

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Arbeitsgruppe Tumorimmunologie

Leitung: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Der Effekt einer durch *Toll-like*-Rezeptor-Liganden induzierten  
Interferon- $\alpha$ -Produktion auf myeloide Suppressorzellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Helen Johanna Bauer

aus Rosenheim

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatlerin: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Carole Bourquin

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann  
Priv. Doz. Dr. Reinhard Obst  
Prof. Dr. Jan Braess

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres  
Dr. rer. nat. Christine Zoglmeier

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser,  
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2014

Meinen Eltern



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1	Immunantworten gegen Krebs und <i>immunosurveillance</i> .....	3
2.2	Grundzüge der Tumorimmuntherapie .....	4
2.3	<i>Toll-like</i> -Rezeptoren und therapeutische Oligonukleotide.....	6
2.4	Dendritische Zellen und Interferone .....	9
2.5	<i>Tumor-escape</i> -Mechanismen .....	12
2.6	Suppressoren des Immunsystems: <i>myeloid-derived suppressor cells</i> .....	13
2.6.1	Ursprung und Subpopulationen von MDSC .....	14
2.6.2	MDSC-Hemmmechanismen .....	16
2.6.3	Expansion und Aktivierung von MDSC .....	17
2.7	Zielsetzung und Fragestellung .....	18
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
3.1	Material.....	21
3.1.1	Versuchstiere, Zelllinien und rechtliche Bestimmungen .....	21
3.1.2	Reagenzien und Chemikalien .....	21
3.1.3	Puffer und Medien .....	25
3.1.4	Geräte .....	27
3.2	Methoden.....	27
3.2.1	Kultivierung von C26-Tumorzelllinien.....	27
3.2.2	Tumorinduktion.....	28
3.2.3	Tumorthherapie .....	28
3.2.3.1	CpG-Therapie .....	28
3.2.3.2	Interferon- $\alpha$ -Therapie .....	29
3.2.4	Zellgewinnung .....	29
3.2.4.1	Organentnahme .....	29
3.2.4.2	Waschen von Zellen.....	30
3.2.4.3	Herstellung von Einzelzellsuspensionen.....	30
3.2.4.4	Zellzählung.....	31
3.2.4.5	Zellaufreinigung.....	31
3.2.5	Zellkultur.....	35
3.2.6	Generierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen.....	35
3.2.7	Generierung von Überständen aktivierter Zellen.....	36

---

3.2.8	Induktion von Zellapoptose und -nekrose .....	36
3.2.9	Durchflusszytometrie .....	37
3.2.10	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA) .....	40
3.2.10.1	Standard-ELISA .....	40
3.2.10.2	BrdU-Suppressions-Assay .....	41
3.2.11	Arginase-Assay .....	44
3.2.12	Statistische Analyse .....	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
4.1	Methodische Voraussetzungen .....	47
4.1.1	Die Wahl der richtigen Aufreinigungsmethode: Vergleich von MACS Gr1-Positiv- <i>sort</i> , StemCell Gr1-PE-Positiv- <i>sort</i> und StemCell Negativ- <i>sort</i> .....	47
4.1.1.1	Reinheit .....	48
4.1.1.2	Viabilität .....	50
4.1.2	Die Auswirkung von Apoptose auf die Suppression im BrdU-Assay	52
4.1.3	Die Bindung von Gr1-Antikörpern und die Auswirkung auf MDSC ...	55
4.1.4	Konsequenzen für folgende Versuche .....	57
4.2	CpG-Immuntherapie, MDSC und die Rolle von IFN- $\alpha$ .....	57
4.2.1	Der Effekt von <i>in vivo</i> -CpG-Therapie auf MDSC in subkutanen Tumoren .....	58
4.2.2	Der Effekt von <i>in vivo</i> -CpG-Therapie auf MDSC in orthotopen Tumoren .....	61
4.2.3	Der Effekt von <i>in vitro</i> -CpG-Therapie auf MDSC .....	64
4.2.4	Überstandsversuche und die Rolle von plasmazytoiden dendritischen Zellen .....	66
4.2.5	Der Effekt von <i>in vitro</i> -IFN- $\alpha$ -Therapie auf MDSC .....	67
4.2.6	Der Effekt von <i>in vivo</i> -IFN- $\alpha$ -Therapie auf MDSC .....	70
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
5.1	Methodisches und Grundsätzliches .....	77
5.1.1	Aufreinigung und Antikörpereinfluss auf MDSC .....	77
5.1.2	Gesamt-MDSC versus MDSC-Subpopulationen .....	78
5.1.3	Subkutane und autochthone Tumormodelle in der Maus .....	79
5.2	MDSC unter TLR-Therapie .....	81
5.2.1	Abhängigkeit zwischen Expansion und Aktivität von MDSC .....	81

---

5.2.2	Verlust der suppressiven Aktivität der MDSC unter CpG-Therapie <i>in vivo</i> .....	82
5.2.3	Maturierung von MDSC .....	84
5.2.4	Die zentrale Bedeutung von plasmazytoiden dendritischen Zellen und IFN- $\alpha$ .....	85
5.2.5	MDSC-Hemmmechanismen nach CpG- und IFN- $\alpha$ -Therapie .....	87
5.3	MDSC als therapeutisches Ziel in der Tumorimmuntherapie.....	88
5.4	MDSC als therapeutisches Ziel in der gesamten Medizin.....	91
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis und Glossar .....</b>	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>117</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>119</b>



# 1 Zusammenfassung

Die Tumorimmuntherapie hat sich seit langem zum Ziel gesetzt, durch Aktivierung des körpereigenen Immunsystems Krebszellen zu bekämpfen. Ein Hindernis auf diesem Weg stellen verschiedene immunsupprimierende Mechanismen in der Tumorumgebung dar, die die Entstehung einer potenten antitumoralen Immunantwort verhindern. Dazu zählen die Expansion und Aktivierung von *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC), die bei Tumorerkrankungen akkumulieren und im Gewebe T-Zellantworten supprimieren. Für eine effektive Tumorimmuntherapie ist es unabdingbar, die tumorinduzierte Immunsuppression zu überwinden, sodass körpereigene Immunzellen aktiv werden und entartete Zellen vernichten können. Eine Möglichkeit hierfür besteht darin, die hemmende Aktivität von MDSC auszuschalten.

Der synthetische *Toll-like-Rezeptor* (TLR) 9-Ligand CpG ist ein potentes Adjuvans in der Tumorimmuntherapie und wird bereits in klinischen Studien getestet. Es gibt allerdings Beweise dafür, dass CpG unter bestimmten Bedingungen zu einer Expansion von MDSC führen kann, was den guten antitumoralen Effekten dieser Substanz zu widersprechen scheint. Wir untersuchten aufgrund dieser Beobachtungen, wie sich CpG-Therapie in einem subkutanen sowie einem orthotopen Tumormodell auf die Funktion sowie den Phänotyp von MDSC auswirken würde und beleuchteten die molekularen Mechanismen, die hinter unseren Beobachtungen steckten.

Nach einigen methodischen Optimierungen konnten wir in unseren Therapieversuchen mit CpG in beiden Tumormodellen nachweisen, dass es durch CpG-Therapie zu keiner weiteren Expansion der Zahl, sondern stattdessen zu einer starken Verminderung der Suppressivität von MDSC kommt. Durchflusszytometrisch wurde eine Hochregulation von bestimmten Oberflächenmarkern nachgewiesen, die mit dem Maturierungsstatus von MDSC einhergehen. Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), das von mit CpG stimulierten plasmazytoiden dendritischen Zellen sezerniert wurde, konnte als starker Einflussfaktor auf die Maturierung und Ausreifung von MDSC identifiziert werden. Schließlich führte die Therapie von C26-tumortragenden Mäusen mit IFN- $\alpha$ , ähnlich wie unter CpG-Therapie, ebenfalls zur Maturierung sowie zu reduzierter Suppressivität von MDSC.

Zum ersten Mal zeigen wir mit unseren Ergebnissen in zwei verschiedenen Tumormodellen, dass der TLR9-Ligand CpG zu einer deutlichen Reduktion der

immunsuppressiven Fähigkeiten und gleichzeitig zur Hochregulation von Maturierungs- und Aktivierungsmarkern von MDSC führt. Diese Ergebnisse untermauern das Konzept einer durch Adjuvantien wie CpG unterstützten Tumorimmuntherapie, da hierdurch nicht nur Immunzellen aktiviert, sondern auch immunsuppressive Zellen in ihrer Funktion gehemmt werden. Zusätzlich stellten wir fest, dass IFN- $\alpha$  für die beobachteten phänotypischen und funktionellen Veränderungen von MDSC verantwortlich war und zeigen somit einen neuen Mechanismus, durch den MDSC durch Stimuli von außen in ihrer Immunsuppression gehemmt werden können. Dieses tiefere biologische Verständnis von MDSC ist unabdingbar, um MDSC in der Tumorimmuntherapie nutzbar zu machen und stellt möglicherweise einen weiteren Schritt in Richtung einer effizienten Immuntherapie gegen Krebs dar.

## 2 Einleitung

### 2.1 Immunantworten gegen Krebs und *immunosurveillance*

Das Immunsystem, bestehend aus angeborenem und erworbenem Immunsystem, hat drei Hauptaufgaben in der Prävention von Tumoren: Erstens kann es Viren abwehren, die wie beispielsweise das Humane Papilloma Virus (HPV) im Menschen zu Krebs führen können. Zweitens kann durch die sofortige Elimination von Pathogenen die Entstehung einer chronischen Entzündung verhindert werden, die ebenfalls ein Auslöser von Krebs sein kann. Schließlich kann das Immunsystem in Form der sog. Immunüberwachung (*immunosurveillance* bzw. *immunoediting*) auch maligne entartete Zellen erkennen und zerstören (Burnet, 1957; Schreiber et al., 2011). Dies kann durch die Erkennung tumorspezifischer oder tumorassoziierter Antigene geschehen, die zur Etablierung einer Immunantwort und durch Aktivierung von T- und B-Zellen und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zur Zerstörung von Tumorzellen in einem frühen Stadium führt. Dies tritt erst ein, wenn die Tumorzelle körpereigene Schutzmechanismen (DNA-Reparaturmechanismen, Tumorsuppressorgene wie p53) bereits umgangen hat und dabei ist, einen wachsenden Tumor zu bilden (Vesely et al., 2010).

Eine Einschränkung des Immunsystems und der *immunosurveillance* führt zu einer erhöhten Anfälligkeit für maligne Erkrankungen. So sind auch schlechte Ernährung, Stress, Rauchen sowie exzessiver Alkoholkonsum, die die stärksten Risikofaktoren bei der Entstehung von Krebs darstellen, alle mit mehr oder weniger starken Veränderungen des Immunsystems verbunden (Perera, 1997; Reiche et al., 2004; Sun et al., 2013). Die Bedeutsamkeit der Immunüberwachung durch das Immunsystem lässt sich anhand von Daten immunsupprimierter Patienten verdeutlichen: Nach Organtransplantationen haben Patienten unter immunsuppressiver Therapie ein dreifach erhöhtes Risiko, an Krebs zu erkranken, insbesondere an viral bedingten Tumoren (Neuringer, 2013; Vajdic and van Leeuwen, 2009). Dabei ist das Risiko an Krebs zu erkranken, von der Länge und Intensität der immunsuppressiven Behandlung abhängig (Gutierrez-Dalmau, 2007). Auch bei AIDS-Patienten, deren Immunsystem durch den Verlust an CD4-T-Helferzellen durch das HI-Virus stark geschwächt ist, treten Malignome wie das Kaposi-Sarkom, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) als AIDS-definierende Malignome auf. Die Inzidenz von NHL in HIV-Patienten ist

beispielsweise beinahe um das 200-fache erhöht (Wood and Harrington, 2005), was den engen Zusammenhang zwischen der Funktionstüchtigkeit des Immunsystems und der Entwicklung von Tumoren verdeutlicht.

