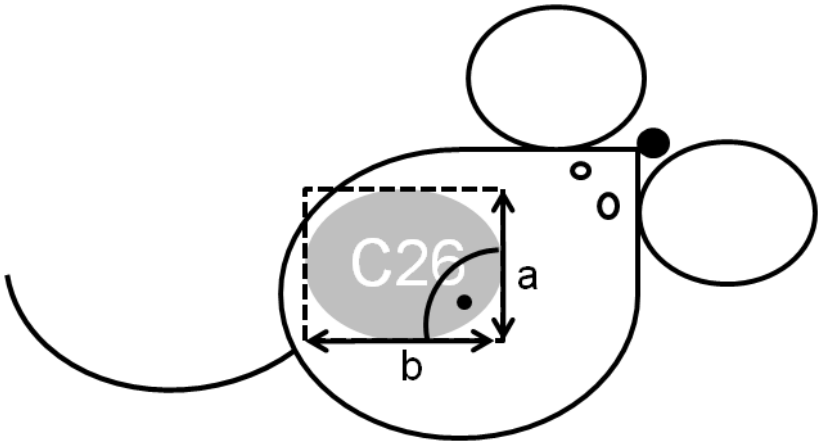


Abbildung 6: Bestimmung der C26-Tumorgröße

Die Größe des C26-Tumors (graues Oval) wurde bestimmt, indem mittels einer Schublehre der größte Längsdurchmesser in mm (a) sowie der darauf senkrecht stehende maximale Querdurchmesser in mm (b) ermittelt wurden. Das Produkt von a und b ergibt die Querschnittfläche des C26-Tumors in mm^2.

Zur Therapie der C26-tumortragenden BALB/c Mäuse wurden die PRR-Liganden CpG und poly(I:C) verwendet. Die verabreichten Dosen waren 100 µg CpG in 200 µl PBS oder 250 µg poly(I:C) in 200 µl PBS. In der jeweiligen Kontrollgruppe erhielt jede Maus 200 µl PBS ohne Zusatz eines TLR-Liganden. Die Injektion der Lösungen erfolgte zur Verabreichung von PBS und CpG peritumoral. Der TLR-Ligand poly(I:C) hingegen wurde intraperitoneal verabreicht. An den Tagen 10, 13 und 16 erfolgte jeweils eine peritumorale Injektion von 100 µg CpG bzw. eine intraperitoneale Injektion von 250 µg poly(I:C). An Tag 18 wurde der Versuch beendet, um das Material zur weiteren Analyse zu gewinnen.

Zusätzlich erhielten wir dankenswerterweise aus unserer Arbeitsgruppe frische Proben aus C26-tumortragenden Tieren, die mit 3P-RNA therapiert worden waren. Vor Organentnahme an Tag 12 nach Tumorinduktion hatten die Mäuse eine dreimalige Injektion von 50 µg 3P-RNA in 200 µl PBS an den Tagen 3, 6 und 9 erhalten (Poeck et al. 2008). Die 3P-RNA (9.2RNAs) stammte hierbei aus eigener *in vitro*-Transkription (Hornung et al. 2006)

3.4. Statistische Analyse und Darstellung

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardfehler („standard error of the mean“, SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung wurde mittels des Student’s t-Test im Falle von normalverteilten Daten oder dem Mann-Whitney Test für nicht normal verteilte Daten durchgeführt. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant unterschiedlich betrachtet und mit (*) gekennzeichnet. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Excel 2007 (Fa. Microsoft, Redmond, USA) verwendet. Zur Erstellung der Abbildungen, Tabellen und Texte dienten die Programme Excel 2007, Powerpoint 2007 und Word 2007 (jeweils Fa. Microsoft, Redmond, USA).

4. Ergebnisse

4.1. Expansion der MDSC-Subpopulationen im C26-Tumormodell

Ein Anstieg des Anteils von $CD11b^{+}Gr^{+}$ Zellen an den Splenozyten von BALB/c-Mäusen nach der Induktion von C26-Tumoren ist wiederholt beschrieben (Gallina et al. 2006; Youn et al. 2008). Diese in C26-Tumortieren verstärkt gebildeten MDSCs sollten in einem ersten Schritt genauer charakterisiert werden, besonders im Hinblick auf die bisher nicht ausreichend geklärte Frage, inwieweit die Zellen den Subpopulationen der PMN-MDSCs und MO-MDSCs zuzuordnen sind (Youn et al. 2008).

Im Anschluss betrachteten wir den Phänotyp der MDSCs sowie ihre quantitative Akkumulation und ihre funktionellen Eigenschaften. Dabei sind die Unterschiede zwischen PMN-MDSCs und MO-MDSCs, die gegebenenfalls durch die Entwicklung des C26-Tumors entstehen, jeweils von besonderem Interesse.

4.1.1. Nachweis von PMN-MDSC und MO-MDSCs im C26-Tumormodell

Unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD11b, Ly6G und Ly6C wurden die Splenozyten aus C26-tumortragenden BALB/c-Mäusen in der FACS-Analyse betrachtet. Durch die gewählten Antikörper sollten die in dem vorliegenden Splenozytengemisch vorhandenen MDSCs genauer differenziert werden. Es gelang eine Unterscheidung in PMN-MDSCs ($CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}Ly6G^{high}Ly6C^{low}$) und MO-MDSCs ($CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}Ly6G^{low}Ly6C^{high}$).

Interessant ist, dass sich die Einteilung der unter C26-Tumorinduktionen entstehenden MDSCs in PMN-MDSCs und MO-MDSCs in der Durchflusszytometrie bereits durch das Verhalten im Forward- und Sidescatter andeutet. Wie in Abb. 7 dargestellt, ist bei der Betrachtung von Splenozyten aus C26-tumortragenden Mäusen für PMN-MDSCs ein höherer SSC-Wert nachweisbar als für MO-MDSCs, was der vergleichsweise stärkeren Granularität der polymorphonukleären PMN-MDSCs gegenüber den Monozyten-ähnlichen MO-MDSCs entspricht.

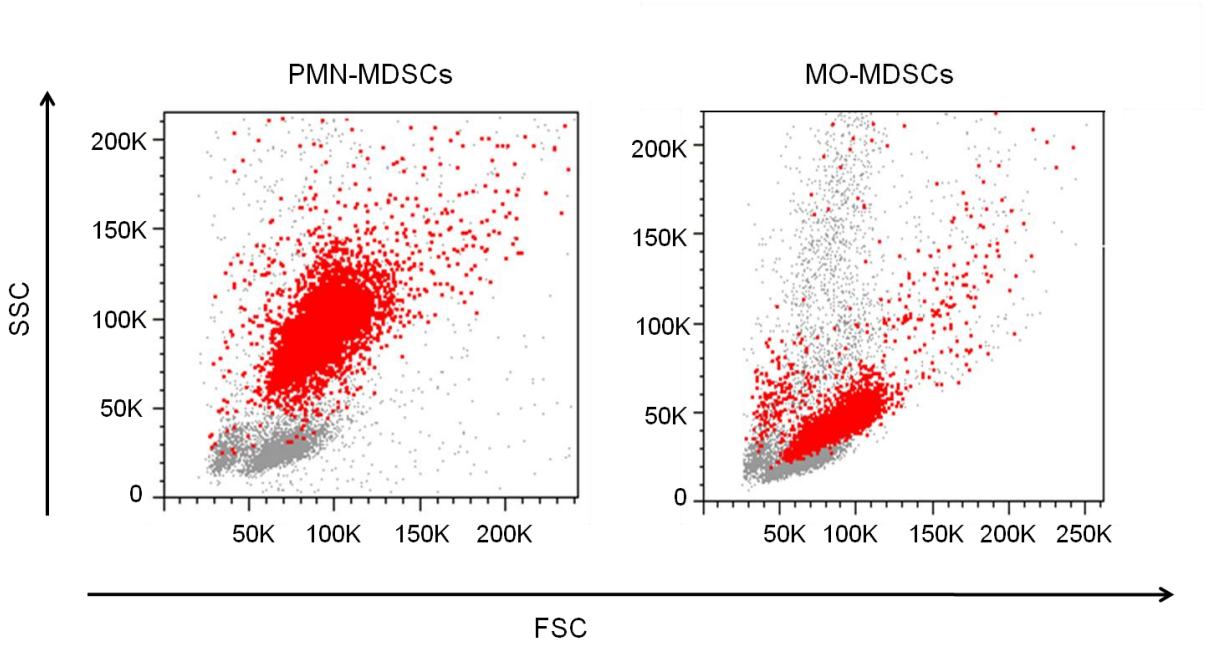


Abbildung 7: Unterschiedliche Darstellung der MDSC-Subpopulationen in der Durchflusszytometrie

MDSCs weisen zwei Subpopulationen auf, die sich u.a. in ihrer Granularität unterscheiden. Polymorphonukleäre PMN-MDSCs sind $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}Ly6G^{high}Ly6C^{low}$ und haben im Vergleich höhere SSC-Werte (linke Bildhälfte). Monozyten-ähnliche MO-MDSCs imponieren als $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}Ly6G^{int}Ly6C^{high}$ mit im Vergleich niedrigeren SSC-Werten (rechte Bildhälfte). Die betreffenden Zellpopulationen sind jeweils rot markiert und wurden mithilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD11b und Ly6G (PMN-MDSCs) bzw. CD11b und Ly6C (MO-MDSCs) unterschieden.

4.1.2. Expansion beider MDSC-Subpopulationen nach C26-Tumorinduktion

Der beschriebene Anstieg von $CD11b^+Gr\text{-}1^+$ Zellen an den Splenozyten unter C26-Tumorinduktion (Youn et al. 2008) wurde im Folgenden dahingehend untersucht, inwieweit die beiden Subpopulationen der MDSCs an diesem Vorgang beteiligt sind.

Wie Abb. 8 darstellt, ist im C26-Modell in der Milz sowohl für $CD11b^+Ly6G^+$ PMN-MDSCs als auch für $CD11b^+Ly6C^+$ MO-MDSCs jeweils eine Zunahme durch die Tumorinduktion gegenüber den entsprechenden iMCs nachweisbar. (PMN-MDSCs: Anstieg gegenüber PMN-iMCs von 0,9% auf 5,6%; MO-MDSCs: Anstieg gegenüber MO-iMCs von 0,5% auf 3,1%).

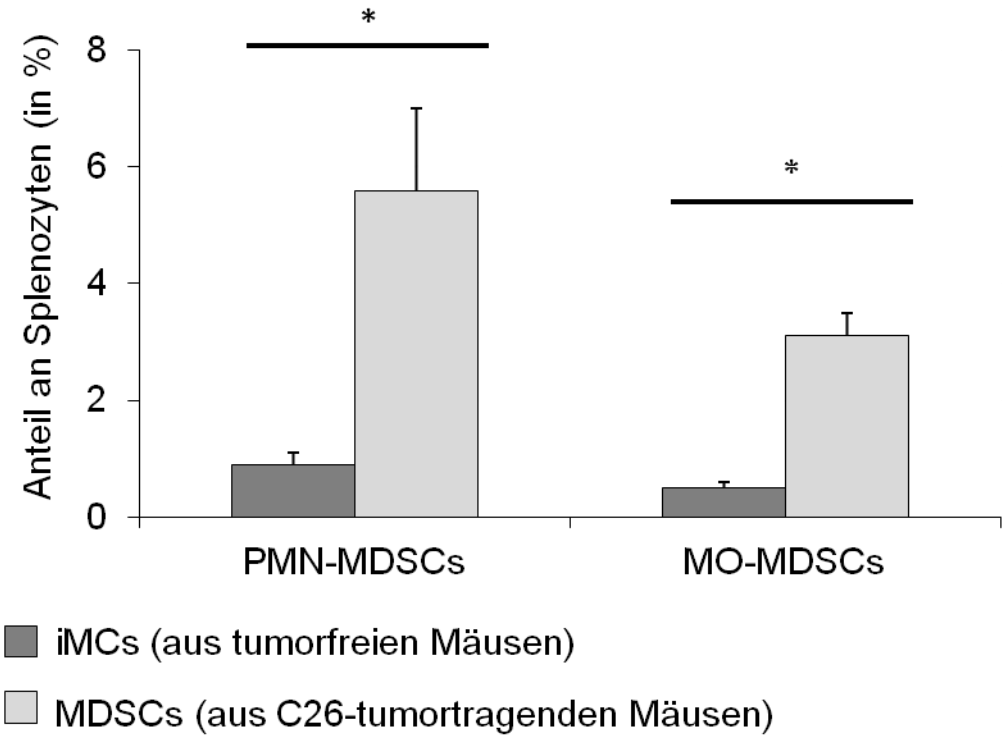


Abbildung 8: C26-Tumorinduktion bewirkt eine Expansion von PMN-MDSCs und MO-MDSCs

Die Graphen stellen den in der FACS-Analyse für die entsprechende Zellpopulation ermittelten prozentualen Anteil der iMC- bzw. MDSC-Subpopulationen an den gesamten Splenozyten dar.

4.2. Verstärkte Immunsuppressivität der MDSC-Subpopulationen im C26-Tumormodell

Im Anschluss an den Nachweis der quantitativen Zunahme beider MDSC-Subpopulationen unter C26-Tumorinduktion war es von Interesse, inwieweit sich die Suppressivität der PMN-MDSCs und MO-MDSCs gegenüber der Funktion der entsprechenden $CD11b^+Gr\text{-}1^+$ iMCs aus tumorfreien Tieren unterscheidet.

Eine Aktivierung von $CD11b^+Gr\text{-}1^+$ Zellen unter dem Einfluss einer Tumorerkrankung mit der Folge einer verstärkten Suppressivität ist bekannt (Kusmartsev et al. 2004), Für die Definition dieser Zellen als MDSCs ist die hemmende Aktiviät gegenüber T-Zellen neben dem myeolischen Ursprung und dem Zustand der Unreife sogar als *conditio sine qua non* zu betrachten (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Die Frage nach eventuellen Unterschieden zwischen PMN-MDSCs und MO-MDSCs bei der tumorbedingten Steigerung der Suppressivität wurde jedoch bisher für kein Tumormodell befriedigend dargestellt.

Voraussetzung für den Erhalt der Daten zur hemmenden Aktivität der MDSC-Subpopulationen war einerseits die Etablierung einer zuverlässigen Methode zur Isolation von PMN-MDSCs und MO-MDSCs bzw. der entsprechenden iMCs aus murinen Splenozyten. Außerdem war die Entwicklung eines geeigneten Kokultivierungsassays notwendig, um die Hemmung der isolierten MDSC-Subpopulationen gegenüber der Aktivität von T-Zellen bestimmen zu können.

4.2.1. Entwicklung eines dreischrittigen MACS-Protokolls zur Isolation von PMN-MDSCs und MO-MDSCs aus Splenozyten

Für die Entwicklung eines Protokolls zur Isolation von PMN-MDSCs und MO-MDSCs bzw. entsprechender iMCs aus Splenozyten nutzten wir die unterschiedliche Expression der Oberflächenmarker Ly6G und Ly6C durch die beiden Subpoplationen. Entsprechend ihrer Expression sollten isolierte PMN-MDSCs ($CD11b^+Gr\text{-}1^+Ly6G^{high}Ly6C^{int}$) und MO-MDSCs ($CD11b^+Gr\text{-}1^+Ly6G^{int}Ly6C^{high}$) bzw. die entsprechenden Subpopulationen der iMCs gewonnen werden.

Dies gelang mit Hilfe eines dreischrittigen MACS-Protokolls (Abb. 9): In einem ersten Schritt wurden aus murinen Splenozyten dendritische Zellen (CD11c-Antikörper) und B-Zellen (CD19-Antikörper) depletiert, was zu einer Anreicherung von $Gr\text{-}1^+/CD11b^+$ Zellen im Durchfluss führte. Der prozentuale Anteil der nachweisbaren MDSCs an dem vorliegenden Splenoztengemisch konnte dadurch deutlich gesteigert werden (Abb. 9A).

Anschließend wurden in einem zweiten Schritt aus diesem Durchfluss Ly6G^{high} PMN-MDSCs unter Verwendung eines anti-Ly6G Antikörpers gewonnen. Im Rahmen des letzten Schrittes der Aufreinigung können Ly6C^{high} MO-MDSCs über die Verwendung eines anti-Gr-1 Antikörpers aus dem Durchfluss des zweiten Schrittes positiv selektiert werden. Dies ist möglich, da der Oberflächenmarker Gr-1 die beiden Epitope Ly6G und Ly6C umfasst und im vorangehenden Schritt die Ly6G^{high} PMN-MDSCs dem Zellgemisch bereits entnommen wurden.

Insgesamt konnten aus einer Milz (ca. $4*10^7$ Splenozyten) ungefähr jeweils $2*10^6$ Zellen der beiden MDSC-Subpopulationen zur weiteren Untersuchung gewonnen werden. Zur Untersuchung der Anwendbarkeit des von uns etablierten Aufreinigungsprotokolls wurde die Reinheit der angereicherten Populationen routinemäßig mittels Durchflusszytometrie überprüft.

Die als PMN-MDSCs definierten CD11b$^+$Ly6G$^+$ Zellen machten in einer beispielhaften Kontrolle der Reinheit des verwendeten Aufreinigungsprotokolls 81,9 % der CD11b$^+$Gr-1$^+$ Zellen innerhalb der als PMN-MDSCs verwendeten Zellfraktion aus. In der als MO-MDSCs verwendeten Zellfraktion sind 79,2 % der CD11b$^+$Gr-1$^+$ Zellen CD11b$^+$Ly6C^{hi}.

Es ist zu erwähnen, dass die mehrstufige MACS-Aufreinigung der Splenozyten zu einer Absättigung der Epitope auf den MDSCs führt. Die tatsächliche Reinheit der MDSC-Subpopulationen wird somit unterschätzt und ist vermutlich entsprechend höher als tatsächlich gemessen. Eine Verwendung der aufgereinigten Zellfraktionen als PMN-MDSCs bzw. MO-MDSCs war im Hinblick der beschriebenen Ergebnisse somit im Folgenden möglich.

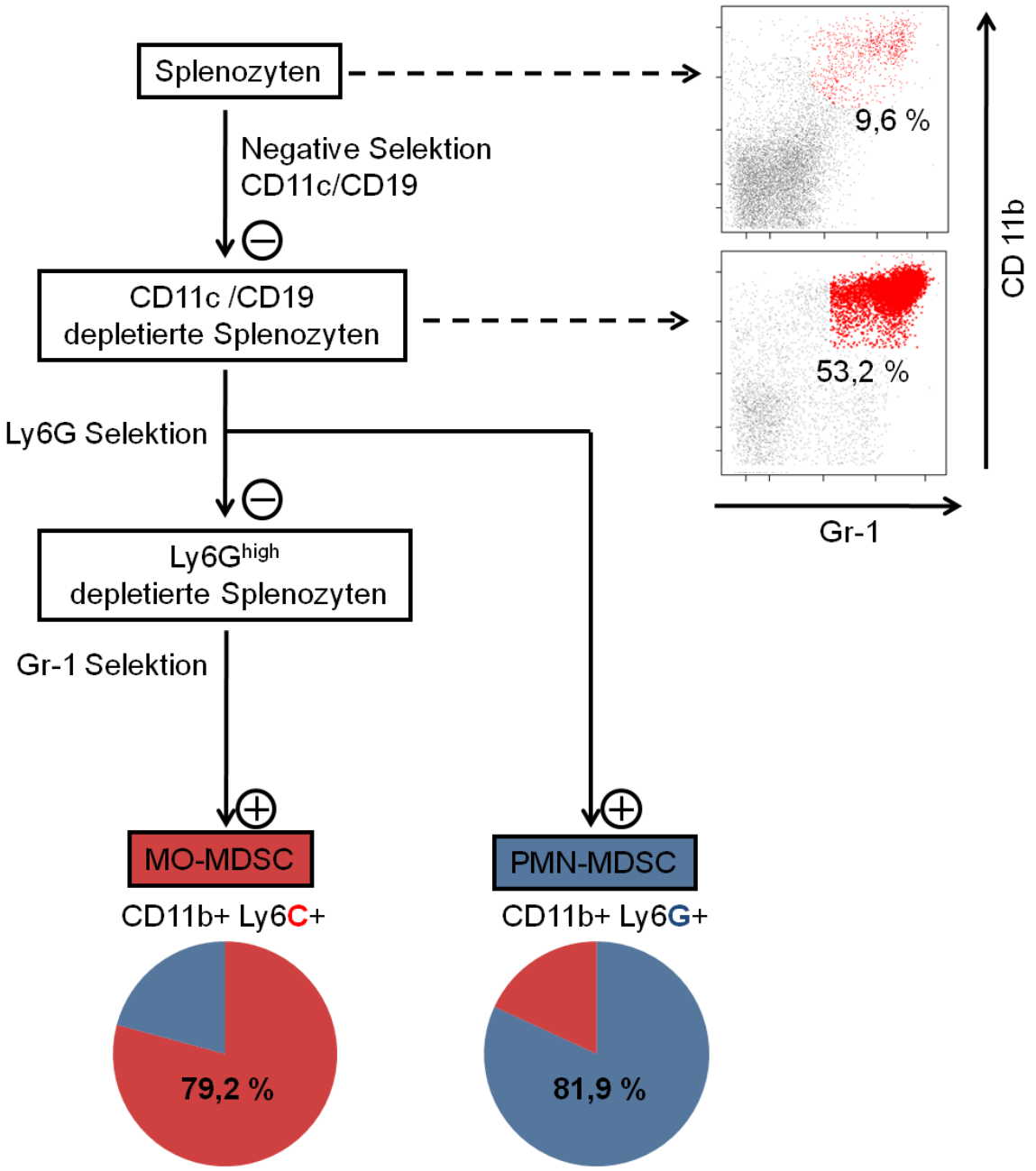


Abbildung 9: Dreischrittiges MACS-Protokoll zur Aufreinigung von MDSC-Subpopulationen

Das von uns etablierte dreischrittige MACS-Protokoll zur Separation von MO-MDSCs und PMN-MDSCs aus Splenozyten ist schematisch als Flussdiagramm dargestellt. Abhängig von den eingesetzten Splenozyten kann es unverändert auch für PMN-iMCs und MO-iMCs verwendet werden. Positive MACS-Selektion ist mit (+), negative MACS-Selektion mit (-) bezeichnet. Auf der rechten Seite ist die Anreicherung der durch den ersten MACS-Schritt im Vergleich zum Anteil an den ursprünglichen Splenozyten durch FACS-Bilder dargestellt. Die Kreisdiagramme stellen den erzielten Anteil der jeweiligen MDSC-Subpopulationen an den $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}$ Zellen innerhalb der entsprechend verwendeten Zellpopulation dar, wobei MO-MDSCs rot, PMN-MDSCs hingegen blau hervorgehoben sind.