## **2.2 Grundzüge der Tumorimmuntherapie**

Ein starkes, nicht supprimiertes Immunsystem ist also die Grundvoraussetzung für eine effektive Therapie bei Krebserkrankungen, da sich der Körper damit aktiv gegen den Tumor wehren kann. Durch diese Erkenntnis entwickelte sich in den letzten Jahrzehnten ein neuer Zweig in der antitumoralen Therapie. Neben den konventionellen Möglichkeiten der Krebstherapie wie der chirurgischen Resektion sowie der Strahlen- und Chemotherapie könnte die Tumorimmuntherapie zur vierten Säule der modernen Krebstherapie werden. Alle diese Verfahren haben zum gemeinsamen Ziel, möglichst viel, am besten die komplette Tumormasse bis zur letzten Zelle zu entfernen. Jede Krebstherapie steht dabei allerdings vor dem Problem der Metastasierung oder auch der Resistenzbildung von Tumoren. Die chirurgische Resektion beispielsweise kann zwar lokale Tumoren erfolgreich entfernen, in der Bildgebung sowie makroskopisch nicht sichtbare Mikrometastasen sind dieser Therapieform allerdings schwer zugänglich. So erleiden z.B. Kolonkarzinompatienten in bis zu 40 bis 60 % der Fälle nach chirurgischer Resektion innerhalb von drei Jahren ein Rezidiv (Kanwar et al., 2012), bei Brustkrebspatientinnen können sich noch Jahre nach chirurgischer Therapie Rezidive und Metastasen bilden (Punglia et al., 2007). Bei der Strahlentherapie ist aufgrund der als Strahlenschäden bekannten Nebenwirkungen nur die Behandlung eines kleinen Bereiches möglich. Viele Chemotherapien haben wie die Strahlentherapie zahlreiche Nebenwirkungen wie die Schädigung der Mukosa des Gastrointestinaltraktes und des Knochenmarks, was zu Immunsuppression und bisweilen sogar zu Zweitmalignomen führen kann. Zudem gibt es zahlreiche Tumorzellen, die gegen Chemotherapien resistent sind (Kanwar et al., 2012).

Bisher stellt bei den meisten Krebsformen eine Kombination aus chirurgischer Resektion, Chemo- und Strahlentherapie den Goldstandard der Therapie dar, durch die das Gesamtüberleben der Patienten bereits in hohem Maße gesteigert werden konnte. Die Tumorimmuntherapie stellt nun eine neue und weitaus spezifischere Möglichkeit dar, Tumorzellen systemisch zu bekämpfen.

Die Tumorimmuntherapie hat sich zum Ziel gesetzt, einen Weg zu finden, wie man eine Therapie spezifisch nur gegen Tumorzellen richten kann und bedient sich der Hilfe des Immunsystems, das im gesunden Körper für die Immunüberwachung sorgt. Im Gegensatz zu allen anderen bisherigen Therapien gegen Tumoren könnte die Tumorimmuntherapie die einzige Therapie sein, die ein Leben lang anhält, da sie vom Körper selbst getragen wird. Theoretisch könnten immunisierte Patienten eine Immunantwort aufbauen, die den Tumor ständig in Schach hält, Rezidive verhindert oder verzögert und damit die Überlebensrate und die Lebensqualität erhöht (Vergati et al., 2010).

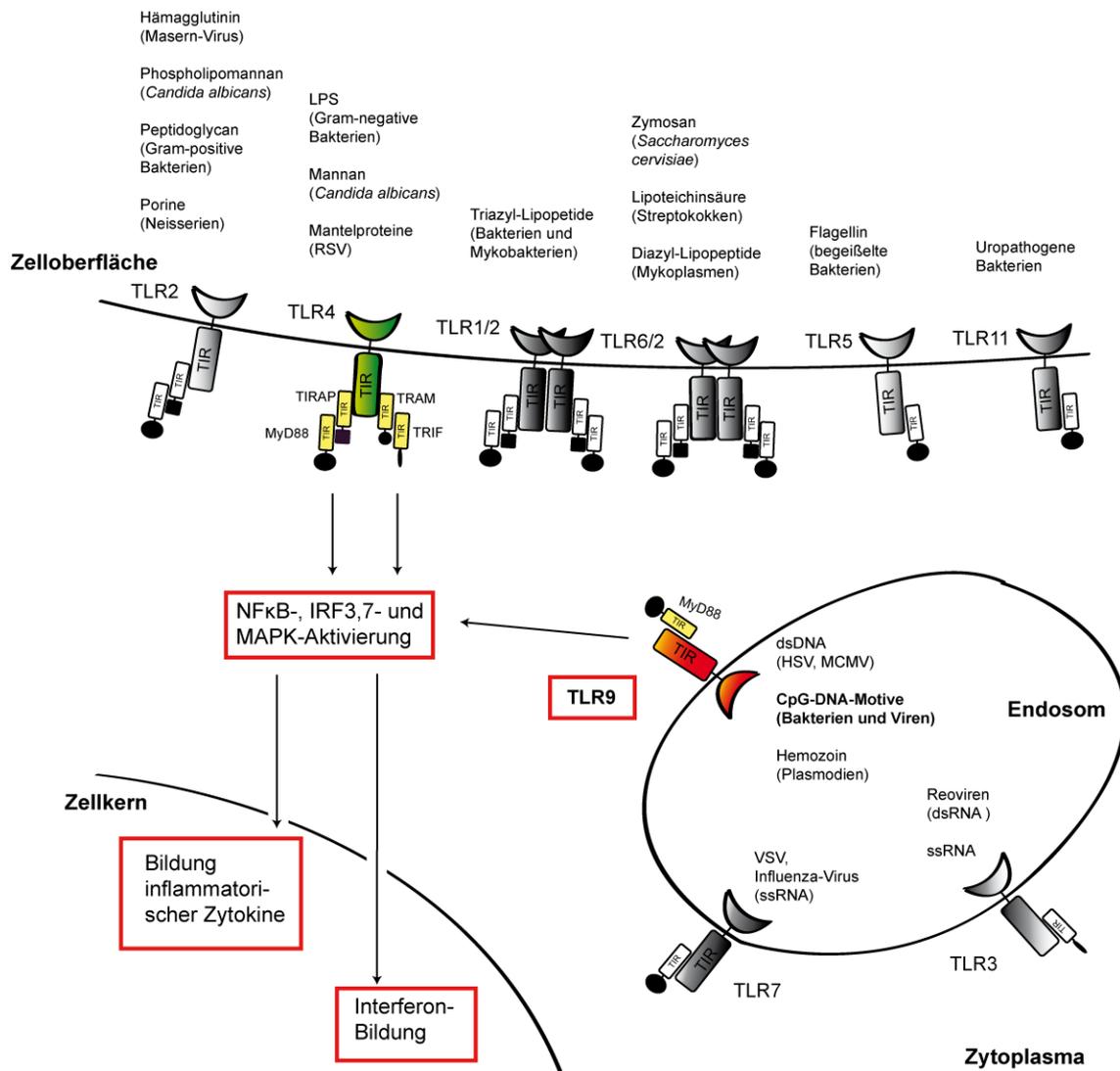
Generell kann die Tumorimmuntherapie eingeteilt werden in eine passive und eine aktive Immunisierung des Patienten, die in vielerlei Hinsicht ähnlich ist zur bekannten passiven und aktiven Impfung gegen Viren und Bakterien. Unter passiver Immunisierung versteht man die Gabe von antitumoralen Zytokinen, Antikörpern oder Zellen, die direkt gegen tumorspezifische Antigene gerichtet sind. 1998 wurde der erste monoklonale Antikörper für die Krebsimmuntherapie zugelassen, es handelt sich um das Medikament Rituximab zur Depletion von CD20-positiven Zellen (B-Zellen) bei malignen Lymphomen (Leget and Czuczman, 1998). Mittlerweile sind einige monoklonale Antikörper, die sich gegen verschiedene Krebs-assoziierte Proteine wie Her2/neu, EGFR, VEGF, CD20, CD52 oder CD33 richten, für die Therapie von soliden und hämatologischen Krebserkrankungen zugelassen (Mellman et al., 2011). Eine weitere Möglichkeit der passiven Tumorimmuntherapie ist die des adoptiven T-Zelltransfers, bei dem T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor gegen das gesuchte tumorspezifische Antigen gerichtet ist, transfundiert werden. Diese Methode entwickelt sich stetig fort, sodass zuletzt schon T-Zellen mit chimären, gegen CD19 gerichteten T-Zell-Rezeptoren erfolgreich bei refraktärer Chronischer Lymphatischer Leukämie eingesetzt wurden (Porter et al., 2011). Insbesondere in Kombination mit anderen antitumoralen Therapiestrategien wie beispielsweise der antiangiogenetischen Therapie kann die adoptive Tumorimmuntherapie immer bessere Erfolge verzeichnen (Shi et al., 2013), auch wenn die Immunsuppression durch das *microenvironment* der Tumoren ein großes Problem für die Effektivität der Therapien darstellt (siehe 2.5). Aktuell werden auch einige klinische Studien zur Sicherheit und Effektivität von adoptivem T-Zell-Transfer durchgeführt, beispielsweise bei therapierefraktären B-Zell-Lymphomen ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), NCT01029366).

Im Gegensatz zur passiven Immunisierung versteht man unter aktiver Immunisierung die direkte Aktivierung des Immunsystems durch verschiedenartige Vakzinen. Wie

auch bei einer normalen Impfung wird das Immunsystem durch die Vakzinen derart stimuliert, dass es schließlich selbst eine spezifisch gegen die Tumorzellen gerichtete Immunantwort auslöst (Brody et al., 2011). Ein Beispiel für die aktive Tumormimmuntherapie ist die Vakzinierung mit dendritischen Zellen (Benencia et al., 2012; Lesterhuis et al., 2004; Schuler, 2010), bei der autologe dendritische Zellen (DC) *ex vivo* mit Antigenen aus Tumorlysaten oder bekannten Tumorantigenen beladen werden, dem Patienten zurückgegeben werden (intravenös, intradermal oder intranodal), um dort T- und B-Zellen zu aktivieren. Die beladenen DC müssen allerdings noch zusätzlich aktiviert werden und maturieren, um eine Immunreaktion durch T- und B-Zellen auslösen zu können. Die Aktivierung von dendritischen Zellen kann z. B. durch sog. „*danger signals*“ wie *pathogen-associated molecular patterns*, also von Molekülen, die z. B. von Bakterien, Viren oder Pilzen exprimiert werden, geschehen. Dieser zusätzliche Stimulus ist notwendig, damit sich das Immunsystem wirklich nur gegen fremde und nicht gegen körpereigene Strukturen wendet, was zu Autoimmunität führen würde (Mellman et al., 2011). Bleibt dieser Stimulus und die damit verbundene DC-Aktivierung aus, kommt es zur Toleranzentwicklung und zur Anergie von Lymphozyten. *Pathogen-associated molecular patterns* werden von *pathogen recognition receptors* erkannt, die von dendritischen Zellen exprimiert werden (Medzhitov and Janeway, 2000). Durch Bindung von Pathogen-assoziierten Molekülen werden sie aktiviert und maturieren daraufhin. Jetzt können sie T- und B-Zellen aktivieren und immunstimulatorische Zytokine wie beispielsweise Interleukin-12 (IL-12) oder IFN- $\alpha$  ausschütten (Reis e Sousa, 2004).