4.2.2. Etablierung von Suppressionsassays zum Nachweis der suppressiven Funktion der MDSC-Subpopulationen

Zur Untersuchung der hemmenden Aktivität von MDSC-Subpopulationen gegenüber T-Zellen war ein geeigneter Kokultivierungsansatz zu etablieren. Wir kultivierten MO-MDSCs und PMN-MDSCs bzw. die entsprechenden iMCs gemeinsam mit murinen Splenozyten für 72 h. Dabei erfolgte zu Beginn der Kokultivierung eine Stimulation der sich unter den Splenozyten befindlichen T-Zellen mit CD3/CD28-beads. Die Aktivierung von T-Zellen über die Verwendung von an beads gekoppelten CD3- und CD28-Antikörpern imitiert über die Stimulation des T-Zell-Rezeptors (CD3) und der Vermittlung kostimulierender Signale (CD28) die physiologische polyklonale Aktivierung von T-Zellen (Trickett et al. 2003). Für Zellen, die wie MDSCs die entsprechenden Oberflächenmarker nicht exprimieren, ist eine Aktivierung durch CD3/ CD28 beads nicht zu erwarten.

Die initiierte Proliferation der T-Zellen wird durch die immunsuppressive Wirkung der zugegebenen MDSC-Subpopoulationen *in vitro* gehemmt. Zwei verschiedene Verfahren zur quantitativen Bestimmung der T-Zell-Proliferation bzw. ihrer durch myeloische Suppressorzellen bedingten Hemmung wurden von uns auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. Einerseits kann durch die Konzentration des bei der Proliferation der T-Zellen in die DNA integrierten Nukleotidanalogons BrdU die Expansion der aktivierten T-Zellen direkt bestimmt werden.

Andererseits zählt neben der Zellproliferation die Produktion von Zytokinen zu den wichtigsten Effektorfunktionen aktivierter T-Zellen. Eine Untersuchung der durch MDSCs gegebenenfalls gehemmten Zytokinsekretion der aktivierten T-Zellen wird anhand des wichtigen proinflammatorischen Th1-Zytokins Interferon gamma (IFNγ) durchgeführt. Die IFNγ-Produktion bzw. ihre Hemmung kann immunologisch mittels ELISA bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Anwendbarkeit der beiden gewählten Methoden wurden sie im Rahmen der Auswertung eines ersten Kokultivierungsversuches getestet. Hierbei verwendeten wir murine Splenozyten aus tumorfreien BALB/c-Mäusen sowie PMN-MDSCs und MO-MDSCs aus nicht therapierten, C26-tumortragenden Mäusen.

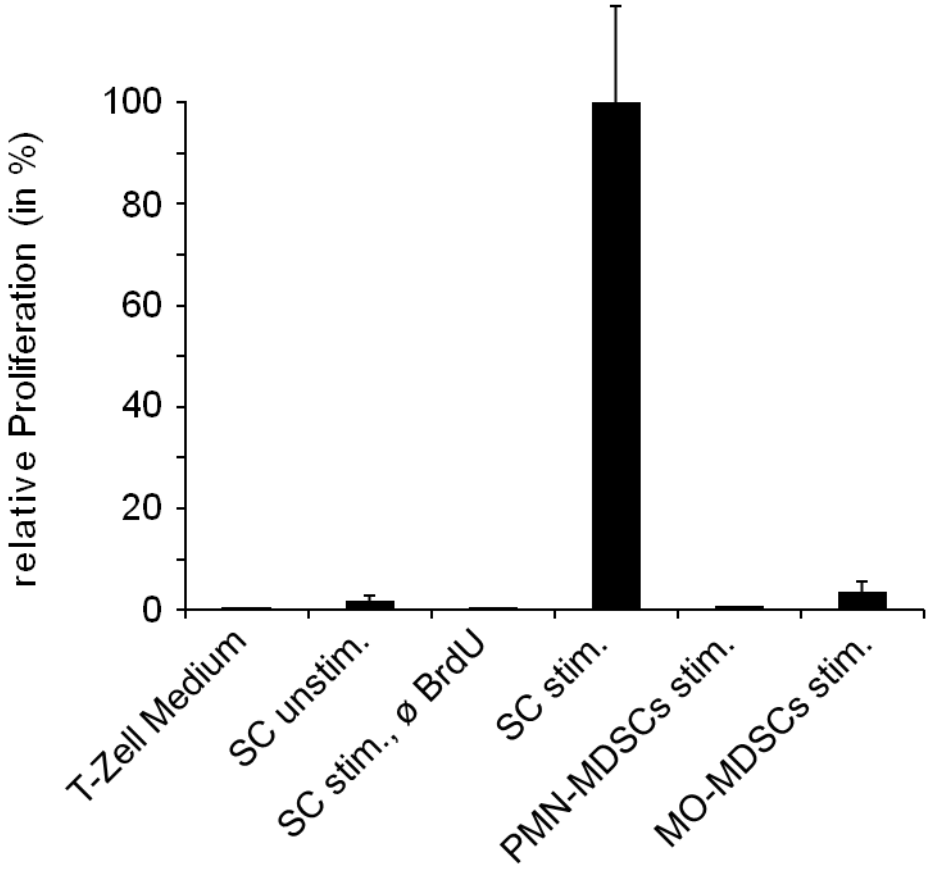


Abbildung 10: MDSC-Subpopulationen werden durch CD3/CD28-beads nicht zur Proliferation stimuliert

Messung der Proliferation im BrdU-Kokultivierungsassay. Die Daten sind als relative Proliferation dargestellt. Proliferation von Splenozyten ohne die Zugabe von MDSCs ist auf 100% gesetzt. Als weitere Kontrollbedingungen dienten: Medium alleine, unstimulierte Splenozyten, stimulierte Splenozyten ohne Zugabe von BrdU sowie jeweils stimulierte PMN-MDSCs und MO-MDSCs.

Wie Abb. 10 ersichtlich macht, hat sich die Bestimmung der BrdU-Aufnahme durch stimulierte T-Zellen als geeignete Auswertungsmethode des Kokultivierungsassays erwiesen. Murine Splenozyten zeigten aufgrund der enthaltenen T-Zellen erwartungsgemäß eine deutliche Antwort auf CD3/CD28 beads, während die beiden Subpopulationen der MDSCs keine Proliferation zeigten. Die betrachteten Kontrollbedingungen „Medium alleine“, „unstimulierte Splenozyten“ sowie „Splenozyten ohne Zugabe von BrdU“ zeigten erwartungsgemäß keine Proliferation.

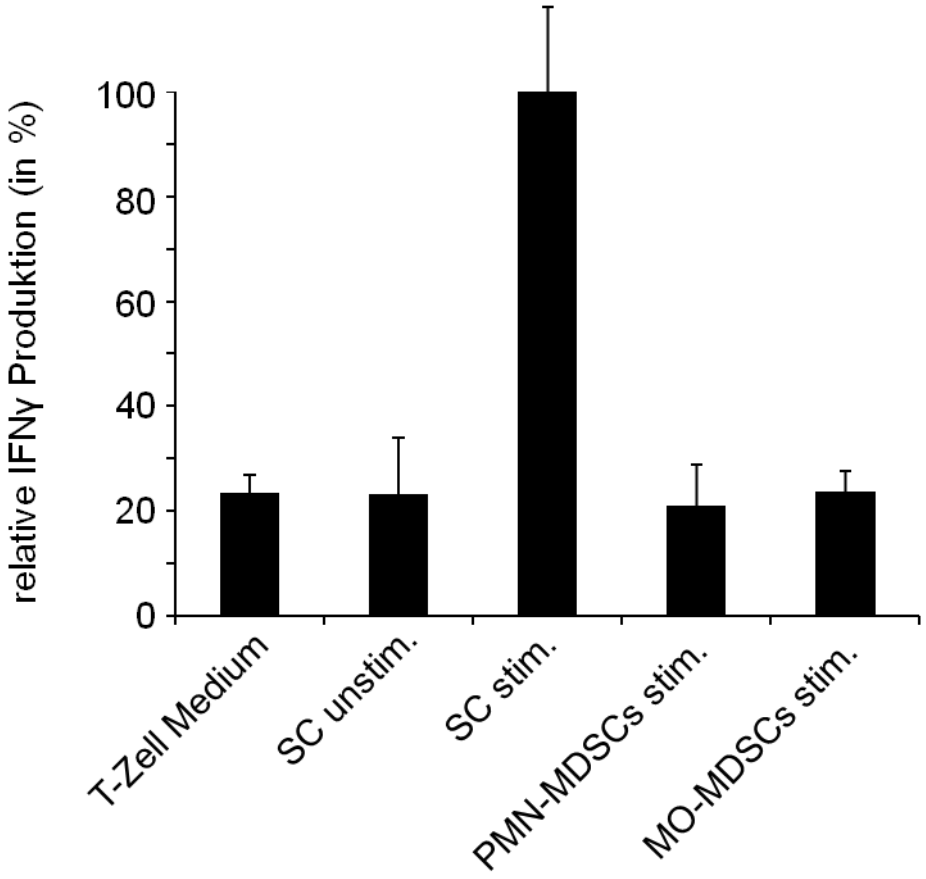


Abbildung 11: Keine IFNγ-Produktion durch MDSC-Subpopulationen nach CD3/CD28-bead-Stimulation

Die Daten sind als relative Zytokinproduktion dargestellt. Die IFNγ-Produktion durch stimulierte Splenozyten ist auf 100% gesetzt. Als weitere Kontrollbedingungen für die IFNγ-Produktion dienten: Medium allein, unstimulierte Splenozyten, stimulierte PMN-MDSCs sowie stimulierte MO-MDSCs.

Auch in der Auswertung des Kokultivierungsassays mithilfe des IFNγ-ELISAs wurde für die Kontrollbedingungen „Medium alleine“ und „unstimulierte Splenozyten“ eine relevante Zytokinprodution ausgeschlossen (Abb. 11). Die Überprüfung der Frage, ob stimulierte PMN-MDSCs und MO-MDSCs alleine in der Lage sind, IFNγ zu produzieren, führte ebenfalls nicht zu höheren Werten als für unstimulierte SCs beobachtet wurden.

Das durch beide Auswertungsmethoden erfasste Ergebnis dieses Vorversuches bestätigte außerdem, dass die im Rahmen der von uns etablierten dreistufigen MACS-Aufreinigung gewonnenen Subpopulationen der MDSCs nicht durch T-Zellen kontaminiert sind, was auch durch entsprechende FACS-Messungen bestätigt wurde. Auf diese Weise gewonnene PMN-MDSCs und MO-MDSCs können somit in den weiteren Versuchen Verwendung finden.

Die Spezifität der CD3/CD28-vermittelten Stimulation von T-Zellen und die nachgewiesene Anwendbarkeit des etablierten Kokultivierungsassays erlauben es, die beobachtete Splenozytenproliferation in den Kokultivierungsansätzen mit der Proliferation der enthaltenen T-Zellen gleichzusetzen. Auf eine Verwendung isolierter T-Zellen zugunsten der unkomplizierter zu gewinnenden Splenozyten kann folglich verzichtet werden. In allen folgenden Kokultivierungsassays wurden die jeweiligen Kontrollbedingungen für beide Auswertungsmethoden mitbestimmt und waren stets unauffällig.

4.2.3. Stärkere Suppression von T-Zellen durch PMN-iMCs als durch MO-iMCs

Um den Effekt der C26-Tumorinduktion auf die suppressive Wirkung der Subpopulationen der myeloischen Suppressorzellen zu untersuchen, wurden zunächst PMN-iMCs und MO-iMCs aus naiven, nicht tumortragenden BALB/c-Mäusen (n = 4) in verschiedenen Konzentrationen (Verhältnis von iMCs zu Splenozyten 1:8 bis 1:1) zu mit Hilfe von CD3/ CD28-beads stimulierten T-Zellen (im Splenozytengemisch) hinzugefügt. Die Suppressivität der iMC-Subpopulationen wurde als Referenzwert für eine eventuelle Suppressivitätssteigerung der PMN-MDSCs und MO-MDSCs durch C26-Tumorinduktion bestimmt.

Wie Abb. 12 zu entnehmen ist, führen sowohl PMN-iMCs als auch MO-iMCs in allen verwendeten Konzentrationen zu einer Reduktion der Proliferationsrate der kokultivierten T-Zellen gegenüber stimulierten SCs ohne die Zugabe von iMCs. Insbesondere für PMN-iMCs ist eine mit zunehmender Konzentration stärkere Wirkung zu beobachten. Bei MO-iMCs ist die Dosisabhängigkeit hingegen schwächer ausgeprägt.

In hohen Konzentrationen (Verhältnisse 1:1 und 1:2) ist der Effekt der PMN-iMCs zudem stärker als der der MO-iMCs. In niedrigen Konzentrationen (Verhältnisse 1:4 und 1:8) ist hingegen kein wesentlicher Unterschied zwischen PMN-iMCs und MO-iMCs in Bezug auf die hemmende Wirkung gegenüber der T-Zell-Proliferation festzustellen.

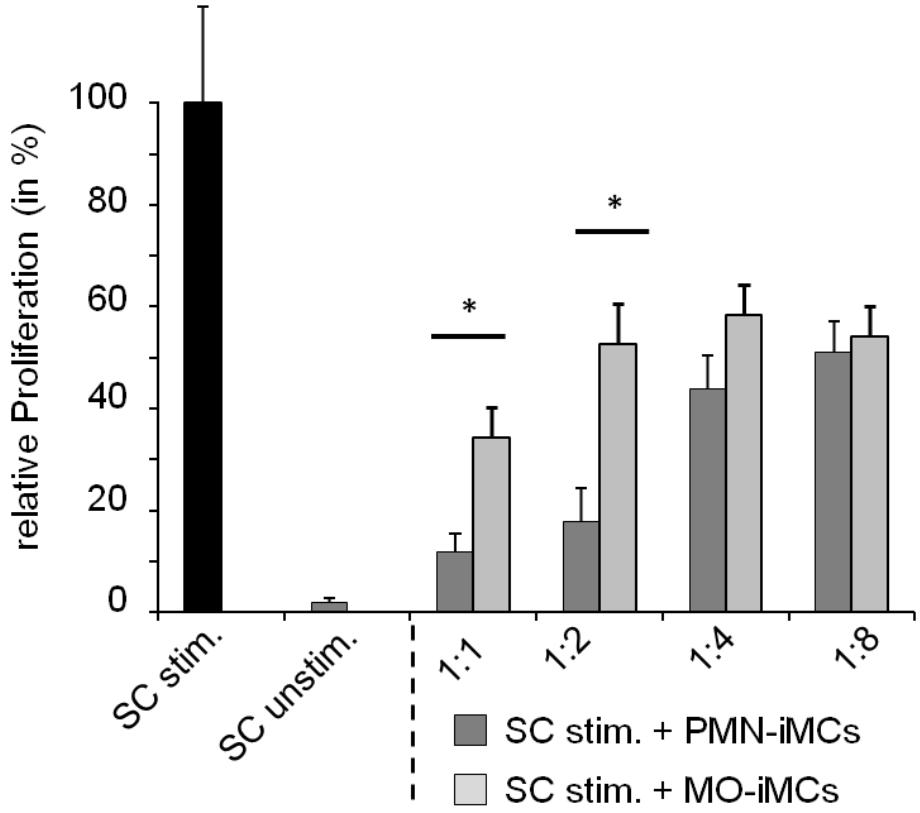


Abbildung 12: iMC-Subpopulationen aus tumorfreien Mäusen unterdrücken die T-Zell-Proliferation

PMN-iMCs aus nicht tumortragenden Mäusen (dunkelgraue Säulen) wurden mit MO-iMCs aus nicht tumortragenden Mäusen (hellgraue Säulen) in Bezug auf ihre supprimierende Funktion gegenüber der Proliferation von T-Zellen verglichen. Es wurde jeweils stimulierten Splenozyten mit der entsprechenden iMC-Subpopulation im angegebenen Verhältnis zusammengeführt. Schwarze Säulen: Stimulierte SCs (Positivkontrolle), unstimulierte SCs (Negativkontrolle).

Zusätzlich wurde der beschriebene Kokultivierungsversuch hinsichtlich der Hemmung der IFNγ-Produktion durch T-Zellen untersucht. PMN-iMCs führten bezüglich dieses Pararmeters dosisabhängig zu einer starken Unterdrückung kokultivierter T Zellen. MO-iMCs hingegen zeigen weit geringere suppressive Fähigkeiten. Es ist ausserdem für MO-iMCs keine Dosisabhängigkeit zu erkennen. Insbesondere die geringe IFNγ-Produktion für die niedrigste eingesetzte Konzentration an MO-iMCs (1:8), sowie der für das Verhältnis 1:4 bestimmte Wert, der den Referenzwert stimulierter Splenozyten übersteigt, laufen dem zuwider.

Analog den Ergebnissen des BrdU-Proliferationsassays war bei höherer verwendeter Konzentration der iMC-Subpopulationen zudem ein Unterschied zwischen PMN-iMCs und MO-iMCs (Verhältnisse 1:1, 1:2 und 1:4) nachweisbar.

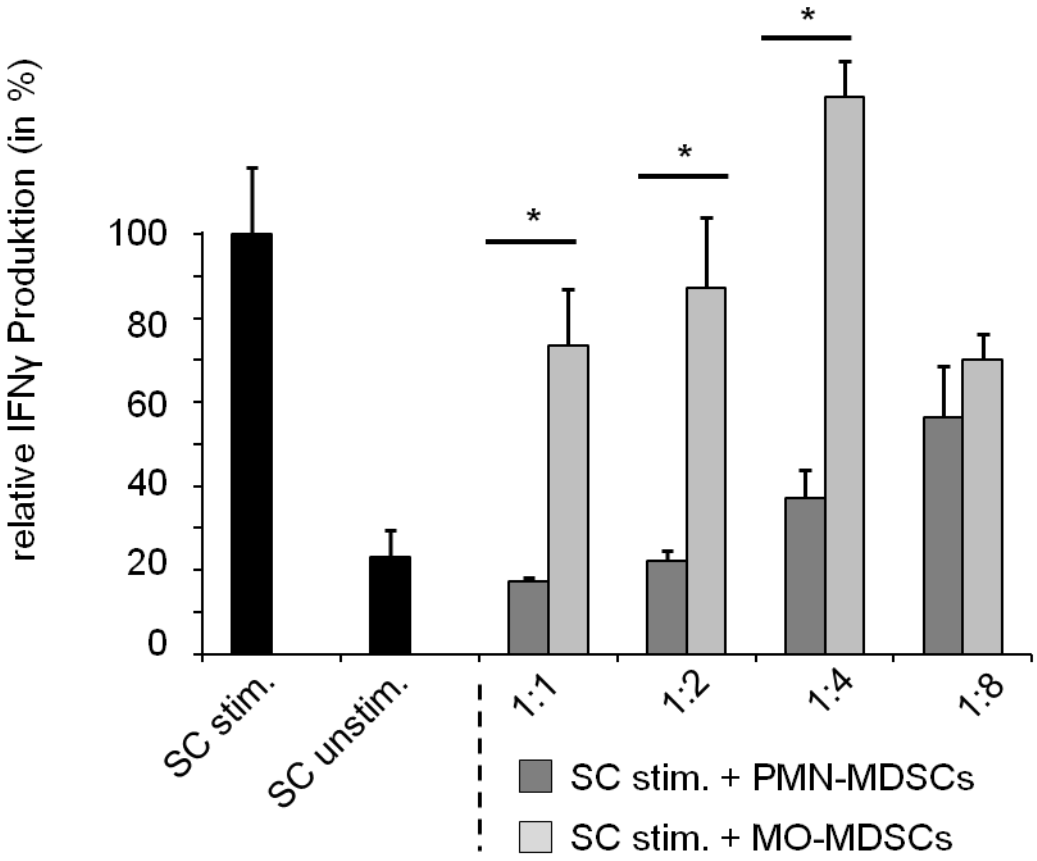


Abbildung 13: PMN-iMCs aus tumorfreien Mäusen unterdrücken die IFNγ-Produktion stärker als MO-iMCs

PMN-iMCs aus nicht tumortragenden Mäusen (dunkelgraue Säulen) wurden mit MO-iMCs aus nicht tumortragenden Mäusen (hellgraue Säulen) in Bezug auf ihre supprimierende Funktion gegenüber der IFNγ-Produktion von T-Zellen verglichen. Es wurden jeweils stimulierte Splenozyten mit der entsprechenden MDSC-Subpopulation im angegebenen Verhältnis zusammengeführt. Schwarze Säulen: Stimulierte SCs (Positivkontrolle), unstimulierte SCs (Negativkontrolle).