### 2.3 *Toll-like*-Rezeptoren und therapeutische Oligonukleotide

Die Aktivierung von dendritischen Zellen als Teil des angeborenen Immunsystems kann durch verschiedene Arten von *pathogen recognition receptors* (PRR) geschehen (Kumar et al., 2009). Eine besonders wichtige und interessante Untergruppe der PRR sind *Toll-like*-Rezeptoren (TLR). Bisher sind 13 verschiedene TLR bekannt, zehn im Menschen und 13 in der Maus, die zu den PRR des angeborenen Immunsystems gehören (Kumar et al., 2009; Takeda and Akira, 2005). Zum besseren Verständnis sind in **Abbildung 1** die bisher bekannten murinen TLR und ihre Liganden dargestellt (nach (Kumar et al., 2009; Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009).



**Abbildung 1: Die Familie der Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden**

Die Toll-like-Rezeptoren (TLR) 1, 2, 4, 5, 6 und 11 befinden sich an der Zelloberfläche, TLR3, 7 und 9 befinden sich im Endosom. Nach Bindung von PAMP (zu jedem TLR sind die wichtigsten Liganden dargestellt), kommt es über Aktivierung von Adaptermolekülen wie MyD88 zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und folglich zur Bildung proinflammatorischer Zytokine und Interferon. Beispielhaft ist dies für TLR4 und 9 gezeigt. Letzterer ist markiert aufgrund seiner besonderen Rolle in der vorliegenden Arbeit. Abbildung nach (Kumar et al., 2009; Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009)

- |        |  |        |   |
|--------|--|--------|---|
| dsDNA  | Double-stranded (Doppelstrang)-DNA                               | RSV:   | Respiratory syncytial virus                         |
| dsRNA  | Double-stranded (Doppelstrang)-RNA                               | ssRNA: | Single-stranded (Einzelstrang)-RNA                  |
| HSV:   | Herpes-simplex-Virus   | TIR:   | Toll/interleukin-1 receptor-like domain             |
| IRF:   | Interferon regulatory factors                                    | TIRAP: | TIR-containing adaptor protein                      |
| LPS:   | Lipopolysaccharid  | TIRAP: | TIR-containing adaptor protein                      |
| MCMV:  | Murines Zytomegalie-Virus  | TRIF:  | TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β |
| MyD88: | Myeloid differentiation primary response gene 88                 | VSV:   | Vesicular stomatitis virus                          |
| NFκB:  | Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |        |   |

Mittels TLR kann das Immunsystem zwischen Selbst und Fremd unterscheiden und Bakterien, Pilze und Viren bekämpfen. Diese Organismen exprimieren diverse *pathogen-associated molecular patterns*; beispielsweise exprimieren gramnegative Bakterien Lipopolysaccharid (LPS) in ihrer Zellwand, das von TLR4 erkannt wird. Daraufhin wird eine Signalkaskade ausgelöst, die schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB), einer proinflammatorischen Th1-antigenspezifischen Immunantwort und zur Expression proinflammatorischer Zytokine sowie den Typ I Interferonen IFN-α und IFN-β und Hochregulation kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86 führt, die für die Aktivierung der dendritischen Zellen und der adaptiven Immunantwort unabdingbar sind. Ähnliche Signalkaskaden werden auch ausgelöst, wenn bakterielle oder virale DNA über Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Motive (CpG-Motive) nach Aufnahme in die Zelle an den endosomalen TLR9 bindet (Hemmi et al., 2000; Krug et al., 2001), auch hier wird letztlich die Produktion von Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen induziert. Im Gegensatz zu menschlicher DNA enthält bakterielle DNA eine hohe Zahl von CpG-Motiven. Auch menschliche DNA enthält CpG-Motive, diese liegen allerdings meist in methyliertem und damit inaktivem und für das Immunsystem nicht erkennbarem Zustand vor, sodass die DNA vor Zerstörung durch das eigene Immunsystem geschützt ist (Jain et al., 2003).

Nach dem Vorbild dieser *pathogen-associated molecular patterns* können zur Stimulation von TLR und damit zur Aktivierung von dendritischen Zellen auch synthetische Oligonukleotide verwendet werden. Für TLR9 werden unterschiedliche Typen von synthetischen CpG-Oligonukleotiden (CpG-ODN; kurze DNA-Stücke mit spezifischen CpG-Dinukleotid-Motiven) gebraucht, die an den intrazellulären TLR9 binden, z. B. Typ A, B oder C CpG-Oligonukleotide, die leichte Unterschiede in der Art der Aktivierung des Immunsystems aufweisen (Agrawal and Kandimalla, 2003).

Schon früh wurde bekannt, dass die Aktivierung durch TLR9-Liganden eine antiinfektiöse Wirkung zeigt; beispielsweise wurde die gute Wirksamkeit von CpG als Adjuvans bei Impfstoffen beschrieben (Krieg et al., 1999). Auch konnten erste Erfolge in der passiven Tumormimmuntherapie gezeigt werden, in der bei der zusätzlichen Gabe von CpG-ODN zu monoklonalen Antikörpern gegen ein B-Zell-Lymphom in der Maus die Überlebensrate von 10 bis 30% auf beachtliche 70 bis 80 % gesteigert werden konnte (Wooldridge et al., 1997). Auch in den folgenden Jahren mehrten sich die Beweise für die antitumorale Wirkung von CpG, vor allem, wenn es zusammen mit einer Chemotherapie oder DC-Vakzinen verabreicht wurde (Krieg, 2004). Auch im

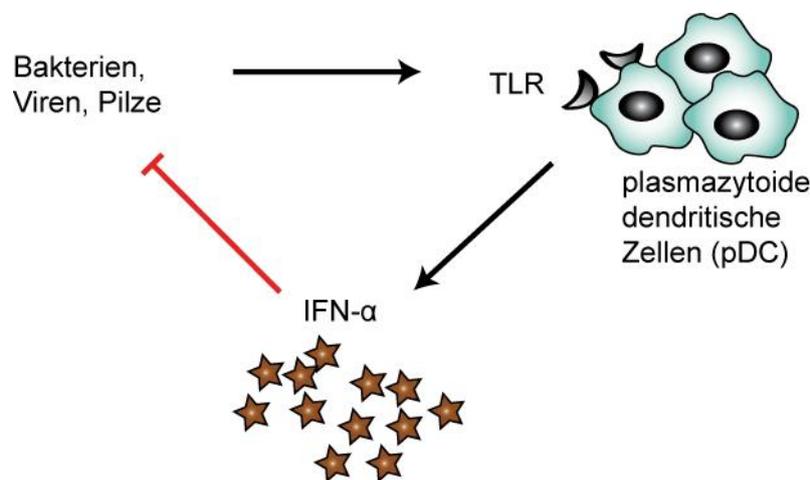
murinen C26-Tumormodell, einem subkutanen Kolonkarzinommodell, konnte dieser Effekt bei kombinierter DC-Vakzinierung, Chemotherapie und CpG als Adjuvans bestätigt werden (Bourquin et al., 2006). Diese Erkenntnisse im Mausmodell führten schließlich zu Phase II und III Studien bei Patienten mit CpG als möglicher Immuntherapie bei Krebs, z.B. bei B-Zell-Lymphomen (Brody et al., 2010) oder nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom (*non small cell lung cancer*, NSCLC) (Manegold et al., 2008). Stetig werden neue klinische Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit von CpG als Adjuvans in der Tumorimmuntherapie durchgeführt ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), Stichwort „CpG“). Mehrere klinischen Studien zur CpG-Therapie waren allerdings nicht erfolgreich, beispielsweise wurde eine Phase III Studie aufgrund von nicht nachgewiesener erhöhter Effizienz gegenüber der Kontrollgruppe abgebrochen (Murad and Clay, 2009). Aus diesem Grund ist es von großer Relevanz, weitere Grundlagenforschung zur Therapie mit CpG-ODN und deren Wirkungsweise auf den menschlichen Körper durchzuführen.

In der Tumorimmuntherapie wurden bereits einige TLR-Liganden als Adjuvantien getestet, allerdings erst wenige zur Behandlung von Patienten zugelassen (Ishii and Akira, 2007). Darunter werden z. B. die TLR7-Liganden Imiquimod und Resiquimod zur lokalen Behandlung von Basaliomen, Blasenkrebs und Genitalwarzen eingesetzt (Love et al., 2009; Smith et al., 2007; Vacchelli et al., 2012), jedoch gestaltet sich die systemische Anwendung als Adjuvans durch viele Nebenwirkungen als schwierig (Savage et al., 1996). Auch in anderen medizinischen Gebieten als der Onkologie finden TLR-Agonisten bereits Anwendung. Für die Behandlung von Allergien und Asthma mit CpG liegen bereits vielversprechende Ergebnisse vor (Gupta and Agrawal, 2010). Andererseits kann die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch TLR-Aktivierung auch unerwünscht sein, beispielsweise bei Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematoses. Hier wird statt einer Aktivierung der TLR durch die Therapie mit TLR-Antagonisten versucht, die Bildung von Autoantikörpern gegen körpereigenes Gewebe zu stoppen (Horton et al., 2010).

## 2.4 Dendritische Zellen und Interferone

Dendritische Zellen (DC) sind antigenpräsentierende Zellen des angeborenen Immunsystems, die bei Infektionen durch die Bindung von TLR-Liganden aktiviert werden und daraufhin B- und T-Zellen aktivieren können. Neben myeloiden

dendritischen Zellen (mDC) spielen v. a. plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) eine wichtige duale Rolle in der aktiven Tumormimmuntherapie. Einerseits sind sie unabdingbare antigenpräsentierende Zellen des angeborenen Immunsystems, die durch Präsentation von tumorspezifischen Antigenen eine Immunantwort des erworbenen Immunsystems initiieren können. Andererseits haben pDC die Fähigkeit in Form einer Immunantwort nach TLR-Aktivierung durch fremde Antigene große Mengen an IFN- $\alpha$  zu produzieren (**Abbildung 2**). Aus diesem Grund sind sie auch unter dem Namen *type I interferon-producing cells* (IPC) bekannt (Siegal et al., 1999; Swiecki and Colonna, 2010).



### Abbildung 2: IFN- $\alpha$ -Produktion durch plasmazytoide dendritische Zellen

Plasmazytoide dendritische Zellen bilden nach TLR-Liganden-Bindung große Mengen an Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), das zu Elimination der eindringenden Pathogene durch multiple Mechanismen unter Aktivierung des Immunsystems führt.

Interferone sind Zytokine des Immunsystems, die bei vielen Immunantworten durch Stimulation von Viren, Bakterien oder chemischen Substanzen ausgeschüttet werden und hauptsächlich antiviral, antiproliferativ und immunmodulatorisch wirken, sowie eine wichtige Rolle in der Immunüberwachung von Tumoren spielen (Platanias, 2005). Vor über 50 Jahren wurden sie zum ersten Mal beschrieben und bald wurde klar, dass Interferone eine wichtige Rolle im Immunsystem spielen und als mögliche Therapie gegen Viren eingesetzt werden könnten. Trotz der hohen Forschungstätigkeit auf

diesem Gebiet sind die biologische Wirksamkeit von Interferonen und die zugehörigen Mechanismen aufgrund ihrer Komplexität allerdings noch nicht vollständig geklärt (Borden et al., 2007).

Es sind drei Klassen von Interferonen bekannt, die an unterschiedliche Rezeptoren binden (Ng and Gomerman, 2013). Die Typ I Interferone Interferon- $\alpha$  und Interferon- $\beta$  lösen bei Bindung an ihre Rezeptoren (Interferon- $\alpha$ -Rezeptor (IFNAR)-1 und -2) Signalkaskaden über Mitglieder der *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Familie aus, wodurch die Gentranskription im Zellkern reguliert wird. Das Typ II Interferon IFN- $\gamma$  bindet an einen anderen Rezeptor und hat andere, wenngleich ähnliche Signaltransduktionswege und biologische Funktionen als die Typ I Interferone (Pestka et al., 2004). Die zuletzt entdeckten Typ III Interferone, die auch als IL-28 und IL-29 bekannt sind, scheinen dieselben Signaltransduktionswege zu aktivieren wie Typ I Interferone und inhibieren wie diese ebenfalls Tumorzellproliferation durch Zellzyklusarrest und Apoptose. Im Gegensatz zu Typ I Interferonen scheinen sie aber eine verminderte Toxizität gegenüber normalen Zellen zu besitzen, weshalb sie aktuell als antitumoral wirkende Substanzen getestet werden (Tagawa et al., 2011).

IFN- $\alpha$  gehört zur Gruppe der Typ I Interferone, die aus 13 funktionellen Subtypen besteht, die an die gleichen Rezeptoren, IFNAR-1 und -2, binden. Nach Bindung an den Rezeptor werden *Janus-activated kinase* (JAK)/STAT-Kaskaden ausgelöst, wodurch weitere Signaltransduktionswege induziert werden. Daneben wurden aber noch weitere wichtige Signalelemente entdeckt, über die IFN- $\alpha$  wirken kann, beispielsweise durch Aktivierung von *mitogen-activated protein kinases* (MAP)-Kinasen sowie Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen (PI3K) (Platanias, 2005). Über diese verschiedenen Signaltransduktionswege kann IFN- $\alpha$  die Expression einer großen Bandbreite von Genen (sog. ISG, *IFN-stimulated genes*) induzieren, wodurch sich seine vielseitige Wirkung und seine multiplen Effekte auf unterschiedlichste Zelltypen und -funktionen erklären lassen. In den letzten Jahrzehnten wurden die Wirkmechanismen von IFN- $\alpha$  ausführlich erforscht und neben seiner antiviralen auch seine antitumorale Wirkung entdeckt (Gresser et al., 1969; Isaacs and Burke, 1958). Seitdem wurde IFN- $\alpha$  für mehr als 14 verschiedene Krebstypen, darunter hämatologische Erkrankungen wie Leukämien und Lymphome, solide Tumoren wie Melanome, Nierenzellkarzinome und Kaposi-Sarkome eingesetzt. Ebenso ist es Teil der Standardmedikation von viralen Erkrankungen wie Hepatitis B und C (Platanias, 2005; Vilcek, 2006). Für die chronische myeloische Leukämie beispielsweise war bis zur Zulassung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib die Behandlung mit IFN- $\alpha$  die

Therapie der ersten Wahl und wird weiterhin in der Kombinationstherapie eingesetzt (Simonsson et al., 2011). IFN- $\beta$  wird interessanterweise zudem in der Therapie von Multipler Sklerose eingesetzt (Bermel and Rudick, 2007).

Die Wirkung von IFN- $\alpha$  ist vielseitig, insgesamt führt es neben der direkten Hemmung der viralen Replikation zu einer generellen Aktivierung des Immunsystems, beispielsweise durch Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen, die schließlich infizierte Zellen vernichten. Zudem zeigt IFN- $\alpha$  gute Wirkung in anderen immunologischen, angiogenetischen, inflammatorischen und fibrotischen Erkrankungen (Bogdan, 2000). Der antitumorale Effekt dieses Zytokins kann u.a. darauf zurückgeführt werden, dass IFN- $\alpha$  die Proliferation normaler und auch von Tumorzellen *in vitro* als auch *in vivo* hemmen kann. Mechanismen dafür sind beispielsweise die Hochregulation von *major histocompatibility complex* (MHC I) auf Tumorzellen, was zu einer besseren Erkennung durch das Immunsystem führt oder die Hochregulation von Tumorsuppressorgenen und Herabregulation von Protoonkogenen (Ferrantini et al., 2007; Gutterman, 1994). Zudem werden auch dendritische Zellen selbst durch IFN- $\alpha$  stimuliert, sodass sie potentere Immunantworten in Form einer Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten auslösen können (Tosi et al., 2004).

## 2.5 Tumor-escape-Mechanismen

Die Tumorimmuntherapie mit Immunstimulantien wie CpG-ODN ist ein vielversprechender und viel erforschter Ansatz, um Tumoren mit Hilfe des Immunsystems zu bekämpfen. Es gibt allerdings viele Hindernisse auf diesem Weg, da im Tumormikromilieu (*tumor microenvironment*) Mechanismen vorhanden sind, die die Effektivität des Immunsystems außer Kraft setzen können. So wurden vor kurzem die sogenannten *Hallmarks of Cancer*, postuliert von D. Hanahan und R. Weinberg, um zwei wichtige Bereiche erweitert: Neben Veränderungen im Energiestoffwechsel der Tumorzellen wurde auch deren Fähigkeit, der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen, als entscheidend für Tumorentstehung und –progression anerkannt (Hanahan and Weinberg, 2011). Die Aufnahme in diese *hallmarks*, die die wichtigsten Eigenschaften zusammenfassen, die ein malignes Tumorgeschehen ausmachen, unterstreicht die herausragende Bedeutung des Immunsystems in der modernen Krebstherapie.

Generell bedient sich der Tumor zweierlei Strategien, um das Immunsystem zu umgehen: Entweder „versteckt“ er sich vor dem Immunsystem oder er setzt die Zellen des Immunsystems direkt durch verschiedene Mechanismen außer Gefecht. Grundsätzlich wird das Gewebe, das einen sich bildenden Tumor umgibt, nämlich durchaus von Immunzellen infiltriert, oft können diese aber keine hinreichende Immunantwort initiieren. In Tumorzellen sind beispielsweise Erkennungsmoleküle für T-Zellen wie MHC I herabreguliert und oftmals bilden sie nur tumorassoziierte Antigene aus, die einen schwächeren Stimulus für T-Zellen darstellen als tumorspezifische Antigene, noch dazu, wenn sie vom Tumor an dessen Oberfläche durch Mutationen nicht korrekt präsentiert werden (Marincola et al., 2000).

Tumorzellen können auch Faktoren sezernieren, die Immunzellen entweder in ihrer Funktion einschränken oder sie gar in Apoptose, den programmierten Zelltod, gehen lassen, beispielsweise Zytokine wie IL-10, *transformed growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), Tumornekrosefaktor (TNF) oder Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B (Whiteside, 2006; Yaguchi et al., 2011). Zusätzlich können Tumoren bestimmte immunsupprimierende Zellen wie regulatorische T-Zellen, tumorassoziierte Makrophagen (TAM) oder regulatorische dendritische Zellen rekrutieren, die ebenfalls Immunantworten hemmen (Curiel, 2008; Shurin et al., 2013; Solinas et al., 2009). Solche Zellen braucht der Körper physiologischerweise, um überschießende Immunantworten, die zu Autoimmunkrankheiten führen könnten, zu unterdrücken. Bei Tumorerkrankungen geht die Infiltration des Tumors mit derartigen Zellen allerdings mit einer Verschlechterung der Prognose einher (Curiel, 2008; Curiel et al., 2004). Neben diesen durch von Tumoren sezernierten Zytokinen rekrutierten regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ -Zellen) akkumulieren auch *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) im Tumorgewebe und fördern das Tumorwachstum, indem sie das Immunsystem supprimieren. Da sie die Hauptakteure der vorliegenden Arbeit sind, wird ihnen im Folgenden ein eigener Abschnitt gewidmet.

## 2.6 Suppressoren des Immunsystems: *myeloid-derived suppressor cells*

MDSC sind eine heterogene Population von Zellen, die aus myeloiden Vorläuferzellen und unreifen myeloiden Zellen besteht. Unter pathologischen Bedingungen wie Infektionen, Entzündungen, Verletzungen, Sepsis oder Knochenmarks-

transplantationen akkumulieren MDSC, da die physiologisch vorkommenden myeloiden Vorläuferzellen (*immature myeloid cells*, IMC) einem Maturierungsblock unterliegen und nicht weiter ausdifferenzieren können (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Auch unter nichtpathologischen Bedingungen sind solche Zellen im Blut und anderen Organen nachzuweisen, jedoch in sehr geringer Zahl, da sie sehr schnell zu reifen Zellen wie Granulozyten, Makrophagen oder DC ausdifferenzieren. Nur im pathologischen Milieu akkumulieren diese Zellen im Blut, in der Milz und im Tumorgewebe.

Wie der Begriff „heterogen“ schon vermuten lässt, ist eine präzise Definition von MDSC noch immer schwierig. Insgesamt haben alle MDSC gemeinsam, dass sie myeloiden Ursprungs sind und ähnliche biologische Eigenschaften aufweisen. Die wichtigste bekannte und namensgebende Eigenschaft von MDSC ist ihre Fähigkeit, T-Zellproliferation und –aktivierung zu unterdrücken, weshalb MDSC einen bedeutenden Faktor im immunsuppressiven Milieu des *microenvironments* von Tumoren darstellen (Umansky and Sevko, 2013). Für verschiedene Tumorarten konnte bei Patienten mit hoher MDSC Zahl im Blut zudem eine Verschlechterung der Prognose festgestellt werden, sodass MDSC als Angriffspunkt für antitumorale Therapien geeignet sind (Raychaudhuri et al., 2011; Solito et al., 2011).