4.2.4. Verstärkung der hemmenden Funktion der MDSC-Subpopulationen durch C26-Tumorinduktion

Es ist bekannt, dass das Vorliegen eines Tumors zu einer Expansion und zu einer veränderten Funktion der $CD11b^{+}Gr\text{-}1^{+}$-Zellen führt. Diese werden dann definitionsgemäß als MDSCs bezeichnet (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Anhand eines weiteren Kokultivierungsansatzes haben wir deshalb die Auswirkung der Induktion eines C26-Tumors speziell auf die immunsuppressiven Eigenschaften der beiden Subpopulationen der MDSCs untersucht.

Dazu wurden die supprimierenden Eigenschaften von PMN-iMCs und MO-iMCs aus tumorfreien Mäusen und von entsprechenden MDSC-Subpopulationen aus C26-Tumortieren zunächst mit Hilfe eines BrdU-Assays miteinander verglichen (Abb. 14, Abb. 15). Die verwendeten PMN-MDSCs und MO-MDSCs wurden an Tag 18 nach C26-Tumorinduktion aus untherapierten Mäusen (n = 5) gewonnen, die alle zu diesem Zeitpunkt einen soliden Tumor aufwiesen (siehe Abb. 18).

Wie Abb. 14 zu entnehmen ist, führten beide Subpopulationen der MDSCs ebenso wie die entsprechenden iMCs aus tumorfreien Tieren in allen verwendeten Konzentrationen zu einer Reduktion der Proliferation aktivierter T-Zellen. PMN-MDSCs aus C26 Mäusen wiesen in allen eingesetzten Konzentrationen eine stärkere Suppression gegenüber der T-Zell-Proliferation auf als die entsprechenden PMN-iMCs. Selbst in der niedrigsten getesteten Konzentration (Verhältnis 1:8) war bei Verwendung von PMN-MDSCs die T-Zell-Proliferation fast vollständig unterdrückt (Reduktion: 91 ± 1%). Dem steht eine Proliferationshemmung von 49 ± 6% bei Verwendung von PMN-iMCs im entsprechenden Verhältnis gegenüber. Aufgrund der sehr starken hemmenden Eigenschaften der PMN-MDSCs auch in niedrigen Konzentrationen konnte eine Dosisabhänigigkeit dieser Eigenschaft für diesen Zelltyp jedoch nicht aus den Ergebnissen abgeleitet werden.

Für MO-MDSCs konnte der Effekt einer gesteigerten Suppressivität ebenfalls festgestellt werden: Hier führten hohe Konzentrationen (Verhältnisse Splenozyten zu MO-MDSCs 1:1 und 1:2) zu einer im Vergleich zu PMN-MDSCs ähnlich starken Hemmung der T-Zell-Proliferation. Es bestand bei diesen Dosen ein nachweisbarer Unterschied zur hemmenden Wirkung entsprechend konzentrierter MO-iMCs. Für niedrige Konzentrationen (Verhältnisse 1:4 und 1:8) war jedoch kein Unterschied zwischen der durch MO-MDSCs und MO-iMCs bedingten Hemmung der Proliferation von Splenozyten nachweisbar. Eine Dosisabhängigkeit der Suppressivität gegenüber aktivierten T-Zellen deutet sich für MO-MDSCs aus den Ergebnissen jedoch an.

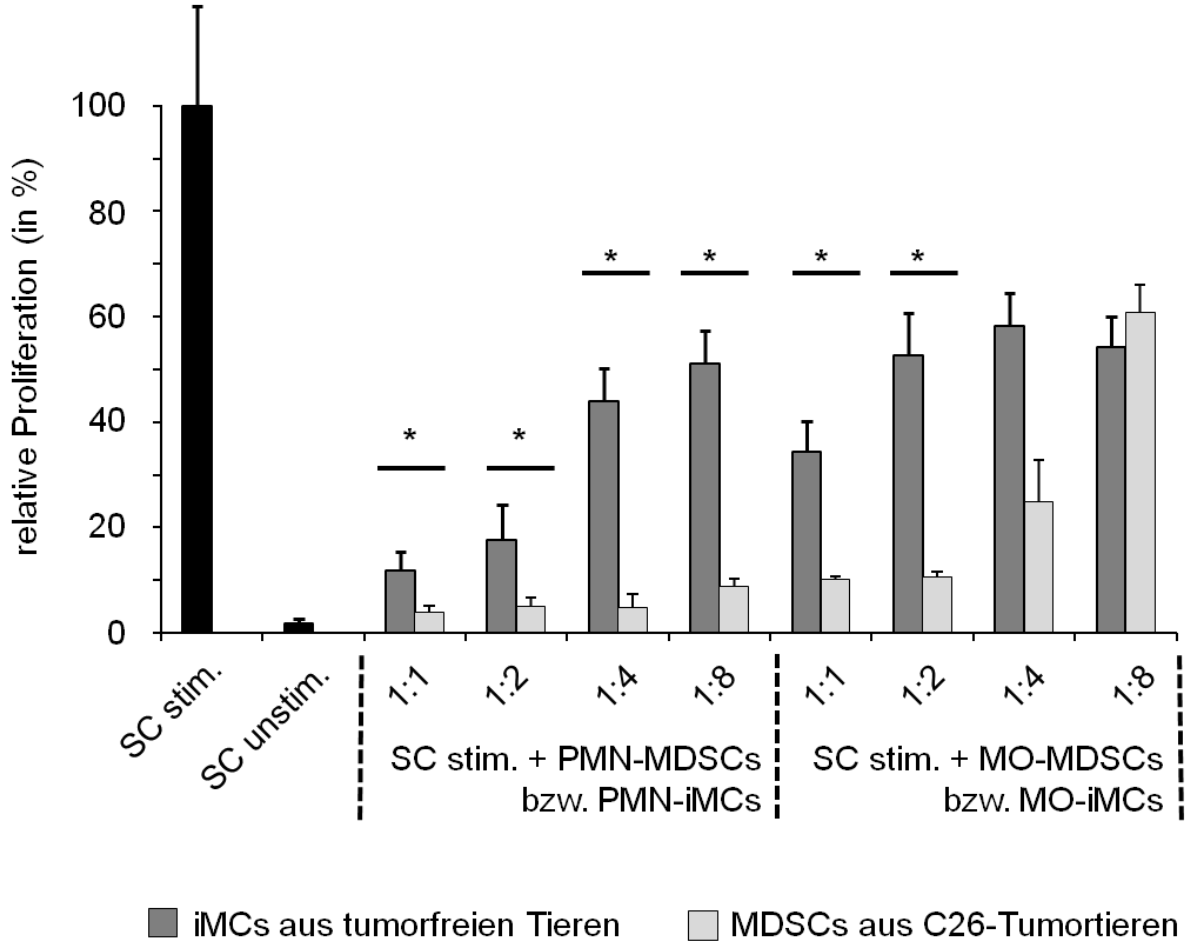


Abbildung 14: In C26-tumortragenden Mäusen sind PMN-MDSCs und MO-MDSCs stärker hemmend als die iMC-Subpopulationen aus tumorfreien Tieren

MDSCs aus C26-Tumormäusen wurden mit iMCs aus naiven Tieren in Bezug auf ihre supprimierende Kapazität gegenüber T-Zellen verglichen. Positivkontrolle: stimulierte Splenozyten; Negativkontrolle: unstimulierte Splenozyten (schwarze Säulen). Hellgraue Säulen: Stimulierte Splenozyten + MDSCs. Dunkelgraue Säulen: Stimulierte Splenozyten + iMCs.

Der Einfluss einer C26-Tumorinduktion auf CD11b-Gr-1 Zellen wurde von uns anschließend auch in Hinblick auf etwaige Änderungen der Suppressivität gegenüber der IFNγ-Produktion aktivierter T-Zellen untersucht (Abb. 15). Insgesamt betrachtet hemmen sowohl PMN-MDSCs als auch MO-MDSCs die IFNγ-Produktion in allen eingesetzten Konzentrationen. Eine stärkere Wirkung von PMN-MDSCs gegenüber der Wirkung von PMN-iMCs ist hier jedoch lediglich für die niedrigste Zellkonzentration (1:8) festzustellen (Relative IFNγ-Produktion 29 ± 6% (PMN-MDSCs) versus 56 ± 12% (PMN-iMCs). Hierbei ist jedoch zu

berücksichtigen, dass die von aktivierten T-Zellen ausgehende IFNγ-Produktion durch naive PMN-iMCs in höheren Konzentrationen bereits auf das Niveau der Negativkontrollen reduziert werden konnte.

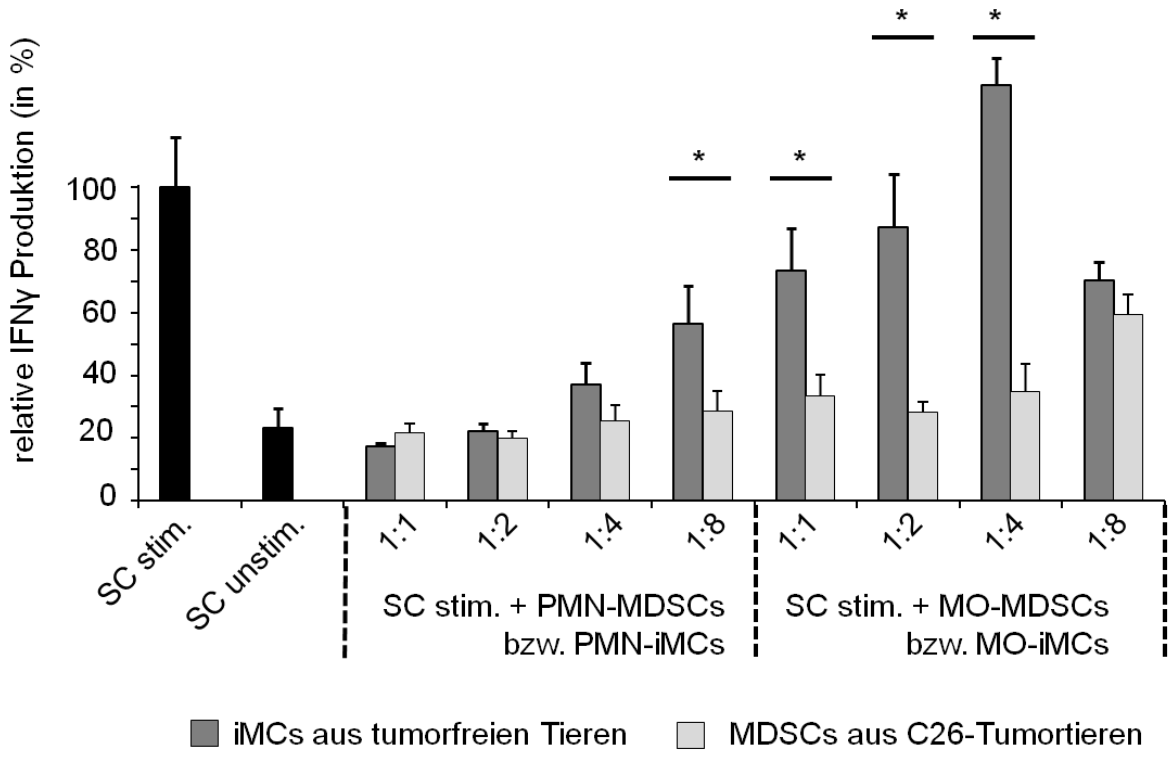


Abbildung 15: Durch MDSC-Subpopulationen aus C26-tumortragenden Mäusen erfolgt eine verstärkte Hemmung der IFNγ-Produktion

iMCs aus naiven Mäusen sowie MDSCs aus C26-Tumormäusen wurden jeweils mit CD3/CD28-beads stimulierten Splenozyten aus naiven Tieren kokultiviert. Die IFNγ-Produktion wurde mittels ELISA bestimmt. Positivkontrolle: stimulierte Splenozyten, Negativkontrolle: unstimulierte Splenozyten (schwarze Säulen). Dunkelgraue Säulen: Stimulierte Splenozyten + iMCs. Hellgraue Säulen: Stimulierte Splenozyten + MDSCs.

MO-iMCs hingegen zeigen keine vergleichbar starke Hemmung der T-Zell-Produktivität. Durch C26-Tumorinduktion wurde aber für MO-MDSCs eine deutliche Steigerung der Suppression der IFNγ-Produktion bedingt. Eine stärkere Suppressivität der MO-MDSCs gegenüber der Suppressivität entsprechender iMCs trat für alle verwendeten Verhältnisse außer der niedrigsten eingesetzen Konzentration (Verhältnis 1:8) auf. Die relative Hemmung der IFNγ-Produktion durch MO-MDSCs erreichte in hohen Konzentration (Verhältnisse 1:1 bis 1:4) fast das durch entsprechend eingesetzte PMN-MDSCs erreichte Niveau.

4.2.5. Stärkere Hemmung durch PMN-MDSCs als durch MO-MDSCs

Wie in den vorangehenden Experimenten ermittelt (siehe Abb. 12, Abb. 13), wirken PMN-iMCs gegenüber T-Zellen stärker hemmend als die entsprechenden MO-iMCs, sofern sie in hohen Konzentrationen eingesetzt werden (Verhältnisse iMCs zu Splenozyten 1:1, 1:2 und bzgl. IFNγ-Produktion zusätzlich Verhältnis 1:4).

Vergleicht man die für PMN-MDSCs und MO-MDSCs ermittelten Werte bezüglich der Hemmung von T-Zellen, ist festzustellen, dass auch die nach C26-Tumorinduktion gewonnen Subpopulationen der myeloischen Suppressorzellen unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Zur Verdeutlichung der Unerschiede zwischen den MDSC-Subpopulationen sind die schon in Abb. 14 und Abb. 15 dargestellten Daten in Abb. 16 in der direkten Gegenüberstellung zusammengefasst. Nach C26-Tumorinduktion sind in allen verwendeten Konzentrationen PMN-MDSCs stärker hemmend als MO-MDSCs. In niedrigen Konzentrationen ist der diesbezügliche Unterschied zwischen den beiden MDSC-Subpopulationen wegen der beschriebenen Dosisabhängigkeit von MO-MDSCs stärker ausgeprägt.

Betrachtet man die hemmende Wirkung auf die IFNγ-Produktion der T-Zellen, ist ein Unterschied zwischen PMN-MDSCs und MO-MDSCs nur für die Verhältnisse von MDSCs zu Spleonzyten von 1:8 und 1:1 klar nachweisbar. Auch für die anderen beiden eingesetzten Konzentrationen sind PMN-MDSCs stärker hemmend als MO-MDSCs, jedoch ist der Unterschied hier nicht signifkant.

Es fällt auf, dass die MDSC-Subpopulationen aus C26-tumortragenden Mäusen eine so starke hemmenden Funktion aufweisen, dass sowohl PMN-MDSCs als auch MO-MDSCs in hohen Dosen die T-Zell-Proliferation bzw. IFNγ-Produktion fast bis auf das Niveau der Negativkontrolle erniedrigen.

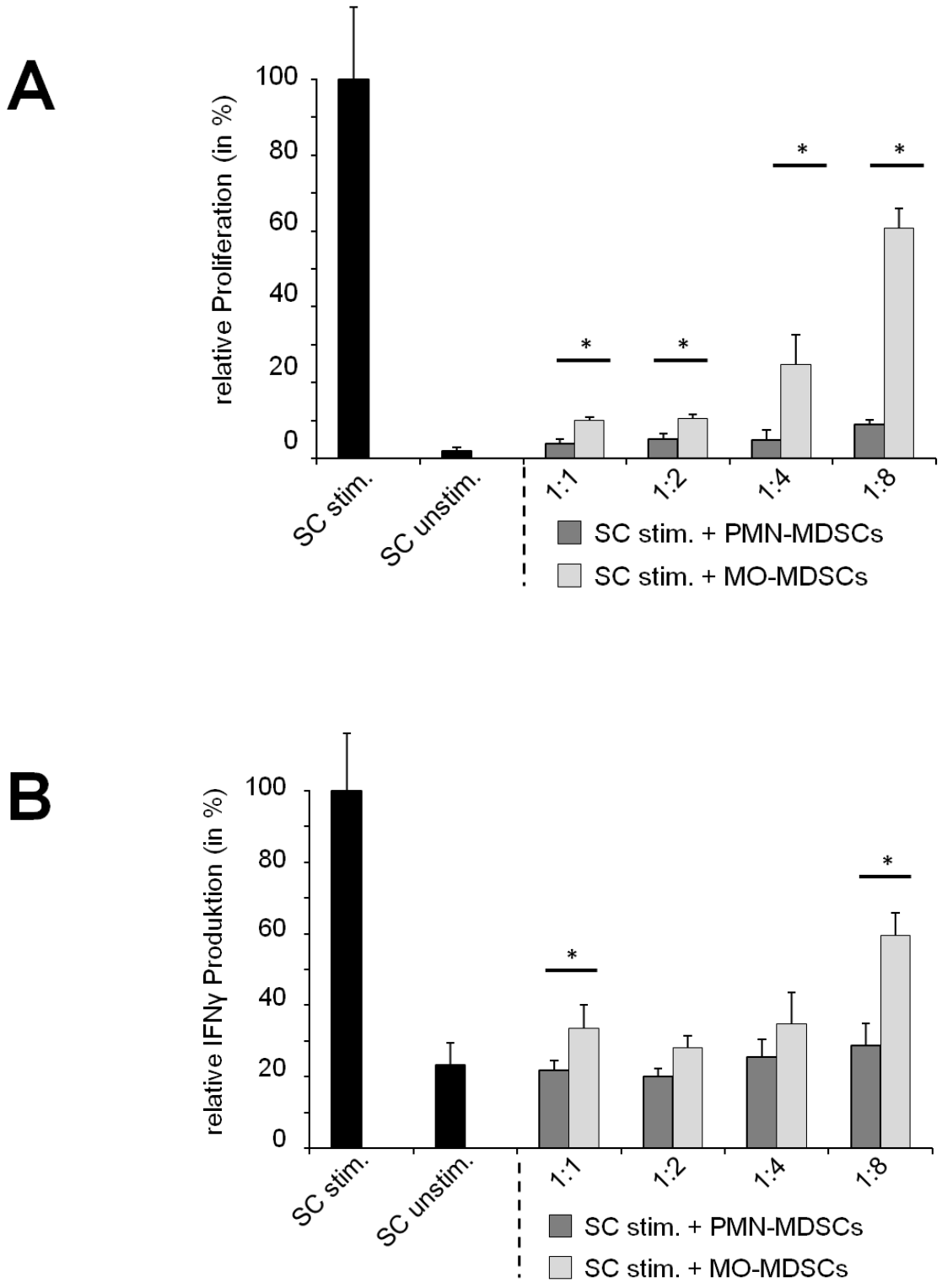


Abbildung 16: PMN-MDSCs aus C26-tumortragenden Mäusen zeigen eine stärkere immunsuppressive Wirkung als MO-MDSCs

Die beschriebenen Wirkungen der MDSC-Subpopulationen auf T-Zell Proliferation (Abb. 14) und IFNγ-Produktion (Abb. 15) sind hier zum direkten Vergleich nebeneinander dargestellt. Positivkontrolle: stimulierte Splenozyten, Negativkontrolle: unstimulierte Splenozyten (schwarze Säulen). **A) T-Zell-Proliferation B) IFNγ-Produktion**

4.3. Hemmender Effekt der Immuntherapie auf die suppressive Funktion der MDSC-Subpopulationen

4.3.1. Experimenteller Ansatz zur Untersuchung der Immuntherapie

Für die Untersuchung von MDSC-Subpopulationen nach immuntherapeutischer Stimulation des angeborenen Immunsystems wurde ein in unserem Labor etabliertes Tumormodell angewendet (Brunner et al. 2000; Heckelsmiller et al. 2002). Wie in Abb. 17 dargestellt, wurden hierzu BALB/c-Mäusen Zellen der C26-Kolonkarzinomlinie injiziert. Nach einer dreimaligen Therapie mit CpG (TLR9-Ligand) oder poly(I:C) (TLR3-Ligand) wurde das für die weiteren Untersuchungen notwendige Material aus den Mäusen gewonnen. Zusätzlich war es uns möglich, entsprechende Proben aus uns überlassenen C26-Tieren zu gewinnen, die zuvor in unserer Arbeitsgruppe mit 3P-RNA therapiert worden waren (Poeck et al. 2008).

Im Vordergrund des in Abb. 17 dargestellten Versuchsablaufes steht stets die Frage, wie sich die Tumortherapie mit CpG und poly(I:C) auf die myeloischen Suppressorzellen auswirkt. Hierbei sind erneut besonders die Unterschiede zwischen PMN-MDSCs und MO-MDSCs von besonderem Interesse.

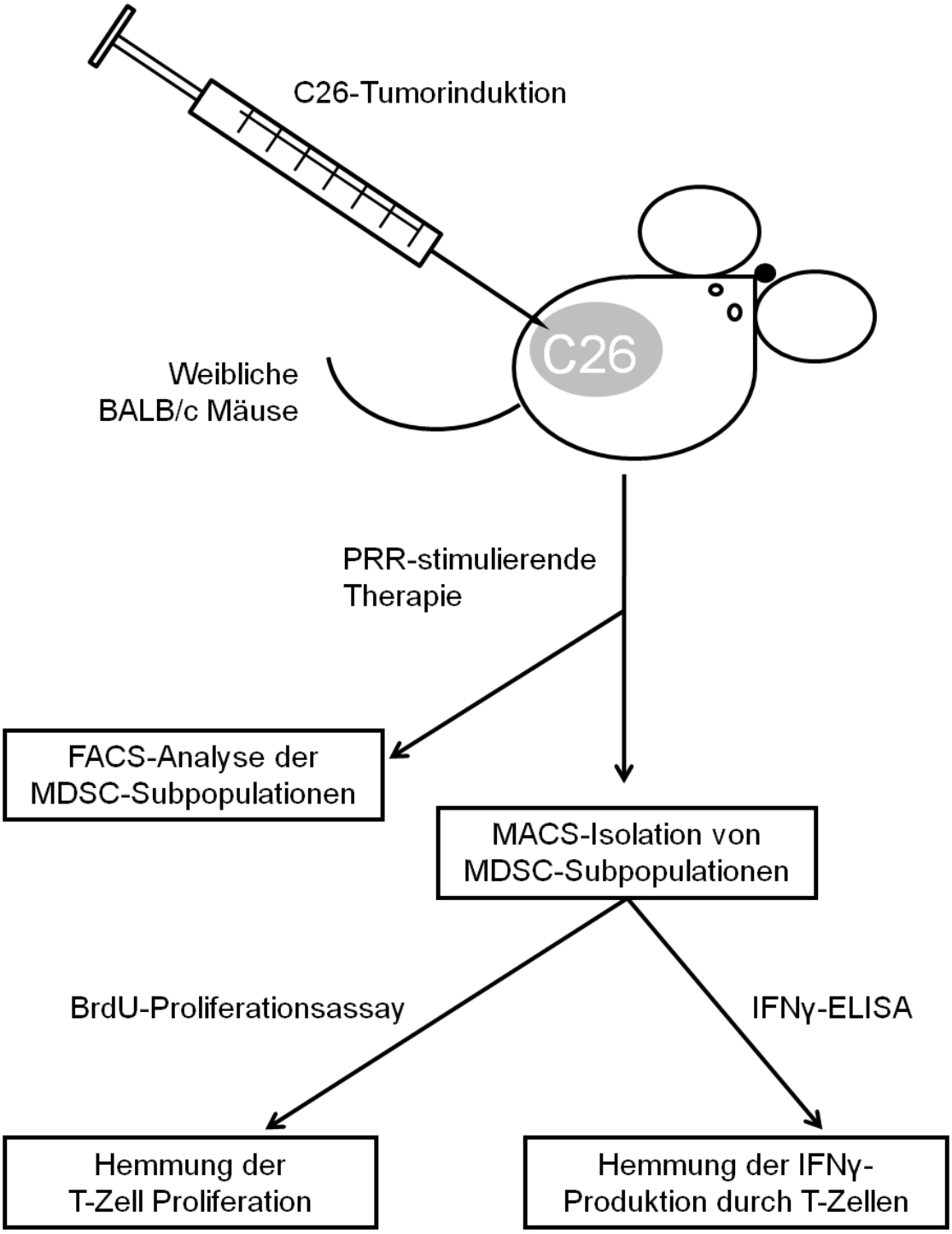


Abbildung 17: Untersuchung des Einflusses der Immuntherapie mit CpG und poly(I:C) auf die MDSC-Subpopulationen

Die zur Untersuchung der MDSC-Subpopulationen unter PRR-stimulierender Therapie gewählten Methoden sind hier zur Übersicht als Flussdiagramm dargestellt. Als Therapeutika wurden CpG und poly(I:C) verwendet. Darüber hinaus hatten wir Organe und Gewebe zur Verfügung, die aus C26-Mäusen stammten, die zuvor mit 3P-RNA behandelt worden waren. Als funktionelle Eigenschaften der MDSC-Subpopulationen waren ihre hemmende Wirkung auf die T-Zell-Proliferation sowie die Hemmung der IFNγ-Produktion durch T-Zellen von Interesse.

4.3.2. Rückgang des C26-Tumorwachstum unter PRR-Therapie

Eine subkutane Injektion der syngenen C26-Adenokarzinomzellline (Griswold et al. 1975) führte in den verwendeten BALB/c-Mäusen zu einem palpablen Tumor, dessen Fläche täglich gemessen wurde. Bei allen Tieren im Versuch bildete sich ein Tumor. Neben der Kontrollgruppe, in der keine therapeutische Behandlung erfolgte, wurden zwei Therapiegruppen gebildet, in denen als Aktivator des angeborenen Immunsystems CpG sowie poly(I:C) verwendet wurden.

Die Gruppenbildung erfolgte mit der ersten therapeutischen Intervention am Tag 10 und somit nachdem sich in allen Tieren Tumoren etabliert haben. Die in Abb. 18 dargestellten Werte für die Tumorgröße vor dem Tag 10 unterscheiden sich für die einzelnen, anschließend in verschieden Gruppen unterteilten Tiere dementsprechend nicht.

Eine dreimalige Injektion von CpG führte hingegen zu einer Reduktion der Tumorgröße ab dem 16. Tag. Bei Versuchsende an Tag 18 zur Organentnahme war die Tumorgröße im Vergleich zur nicht therapierten Kontrollgruppe deutlich verringert. Einen noch stärkeren Effekt wies die Behandlung mit poly(I:C) auf, wo bereits kurz nach der zweiten Injektion am 13. Tag ein Unterschied in der Tumorgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen war.

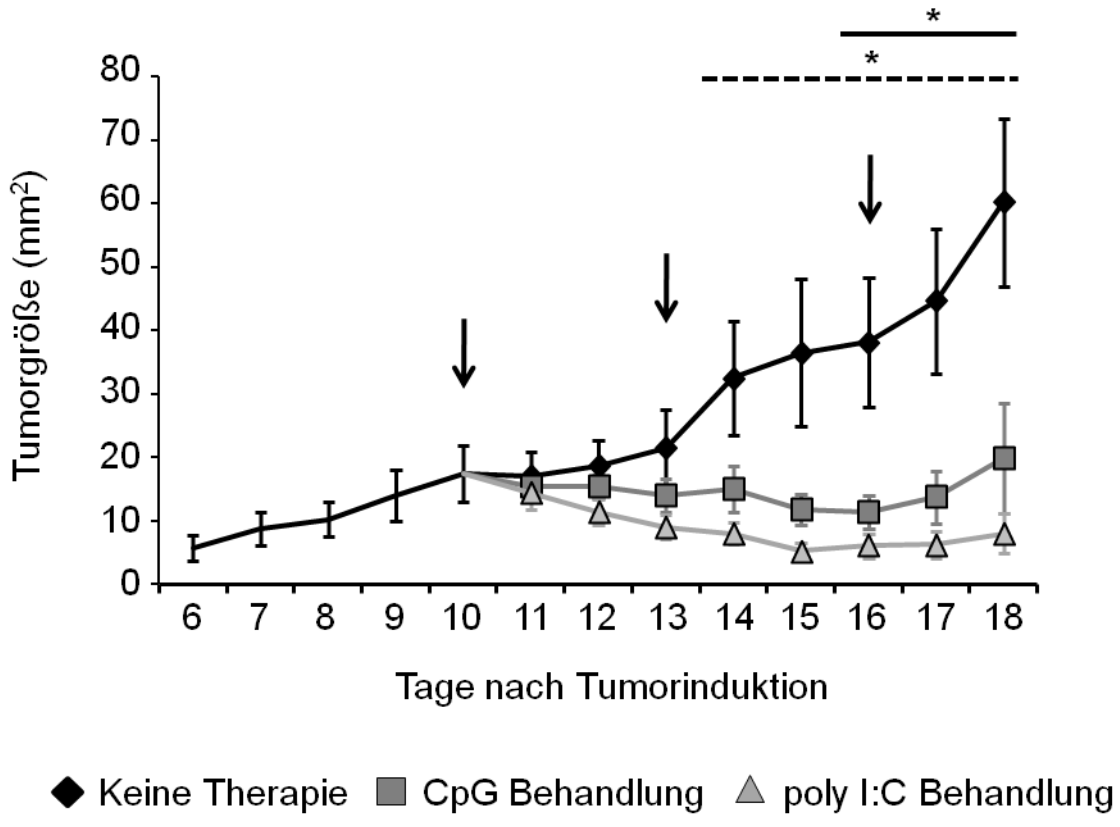


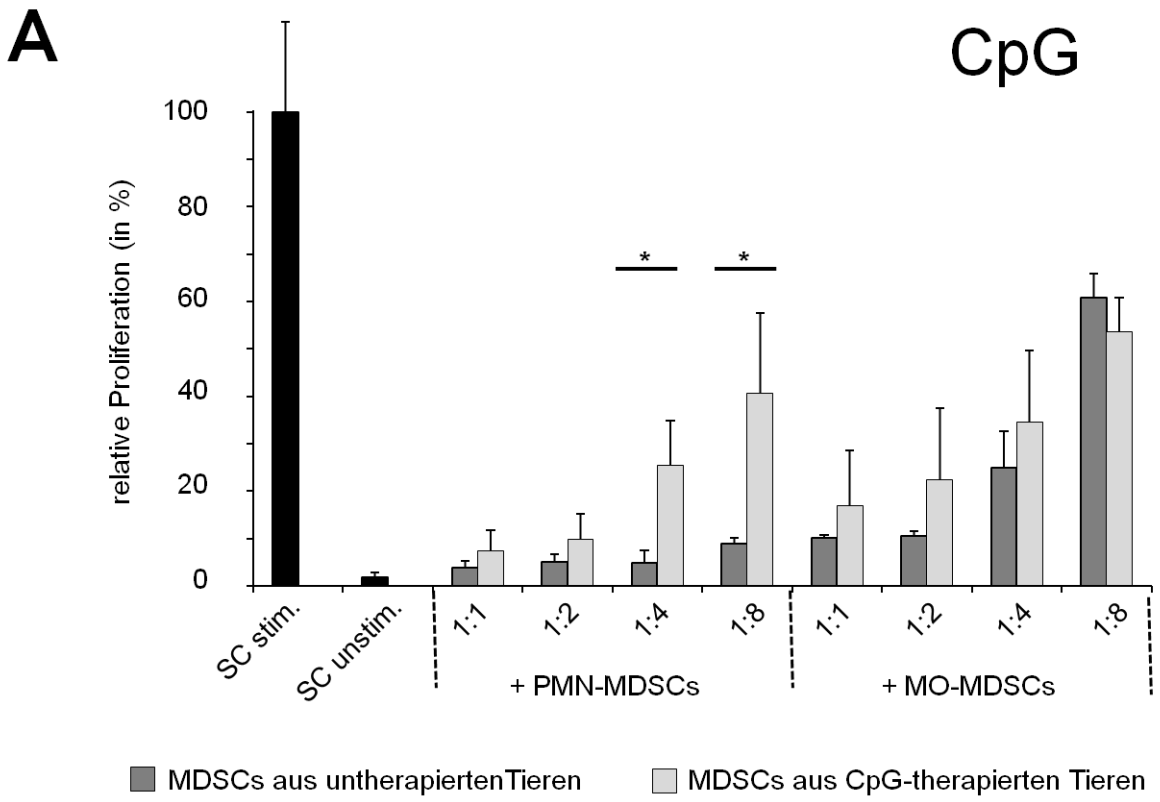
Abbildung 17: PRR-Therapie führt zu Reduktion des C26-Tumorwachstums

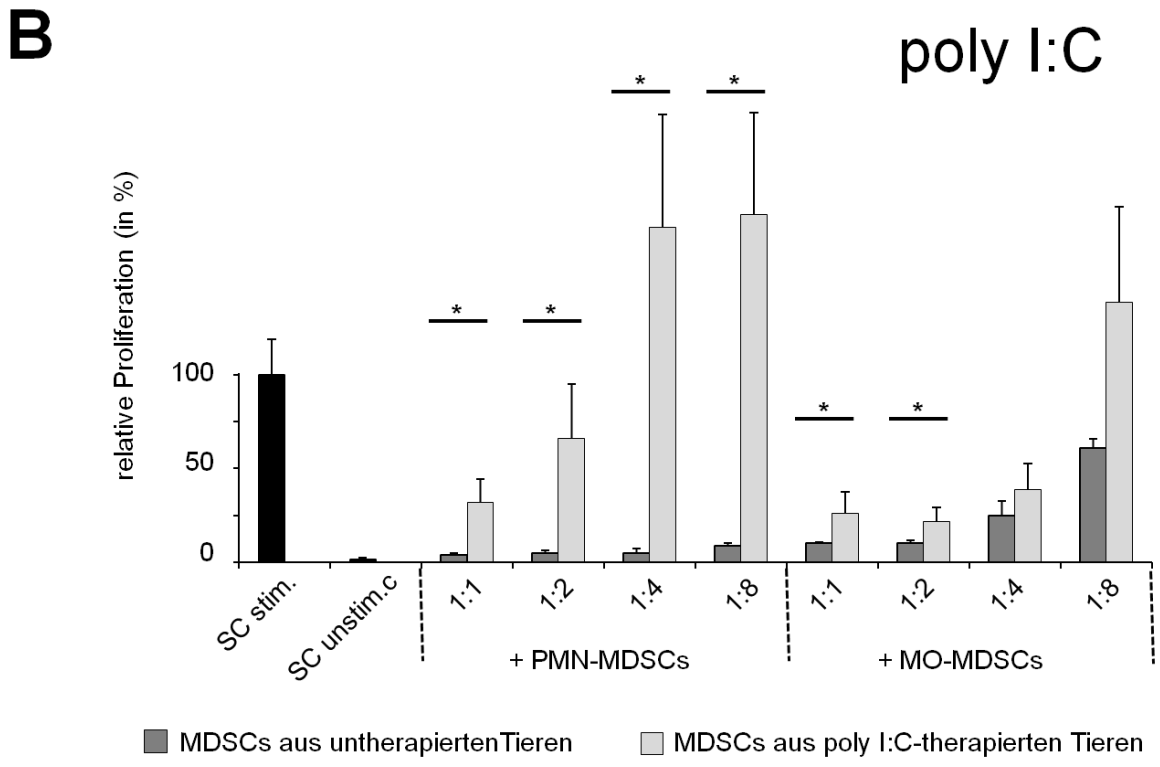
Tägliche Tumorgrößenbestimmung von Tag 6 bis Tag 18. In der Kontrollgruppe (5 Tiere) unterblieb eine antitumorale Therapie (schwarze Rauten). An den Tagen 10, 13 und 16 (durch Pfeile gekennzeichnet) erfolgte eine Behandlung mit CpG (dunkelgraue Quadrate) beziehungsweise poly(I:C) (hellgraue Dreiecke) in den Therapiegruppen (7 Tiere poly(I:C)-Therapie, 5 Tiere CpG-Therapie). Vor Gruppenbildung an Tag 10 identische Behandlung der Tiere. Signifikant geringere Tumorgrößen im Vergleich zur nicht therapierten Kontrollgruppe waren für die CpG-Therapie an den Tagen 16 bis 18 festzustellen (durchgehende Linie), für die poly(I:C)-Therapie sogar für die Tage 14 bis 18 (unterbrochene Linie). Am 18. Tag wurde der Versuch zur Organentnahme beendet.

4.3.3. Einschränkung der hemmenden Funktion von PMN-MDSCs und MO-MDSCs durch Immuntherapie

Wie in Abb. 18 gezeigt, können durch die Behandlung von C26-tumortragenden Mäusen mit Liganden des angeborenen Immunsystems deutliche Therapieerfolge erzielt werden. Im Folgenden verwendeten wir isolierte PMN-MDSCs und MO-MDSCs, die aus erfolgreich therapierten C26-tumortragenden Mäusen gewonnen wurden. Zur Bestimmung einer etwaigen Veränderung der Suppressivität gegenüber aktivierten T-Zellen wurden diese Zellpopulationen mit Splenozyten aus nicht tumortragenden BALB/c-Mäusen kokultiviert und ihre hemmende Funktion mit den beiden beschriebenen Methoden (BrdU-Suppressionsassy und IFNγ-ELISA) bestimmt.

Bei der Verwendung von MDSC-Subpopulationen, die aus mit CpG therapierten Tieren stammen (Abb. 19A), sieht man im Kokultivierungsversuch für PMN-MDSCs eine Abnahme der suppressiven Wirkung gegenüber der Proliferation aktivierter T-Zellen. Betrachtet man die Subpopulation der MO-MDSCs, sieht man hingegen keine Änderung.


A
CpG
relative Proliferation (in %)
100
80
60
40
20
0
*
*
SC stim.
SC unstim.
1:1
1:2
1:4
1:8
1:1
1:2
1:4
1:8
+ PMN-MDSCs
+ MO-MDSCs
MDSCs aus untherapiertenTieren
MDSCs aus CpG-therapierten Tieren


B
poly I:C
relative Proliferation (in %)
100
50
0
*
*
*
*
*
*
SC stim.
SC unstim.c
1:1
1:2
1:4
1:8
1:1
1:2
1:4
1:8
+ PMN-MDSCs
+ MO-MDSCs
MDSCs aus untherapiertenTieren
MDSCs aus poly I:C-therapierten Tieren

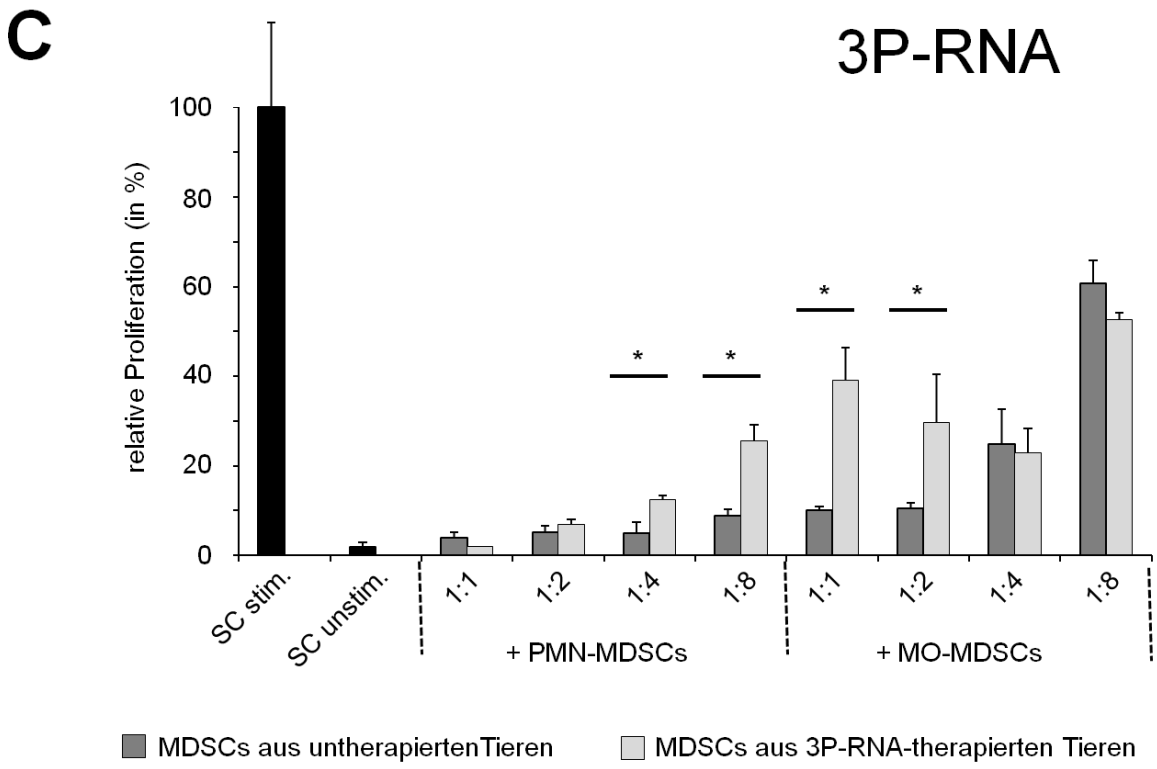


Abbildung 19: PRR-Therapie hemmt die suppressive Wirkung von PMN-MDSCs und MO-MDSCs gegenüber der Proliferation von T-Zellen

Im Kokultivierungsansatz wurden aktivierte T-Zellen (als Teil der Splenozyten) in unterschiedlichen Verhältnissen entweder mit PMN-MDSCs und MO-MDSCs aus nicht therapierten C26-Tumormäusen (dunkelgraue Säulen) zusammengebracht, oder mit den entsprechenden MDSC-Subpopulationen aus C26-Tumormäusen, die erfolgreich mit CpG, poly(I:C) oder 3P-RNA therapiert wurden (hellgraue Säulen). Als Positivkontrolle dienten stimulierte Splenozyten ohne die Zugabe von MDSCs, als Negativkontrolle unstimulierte Splenozyten (schwarze Säulen).