### 2.6.1 Ursprung und Subpopulationen von MDSC

Mitte der 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurden in der wissenschaftlichen Literatur zum ersten Mal „natürliche Suppressorzellen“ erwähnt (Strober, 1984). Etwa ein Jahrzehnt später stellte man fest, dass im Tumorgewebe von Patienten eine stark erhöhte Anzahl von unreifen Zellen nachzuweisen waren, die in der Lage waren, T-Zellproliferation *in vitro* und damit eine effektive Immunantwort zu unterdrücken (Pak et al., 1995). Die Forschung der folgenden Jahre brachte die Erkenntnis, dass es sich bei diesen natürlichen Suppressorzellen um Zellen myeloiden Ursprungs handelt. Nachdem früher verwendete Begriffe wie *myeloid suppressor cells* oder *immature myeloid cells* diese Zellpopulation nicht hinreichend beschrieben und die uneinheitliche Namensgebung für Verwirrung sorgte, wurden diese Zellen schließlich unter dem Oberbegriff *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) zusammengefasst (Gabrilovich et al., 2007). Doch erst die letzten Jahre brachten etwas mehr Klarheit in die Funktion von MDSC innerhalb des Immunsystems und in welchem Zusammenhang sie mit Tumorentstehung und Tumorprogression stehen (Gabrilovich et al., 2012). Seither

forschen weltweit mehrere Gruppen an dieser Thematik und MDSC entwickeln sich immer mehr zu einem möglichen Ziel der Tumorummuntherapie.

Grundsätzlich unterschieden werden müssen MDSC im Menschen von MDSC in der Maus, da sie in beiden Systemen durch unterschiedliche Oberflächenantigene bestimmt werden. Menschliche MDSC exprimieren CD11b sowie CD33, sind aber MHC II negativ und ihnen fehlen Oberflächenmarker von reifen myeloiden und lymphoiden Zellen. Zudem können sie unterteilt werden in eine granulozytische CD14<sup>-</sup> und eine monozytische CD14<sup>+</sup> Unterpopulation (Greten et al., 2011). In der Maus – und im Folgenden wird fast ausschließlich auf das murine System eingegangen werden – werden MDSC als Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> definiert. CD11b ist dabei auch unter dem Namen *Macrophage-1 antigen* (Mac-1) bekannt. Gr1 ist ein Granulozyten-Antigen, das bisher nur in der Maus beschrieben ist und hier vor allem im Knochenmark in frühen Stadien der Myelopoese exprimiert wird (Subiza et al., 1989). Im Menschen findet sich kein zu murinem Gr1 homologes Antigen, was die Übertragbarkeit der Studien an murinen MDSC auf den Menschen erschwert.



PMN-MDSC

(CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>high</sup>/Ly6G<sup>+</sup>/Ly6C<sup>low</sup>)



MO-MDSC

(CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>low</sup>/Ly6G<sup>-</sup>/Ly6C<sup>high</sup>)

### Abbildung 3: Murine MDSC-Subpopulationen

Murine granulozytäre (PMN-) MDSC zeichnen sich durch die Markerkonstellation CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>high</sup>/Ly6G<sup>+</sup>/Ly6C<sup>low</sup> aus. Monozytäre (MO-) MDSC werden durch die Markerkonstellation CD11b<sup>+</sup>/Gr1<sup>low</sup>/Ly6G<sup>-</sup>/Ly6C<sup>high</sup> definiert.

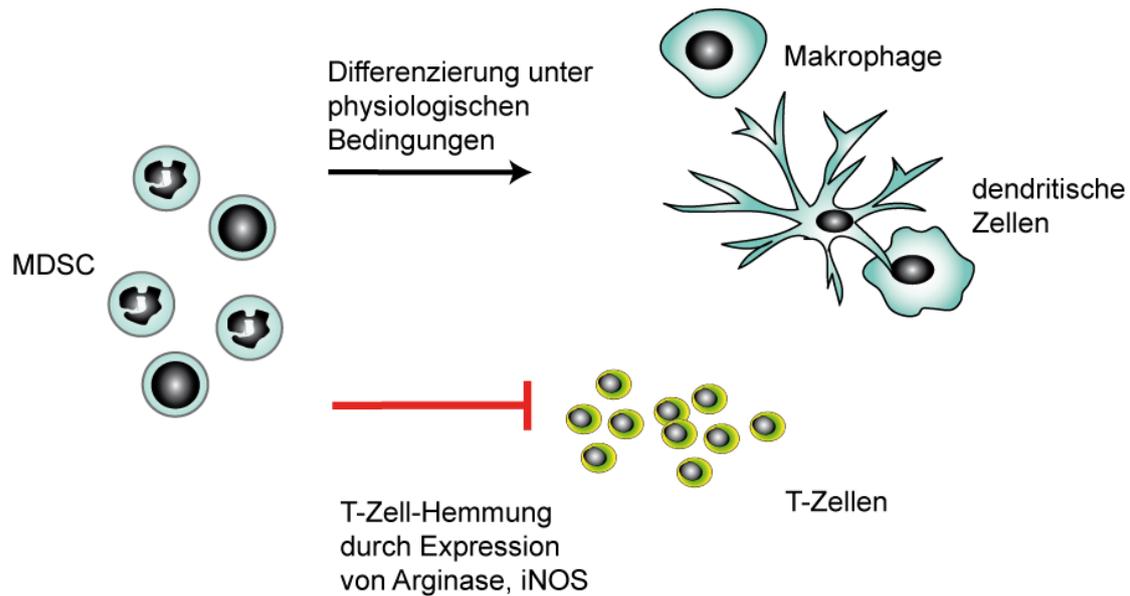
In den letzten Jahren konnten MDSC in weitere Unterpopulationen unterteilt werden, nämlich durch die unterschiedlichen Intensitäten in der Expression von Gr1 sowie der beobachteten Kernmorphologie der Zellen (Greifenberg et al., 2009). Gr1 besteht aus den zwei unterschiedlichen Epitopen Ly6G sowie Ly6C und beide Epitope können durch dafür spezifische Antikörper auch separat detektiert werden. Die beiden wichtigsten MDSC-Untergruppen sind polymorphonukleäre MDSC (PMN-MDSC) sowie monozytäre (MO-MDSC, **Abbildung 3**). PMN-MDSC zeichnen sich durch einen

granulozytären Phänotyp mit ringförmigem oder segmentiertem Zellkern aus und lassen sich durch die Markerkonstellation  $CD11b^+/Gr1^{high}/Ly6G^+/Ly6C^{low}$  definieren. MO-MDSC haben einen monozytären Phänotyp mit rundem Zellkern und zeigen das Markerprofil  $CD11b^+/Gr1^{low}/Ly6G^-/Ly6C^{high}$  (Youn and Gabrilovich, 2010).

### 2.6.2 MDSC-Hemmmechanismen

MDSC besitzen die Fähigkeit, das Immunsystem des Wirtes durch verschiedene Mechanismen zu supprimieren. Hauptziele der MDSC stellen dabei direkt die T-Zellen dar. PMN-MDSC hemmen die T-Zellproliferation vorwiegend durch die Produktion von *reactive oxygen species* (ROS), wodurch die Rezeptoren der T-Zellen geschädigt werden (Kusmartsev et al., 2005). MO-MDSC hemmen T-Zellen zusätzlich durch Expression des Enzyms *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), das auf T-Zellen auf verschiedene Weisen schädigend wirkt. Beide Populationen exprimieren in hohem Maße das Enzym Arginase-1, durch das die essentielle Aminosäure Arginin im Medium depletiert wird (Bronte and Zanovello, 2005). T-Zellen benötigen Arginin zur Expression ihrer CD3- $\zeta$ -Kette, die zur vollständigen Synthese des CD3-T-Zell-Rezeptors und damit zur Funktionsfähigkeit der T-Zelle unabdingbar ist (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Rodriguez et al., 2004). Auch durch Induktion von regulatorischen T-Zellen sowie Sekretion von TGF- $\beta$  stellen hemmen MDSC die Funktionsfähigkeit des Immunsystems (Huang et al., 2006; Li et al., 2009).

Erst kürzlich wurden zwei weitere Hemmmechanismen von MDSC aufgedeckt, nämlich die Depletion der Aminosäure Cystein, die T-Zellen nicht selbst synthetisieren können und die für ihre Aktivierung nötig ist (Srivastava et al., 2010). Zudem können MDSC das Zelladhäsionsmolekül L-Selektin (CD62L) auf T-Lymphozyten herabregulieren, ein essentielles Molekül für das sog. Lymphozyten-Homing, das ebenfalls wichtig zur Aktivierung von T-Zellen ist (Ostrand-Rosenberg, 2010). In **Abbildung 4** wird die Hemmung von T-Zellen durch MDSC noch einmal schematisch zusammengefasst, zudem wird gezeigt, dass MDSC unter physiologischen Bedingungen zu reifen und nicht mehr immunsupprimierenden Zellen ausdifferenzieren können (Gabrilovich et al., 2012).



**Abbildung 4: Hemmung und Differenzierung von MDSC**

MDSC hemmen T-Zell-Proliferation und Aktivierung durch verschiedene Mechanismen wie Expression von Arginase oder iNOS (induzierbare NO-Synthase). Unter physiologischen Bedingungen können MDSC zu reifen Makrophagen oder dendritischen Zellen ausdifferenzieren.

### 2.6.3 Expansion und Aktivierung von MDSC

Unter pathologischen Bedingungen akkumulieren MDSC wie bereits erwähnt im Entzündungsgewebe, im Blut und in lymphoiden Organen. Wie allerdings die Regulation dieser Akkumulation vonstatten geht, stellt noch immer eine der Hauptfragen in der Biologie von MDSC dar (Condamine and Gajarski, 2011). Diese Expansion von MDSC, die physiologischerweise im Knochenmark und in geringer Zahl auch im gesamten Körper vorkommen, wird durch verschiedene Faktoren ausgelöst. Besonders in Tumoren und deren *microenvironment* werden Substanzen produziert, die die Expansion von MDSC fördern und unter Umständen auch zu einer Aktivierung von MDSC führen können (Gajarski et al., 2012). Die Wirkung dieser Tumorfaktoren zeigt sich bereits in *in vitro*-Versuchen, in denen normale Knochenmarkszellen einen immunsuppressiven Phänotyp erlangen, wenn sie einige Tage mit den Überständen von bestimmten Tumorzellen und den darin enthaltenen Tumorfaktoren kultiviert werden (Young et al., 1987). Ebenso können solche vom Tumor produzierte Substanzen z. B. immunsuppressive Makrophagen rekrutieren und die normale Differenzierung von DC unterdrücken (Lin et al., 2002). Zu diesen Tumorfaktoren

zählen GM-CSF, das normalerweise die Expansion und Differenzierung myeloider Vorläuferzellen regelt, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), das zur Angiogenese im Tumor gebildet wird, Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-10, die bei Entzündungen gebildet werden und bei erhöhten Werten ein schlechter Prognosefaktor bei Tumorpatienten darstellen (Serafini et al., 2006). Einige der genannten Tumorfaktoren führen zur Aktivierung von *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3)-Signalkaskaden. Auf molekularer Ebene spielt STAT3 eine wichtige Rolle bei der Proliferation und dem Überleben von Tumorzellen, ebenso wie in der Inhibition von antitumoralen Immunantworten (Yu et al., 2009). Zudem wurde gezeigt, dass eine persistierende Aktivierung von STAT3 zu Immunsuppression durch die Expansion von MDSC führen kann (Wu et al., 2011).