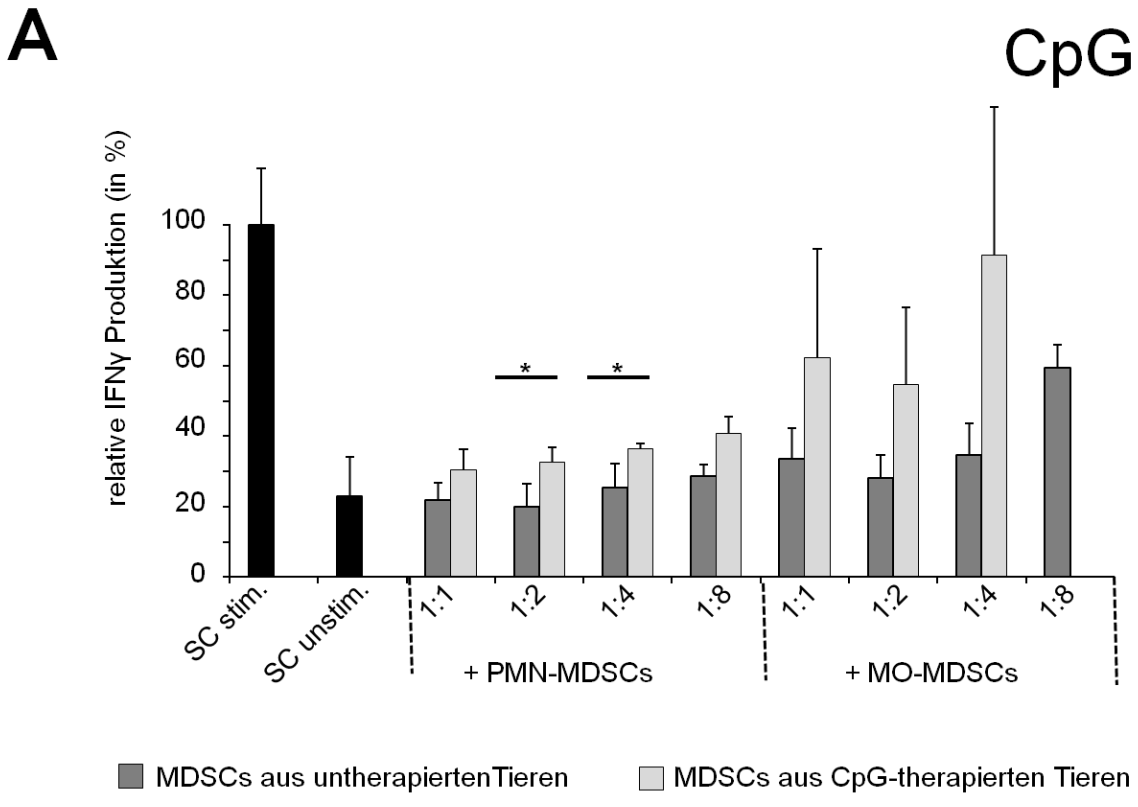
Sowohl PMN-MDSCs als auch MO-MDSCs zeigen bei Betrachtung von MDSC-Subpopulationen, die aus poly(I:C)-therapierten C26-tumortragenden Mäusen gewonnen wurden, in allen verwendeten Konzentrationen schwächere suppressive Effekte auf die Proliferation aktivierter T-Zellen als die entsprechenden MDSC-Subpopulationen aus nicht therapierten Tieren (Abb. 19B). Die Suppressivität der PMN-MDSCs nimmt stärker ab als die der MO-MDSCs. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die gemessenen Proliferationswerte für hohe Konzentration der MDSC-Subpopulationen teilweise fast doppelt so hoch wie die Positivkontrolle waren und demzufolge die Werte wahrscheinlich aus technischen Gründen etwas überschätzt sind.

Eine verminderte suppressive Wirkung von MDSC-Subpopulationen gegenüber der Proliferation aktivierten T-Zellen war auch bei den PMN-MDSCs und MO-MDSCs nachweisbar, die aus mit 3P-RNA therapierten Tieren gewonnen wurden (Abb. 19C).

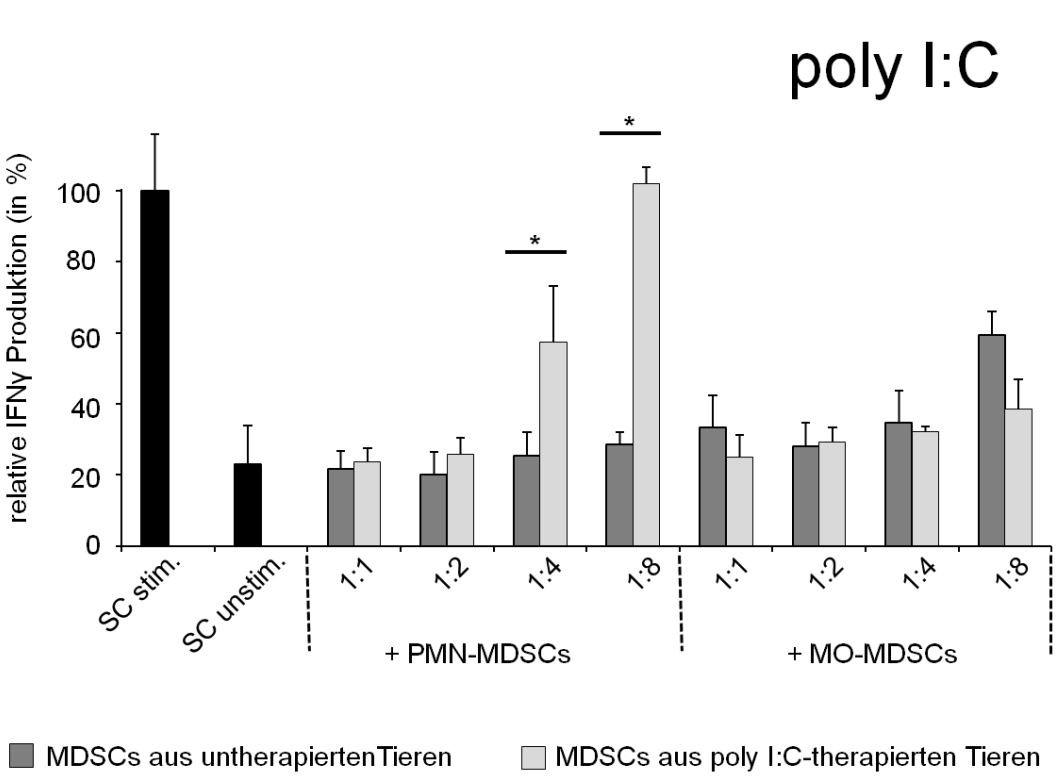
Im Hinblick auf die hemmende Wirkung der MDSC-Subpopulationen gegenüber der IFNγ-Produktion von aktivierten T-Zellen bestätigen sich die gerade beschriebenen immunsuppressiven Wirkungen. Es zeigt sich für PMN-MDSCs aus CpG-therapierten Mäusen in den Verhältnissen 1:2 und 1:4 eine signifikante Hemmung der Suppressivität. MO-MDSCs aus entsprechend therapierten Mäusen zeigen ebenfalls einen Rückgang in der hemmenden Wirkungen gegenüber der IFNγ-Produktion durch T-Zellen, dieser ist jedoch nicht signifikant (Abb. 20A).

Betrachtet man die MDSC-Subpopulationen aus poly(I:C)-therapierten Tieren in Hinblick auf ihr Vermögen, die IFNγ-Produktion von aktivierten T-Zellen zu supprimieren (Abb. 20B), so zeigen PMN-MDSCs in allen eingesetzten Konzentrationen eine Reduktion der Suppressivität. Für MO-MDSCs ist der Effekt hingegen nicht zu beobachten.

Betrachtet man den unter Verwendung von PMN-MDSCs und MO-MDSCs aus 3P-RNA therapierten Tieren durchgeführten Kokultivierungsversuch in Hinblick auf die Suppressivität der MDSC-Subpopulationen gegenüber der IFNγ-Produktion aktivierter T-Zellen (Abb. 20C), so ist eine Reduktion dieser Funktion nicht in allen eingesetzten Konzentrationen nachweisbar.



B


poly I:C
relative IFNγ Produktion (in %)
100
80
60
40
20
0
*
*
SC stim.
SC unstim.
1:1
1:2
1:4
1:8
1:1
1:2
1:4
1:8
+ PMN-MDSCs
+ MO-MDSCs
MDSCs aus untherapiertenTieren
MDSCs aus poly I:C-therapierten Tieren

C

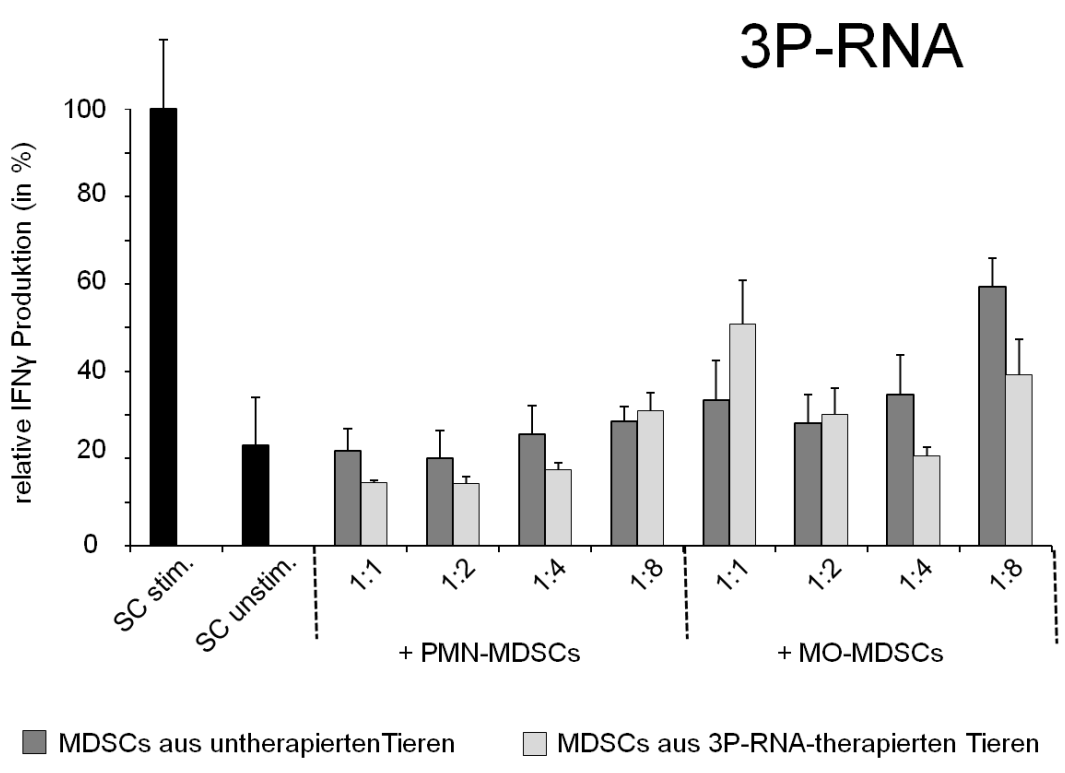

3P-RNA
relative IFNγ Produktion (in %)
100
80
60
40
20
0
SC stim.
SC unstim.
1:1
1:2
1:4
1:8
1:1
1:2
1:4
1:8
+ PMN-MDSCs
+ MO-MDSCs
MDSCs aus untherapiertenTieren
MDSCs aus 3P-RNA-therapierten Tieren

Abbildung 20: PRR-Therapie hemmt die suppressive Wirkung von PMN-MDSCs und MO-MDSCs gegenüber der IFNγ-Produktion von T-Zellen

Im Kokultivierungsansatz wurden aktivierte T-Zellen (als Teil der Splenozyten) in unterschiedlichen Verhältnissen entweder mit PMN-MDSCs und MO-MDSCs aus untherapierten C26-Tumormäusen (dunkelgraue Säulen) zusammengebracht, oder mit den entsprechenden MDSC-Subpopulationen aus C26-Tumormäusen, die erfolgreich mit CpG, poly(I:C) oder 3P-RNA therapiert wurden (hellgraue Säulen). Als Positivkontrolle dienen Splenozyten ohne Zugabe von MDSCs, als Negativkontrolle nicht stimulierte Splenozyten (schwarze Säulen).

5. Diskussion

5.1. Unterscheidung der Subpopulationen der PMN-MDSCs und MO-MDSCs

5.1.1. Differenzierte Betrachtung der MDSC-Subpopulationen als Voraussetzung einer gezielteren Tumortherapie

Ein Einfluss von MDSCs auf die Genese und den Verlauf pathophysiologischer Prozesse ist u.a. für Traumen, Sepsis und Autoimmunerkrankungen erkannt (Makarenkova et al. 2006; Zhu et al. 2007). Die Nutzung der immunsuppressiven MDSCs zur Begrenzung einer überbordenden Immunantwort im Rahmen der Therapie beispielsweise von Autoimmunerkrankungen wird in diesen Zusammenhängen angedacht (Cuenca et al. 2010).

Im Zusammenhang mit Tumoren stellt die hemmende Wirkung von MDSCs gegenüber T-Zellen hingegen eine Behinderung der immunologischen Abwehr dar und steht somit einer Heilung entgegen. Führt eine Sezernierung von humoralen Faktoren durch Tumorzellen gar zu einer Expansion und Aktivierung von MDSCs, sind diese als Teil des tumoralen Escapes zu betrachten (Kusmartsev et al. 2004).

Eine effiziente Nutzbarmachung dieser Kenntnisse in der Tumortherapie im Sinne einer negativen Beeinflussung der MDSC-vermittelten Immunsuppression ist jedoch bisher nur eingeschränkt möglich. Dem stehen neben mangelnden Kenntnisse der vielfältigen Wirkmechanismen von myeloischen Suppressorzellen vor allem die Heterogenität der unter dem Begriff MDSCs subsumierten Zellen gegenüber (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Die Differenzierung verschiedener MDSC-Subpopulationen und besonders die Unterscheidung ihrer divergierenden hemmenden Eigenschaften gegenüber T-Zellen kann somit entscheidend sein für die Identifizierung der Ansatzpunkte für gezieltere tumortherapeutische Verfahren.

5.1.2. Problem der Unterteilung der MDSCs an Hand von Oberflächenmarkern

MDSCs werden im Mausmodell generell durch die Expression der beiden Oberflächenmarker Gr-1 und CD11b+ definiert (Kusmartsev et al. 2004). Darüber hinaus sind MDSCs durch die Trias myeloischer Ursprung, unreiferer Entwicklungsstand sowie hemmende Eigenschaften gegenüber T-Zellen gekennzeichnet (Bronte et al. 2000; Gabrilovich et al. 2007). Jedoch sind die beschriebenen Oberflächenmarker und

Eigenschaften nur als Hilfsmittel zur Abgrenzung einer sehr heterogenen Zellpopulation zu betrachten (Mantovani 2010).

Auf der einen Seite ist es wissenschaftlicher Konsens, dass MDSCs in pathophysiologischen Prozessen eine bedeutende Rolle durch die Begrenzung der Immunantwort inne haben (Youn et al. 2010). Auch ist das Wissen über die Wirkungsweise von MDSCs und ihre Aktivierung in letzter Zeit stetig gewachsen. Die Erkenntnis, dass die Aktivierung von cannabinoiden Rezeptoren zu einer Mobilisierung von MDSCs führt (Elkabets et al. 2010), sei als aktuelles Beispiel ebenso genannt wie die nachgewiesene hemmende Wirkung von MDSCs auch auf die Entwicklung und Funktion von NK-Zellen (Liu et al. 2007; Hegde et al. 2010).

Im Hintergrund der vielfältigen Erkenntnisse über die Funktion myeloischer Suppressorzellen in unterschiedlichen Erkrankungen und Tumormodellen blieb jedoch oft die Frage offen, inwieweit verschiedene Subpopulationen der MDSCs für diese Effekte verantwortlich sind. In der Annahme, dass innerhalb der MDSCs ein für die Immunsuppression wesentlich verantwortlicher Subtyp vorliegt, wurde versucht, Oberflächenmarker nachzuweisen, die es erlauben, diese Subpopulation zu identifizieren. CD115 (M-CSFR) (Huang et al. 2006), CD124 (IL-4Rα) (Gallina et al. 2006), CD40 (Pan et al. 2010) und CD80 (Yang et al. 2006) wurden in diesem Zusammenhang genannt (siehe Abb. 21).

Jedoch wurde zwischenzeitlich widerlegt, dass diese jeweils in nur ein oder zwei verschiedenen Tumormodellen gewonnene Erkenntnisse generell auf andere Tumormodelle übertragbar sind (Youn et al. 2008). In einer Untersuchung der angegebenen Marker in 10 verschiedenen murinen Tumormodellen konnten YOUN et al. nachweisen, dass keiner von ihnen zur Identifizierung einer besonders suppressiv wirksamen MDSC-Subpopulation geeignet ist: Der Anteil an $CD40^+$- bzw. $CD80^+$-MDSCs war in keinem der untersuchten Tumormodelle gegenüber entsprechenden iMCs aus nicht tumortragenden Tieren erhöht. Für die Oberflächenmarker CD124 (IL-4Rα) und CD115 (M-CSFR) konnte zwar in jeweils zwei der untersuchten Tumormodelle eine gesteigerte Expression nachgewiesen werden (CD124: DA3-Mammakarzinom und EL-4-Thymom; CD115: DA3-Mammakarzinom und MC38-Kolonkarzinom). In Hinblick auf die immunsuppressiven Eigenschaften gegenüber T-Zellen waren die entsprechenden Supopulationen jedoch auch in diesen Tumormodellen Gesamt-MDSCs nicht überlegen (Youn et al. 2008)

Vor diesem Hintergrund ist zu erkennen, dass die Suche nach einem Oberflächenmarker, der eine MDSC-Subpopulation definiert, welche für die MDSC-bedingte Immunsuppression primär verantwortlich ist, bisher nicht erfolgreich war. Dies bedeutet jedoch nicht, dass unter

den MDSCs keine verschiedenen Subpopulationen mit divergierenden hemmenden Eigenschaften bestehen würden.

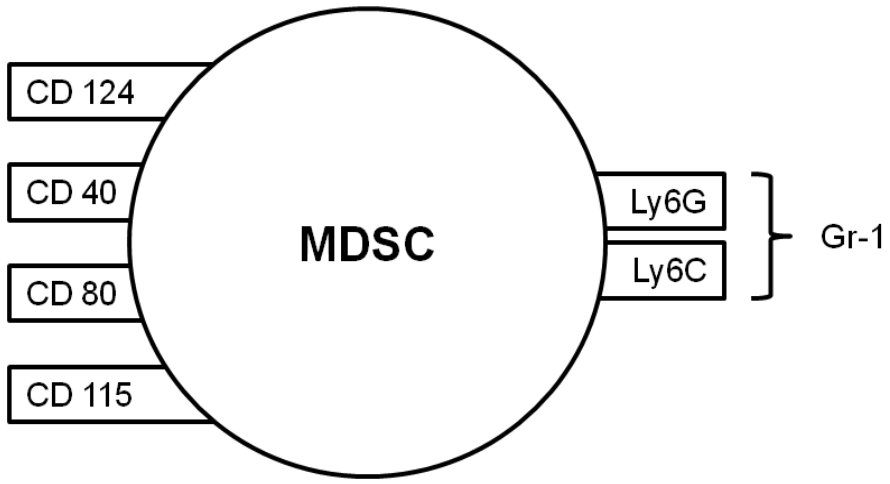


Abbildung 21: Unterteilung der heterogenen MDSC-Zellpopulation an Hand von Oberflächenmarkern

Die zur Unterteilung der MDSCs in verschiedene Subpopulationen vorgeschlagenen Oberflächenmarker CD40, CD80, CD124 (IL-4Rα) und CD115 (M-CSFR) erwiesen sich nicht als überzeugend (linke Bildseite). Hingegen erlaubt eine Differenzierung entsprechend des Grades der Expression von Ly6G und Ly6C, zwei Epitopen des Oberflächenmarkers Gr-1, die Isolierung von PMN-MDSCs ($CD11b^{+}Ly6G^{hi}Ly6C^{lo}$) und MO-MDSCs ($CD11b^{+}Ly6C^{hi}Ly6G^{lo}$) (rechte Bildseite). PMN-MDSCs und MO-MDSCs unterscheiden sich außer in ihrem Phänotyp auch im Funktionsmechanismus ihrer hemmenden Aktivität.

5.1.3. Vorteile der Einteilung von MDSCs in die Subpopulationen der PMN-MDSCs und MO-MDSCs

Die genauere Untersuchung des Oberflächenmarkers Gr-1, der auf MDSCs stets exprimiert ist, führte schließlich zu einem schlüssigen Konzept der Unterteilung der heterogenen Zellpopulation der MDSCs (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Zwei verschiedene Proteine konstituieren das Antigen Gr-1, diese sind Genprodukte des Ly6G- und Ly6C-Gens. Beide Gene befinden sich im Ly6-Lokus des murinen Chromosom 15. Der spezifische Gr-1-Antikörper ist kreuzreagierend gegenüber diesen beiden Genprodukten (Fleming et al. 1993). Abhängig von der unterschiedlich starken Expression von Ly6-G und Ly6-C, konnte eine Granulozyten-ähnliche polymorphkernige $CD11b^{+}Ly\text{-}6G^{hi}Ly\text{-}6C^{lo}$ Subpopulation (PMN-

MDSCs) sowie eine Monozyten-ähnliche $CD11b^{+}Ly\text{-}6C^{hi}Ly\text{-}G^{lo}$ Population (MO-MDSCs) unterschieden werden (Youn et al. 2008; Ribechini et al. 2010).

Schon vor der Publikation des Konzeptes der Unterscheidung dieser Subpopulationen (Movahedi et al. 2008), konnten wir das Vorliegen der entsprechenden Zelltypen in C26-tumortragenden BALB/C-Mäusen nachweisen. Mittels durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten wir darüber hinaus einen signifkanten Anstieg sowohl von $CD11b^{+}Ly6\text{-}G^{+}$ PMN-MDSCs als auch von $CD11b^{+}Ly6\text{-}C^{+}$ MO-MDSCs in C26-tumortragenden Mäusen gegenüber den entsprechend ausgestatteten iMCs aus nicht tumortragenden Tieren.

$CD11b^{+}Ly6\text{-}G^{+}$ MDSCs ähneln in ihrem Phänotyp unreifen neutrophilen Granulozyten, während CD11b+Ly6-C+ MDSCs mit unreifen (inflammatorischen) Monozyten vergleichbar sind. Für die vorliegende Dissertation wurden die Bezeichnungen polymorphkernige MDSCs (PMN-MDSCs) für $CD11b^{+}Ly6\text{-}G^{+}$ Zellen und Monozyten-ähnliche MDSCs (MO-MDSCs) für $CD11b^{+}Ly6C^{+}$ Zellen präferiert (Movahedi et al. 2008). Daneben sind auch die Bezeichnungen granulozytäre MDSCs (G-MDSCs) und monozytische MDSCs (M-MDSCs) in der Literatur vertreten (Youn and Gabrilovich 2010).