Auch Infektionen führen zur Expansion von MDSC, beispielsweise durch Bakterien wie Salmonellen, Protozoen wie *Toxoplasma gondii* oder Pilzen wie *Candida albicans* (Ribechini, Greifenberg et al. 2010). In einem Modell polymikrobieller Sepsis konnte nachgewiesen werden, dass die Expansion von MDSC hier TLR- bzw. vom TLR-Adaptermolekül *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) abhängig ist (Delano et al., 2007) und auch die chronische Gabe von TLR-Liganden wie TLR2, 3, 4 und 9 hat eine Expansion von MDSC zur Folge (Greifenberg et al., 2009). Die Frage, ob MDSC dadurch nicht nur in ihrer Anzahl zunehmen, sondern auch aktiviert werden und damit stärker supprimierend wirken, wurde bisher noch nicht eindeutig geklärt (Vaknin et al., 2008).

## 2.7 Zielsetzung und Fragestellung

MDSC unterdrücken eine effiziente Immunantwort durch verschiedene Mechanismen und fördern somit durch Umgehung der körpereigenen Immunüberwachung das Tumorwachstum. Um die Wirksamkeit von Tumorimmuntherapien zu verbessern, müssen neben der Etablierung von potenten Immunstimulatoren auch die *Tumor-escape*-Mechanismen überwunden werden. Als vielversprechender Ansatz gilt es, die Rekrutierung und Aktivierung von MDSC auszuschalten, um dann mit Hilfe eines kompetenten Immunsystems Tumorzellen als gefährlich zu erkennen und sie zu vernichten.

Therapeutische Oligonukleotide, die an TLR binden und dadurch eine Immunantwort gegen Bakterien oder Viren simulieren, haben nachweislich auch einen Anti-Tumoreffekt: Werden tumortragende Mäuse mit CpG-Oligonukleotiden therapiert, so verringert sich die Tumorgröße im Laufe der Therapie signifikant und ihre Überlebensrate steigt deutlich an. Dies geschieht zum einen durch die direkte Stimulation des Immunsystems über dendritische Zellen und konsekutive Aktivierung von Lymphozyten. Welche Auswirkungen CpG-ODN jedoch auf immunregulatorische Zellen hat, ist zur Zeit nicht abschließend geklärt.

Die folgende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt, die Einflüsse von CpG-ODN auf MDSC zu studieren und herauszufinden, ob CpG direkt oder indirekt auch auf MDSC einen Einfluss ausüben kann und welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen. Dies würde erklären, wieso MDSC einerseits bei CpG-Gabe in tumorfreien Tieren stark ansteigen, CpG aber dennoch eine effektive antitumorale Wirkung etablieren kann. Klinisch ist diese Fragestellung insofern relevant, als MDSC immer mehr zu einem interessanten Ziel der Tumorimmuntherapie avancieren: Könnte die immunregulatorische Funktion der MDSC ausgeschaltet werden, so könnten Immuntherapien und damit die Bekämpfung von Krebs effizienter gemacht werden.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Versuchstiere, Zelllinien und rechtliche Bestimmungen

##### Versuchstiere

Für die Versuche an Mäusen wurden verschiedene Mausstämme verwendet. Für Versuche im C26-Tumormodell wurde mit weißen Balb/c-Mäusen im Alter von 4 bis 8 Wochen gearbeitet. Die Tiere stammten von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, D). Die von uns verwendeten CEA424-SV40-T-Antigen-transgenen (CEA424-TAg-) Mäuse mit C57/BL6 Hintergrund, die ab Tag 40 spontan gastrointestinale Tumoren entwickeln (siehe 5.1.3) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. W. Zimmermann, LIFE Zentrum, Klinikum der Universität München, zur Verfügung gestellt und in unserer Abteilung weitergezüchtet. Für unsere Versuche wurden 90 bis 100 Tage alte CEA424-TAg-Mäuse verwendet.

##### Zelllinie

Die C26-Kolon-Karzinom-Zelllinie wurde von Cell Lines Service (Eppelheim, D) erworben und in unserem Labor weitergezogen (siehe 3.2.1).

##### Rechtliches

Alle Tiere wurden gemäß den Vorgaben des Tierschutzgesetzes gehalten und sämtliche Tierversuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

#### 3.1.2 Reagenzien und Chemikalien

##### Allgemeine Versuchsreagenzien und –chemikalien

jeweils mit Hersteller

*Aqua ad injectabilia*

*Aqua destillata*

B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)

selbstgewonnen durch

Wasseraufbereitungsanlage Direct-Q

3UV der Firma Millipore (Billerica, MA,

	USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
DNase/Kollagenase	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	
(DMEM) <i>high glucose</i>	PAA (Pasching, A)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Biochrom (Berlin, D); Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACS Clean Solution	BD Biosciences (San Diego, USA)
FACS Flow Solution	BD Biosciences (San Diego, USA)
Flüssiger Stickstoff	Linde AG (München, D)
<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>	
(Flt3)–Ligand	Tebu-Bio (Offenbach, D)
Fötales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL (Paisley, GB)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Hydroxyethylpiperazinethanschwefelsäure	
(HEPES) Puffer	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Isofluran (Forene®)	Abbott (Wiesbaden, D)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, D)
Leupeptin (Proteaseinhibitor)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
L-Glutamin	PAA (Pasching, A)
<i>minimum essential medium with non-essential amino acids</i>	
(MEM-NEAA)	GibcoBRL (Paisley, GB)
Natriumchlorid (NaCl 0,9 %)	Baxter S. A. (Lessines, B)
Natriumkarbonat (pH 9,5)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Natrium-Pyruvat	Biochrom (Berlin, D)
Penicillin	PAA (Pasching, A)
Pepstatin A (Proteaseinhibitor)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
PharmLyse Lysereagenz	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	PAA (Pasching, A)
Rattenserum	StemCell Technologies (Grenoble, F)
<i>Roswell Park Memorial Institute</i>	
(RPMI) 1640 Medium	Biochrom (Berlin, D)
RPMI <i>very low endotoxin</i> (VLE)	PAA (Pasching, A)
Streptomycin	PAA (Pasching, A)
Tris-HCL (pH 7,4)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Triton-X 100	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin (10x)	PAA (Pasching, A)
Tween-20 (pH 7,0)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

### Spezielle Reagenzien für *in vitro*- und *in vivo*-Experimente

jeweils mit eingesetzter Konzentration in Klammern sowie Hersteller

Rekombinantes IFN- $\alpha$ (300 I.U. pro Well bzw. 100 $\mu$ g i.p.)	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, D)
CpG-B-ODN (1826) (6 $\mu$ g/ml)	Coley Pharmaceutical Group (Langenfeld, D)
Neutralisierende Antikörper gegen: IFN- $\alpha$ (2 $\mu$ g/ml)	PBL Interferon Source (Piscataway, NJ, USA)
IL-2 (20 $\mu$ g/ml), IL-6 (5 $\mu$ g/ml), IL-10 (5 $\mu$ g/ml), IL-12 (20 $\mu$ g/ml)	alle R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)

### FACS-Antikörper

Alle FACS-Antikörper stammen von BD Biosciences (Heidelberg, D) oder BioLegend (San Diego, CA, USA). Klone sind in Klammern angegeben. Die Antikörper wurden in unterschiedlicher Zusammensetzung in folgenden Farben verwendet: PE, PerCP, Pe-Cy7, APC, APC-Cy7, Pacific Blue und FITC.

Annexin V
TO-PRO-3 Iodid
Anti-Gr1 (RB6-8C5)
Anti-Ly6G (1A8)
Anti-Ly6C (AI-21)
Anti-CD11b (MI/70)
Anti-CD11c (HL3)
Anti-F4/80 (CI:A3-1)

Anti-CD80 (16-10A1)  
 Anti-CD86 (GL1)  
 Anti-MHC II (MR-4)  
 Anti-Sca1 (D7)  
 Anti-CD3 (145-2C11)  
 Anti-CD4 (RM4-5)

### Kits zur Zellaufreinigung

#### Zellaufreinigung mittels EasySep® System:

##### StemCell Gr1-PE-Positivsort

*Positive selection cocktail (PE)*

*PE selection cocktail*

*Magnetic nanoparticles*

StemCell Technologies (Grenoble, France)

##### StemCell Negativsort

*Negative selection cocktail*

(Antikörperkombination CD3, CD5, CD19,  
 CD45R/B220, Ter119)

*Biotin selection cocktail*

*Magnetic nanoparticles*

StemCell Technologies (Grenoble, France)

#### Zellaufreinigung mittels *magnetic-activated-cell sorting (MACS)*:

##### MACS Gr1-Positivsort

Anti-Gr1-Biotin

Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

Anti-Biotin-Mikropartikel

Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

Anti-Mouse CD45R/B220,

*Magnetic Particles*

BD Biosciences (Heidelberg, D)

##### BrdU-Suppressions-Assay

*Cell Proliferation ELISA, BrdU*

*(chemiluminescent)*

Roche Diagnostics (Mannheim, D)

Anti-CD3/CD28 Mikropartikel

Invitrogen (Carlsbad, USA)

Arginase-Assay

QuantiChrom Arginase-Assay Kit

BioAssay Systems (Hayward, CA, USA)

ELISA-Kits*Mouse* IL-2 ELISA Set (OptEIA™)

BD Biosciences (San Diego, CA, USA)

*Mouse* IFN- $\alpha$  ELISA

PBL Interferon Source (Piscataway, NJ, USA)

**3.1.3 Puffer und Medien**Puffer und Medien in der Zellkultur:FACS-Puffer

5 % FCS

in PBS

10x Annexin-Puffer

(BD Biosciences, San Diego, USA)

0,1 M HEPES/NaOH (pH 7,4)

1,4 M NaCl

25 mM CaCl<sub>2</sub>

in Aqua dest., 1:10 verdünnt

StemCell Puffer für Gr1-PE-Positivsort

2 % FCS

1 mM EDTA

in PBS

MACS-Puffer

10 % FCS

2 mM EDTA

in PBS

Erythrozyten-Lyse-Puffer

10 % PharmLyse

in PBS

Lysepuffer für Arginase-Assay

10 mM Tris-HCL (pH 7,4)

0,4 % Triton-X 100

0,15 mM Pepstatin A

0,2 M Leupeptin

StemCell Puffer für Negativsort

2 % FCS

1 mM EDTA

5 % Rattenserum

in PBS

T-Zell-Medium (TZM)

10 % FCS  
 2 mM L-Glutamin  
 100 IU/ml Penicillin  
 100 µg/ml Streptomycin  
 1 mM Natrium-Pyruvat  
 2 mM MEM-NEAA  
 1 x 10<sup>-4</sup> % β-Mercaptoethanol  
 in RPMI 1640 VLE

pDC-Medium

10 % FCS  
 100 IU/ml Penicillin  
 100 µg/ml Streptomycin  
 2 mM MEM-NEAA  
 1 % L-Glutamin  
 1 x 10<sup>-4</sup> % β-Mercaptoethanol  
 0,1 % Flt3-Ligand  
 in RPMI 1640 VLE  
 (β-Mercaptoethanol und Flt3-Ligand  
 immer frisch dazugegeben)

C26-Zellmedium

10 % FCS  
 2 mM L-Glutamin  
 100 IU/ml Penicillin  
 100 µg/ml Streptomycin  
 in DMEM

Medien und Puffer für enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)Coating buffer

0,1 M Natriumkarbonat (pH 9,5)  
 in Wasser

Wash buffer

0,05 % Tween-20 (pH 7,0)  
 in PBS

Blocking buffer und assay diluent

10 % FCS (pH 7,0)  
 in PBS

Stop solution

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 3.1.4 Geräte

ELISA-Reader	Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB)
FACS Canto II	BD Biosciences (San Diego, USA)
Luminometer (Mithras LB 940)	BertholdTechnologies (Bad Wildbad, D)
Mikroskop (Axiovert 25)	Zeiss (Jena, D)
Mini MACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D)
UV-Gerät für Bestrahlung	Biotec-Fischer (Reiskirchen, D)
20 G; 27 G-Kanülen	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
LS-Säulen	Miltenyi (Bergisch-Gladabch, D)
EasySep© Magnet	StemCell Technologies (Grenoble, France)
Wasserbehandlungsanlage	
Direct-Q 3UV	Millipore (Billerica, MA, USA)

Einweg-Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg, D), Bibby Sterilin (Stone, GB), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg, D), Falcon (Heidelberg, D), Gilson (Den Haag, NL) Greiner (Frickenhausen, D), Henke-Sass Wolf (Tuttlingen, D) und Sarstedt (Nümbrecht, D) bezogen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Kultivierung von C26-Tumorzelllinien

Die C26-Kolonkarzinom-Zelllinien wurden ursprünglich von der Firma *Cell Lines Service* (Eppenheim, D) bezogen, in unserem Labor vermehrt und nach wenigen Passagen in flüssigem Stickstoff ( $< -195,8^{\circ}\text{C}$ ) unter Zugabe von DMSO als Lösungsmittel aufbewahrt. Zur Kultivierung der Zellen wurden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt und zügig in C26-Zellmedium aufgenommen. Nach einem Waschschrift (Zentrifugation bei 400 g, 7 min, Dekantieren des Überstands) wurde das verbleibende Zellpellet in ca. 20 ml C26-Zellmedium in eine Kulturflasche aufgenommen.

Da C26-Zellen ein starkes Wachstum aufweisen, wurden die Zellen mindestens 2 Mal pro Woche oder bei Bedarf vereinzelt (= splitten). Dazu wurde das alte Medium der adhärennten Zellen mit einer Pipette abgenommen und verworfen. In wenigen ml frischem Medium wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Wand der Kulturflasche gelöst und nach Vereinzelnung mittels einer 20 G-Kanüle im Verhältnis 1:3 in neue Kulturflaschen mit neuem Medium ausgesät. Routinemäßig wurde die Vitalität der Zellen mittels Trypanblau-Tests geprüft (vgl. 3.2.4.4) sowie eine mikrobielle Verunreinigung ausgeschlossen.

### **3.2.2 Tumorinduktion**

Zur Tumorinduktion wurden die C26-Zellen zunächst wie beim Splitten der Zellen beschrieben, vereinzelt. Um mögliche Agglutinationen der stark adhärennten Zellen zu vermeiden, wurden die Zellen zur Tumorinduktion mehrfach mit Hilfe einer 20 G-Kanüle vereinzelt, gewaschen und in PBS aufgenommen. Nach Zählung der Zellen und Ausschluss toter Zellen mittels Trypanblau-Test konnten die Zellen injiziert werden. Dazu wurden Balb/c-Mäusen 250 000 C26-Zellen in 150 µl PBS s.c. mit einer 27 G-Kanüle in die rechte hintere Flanke injiziert. Nach ca. 1 Woche waren die Tumoren tastbar, nach 14 Tagen hatten die Tumoren eine Größe von ca. 100 mm<sup>2</sup> erreicht. Nach 3 bis 4 Wochen wurden Mäuse mit Tumoren von etwa 100 bis 250 mm<sup>2</sup> für die Versuche eingesetzt. Die Mäuse wurden zunächst mit dem Anästhetikum Isofluran narkotisiert und danach durch zerebrale Dislokation getötet. Daraufhin wurden Milzen, Tumoren sowie Knochenmark für FACS-Analysen und zur Aufreinigung von MDSC entnommen.

### **3.2.3 Tumorthherapie**

#### **3.2.3.1 CpG-Therapie**

Um die Wirkung des Oligonukleotids CpG auf die verschiedenen Tumormodelle im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu untersuchen, wurde den Tieren CpG verabreicht. Wir verwendeten *phosphorothioate* (PTO)-modifiziertes CpG1826 (5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3' von Coley Pharmaceutical Group (Langenfeld, D)). Es handelt sich dabei um CpG der Klasse B, das eine Aktivierung insbesondere von B-Zellen sowie

eine Maturierung von pDC auslöst, jedoch nur eine schwache Induktion von IFN- $\alpha$ -Sekretion durch pDC auslöst (Krieg, 2006). 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CpG (verdünnt aus dem Stock mit PBS oder NaCl) wurde den Tieren dafür s.c. gespritzt. Für den Fall, dass die Tiere zuvor einen subkutanen Tumor bekommen hatten, wurde das CpG auf der kontralateralen Seite injiziert, ansonsten im Bereich der rechten Flanke. Die Kontrollgruppe erhielt simultan 100  $\mu\text{l}$  PBS, ebenfalls s.c. appliziert. Für *in vitro*-Versuche wurde routinemäßig eine CpG-Konzentration von 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  benutzt.

### 3.2.3.2 Interferon- $\alpha$ -Therapie

C26-tumortragenden Tieren, deren Tumoren nach 3 Wochen 100 bis 200  $\text{mm}^2$  erreicht hatten, wurden je 10  $\mu\text{g}$  rekombinantes IFN- $\alpha$  in 150  $\mu\text{l}$  PBS verdünnt i.p. verabreicht. Dies geschah im Abstand von jeweils 24 h an 3 aufeinander folgenden Tagen. 24 Stunden nach der letzten IFN- $\alpha$ -Gabe wurden die Organe der Tiere entnommen. Die Kontrollgruppe erhielt simultan 150  $\mu\text{l}$  PBS, ebenfalls i.p. appliziert.

### 3.2.4 Zellgewinnung

Zur Gewinnung von Zellpopulationen wie MDSC mussten zunächst die Organe der Versuchstiere entnommen und daraus Einzelzellsuspensionen hergestellt werden. Nach dem Zählen der Zellen konnte mit der Aufreinigung der Zellen begonnen werden. Im Folgenden wird das Vorgehen für diese einzelnen Schritte erläutert.

#### 3.2.4.1 Organentnahme

##### Milz

Zur Organentnahme wurde nach Betäubung mit Isofluran und zervikaler Dislokation (gemäß § 4 Tierschutzgesetz) das Fell der Tiere desinfiziert, von ventral her abpräpariert und der Situs eröffnet. Mit einer Pinzette wurde daraufhin die Milz entnommen und in ein mit sterilem PBS gefülltes Falcon-Tube auf Eis zwischengelagert.

### Knochen

Zur Gewinnung von Knochenmark wurden den Tieren Femora und Tibiae entnommen. Nach Abpräparation des Fells von den Extremitäten wurden zunächst die Knochen durch Entfernen des umliegenden Muskelgewebes freigelegt. Das Hüftgelenk wurde exartikuliert, ebenso Knie- und Sprunggelenk, um Femur von Tibia zu trennen. Die gewonnenen Knochen wurden mit Isopropanol desinfiziert und dann zur Gewinnung von Knochenmark weiterverwendet (siehe 3.2.6).

### Tumor

Subkutane C26-Tumoren der Mäuse wurden von umgebendem Fell befreit und herauspräpariert. In PBS und auf Eis wurden sie bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

#### **3.2.4.2 Waschen von Zellen**

Beim Umgang mit Zellsuspensionen ist es sowohl in der Zellkultur als auch bei vielen anderen Methoden wie der Durchflusszytometrie oder fotometrischen Assays nötig, Zellen zu waschen. Dies bedeutet, dass die Zellen von nicht bindenden, die Probe verunreinigenden Bestandteilen getrennt werden, um schließlich eine reine Zellpopulation zu gewinnen. Ein Waschschrift wurde durchgeführt, indem zunächst die Konzentration der Zellsuspension durch Zugabe von zusätzlichem Volumen verringert wurde, meist in Form von PBS oder Medium, wodurch die Zellen gut vereinzelt wurden. Daraufhin wurden die Zellen abzentrifugiert, standardmäßig bei 400 g und 4 °C für 7 min. Wurde mit aufgereinigten MDSC gearbeitet, so wurde zur Schonung der Zellen bei 300 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Zellpellet im neuen gewünschten Volumen PBS oder Medium resuspendiert.

#### **3.2.4.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen**

Milzen der Versuchstiere wurden unter sterilen Bedingungen zunächst mit dem Stempel einer 5 ml-Spritze durch 40 µm-Siebe gedrückt und in 50 ml Falcon-Tubes in PBS mit 2 % FCS aufgefangen. Nach Abzentrifugation bei 400 g und 4 °C für 7 min wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet in 4 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Nach 3 min wurde die Lyse-

Reaktion durch Auffüllen des Falcon-Tubes mit PBS abgestoppt. Nach einem Waschschrift wurde das Pellet in PBS mit 2 % FCS aufgenommen.

Um aus Tumoren eine Einzelzellsuspension herzustellen, wurden Tumoren zunächst mit Einwegskalpellen in kleinen Kulturschälchen zerkleinert. Nach einem Waschschrift bei 400 g, 4 °C für 5 min wurde durch Zugabe von 0,05 mg/ml DNase sowie 1 mg/ml Kollagenase für 30 bis 45 min bei 37°C unter Schütteln das Bindegewebe des Tumors zerstört. Danach wurden die Zellgemische in zwei Schritten gefiltert, zunächst durch ein 100 µm-Zellsieb, ein zweites Mal durch ein 40 µm-Zellsieb. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in PBS aufgenommen und weiterverarbeitet.

Zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen von Knochenmarkszellen siehe 3.2.6.

#### **3.2.4.4 Zellzählung**

Zur Bestimmung der Zellzahl und schließlich der Konzentration der Zellsuspension wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Zum Ausschluss toter Zellen wurden die Zellen dem Farbstoff Trypanblau ausgesetzt. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran nehmen diesen Stoff nicht auf, nur geschädigte oder tote Zellen färben sich blau. Zur Zellzahlbestimmung wurden nur vitale, also ungefärbte Zellen gezählt.

#### **3.2.4.5 Zellaufreinigung**

Zur Gewinnung von MDSC mussten aus einer Einzelzellsuspension entweder alle Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen isoliert oder alle Gr1<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup> Zellen entfernt werden. Diesen beiden Prinzipien zufolge handelt es sich um einen Positiv-, respektive einen Negativsort. Im Folgenden werden die verschiedenen Methoden beschrieben, die zur Aufreinigung und Anreicherung von MDSC verwendet wurden.