Eine Übertragung der Unterteilung von myeloischen Suppressorzellen in PMN-MDSCs und MO-MDSCs vom murinen Modell in die Situation im menschlichen Körper ist schwierig. Eine Differenzierung an Hand von Ly6G und Ly6C verbietet sich, da das Antigen Gr-1 auf humanen MDSCs nicht exprimiert wird (Almand et al. 2001; Schmielau and Finn 2001). Jedoch wurden die Oberflächenmarker CD15 und CD66b in jüngeren Veröffentlichungen als geeignete Werkzeuge dargestellt, um eine Unterscheidung zwischen PMN-MDSCs und MO-MDSCs auch im menschlichen Körper zu erreichen (Ko et al. 2009; Rodriguez et al. 2009).

Sowohl für PMN-MDSCs als auch für MO-MDSCs wurden immunsuppressive Eigenschaften gegenüber T-Zellen zunächst in den murinen Tumormodellen des BW5147 T-Zell-Lymphoms und des EL-4 Thymoms nachgewiesen (Movahedi et al. 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigten wir für das C26-Tumormodell, dass beide MDSCs-Subpopulationen eine hemmende Aktivität besitzen (Bronte et al. 2000).

Eine rein phänotypische Beschreibung der MDSC-Subpopulationen würde jedoch zu kurz greifen, da unreife myeloische Zellen des Phänotyps CD11b+Gr-1+, wie sie in nicht tumortragenden Tieren auftreten, dieselben Oberflächenmarker wie die MDSC-Subpopulationen exprimieren (Mantovani et al. 2009; Geissmann et al. 2010). CD11b+Ly6G+ unreife neutrophile Granulozyten (entsprechen dem Phänotyp der PMN-MDSCs) und CD11b+Ly6C+ unreife Monozyten (entsprechen dem Phänotyp der MO-

MDSCs) weisen jedoch nicht die immunsuppressiven Eigenschaften der MDSC-Subpopulationen auf und sind dadurch klar von diesen abzugrenzen.

Wir folgen in der vorliegenden Dissertation der verbreiteten Nomenklatur und bezeichnen nicht immunsuppressive CD11b+Gr-1+ Zellen als unreife myeloische Zellen (iMCs), die entsprechend der Expression von Ly6G und Ly6C in die Subpopulationen der PMN-iMCs und MO-iMCs aufgeteilt werden können (Youn and Gabrilovich 2010).

Für eine Unterscheidung von PMN-MDSCs und MO-MDSCs spricht auch, dass zwar beide Subpopulationen hemmend auf T-Zellen wirken, der Effekt jedoch auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen ist (Dietlin et al. 2007). Während PMN-MDSCs hohe ROS- und niedrige NO-Level auf, initiieren MO-MDSCs eine hohe NO-, und Arginase- aber nur eine niedrige ROS-Produktion (Movahedi et al. 2008; Youn et al. 2008). PMN-MDSCs hemmen besonders Antigen-spezifische T-Zell-Antworten und benötigen hierfür einen engen Zell-Zell-Kontakt zwischen PMN-MDSCs und T-Zellen (Nagaraj et al. 2007). Ohne hierfür einen engeren Zell-Zell-Kontakt zu benötigen, supprimieren MO-MDSCs hingegen vor allem Antigen-unabhängige T-Zell-Antworten (Youn and Gabrilovich 2010).

5.1.4. Aufreinigungsvarianten als möglicher Grund für abweichende Angaben zur Suppressivität der MDSC-Subpopulationen

Gegenüber den entsprechenden iMC-Subpopulationen konnten wir nach C26-Tumorinduktion jeweils eine signifkante Steigerung des Anteils an PMN-MDCS und MO-MDSCs nachweisen. Dadurch wiesen wir erstmalig nach, das es sich bei dem im C26-Tumormodell beschriebenen Anstieg von Gr-1^{+}CD11b^{+}-Zellen um die Expansion beider MDSC-Subpopulationen handelt (Bronte et al. 2000; Gallina et al. 2006).

Bereits für PMN-iMCs und MO-iMCs aus nicht tumortragenden Tieren stellten wir eine fast durchgehend signifikante Hemmung von T-Zellen fest. Diese äußert sich sowohl in der Unterdrückung der T-Zell-Proliferation, als auch in der negativen Beeinflussung der IFNγ-Produktion durch T-Zellen. Durch C26-Tumorinduktion erfolgte jedoch eine deutliche Steigerung der suppressiven Eigenschaften beider MDSC-Subtypen. Wir konnten somit zeigen, dass im C26-Tumormodell neben der Expansion von MDSCs auch die Aktivierung von MDSCs beide MDSC-Subpopulationen umfasst (Kusmartsev et al. 2004; Nagaraj et al. 2008).

Für unterschiedliche Tumoren ist berichtet, dass MO-MDSCs stärker immunsuppressiv wirken als PMN-MDSCs. So liegen entsprechende Daten für murine Tumormodelle des Lungenkarzinoms, des Melanoms (Priceman et al. 2010), des Thymoms, des Lymphoms (Movahedi et al. 2008; Nausch et al. 2008), des Kolonkarzinoms, des Mammakarzinoms und des Fibrosarkoms (Dolcetti et al. 2010) vor. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen, die wir bei der Untersuchung von PMN-MDSCs und MO-MDSCs im Rahmen des C26-Tumormodells gewonnen haben. Auch für dieses Tumormodell ist im Vergleich eine stärkere Hemmung durch MO-MDSCs beschrieben (Bronte et al. 2000). In Rahmen unserer Versuche ist jedoch durchgehend für PMN-MDSCs eine stärkere immunsuppressive Aktivität gegenüber T-Zellen nachweisbar als für MO-MDSCs.

Jedoch ist anzumerken, dass auch für die entsprechenden iMC-Subpopulationen gilt, dass wir für PMN-iMCs stets eine stärkere T-Zellhemmung nachwiesen als für MO-iMCs. Da diese Zellen aus Mäusen gewonnen wurden, die nicht mit Tumorzellen in Kontakt gekommen sind, ist denkbar, dass der Nachweis einer Überlegenheit von PMN-MDSCs gegenüber MO-MDSCs bezüglich der immunsuppressiven Potenz nicht im verwendeten C26-Tumormodell begründet ist.

Beachtung sollten in Bezug auf dieses Thema die in einem kürzlich erschienenen Review formulierten Überlegungen von YOUN und GABRILOVICH finden (Youn and Gabrilovich 2010). Sie erklären die Problematik, dass verschiedene Arbeitsgruppen unterschiedliche Daten zur immunsuppressiven Aktivität der MDSC-Subpopulationen ermitteln, mit dem Umstand, dass die jeweils verwendeten Aufreinigungsprotokolle keine absolut vollständige Auftrennung von PMN-MDSCs und MO-MDSCs erlauben (Ribechini et al. 2009; Dolcetti et al. 2010; Geissmann et al. 2010).

Im Rahmen der Überprüfung der von uns selbst etablierten Aufreinigungsmethode haben wir unter den PMN-MDSCs und MO-MDSCs 7,2% bzw. 2,4% der jeweils anderen MDSC-Subpopulation nachgewiesen. Innerhalb der von uns aufgereinigten MO-MDSCs war neben einer CD11b+Ly6C++ Zellpopulation eine weitere, zahlenmäßig stärkere Zellpopulation vertreten, die sich durch eine geringfügig schwächere Ly6C-Oberflächmarker-Expression auszeichnet. Vor diesem Hintergrund sind die erwähnten, von anderen Arbeitsgruppen abweichenden Erkentnisse zur immunsuppressiven Aktivität von MDSC-Subpopulationen möglicherweise auf eine unterschiedliche Abgrenzung der MO-MDSCs zurückzuführen.

5.2. Verringerte Immunsuppressivität der MDSC-Subpopulationen durch Therapie mit CpG und poly(I:C)

5.2.1. MDSC-Subpopulationen als möglicher Teil des Funktionsmechanismus der antitumoralen PRR-Therapie

Die erfolgreiche Immuntherapie des C26-Tumormodells und der gleichzeitg zu beobachtende Anstieg von auf das Immunsystem hemmend wirkenden MDSCs erscheint widersprüchlich. Eine Hypothese, die bei Bestätigung diesen Widerspruch aufklären würde, formulierten wir mit der Annahme, dass die Aktivierung von Pattern-Recognition-Rezeptoren durch CpG und andere Liganden des angeborenen Immunsystems zu einer Beschränkung der MDSCs vermittelte Immunsuppression führt (Abb. 22).

Der Hypothese einer eingeschränkten immunsuppressiven Funktion von MDSCs, die durch PRR-Therapie bedingt ist, steht die wiederholt publizierte These entgegen, dass die Stimulierung von *Toll-like*-Rezeptoren durch die entsprechenden PAMPs neben der Expansion von T-Zellen auch die Aktivierung von MDSCs verursachen (Gabrilovich and Nagaraj 2009).

Eine Aktivierung von T-Zellen in Richtung stärkerer suppressiver Aktivität konnte jedoch bislang nur für TLR4 nachgewiesen werden (Bunt et al. 2009; De Wilde et al. 2009). Von DELANO et al. wurden in einem murinen Modell der Sepsis durch die Stimulation des TLR4-Rezeptors mit LPS und die anschließende Signalkaskade mit MyD88 und NFκB MDSCs aktiviert (Delano et al. 2007). Es ist denkbar, dass TLR4 in diesem Verhalten eine Ausnahme innerhalb der Familie der *Toll-like*-Rezeptoren bildet.

Zu dem von uns untersuchten Effekt einer Stimulierung von TLR3, MDA-5, TLR9 und RIG-I im murinen C26-Tumormodell gab es bisher noch keine veröffentlichten Daten. Somit konnten wir erstmalig zeigen, dass die Aktivierung der genannten Rezeptoren mittels CpG und poly(I:C) zu einer deutlichen Minderung der suppressiven Aktivität von PMN-MDSCs und MO-MDSCs gegenüber T-Zellen führt. Die Verwendung von 3P-RNA zeigte denselben Effekt in eingeschränkter Form. Wir konnten somit zeigen, dass der Funktionsmechanismus der antitumoralen PRR-Therapie die Hemmung der Immunsuppressivität der MDSC-Subpopulationen beinhaltet.

Die nachgewiesene Minderung der hemmenden Eigenschaften der MDSC-Subpopulationen betraf sowohl den hemmenden Einfluss von MDSCs auf die T-Zell-Proliferation als auch den immunsuppressiven Einfluss auf die IFNγ-Produktion durch T-Zellen. Für PMN-MDSCs war

die beobachte Einschränkung der immunsuppressiven Eigenschaften stärker zu beobachten als für MO-MDSCs.

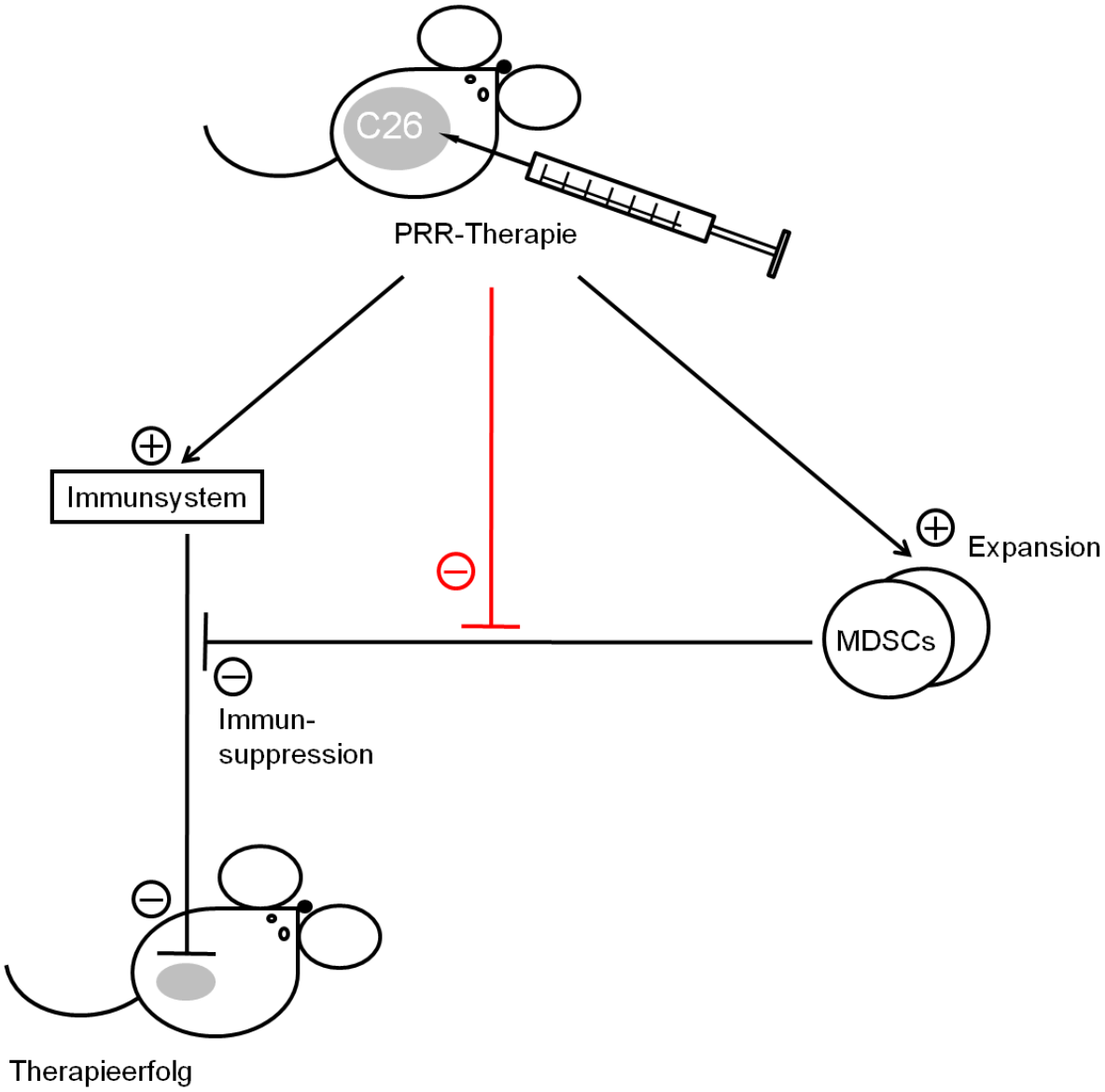


Abbildung 22: Durch Therapie mit poly(I:C) und CpG bedingte Hemmung der MDSC-Subpopulationen erlaubt erfolgreiche immunologische Tumortherapie

Die Beobachtungen aus der vorliegenden Dissertation (in roter Farbe) sind hier in Verbindung mit dem bekannten Wissenstand (in schwarzer Farbe) dargestellt. Während die Immuntherapie des C26-Tumors mit CpG und poly(I:C) einerseits über die Aktivierung des Immunsystems mit dem Rückgang der Tumorgröße zum Therapieerfolg führt, bedingt sie andererseits die Expansion immunsuppressiver MDSCs. Dieser scheinbare Widerspruch konnte durch unsere Beobachtung aufgeklärt werden, dass die Pattern-Recognition-Rezeptor-Therapie hemmend auf die Immunsuppressivität der MDSC-Subpopulationen wirkt.

Unter CpG-Therapie wurde darüber hinaus in unserer Arbeitsgruppe eine Hochregulation von Aktivierungsmarkern von PMN-MDSCs und MO-MDSCs beobachtet (Zoglmeier et al. 2011). Dies steht im Einklang mit früheren Berichten, die im Rahmen des immunstimulierenden Effekts von CpG eine höhere Expression von Aktivierungsmarkern auf verschiedenen Immunzelltypen beschreiben (Hartmann et al. 2000; Hartmann et al. 2000). Die vermehrte Expression von Aktivierungsmarkern kann als Ausdifferenzierung von MDSCs zu reifen Zellen gewertet werden, die keine hemmende Aktivität mehr aufweisen. Jüngst veröffentliche Ergebnisse zur CpG-Therapie im C26-Tumormodell berichten von einer Umwandlung von immunsuppressiven MDSCs in Makrophagen, die direkt zur Tumorelimination beitragen (Shirota et al. 2012).

5.2.2. Möglicher Einfluss unterschiedlicher Therapieschemata auf die Immunsuppressivität der MDSC-Subpopulationen

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen stehen die von VAKNIN et al. beobachteten Effekte einer chronischen Stimulation von TLR2, TLR3, TRL4 und TLR9. Diese induzierte eine Hemmung der immunologischen Aktivität von NK- und T-Zellen und führte somit zur Immunsuppression. MDSCs wurden zur Erklärung dieses Phänomens genannt (Vaknin et al. 2008).

Die Abweichung in den beobachteten Ergebnissen stammt möglicherweise aus Unterschieden in der Verabreichungsweise der Liganden des angeborenen Immunsystems: Wir haben innerhalb von einer Woche eine dreimalige Therapie von C26-tumortragenden Tieren direkt mit poly(I:C) und CpG durchgeführt. Vaknin et al. hingegen verabreichten nicht tumortragenden Tieren TLR-Liganden mittels eines liposomalen Transportsystems, das eine chronische, kontinuierliche Freisetzung bewirkt (Joseph et al. 2002).

SHIROTA et al. konnten in Anschluss an die intratumorale Verabreichung von CpG für MO-MDSCs jedoch ebenfalls eine verminderte immunsuppressive Wirkung gegenüber T-Zellen nachweisen (Shirota et al. 2012).

5.3. MDSCs als Ansatzpunkt einer verbesserten Immuntherapie von Tumorerkrankungen

Bereits in den 1980er Jahren wurde im murinen Tumormodell das Auftreten immunsuppressiver MDSCs nachgewiesen (Buessow et al. 1984; Young et al. 1987; Subiza et al. 1989). Sowohl in transgenen Tieren mit sich spontan entwickelnden Tumoren, als auch in Mäusen, denen Tumorzellen induziert wurden, sind Expansion und Aktivierung von MDSCs nachzuweisen, ebenfalls bei Tumorpatienten (Almand et al. 2001; Gabrilovich and Nagaraj 2009).

Bedingt durch die Sekretion diverser Faktoren durch Tumorzellen kommt es zu einer aktiven Migration von MDSCs in die Tumorumgebung und in Lymphknoten sowie zu den weiteren beschriebenen Mechanismen der MDSC-Expansion und Aktivierung (Kusmartsev et al. 2004). Der Rekrutierung von MDSCs durch den Tumor führt folglich zu einer Hemmung der antitumoralen Immunantwort (Gallina et al. 2006). Neben der beschriebenen immunsuppressiven Aktivität gegenüber T-Zellen fördern MDSCs die Tumorprogression über weitere Mechanismen. So sind eine entsprechende Beeinflussung der Zytokinproduktion von Makrophagen (Sinha et al. 2007) und eine Beteiligung an der Tumorangiogenese beschrieben (Murdoch et al. 2008). In der Tumorumgebung differenzieren MDSCs auch teilweise in tumorassoziierte Makrophagen (TAM), die ebenfalls immunsuppressiv wirken, sich von MDSCs aber phänotypisch klar unterscheiden (Mantovani et al. 2002; Kusmartsev and Gabrilovich 2005).

Da die Rekrutierung von MDSCs durch Tumoren einen wesentlichen Bestandteil des tumoralen Escapes darstellt, sind MDSC als therapeutisches Ziel in den Blickpunkt gerückt. Als Therapieansätze sind eine Förderung der Ausdifferenzierung von MDSCs in nicht mehr immunsuppressiv wirkende, reife myeloische Zellen ebenso denkbar (Kusmartsev et al. 2003; Mirza et al. 2006) wie eine Hemmung der Expansion der MDSCs (Kusmartsev et al. 2008; Pan et al. 2008) bzw. ihrer Funktion (Zea et al. 2005; Serafini et al. 2006). Auch eine direkte Vernichtung der MDSCs durch Chemotherapeutika (Suzuki et al. 2005; Ko et al. 2007) würde zum erwünschten Effekt führen.

Wie in Tab. 4 in der Übersicht gezeigt, sind in experimentellen Ansätzen zur Adressierung von MDSCs im Rahmen der Tumortherapie verschiedene Substanzen in einem breiten Spektrum an murinen Tumormodellen und in Studien an Tumorpatienten zur Verwendung gekommen (Gabrilovich and Nagaraj 2009; Lechner et al. 2011). MDSCs erscheinen im Hinblick auf eine verbesserte Tumortherapie als vielversprechender Ansatzpunkt (Montero et al. 2012).

Substanz	Tumortyp	Referenz
Vitamin D3	Kopf- und Halstumor (H)	(Lathers et al. 2004)
All-trans Retinolsäure	Sarkome (M), Kolonkarzinom (M), Nierenzellkarzinom (H)	(Kusmartsev et al. 2003; Mirza et al. 2006; Nefedova et al. 2007)
CD117-spezifischer Antikörper	Kolonkarzinom (M)	(Pan et al. 2008)
5-Aza-2'-Desoxycytidin	Solide Tumore (H)	(Daurkin et al. 2010)
VEGF-Antikörper (Avastin)	Metastasiertes Nierenzellkarzinom (H)	(Kusmartsev et al. 2008)
COX-2-Inhibitoren	Mammakarzinom (M), Mesotheliom (M)	(Sinha et al. 2007; Veltman et al. 2010)
Bisphosphonate, Sildenafil und Tadlafil	Mammakarzinom (M), Kolon-karzinom (M), Fibrosarkom (M)	(Serafini et al. 2006)
Aminobisphosphonate	Mammakarzinom (M)	(Melani et al. 2007)
Nitroaspirin	Kolonkarzinom (M)	(De Santo et al. 2005)
Gemcitabin	Bronchialkarzinom (M), Mammakarzinom (M)	(Suzuki et al. 2005), (Hamm et al. 2007; Le et al. 2009)
Amilorid	Adenokarzinom der Lunge (M)	(Chalmin et al. 2010)
Sunitinib	Nierenzellkarzinom (H), Melanom (M)	(Ko et al. 2009; Bose et al. 2010)
5-Fluoruracil	Thymom (M)	(Vincent et al. 2010)
GW2580	Prostatakarzinom (M)	(Priceman et al. 2010)
Docetaxel	Mammakarzinom (M)	(Kodumudi et al. 2010)

Tabelle 4: Übersicht über Substanzen, die zur Beeinflussung von MDSCs im Rahmen einer Tumortherapie führen

Es sind verschiedene therapeutische Substanzen gezeigt, deren Wirksamkeit bezüglich der Beeinflussung der hemmenden Aktivität von MDSCs in experimentellen Ansätzen untersucht wurde bzw. ein entsprechender Effekt beobachtet wurde. Für den angegebenen Tumortyp ist jeweils vermerkt, ob es sich um ein murines Tumormodel (M) oder um eine Untersuchung von Tumorpatienten (H) handelt.

5.4. Einordnung und Bewertung der Ergebnisse

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnte die verminderte suppressive Aktivität der MDSC-Subpopulationen im C26-Tumormodell nach Pattern-Recognition-Rezeptor-Therapie für den sich spontan entwickelnden CEA424-Magentumor bestätigt werden (Zoglmeier et al. 2011). Der Nachweis einer durch PRR-Therapie gehemmten Aktivität von MDSCs sowohl in induzierten als auch in autochthonen Tumoren lässt vermuten, dass diese Beobachtung unabhängig vom Tumortyp Geltung hat. Mit dem erstmaligen Nachweis einer durch die Immuntherapie mit CpG und poly(I;C) bedingten Hemmung der immunsuppressiven Aktivität von MDSCs im murinen Tumormodell haben wir einen Beitrag zum besseren Verständnis der myeloischen Suppressorzellen geleistet.

Für die intratumorale Injektion von CpG im C26-Tumormodell bestätigten SHIROTA et al. die zwischenzeitlich publizierten Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit, indem sie ebenfalls vom Effekt einer quantitativen Zunahme der MO-MDSCs bei gleichzeitiger Beeinträchtigung ihrer Immunsuppressivität berichten (Zoglmeier et al. 2011). Für PMN-MDSCs sehen sie jedoch keine zahlenmäßige Zunahme. Zusammen mit den von uns beobachteten Unterschieden zwischen PMN-MDSCs und MO-MDSCs mag dies als Hinweis darauf gelten, wie wichtig eine gesonderte Betrachtung der MDSC-Subpopulationen ist (Shirota et al. 2012).

Die gewonnenen Erkenntnisse mögen dazu beitragen, dem tumoralen Escape wirksamer zu begegnen. Vielleicht ist auch ein Beitrag dazu geleistet, durch ein besseres Verständnis effizientere Wege zu finden, um MDSC in der Therapie von Tumoren und anderen Krankheiten zu adressieren. Die beschriebene Existenz von PMN-MDSCs und MO-MDSCs auch im Menschen (Ko et al. 2009; Rodriguez et al. 2009) wirft die Frage auf, ob sich die im murinen Modell gewonnenen Erkenntnisse zur Beeinflussung von MDSCs durch TLR-Therapie im Menschen bestätigen.

6. Zusammenfassung

Die Stimulation von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems ist ein etabliertes immunologisches Verfahren zur Tumortherapie, das im Rahmen des von uns untersuchten subkutanen C26 Tumors bei Verwendung von CpG und poly(I:C) zur Tumorreduktion führte. Gleichzeitig konnten wir jedoch im Rahmen der experimentellen Tumortherapie mit CpG und poly(I:C) die Expansion von immunsuppressiv wirksamen myeloischen Suppressorzellen (MDSCs) nachweisen. Der Erfolg einer das Immunsystem aktivierenden Tumortherapie und die Zunahme der definitionsgemäß suppressiv wirkenden MDSCs unter dieser Therapie erschienen als Widerspruch.

Im Zentrum der vorliegenden Dissertation stand die nähere Untersuchung dieses Gegensatzes. Es gelang der Nachweis, dass unter Verwendung von CpG und poly(I:C) zur C26-Tumortherapie die immunsuppressive Aktivität der MDSCs negativ beeinflusst wurde. Erstmalig wurde somit nachgewiesen, dass mit dem Effekt dieser Therapie eine negative Beeinflussung der immunsuppressiven MDSC-Funktion einhergeht. Ein besonderes Augenmerk lag darüber hinaus auf der differenzierenden Betrachtung der heterogenen Zellpopulation der MDSCs. Wir konnten im C26-Tumormodell eine unterschiedliche immunsuppressive Potenz der beiden MDSC-Subpopulationen beobachten. Durchgehend wiesen wir für PMN-MDSCs (polymorphonuclear MDSCs) eine stärkere suppressive Aktivität als für MO-MDSCs (Monocyte-like MDSCs) nach.

Die gewonnenen Erkenntnisse tragen dazu bei, ein besseres Verständnis der antitumoralen Immuntherapie zu entwickeln. Dies ist wichtig, da der klinischen Anwendung entsprechender Therapieschemata oft Formen tumoralen Escapes gegenüberstehen. Mit dem Nachweis der Beteiligung von MDSCs an der Wirkung von den Liganden des angeborenen Immunsystems CpG und poly(I:C) wurde ein Mechanismus aufgezeigt, der im Rahmen einer Weiterentwicklung der immunologischen Tumortherapie als Ansatzpunkt dienen kann. Des Weiteren unterstrichen unsere Ergebnisse zum Verhalten der MDSC-Subpopulationen unter immunologischer Therapie des C26-Tumors, dass es zielführend wäre, der Heterogenität der MDSCs durch eine getrennte Betrachtung der beschriebenen Subpopulationen Beachtung zu schenken.

7. Literaturverzeichnis

Agostinelli, E. and N. Seiler (2006). "Non-irradiation-derived reactive oxygen species (ROS) and cancer: therapeutic implications." *Amino Acids* 31(3): 341-355.

Alexopoulou, L., A. C. Holt, et al. (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* 413(6857): 732-738.

Almand, B., J. I. Clark, et al. (2001). "Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer." *J Immunol* 166(1): 678-689.

Alonso-Curbelo, D. and M. S. Soengas (2010). "Self-killing of melanoma cells by cytosolic delivery of dsRNA: wiring innate immunity for a coordinated mobilization of endosomes, autophagosomes and the apoptotic machinery in tumor cells." *Autophagy* 6(1): 148-150.

Appay, V. (2009). "25 years of HIV research! ... and what about a vaccine?" *Eur J Immunol* 39(8): 1999-2003.

Areschoug, T. and S. Gordon (2008). "Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands." *Contrib Microbiol* 15: 45-60.

Ballas, Z. K., A. M. Krieg, et al. (2001). "Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs." *J Immunol* 167(9): 4878-4886.

Bannai, S. (1984). "Transport of cystine and cysteine in mammalian cells." *Biochim Biophys Acta* 779(3): 289-306.

Baratelli, F., Y. Lin, et al. (2005). "Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells." *J Immunol* 175(3): 1483-1490.

Bergman, P. J. (2009). "Cancer immunotherapy." *Top Companion Anim Med* 24(3): 130-136.

Besch, R., H. Poeck, et al. (2009). "Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells." *J Clin Invest* 119(8): 2399-2411.

Bhattacharya, S. (2008). "The World Health Organization and global smallpox eradication." *J Epidemiol Community Health* 62(10): 909-912.

Bickels, J., Y. Kollender, et al. (2002). "Coley's toxin: historical perspective." *Isr Med Assoc J* 4(6): 471-472.

Bieback, K., E. Lien, et al. (2002). "Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling." *J Virol* 76(17): 8729-8736.

Bingisser, R. M., P. A. Tilbrook, et al. (1998). "Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway." *J Immunol* 160(12): 5729-5734.

Blattman, J. N. and P. D. Greenberg (2004). "Cancer immunotherapy: a treatment for the masses." *Science* 305(5681): 200-205.

Bose, A., J. L. Taylor, et al. (2010). "Sunitinib facilitates the activation and recruitment of therapeutic anti-tumor immunity in concert with specific vaccination." *Int J Cancer* 129: 2158-2170.

Bourquin, C., L. Schmidt, et al. (2007). "Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response." *Blood* 109(7): 2953-2960.

Bourquin, C., S. Schreiber, et al. (2006). "Immunotherapy with dendritic cells and CpG oligonucleotides can be combined with chemotherapy without loss of efficacy in a mouse model of colon cancer." *Int J Cancer* 118(11): 2790-2795.

Breman, J. G. and I. Arita (1980). "The confirmation and maintenance of smallpox eradication." *N Engl J Med* 303(22): 1263-1273.

Bronte, V., E. Apolloni, et al. (2000). "Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells." *Blood* 96(12): 3838-3846.

Bronte, V. and S. Mocellin (2009). "Suppressive influences in the immune response to cancer." *J Immunother* 32(1): 1-11.

Bronte, V., P. Serafini, et al. (2003). "IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice." *J Immunol* 170(1): 270-278.

Bronte, V. and P. Zanovello (2005). "Regulation of immune responses by L-arginine metabolism." *Nat Rev Immunol* 5(8): 641-654.

Brunner, C., J. Seiderer, et al. (2000). "Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo." *J Immunol* 165(11): 6278-6286.

Buessow, S. C., R. D. Paul, et al. (1984). "Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice." *J Natl Cancer Inst* 73(1): 249-255.

Bunt, S. K., V. K. Clements, et al. (2009). "Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4." *J Leukoc Biol* 85(6): 996-1004.

Bunt, S. K., L. Yang, et al. (2007). "Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression." *Cancer Res* 67(20): 10019-10026.

Chalmin, F., S. Ladoire, et al. (2010). "Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells." *J Clin Invest* 120(2): 457-471.

Cluff, C. W. (2010). "Monophosphoryl Lipid A (MPL) as an Adjuvant for Anti-Cancer Vaccines: Clinical Results." *Adv Exp Med Biol* 667: 111-123.

Coley, W. B. (1991). "The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893." *Clin Orthop Relat Res*(262): 3-11.

Condamine, T. and D. I. Gabrilovich (2011). "Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function." *Trends Immunol* 32(1): 19-25.

Cools, N., P. Ponsaerts, et al. (2007). "Regulatory T cells and human disease." *Clin Dev Immunol* 2007: 89195.

Cooper, C. L., H. L. Davis, et al. (2004). "CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study." *J Clin Immunol* 24(6): 693-701.

Corbi, A. L., T. K. Kishimoto, et al. (1988). "The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. Cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B." *J Biol Chem* 263(25): 12403-12411.

Crompton, P. D., M. Mircetic, et al. (2009). "The TLR9 ligand CpG promotes the acquisition of Plasmodium falciparum-specific memory B cells in malaria-naive individuals." *J Immunol* 182(5): 3318-3326.

Cubillos-Ruiz, J. R., X. Engle, et al. (2009). "Polyethylenimine-based siRNA nanocomplexes reprogram tumor-associated dendritic cells via TLR5 to elicit therapeutic antitumor immunity." *J Clin Invest* 119(8): 2231-2244.

Cuenca, A. G., M. J. Delano, et al. (2010). "A Paradoxical Role for Myeloid Derived Suppressor Cells in Sepsis and Trauma." *Mol Med*.

Curiel, T. J. (2008). "Regulatory T cells and treatment of cancer." *Curr Opin Immunol* 20(2): 241-246.

Daurkin, I., E. Eruslanov, et al. (2010). "Generation of antigen-presenting cells from tumor-infiltrated CD11b myeloid cells with DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine." *Cancer Immunol Immunother* 59(5): 697-706.

Davies, H. (2007). "Ethical reflections on Edward Jenner's experimental treatment." *J Med Ethics* 33(3): 174-176.

De Jager, R., P. Guinan, et al. (1991). "Long-term complete remission in bladder carcinoma in situ with intravesical TICE bacillus Calmette Guerin. Overview analysis of six phase II clinical trials." *Urology* 38(6): 507-513.

De Santo, C., P. Serafini, et al. (2005). "Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(11): 4185-4190.

De Wilde, V., N. Van Rompaey, et al. (2009). "Endotoxin-induced myeloid-derived suppressor cells inhibit alloimmune responses via heme oxygenase-1." *Am J Transplant* 9(9): 2034-2047.

Delano, M. J., P. O. Scumpia, et al. (2007). "MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis." *J Exp Med* 204(6): 1463-1474.

Diaz-Montero, C. M., M. L. Salem, et al. (2009). "Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy." *Cancer Immunol Immunother* 58(1): 49-59.

Diebold, S. S., T. Kaisho, et al. (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." *Science* 303(5663): 1529-1531.

Dietlin, T. A., F. M. Hofman, et al. (2007). "Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion." *J Leukoc Biol* 81(5): 1205-1212.

Dolcetti, L., E. Peranzoni, et al. (2010). "Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF." *Eur J Immunol* 40(1): 22-35.

Elkabets, M., V. S. Ribeiro, et al. (2010). "IL-1beta regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function." *Eur J Immunol* 40(12): 3347-3357.

Elkord, E., E. M. Alcantar-Orozco, et al. (2010). "T regulatory cells in cancer: recent advances and therapeutic potential." *Expert Opin Biol Ther* 10(11): 1573-1586.

Eriksson, E. M. and D. C. Jackson (2007). "Recent advances with TLR2-targeting lipopeptide-based vaccines." *Curr Protein Pept Sci* 8(4): 412-417.

Finke, J., J. Ko, et al. (2011). "MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy." *Int Immunopharmacol* 11(7): 856-861.

Fleming, T. J., M. L. Fleming, et al. (1993). "Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family." *J Immunol* 151(5): 2399-2408.

Fortier, M. E., S. Kent, et al. (2004). "The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(4): R759-766.

Gabrilovich, D. (2004). "Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects." *Nat Rev Immunol* 4(12): 941-952.

Gabrilovich, D., T. Ishida, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo." *Blood* 92(11): 4150-4166.

Gabrilovich, D. I., V. Bronte, et al. (2007). "The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells." *Cancer Res* 67(1): 425; author reply 426.

Gabrilovich, D. I., T. Ishida, et al. (1999). "Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function." *Clin Cancer Res* 5(10): 2963-2970.

Gabrilovich, D. I. and S. Nagaraj (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." *Nat Rev Immunol* 9(3): 162-174.

Gabrilovich, D. I., M. P. Velders, et al. (2001). "Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells." *J Immunol* 166(9): 5398-5406.

Gallina, G., L. Dolcetti, et al. (2006). "Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells." *J Clin Invest* 116(10): 2777-2790.

Geissmann, F., M. G. Manz, et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." *Science* 327(5966): 656-661.

Gomariz, R. P., I. Gutierrez-Canas, et al. (2010). "Peptides targeting Toll-like receptor signalling pathways for novel immune therapeutics." *Curr Pharm Des* 16(9): 1063-1080.

Gorden, K. K., X. X. Qiu, et al. (2006). "Cutting edge: activation of murine TLR8 by a combination of imidazoquinoline immune response modifiers and polyT oligodeoxynucleotides." *J Immunol* 177(10): 6584-6587.

Gordon, S. (2002). "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response." *Cell* 111(7): 927-930.

Griswold, D. P. and T. H. Corbett (1975). "A colon tumor model for anticancer agent evaluation." *Cancer* 36(6 Suppl): 2441-2444.

Halpern, M. D., R. J. Kurlander, et al. (1996). "Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha." *Cell Immunol* 167(1): 72-78.

Hamm, S., A. Heit, et al. (2007). "Immunostimulatory RNA is a potent inducer of antigen-specific cytotoxic and humoral immune response in vivo." *Int Immunol* 19(3): 297-304.

Hanson, E. M., V. K. Clements, et al. (2009). "Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells." *J Immunol* 183(2): 937-944.

Harari, O. and J. K. Liao (2004). "Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants." *Curr Pharm Des* 10(8): 893-898.

Hartmann, G. and A. M. Krieg (2000). "Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells." *J Immunol* 164(2): 944-953.

Hartmann, G., R. D. Weeratna, et al. (2000). "Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo." *J Immunol* 164(3): 1617-1624.

Haverkamp, J. M., S. A. Crist, et al. (2011). "In vivo suppressive function of myeloid-derived suppressor cells is limited to the inflammatory site." *Eur J Immunol* 41(3): 749-759.

Hayashi, F., K. D. Smith, et al. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." *Nature* 410(6832): 1099-1103.

Heckelsmiller, K., S. Beck, et al. (2002). "Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy." *Eur J Immunol* 32(11): 3235-3245.

Heckelsmiller, K., K. Rall, et al. (2002). "Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model." *J Immunol* 169(7): 3892-3899.

Hedhli, D., I. Dimier-Poisson, et al. (2009). "Protective immunity against Toxoplasma challenge in mice by coadministration of T. gondii antigens and Eimeria profilin-like protein as an adjuvant." *Vaccine* 27(16): 2274-2281.

Heeg, K., A. Dalpke, et al. (2008). "Structural requirements for uptake and recognition of CpG oligonucleotides." *Int J Med Microbiol* 298(1-2): 33-38.

Hegde, V. L., M. Nagarkatti, et al. (2010). "Cannabinoid receptor activation leads to massive mobilization of myeloid-derived suppressor cells with potent immunosuppressive properties." *Eur J Immunol* 40(12): 3358-3371.

Heil, F., H. Hemmi, et al. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* 303(5663): 1526-1529.

Hemmi, H., T. Kaisho, et al. (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." *Nat Immunol* 3(2): 196-200.

Hemmi, H., O. Takeuchi, et al. (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* 408(6813): 740-745.

Hornung, V., J. Ellegast, et al. (2006). "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." *Science* 314(5801): 994-997.

Hornung, V., S. Rothenfusser, et al. (2002). "Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides." *J Immunol* 168(9): 4531-4537.

Huang, B., P. Y. Pan, et al. (2006). "Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host." *Cancer Res* 66(2): 1123-1131.

Ishii, K. J., S. Uematsu, et al. (2006). "'Toll' gates for future immunotherapy." *Curr Pharm Des* 12(32): 4135-4142.

Joseph, A., I. Louria-Hayon, et al. (2002). "Liposomal immunostimulatory DNA sequence (ISS-ODN): an efficient parenteral and mucosal adjuvant for influenza and hepatitis B vaccines." *Vaccine* 20(27-28): 3342-3354.

Jurk, M., F. Heil, et al. (2002). "Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848." *Nat Immunol* 3(6): 499.

Jurk, M. and J. Vollmer (2007). "Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists for immune modulation." *BioDrugs* 21(6): 387-401.

Kang, D. C., R. V. Gopalkrishnan, et al. (2002). "mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(2): 637-642.

Kato, H., O. Takeuchi, et al. (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." *Nature* 441(7089): 101-105.

Katze, M. G., M. Wambach, et al. (1991). "Functional expression and RNA binding analysis of the interferon-induced, double-stranded RNA-activated, 68,000-Mr protein kinase in a cell-free system." *Mol Cell Biol* 11(11): 5497-5505.

Kew, O. M., R. W. Sutter, et al. (2005). "Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication." *Annu Rev Microbiol* 59: 587-635.

Klinman, D. M., S. Klaschik, et al. (2010). "Immunostimulatory CpG oligonucleotides: Effect on gene expression and utility as vaccine adjuvants." *Vaccine* 28(8): 1919-1923.

Klinman, D. M., A. K. Yi, et al. (1996). "CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7): 2879-2883.

Ko, H. J., Y. J. Kim, et al. (2007). "A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model." *Cancer Res* 67(15): 7477-7486.

Ko, J. S., A. H. Zea, et al. (2009). "Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients." *Clin Cancer Res* 15(6): 2148-2157.

Kodumudi, K. N., K. Woan, et al. (2010). "A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers." *Clin Cancer Res* 16(18): 4583-4594.

Kortylewski, M., M. Kujawski, et al. (2005). "Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity." *Nat Med* 11(12): 1314-1321.

Krieg, A. M. (2001). "Now I know my CpGs." *Trends Microbiol* 9(6): 249-252.

Krieg, A. M. (2002). "CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects." *Annu Rev Immunol* 20: 709-760.

Kurt-Jones, E. A., L. Popova, et al. (2000). "Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus." *Nat Immunol* 1(5): 398-401.

Kusmartsev, S., F. Cheng, et al. (2003). "All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination." *Cancer Res* 63(15): 4441-4449.

Kusmartsev, S., E. Eruslanov, et al. (2008). "Oxidative stress regulates expression of VEGFR1 in myeloid cells: link to tumor-induced immune suppression in renal cell carcinoma." *J Immunol* 181(1): 346-353.

Kusmartsev, S. and D. I. Gabrilovich (2003). "Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species." *J Leukoc Biol* 74(2): 186-196.

Kusmartsev, S. and D. I. Gabrilovich (2005). "STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion." *J Immunol* 174(8): 4880-4891.

Kusmartsev, S., S. Nagaraj, et al. (2005). "Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells." *J Immunol* 175(7): 4583-4592.

Kusmartsev, S., Y. Nefedova, et al. (2004). "Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species." *J Immunol* 172(2): 989-999.

Lathers, D. M., J. I. Clark, et al. (2004). "Phase 1B study to improve immune responses in head and neck cancer patients using escalating doses of 25-hydroxyvitamin D3." *Cancer Immunol Immunother* 53(5): 422-430.

Le, H. K., L. Graham, et al. (2009). "Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice." *Int Immunopharmacol* 9(7-8): 900-909.

Lechner, M. G. and A. L. Epstein (2011). "A new mechanism for blocking myeloid-derived suppressor cells by CpG." *Clin Cancer Res* 17(7): 1645-1648.

Li, M. O., Y. Y. Wan, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta regulation of immune responses." *Annu Rev Immunol* 24: 99-146.

Linehan, D. C. and P. S. Goedegebuure (2005). "CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer." *Immunol Res* 32(1-3): 155-168.

Lipford, G. B., M. Bauer, et al. (1997). "CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants." *Eur J Immunol* 27(9): 2340-2344.

Liu, C., S. Yu, et al. (2007). "Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host." *Blood* 109(10): 4336-4342.

Makarenkova, V. P., V. Bansal, et al. (2006). "CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress." *J Immunol* 176(4): 2085-2094.

Manegold, C., D. Gravenor, et al. (2008). "Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* 26(24): 3979-3986.

Mantovani, A. (2010). "The growing diversity and spectrum of action of myeloid-derived suppressor cells." *Eur J Immunol* 40(12): 3317-3320.

Mantovani, A., A. Sica, et al. (2009). "Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation." *Hum Immunol* 70(5): 325-330.

Mantovani, A., S. Sozzani, et al. (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." *Trends Immunol* 23(11): 549-555.

Matsumoto, M. and T. Seya (2008). "TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C)." *Adv Drug Deliv Rev* 60(7): 805-812.

Melani, C., C. Chiodoni, et al. (2003). "Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity." *Blood* 102(6): 2138-2145.

Melani, C., S. Sangaletti, et al. (2007). "Amino-biphosphonate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma." *Cancer Res* 67(23): 11438-11446.

Menetrier-Caux, C., G. Montmain, et al. (1998). "Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor." *Blood* 92(12): 4778-4791.

Miconnet, I., S. Koenig, et al. (2002). "CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide." *J Immunol* 168(3): 1212-1218.

Miltenyi, S., W. Muller, et al. (1990). "High gradient magnetic cell separation with MACS." *Cytometry* 11(2): 231-238.

Mirza, N., M. Fishman, et al. (2006). "All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients." *Cancer Res* 66(18): 9299-9307.

Mogensen, T. H. (2009). "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses." *Clin Microbiol Rev* 22(2): 240-273, Table of Contents.

Montero, A. J., C. M. Diaz-Montero, et al. (2012). "Myeloid-derived Suppressor Cells in Cancer Patients: A Clinical Perspective." *J Immunother* 35(2): 107-115.

Morales, A., D. Eidinger, et al. (1976). "Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors." *J Urol* 116(2): 180-183.

Moss, W. J. (2009). "Measles control and the prospect of eradication." *Curr Top Microbiol Immunol* 330: 173-189.

Movahedi, K., M. Guilliams, et al. (2008). "Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity." *Blood* 111(8): 4233-4244.

Murali, A., X. Li, et al. (2008). "Structure and function of LGP2, a DEX(D/H) helicase that regulates the innate immunity response." *J Biol Chem* 283(23): 15825-15833.

Murdoch, C., M. Muthana, et al. (2008). "The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis." *Nat Rev Cancer* 8(8): 618-631.

Nagaraj, S. and D. I. Gabrilovich (2008). "Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells." *Cancer Res* 68(8): 2561-2563.

Nagaraj, S. and D. I. Gabrilovich (2012). "Regulation of suppressive function of myeloid-derived suppressor cells by CD4(+) T cells." *Semin Cancer Biol*.

Nagaraj, S., K. Gupta, et al. (2007). "Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer." *Nat Med* 13(7): 828-835.

Nausch, N., I. E. Galani, et al. (2008). "Mononuclear myeloid-derived "suppressor" cells express RAE-1 and activate natural killer cells." *Blood* 112(10): 4080-4089.

Nefedova, Y., M. Fishman, et al. (2007). "Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells." *Cancer Res* 67(22): 11021-11028.

Nefedova, Y., S. Nagaraj, et al. (2005). "Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway." *Cancer Res* 65(20): 9525-9535.

Norian, L. A., P. C. Rodriguez, et al. (2009). "Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8+ T cell function via L-arginine metabolism." *Cancer Res* 69(7): 3086-3094.

Ochoa, A. C., A. H. Zea, et al. (2007). "Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma." *Clin Cancer Res* 13(2 Pt 2): 721s-726s.

Ormerod, M. G. (1997). "Analysis of cell proliferation using the bromodeoxyuridine/Hoechst-ethidium bromide method." *Methods Mol Biol* 75: 357-365.

Ostrand-Rosenberg, S., P. Sinha, et al. (2012). "Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression." *Semin Cancer Biol*.

Ozinsky, A., D. M. Underhill, et al. (2000). "The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13766-13771.

Pan, P. Y., G. Ma, et al. (2010). "Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer." *Cancer Res* 70(1): 99-108.

Pan, P. Y., G. X. Wang, et al. (2008). "Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function." *Blood* 111(1): 219-228.

Pasare, C. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptors and acquired immunity." *Semin Immunol* 16(1): 23-26.

Poeck, H., R. Besch, et al. (2008). "5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma." *Nat Med* 14(11): 1256-1263.

Poltorak, A., X. He, et al. (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* 282(5396): 2085-2088.

Priceman, S. J., J. L. Sung, et al. (2010). "Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy." *Blood* 115(7): 1461-1471.

Readett, D., L. Denis, et al. (2007). "PF-3512676 (CPG 7909), a Toll-like receptor 9 agonist—status of development for non-small cell lung cancer (NSCLC)." *12th World Congress on Lung Cancer; September 2–6; Seoul, Korea* PD3-1-6. 2007.

Ribechini, E., V. Greifenberg, et al. (2010). "Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells." *Med Microbiol Immunol* 199(3): 273-281

Ribechini, E., P. J. Leenen, et al. (2009). "Gr-1 antibody induces STAT signaling, macrophage marker expression and abrogation of myeloid-derived suppressor cell activity in BM cells." *Eur J Immunol* 39(12): 3538-3551.

Riedel, S. (2005). "Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination." *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 18(1): 21-25.

Rivoltini, L., M. Carrabba, et al. (2002). "Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction." *Immunol Rev* 188: 97-113.

Roder, J. C., A. K. Duwe, et al. (1978). "Immunological senescence. I. The role of suppressor cells." *Immunology* 35(5): 837-847.

Rodriguez, P. C., M. S. Ernstoff, et al. (2009). "Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes." *Cancer Res* 69(4): 1553-1560.

Rodriguez, P. C., C. P. Hernandez, et al. (2005). "Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma." *J Exp Med* 202(7): 931-939.

Rodriguez, P. C. and A. C. Ochoa (2008). "Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives." *Immunol Rev* 222: 180-191.

Rodriguez, P. C., D. G. Quiceno, et al. (2007). "L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression." *Blood* 109(4): 1568-1573.

Rodriguez, P. C., A. H. Zea, et al. (2002). "Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine." *J Biol Chem* 277(24): 21123-21129.

Sadun, R. E., S. M. Sachsman, et al. (2007). "Immune signatures of murine and human cancers reveal unique mechanisms of tumor escape and new targets for cancer immunotherapy." *Clin Cancer Res* 13(13): 4016-4025.

Satoh, T., H. Kato, et al. (2010). "LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(4): 1512-1517.

Schmielau, J. and O. J. Finn (2001). "Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients." *Cancer Res* 61(12): 4756-4760.

Schwandner, R., R. Dziarski, et al. (1999). "Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2." *J Biol Chem* 274(25): 17406-17409.

Schwartz, R. S. (2004). "Paul Ehrlich's magic bullets." *N Engl J Med* 350(11): 1079-1080.

Serafini, P., I. Borrello, et al. (2006). "Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression." *Semin Cancer Biol* 16(1): 53-65.

Serafini, P., R. Carbley, et al. (2004). "High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells." *Cancer Res* 64(17): 6337-6343.

Serafini, P., K. Meckel, et al. (2006). "Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function." *J Exp Med* 203(12): 2691-2702.

Shirota, Y., H. Shirota, et al. (2012). "Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells." *J Immunol* 188(4): 1592-1599.

Singer, K., E. Gottfried, et al. (2011). "Suppression of T-cell responses by tumor metabolites." *Cancer Immunol Immunother* 60(3): 425-431.

Sinha, P., V. K. Clements, et al. (2007). "Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells." *Cancer Res* 67(9): 4507-4513.

Sinha, P., V. K. Clements, et al. (2005). "Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis." *Cancer Res* 65(24): 11743-11751.

Sivori, S., S. Carlomagno, et al. (2006). "Comparison of different CpG oligodeoxynucleotide classes for their capability to stimulate human NK cells." *Eur J Immunol* 36(4): 961-967.

Slavin, S. and S. Strober (1979). "Induction of allograft tolerance after total lymphoid irradiation (TLI): development of suppressor cells of the mixed leukocyte reaction (MLR)." *J Immunol* 123(2): 942-946.

Srivastava, M. K., P. Sinha, et al. (2010). "Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine." *Cancer Res* 70(1): 68-77.

Stewart, T. J. and M. J. Smyth (2011). "Improving cancer immunotherapy by targeting tumor-induced immune suppression." *Cancer Metastasis Rev* 30(1): 125-140.

Subiza, J. L., J. E. Vinuela, et al. (1989). "Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice." *Int J Cancer* 44(2): 307-314.

Suzuki, E., V. Kapoor, et al. (2005). "Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity." *Clin Cancer Res* 11(18): 6713-6721.

Szuster-Ciesielska, A., E. Hryciuk-Umer, et al. (2004). "Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood." *Acta Oncol* 43(3): 252-258.

Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." *Int Immunol* 17(1): 1-14.

Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). "Toll-like receptors." *Annu Rev Immunol* 21: 335-376.

Takeuchi, O., K. Hoshino, et al. (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." *Immunity* 11(4): 443-451.

Takeuchi, O., A. Kaufmann, et al. (2000). "Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway." *J Immunol* 164(2): 554-557.

Tarleton, R. L. (2007). "Immune system recognition of Trypanosoma cruzi." *Curr Opin Immunol* 19(4): 430-434.

Terabe, M., S. Matsui, et al. (2003). "Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence." *J Exp Med* 198(11): 1741-1752.

Todryk, S. and P. Bejon (2009). "Malaria vaccine development: Lessons from the field." *Eur J Immunol* 39(8): 2007-2010.

Trickett, A. and Y. L. Kwan (2003). "T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads." *J Immunol Methods* 275(1-2): 251-255.

Underhill, D. M., A. Ozinsky, et al. (1999). "Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25): 14459-14463.

Vaknin, I., L. Blinder, et al. (2008). "A common pathway mediated through Toll-like receptors leads to T- and natural killer-cell immunosuppression." *Blood* 111(3): 1437-1447.

Veltman, J. D., M. E. Lambers, et al. (2010). "COX-2 inhibition improves immunotherapy and is associated with decreased numbers of myeloid-derived suppressor cells in mesothelioma. Celecoxib influences MDSC function." *BMC Cancer* 10: 464.

Vincent, J., G. Mignot, et al. (2010). "5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity." *Cancer Res* 70(8): 3052-3061.

Weiner, G. J. (2000). "The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides." *J Leukoc Biol* 68(4): 455-463.

Weiner, G. J., H. M. Liu, et al. (1997). "Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10833-10837.

Whiteside, T. L. (2009). "Tricks tumors use to escape from immune control." *Oral Oncol* 45(10): e119-123.

Williams, S. K., D. M. Hoenig, et al. (2010). "Intravesical therapy for bladder cancer." *Expert Opin Pharmacother* 11(6): 947-958.

Yang, L., J. Huang, et al. (2008). "Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis." *Cancer Cell* 13(1): 23-35.

Yang, R., Z. Cai, et al. (2006). "CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells." *Cancer Res* 66(13): 6807-6815.

Yarovinsky, F., D. Zhang, et al. (2005). "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." *Science* 308(5728): 1626-1629.

Yi, A. K., R. Tuetken, et al. (1998). "CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species." *J Immunol* 160(10): 4755-4761.

Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al. (2005). "Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity." *J Immunol* 175(5): 2851-2858.

Youn, J. I. and D. I. Gabrilovich (2010). "The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity." *Eur J Immunol* 40(11): 2969-2975.

Youn, J. I., S. Nagaraj, et al. (2008). "Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." *J Immunol* 181(8): 5791-5802.

Young, M. R., M. Newby, et al. (1987). "Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors." *Cancer Res* 47(1): 100-105.

Zea, A. H., P. C. Rodriguez, et al. (2005). "Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion." *Cancer Res* 65(8): 3044-3048.

Zent, C. S., B. J. Smith, et al. (2012). "Phase I clinical trial of CpG oligonucleotide 7909 (PF-03512676) in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia." *Leuk Lymphoma* 53(2): 211-217.

Zhang, D., G. Zhang, et al. (2004). "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." *Science* 303(5663): 1522-1526.

Zhao, F., B. Hoechst, et al. (2012). "S100A9 a new marker for monocytic human myeloid derived suppressor cells." *Immunology*.

Zhu, B., Y. Bando, et al. (2007). "CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* 179(8): 5228-5237.

Zoglmeier, C., H. Bauer, et al. (2011). "CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice." *Clin Cancer Res* 17(7): 1765-1775.

8. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

°C	Grad Celsius
3P-RNA	Triphosphat-Ribonukleinsäure
Abb	Abbildung
APC	Allophycocyanin
ARG1	Arginase 1
BALB/c	Bagg Albino
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BrdU	5-Brom-2‘-desoxyuridin
BrdU-POD	Peroxidase-gekoppelter anti-Bromdesoxyuridin Antikörper
CD	*Cluster of differentiation*
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
COX-2	Cyclooxygenase-2
CpG	Dinukleotid der Struktur Cytosin – Phosphat – Guanin
CR	Komplementrezeptor
DC	Dendritische Zelle
DMEM	*Dubecco’s modified eagle medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ehtylendiamintetraessigsäure
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
FACS	*Fluorescence-activated cell sorter*
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	*Forward scatter*
G	Gauge
G	Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
Gr-1	*granulocyte-differentiation antigen*
HBsAg	Hepatitis B Oberflächen-Antigen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	*Human leukocyte antigen*
HRP	*Horseradish peroxidase*
IFN	Interferon

IL	Interleukin
iMC	Unreife myeloische Zellen
iNOS	Induzierbare Stickstoffsynthase
isRNA	Immunstimulierende Ribonukleinsäure
JAK	Januskinase
LAM	Lipoarabinomannan
LGP2	*Laboratory of genetics and physiology-2*-Protein
LIN	*Lineage*
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
Ly6C	*Lymphocyte antigen 6 complex, locus C*
Ly6G	*Lymphocyte antigen 6 complex, locus G*
M	Molare Masse
Mac-1	*Macrophage-1*
MACS	*Magnetic-activated cell sorting*
MALP-2	*Macrophage-activating lipopepitde- 2*
M-CSF	Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
MDA-5	*Melanoma-differentiation-associated gene 5*
MDSC	*Myeloid-derived suppressor cell*
MEM	*Minimum essential medium*
MHC	*Major histocompatibiliy complex*
min	Minuten
MO-MDSC	*Monocyte-like Mmeloid-derived suppressor cell*
MyD88	*Myeloid differentiation primary response gene (88)*
NEAA	*Non essential amino acids*
NF-κB	*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ODN	Oligo(desoxy)nukleotid
p.t.	Peritumoral
PAMP	*Pathogen-associated molecular pattern*
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PFA	Paraformaldehyd
PGE_2	Prostaglandin E_2
PMN-MDSC	*Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cell*

poly(I:C)	Polyinosin-polycytidyl-Säure
PRR	*Pattern recognition receptor*
RIG-I	*Retinoic acid inducible gene I*
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RSV	Respiratory syncytial virus
SCF	Stammzellfaktor
SEM	Standardfehler
SSC	*Side scatter*
STAT	*Signal transducers and activators of transcription*
Tab	Tabelle
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TGF	*Transforming growth factor*
TLR	*Toll-like*-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T_{reg}	Regulatorische T Zelle
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
VLE	*Very low endotoxin*
WHO	*World Health Organisation*

9. Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe Tumorimmunologie bedanken. Ich hatte dort die Möglichkeit, in einer fachlich hervorragenden Arbeitsgruppe zu forschen. Für die Unterstützung bei der Aufnahme in das Förderprogramm des Graduiertenkollegs „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ bin ich ihm ebenso zu Dank verpflichtet wie für die Möglichkeit, meine Daten auf dem Kongress „Molecular targets for cancer therapy“ in den USA zu präsentieren.

Meiner Betreuerin im Rahmen meiner Dissertation, Frau Dr. Christine Zoglmeier gilt mein besonderer Dank für die kontinuierlich enge Betreuung und die kompetente Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten. Frau Professor Dr. Dr. Carole Bourquin als Leiterin der Arbeitsgruppe Tumorimmunologie gilt mein besonderer Dank für ihre stetige Unterstützung. Diese ging weit über jeglichen vorstellbaren Maßstab hinaus.

Bei meinen Kollegen in der Abteilung für Klinische Pharmakologie und meinen Mit-Doktoranden, insbesondere bei Herrn Georg Wedekind, möchte ich mich für die freundliche Atmosphäre im Labor und die gute Zusammenarbeit bedanken. Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Nadja Sandholzer und Frau Julia Vorac gilt mein Dank für ihren Rat bei mancherlei Fragen. Für die außerordentliche Unterstützung in organisatorischen Fragen bin ich Frau Monika Fahrenkamp zu Dank verpflichtet. Meinem Kommilitonen Holger Hägele, der zeitgleich an seiner Dissertation arbeitete, bin ich für seine kameradschaftliche Freundschaft mindestens ein Grillfleischsandwich mit Jahrhundertsoße schuldig.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, Dr. Gerhard Bittner und Eva Bittner, meinen Großeltern, Franz Xaver Eller († 2009) und Hermine Eller, sowie meinem Bruder Stefan Bittner für die stetige und geduldige Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken. Meiner Freundin Theresa Klose bin ich neben vielen anderen Dingen für das motivierende Beispiel einer engagierten Medizinstudentin und fleißigen Doktorandin zu Dank verpflichtet.

10. Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Die Ergebnisse vorliegender Dissertation wurden in folgender Arbeit veröffentlicht:

- Zoglmeier C, Bauer H, Nörenberg D, Wedekind G, **Bittner P**, Sandholzer N, Rapp M, Anz D, Endres S, Bourquin C
  CpG blocks immune suppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice
  Clinical Cancer Research, 2011
  17(7): 1765-1775

Zu obenstehender Arbeit wurde folgender Kommentar veröffentlicht:

- Lechner MG, Epstein AL
  A new mechanism for blocking myeloid-derived suppressor cells by CpG
  Clinical Cancer Research, 2011
  17(7): 1645-1648

Poster

- **Bittner P**, Zoglmeier C, Wedekind G, Sandholzer N, Endres S, Bourquin C
  Decreasing the suppressive activity of MDSC populations by stimulation of innate immune responses
  Molecular Targets for Cancer Therapy, Clearwater, USA (2009)

- Zoglmeier C, Wedekind G, **Bittner P**, Endres S, Bourquin C
  The effect of an activation of the innate immune system on the distribution and phenotype of MDSC subpopulations
  Molecular Targets for Cancer Therapy, Clearwater, USA (2009)

- **Bittner P**, Zoglmeier C, Wedekind G, Sandholzer N, Bourquin C, Endres S
  Myeloid-derived suppressor cells und ihre Rolle in der Tumorimmunologie
  doktamed Doktorarbeitstage Medizin, München (2009)

Vortrag

- **Bittner P**, Zoglmeier C, Sandholzer N, Endres S, Bourquin C
  Myeloid-derived suppressor cells and TLR-ligands in immunotherapy
  3rd Annual Retreat, Graduiertenkolleg 1202, Frauenchiemsee (2008)

11. **Lebenslauf**

Persönliche Daten

Name:	Philipp Max Bittner
geboren:	21.04.1985 in Erlangen

Studium

2005 - 2012	Studium der Humanmedizin an der LMU (München)
09/2007	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2007 – 2008	Experimentelle Forschung in der Klinischen Pharmakologie
2008 – 2010	Famulaturen 1 Monat Unfallchirurgie (Praxisfamulatur) in München 1 Monat Allgemeinchiurgie in Tunis (Tunesien) 1 Monat Plastische und Handchirurgie an der LMU 1 Monat Klinische Pharmakologie an der LMU
2010 – 2011	Praktisches Jahr 4 Monate Innere Medizin in New York und Cincinnati (USA) 4 Monate Orthopädie in Bad Tölz (Stadtklinik Bad Tölz) 4 Monate Chirurgie in München (Klinikum der LMU)
05/2012	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Schulbildung und Zivildienst

1995 – 2004	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Erlangen
06/2004	Allgemeine Hochschulreife
2004 – 2005	Zivildienst in der Krankenpflege und im Praktischen Arten- und Biotopschutz in Neuburg/ Donau und Hilpoltstein

Stipendien

2005 - 2012	Stipendiat nach dem BayBFG bzw. seit 10/10 nach dem BayEFG (Max-Weber-Programm)
11/07-07/08	Stipendiat des Graduiertenkollegs 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“, gefördert durch die DFG
03/2009	Reisekostenstipendium der gsk - Stiftung
08/11-12/11	Stipendium der Munich-Harvard Alliance for Medical Education für einen PJ-Aufenthalt in den USA