### 3.2.4.5.1 MACS Gr1-Positivsort

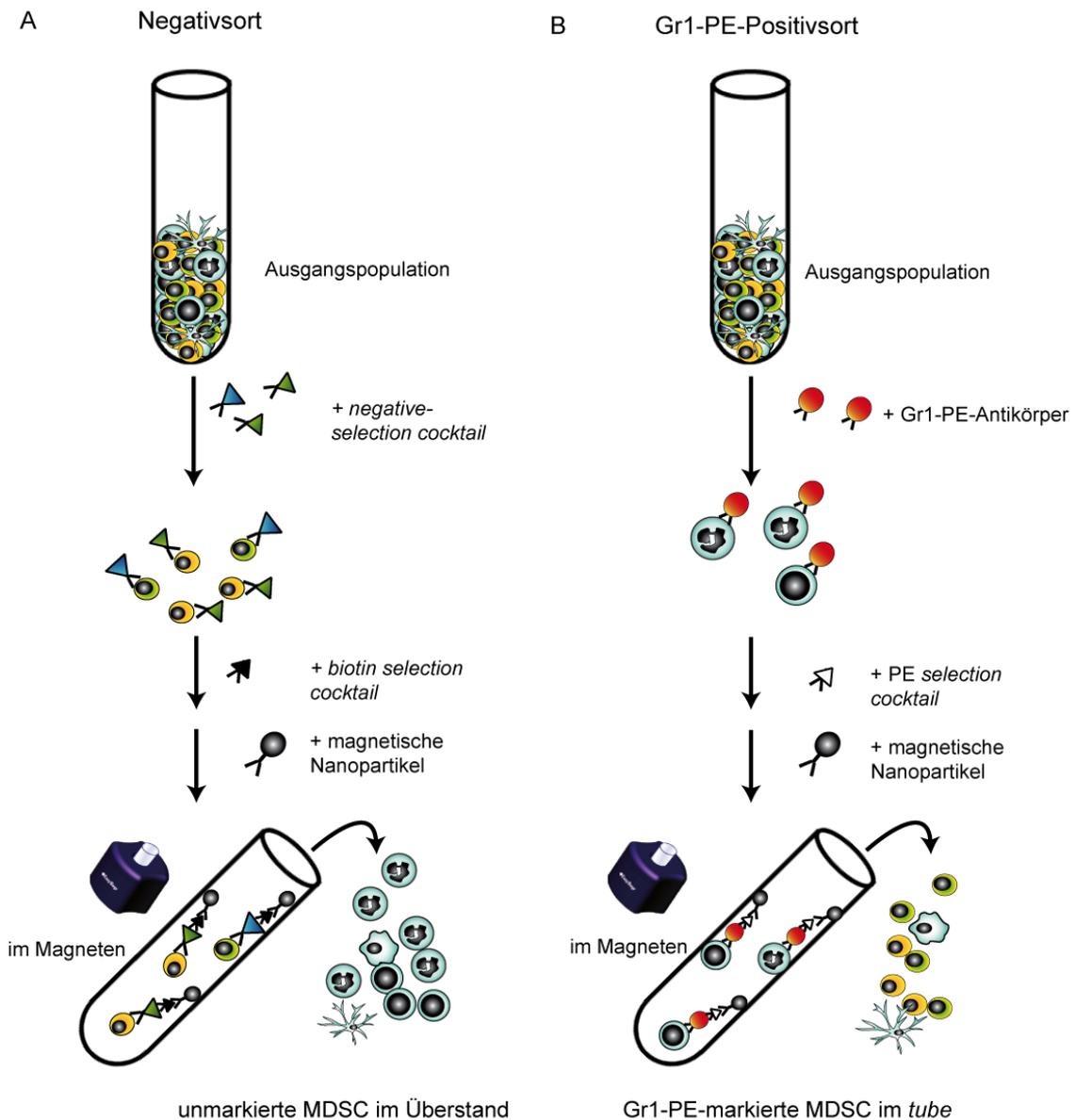
Zur Aufreinigung der Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> MDSCs stand zu Beginn das MACS-Aufreinigungssystem (Miltenyi Biotech) im Vordergrund. Dieses 1990 erstmals zur Zellseparation beschriebene System (Miltenyi et al., 1990) basiert darauf, dass die Antigene auf MDSC (in unserem Fall vorwiegend Gr1 mit den Epitopen Ly6G und Ly6C) von einem speziell dafür hergestellten Antikörper abgegriffen werden, die an das Antigen binden. Die Zellen sind dann markiert. Diese Antikörper besitzen noch eine zweite Bindungsstelle für magnetische Mikropartikel. Fügt man diese Mikropartikel nach Inkubation der vorigen Komponenten zum Zellgemisch hinzu, werden alle Zellen, die das gesuchte Antigen exprimieren auch noch magnetisch markiert. Anschließend fließen die Zellen durch eine Säule, in der die markierten Zellen über einen Magneten festgehalten werden, wohingegen alle unerwünschten Zellen die Säule passieren und als Durchlauf verworfen werden. Die Zellen, die in der Säule verbleiben, werden in einem letzten Schritt durch die Säule gepresst und stehen schließlich als Eluat für weitere experimentelle Ansätze zu Verfügung.

Wir verwendeten folgendes Protokoll für unseren MACS Gr1-Positivsort: Nach Einstellen der Zellsuspension auf eine Konzentration von  $10^8$  Zellen/500  $\mu$ l MACS-Puffer, wurden 20  $\mu$ l/ml anti-Gr1-Biotin zugegeben. Nach Inkubation im Kühlschrank für 8 min wurden 300  $\mu$ l/ml MACS-Puffer sowie 40  $\mu$ l/ml Anti-Biotin-Mikropartikel hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde für weitere 8 min im Kühlschrank inkubiert. Daraufhin folgte ein Waschschrift. Das verbleibende Zellpellet wurde in 500  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert und auf eine LS-Säule, die zuvor mit 3 ml MACS-Puffer vorgespült wurde, aufgetragen. Die Gr1- sowie magnetisch markierten Zellen blieben nun in der magnetischen Säule hängen, während alle unmarkierten Zellen aus der Säule herausgewaschen wurden. Der Durchlauf der Zellen wurde in einem Tube auf Eis aufgefangen, nachdem er die magnetische Säule passiert hatte. 4 Mal wurde die Säule daraufhin mit jeweils 3 ml MACS-Puffer gewaschen, um auch die letzten Gr1-negativen Zellen zu entfernen. Schließlich wurden die Gr1-positiven Zellen aus der Säule mit 5 ml MACS-Puffer eluiert und weiterverarbeitet.

### 3.2.4.5.2 StemCell Negativ- und Gr1-PE-Positivsort

Wir testeten in unseren Versuchen auch ein neues Aufreinigungssystem der Firma StemCell Technologies. Das Prinzip dieser neuen Methode ist dem Vorigen sehr ähnlich, ein Unterschied besteht allerdings darin, dass die Zellen keine Säule passieren müssen, sondern einfach in ihrem Tube in einen starken Magneten (EasySep<sup>®</sup> Magnet) gestellt werden. Die magnetisch markierten Zellen sammeln sich am Rand woraufhin das Tube mitsamt dem das Tube umgebenden Magneten einfach ausgeleert wird, sodass sich zwei Fraktionen ergeben. Je nachdem, ob eine Gr1-Positivselektion oder ein Negativsort durchgeführt wurde, werden anschließend entweder die noch im Tube befindlichen Zellen oder der abgekippte Überstand weiterverwendet.

Nach längerer Austestungs- und Optimierungsphase wurde die StemCell-Negativselektion, bei der durch Verwendung einer Kombination von Antikörpern gegen CD3, CD5, CD19, CD45R/B220 sowie Ter119 T-Zellen, B-Zellen sowie Erythrozytenreste entfernt werden, schließlich nach folgendem Schema durchgeführt: Zunächst wurden die Einzelzellsuspensionen auf ein Volumen von  $10^8$  Zellen/ml in sterilen FACS-Tubes sowie StemCell-Puffer für Negativsort gebracht. Die im Puffer enthaltenen 5 % Rattenserum waren notwendig für eine hohe Ausbeute an Zellen, da durch die im Serum enthaltenen Antikörper unspezifische Bindungen vermieden werden können. 0,2 bis 2 ml dieser Suspension wurden danach mit 50  $\mu$ l/ml biotinyliertem *negative selection cocktail* für 20 min im Kühlschrank inkubiert. In dieser Zeit banden die Antikörper an die entsprechenden Antigene der Zellen. Daraufhin wurde 100  $\mu$ l/ml *biotin selection cocktail* hinzugefügt und wiederum für 20 min im Kühlschrank inkubiert, wodurch die Antikörper nun abgegriffen werden konnten. Dies geschah mit 100  $\mu$ l/ml magnetischen Nanopartikeln, die ebenso für 20 min im Kühlschrank inkubierten. Danach wurde das FACS-Tube auf 2,5 ml mit Puffer aufgefüllt und in den EasySep<sup>®</sup>-Magneten gestellt. Nach ca. 10 min im Magneten, wurde der Überstand abgekippt und gesammelt, da dieser in der Negativ-Selektion die wertvollen MDSC enthält (siehe **Abbildung 5 A**).



### Abbildung 5: Prinzipien der Zellaufreinigung

- A** Prinzip des StemCell Negativsorts: Unerwünschte Zellen der Ausgangspopulation werden mit einem biotinyliertem negative selection cocktail (Antikörperkombination gegen CD3, CD5, CD19, CD45R/B220, Ter119) markiert und über Zugabe eines *biotin selection cocktails* sowie magnetischen Nanopartikeln magnetisch entfernt. Unmarkierte MDSC mit leichten Verunreinigungen durch nicht zu entfernende Makrophagen und dendritische Zellen stellen die Ausbeute dieser negativen Aufreinigungsmethode dar.
- B** Prinzip des StemCell Gr1-PE-Positivsorts: MDSC in der Ausgangspopulation werden mit einem mit dem Farbstoff PE-markierten Gr1-Antikörper markiert. Durch Zugabe von gegen PE gerichteten Antikörpern sowie magnetischen Nanopartikeln werden MDSC magnetisch angereichert und stellen in diesem markierten Zustand die Ausbeute dieser positiven Aufreinigungsmethode dar.

Der StemCell Gr1-PE-Positivsort wurde ähnlich durchgeführt, es wurde allerdings, wie in den Herstellerangaben vorgesehen, auf die Zugabe von Rattenserum verzichtet. Im ersten Schritt wurden die Ausgangszellen mit 25 µl/ml PE-markiertem Gr1-Antikörper für 7 bis 10 min im Kühlschrank inkubiert. Darauf folgte Zugabe von 50 µl/ml PE-*selection cocktail*. Nach weiterer Inkubationszeit von 7 bis 10 min im Kühlschrank wurden gut resuspendierte magnetische Nanopartikel in einer Konzentration von 25 µl/ml zugegeben. Nach 10 min im Kühlschrank wurde wie beim StemCell Negativsort weiter verfahren. Allerdings wurden die Zellen insgesamt 3 Mal in den Magneten gestellt und der Überstand nach neuem Auffüllen abgeschüttet. So konnte gewährleistet werden, dass wirklich nurmehr die Gr1-markierten Zellen im Tube verblieben (**Abbildung 5 B**).

Zur Aufreinigung von pDC wurde ebenfalls das StemCell-Verfahren angewendet, allerdings kombiniert mit gegen B220 gerichteten magnetischen Partikeln (siehe 3.2.6).

### 3.2.5 Zellkultur

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem 5 %igen CO<sub>2</sub>/Luftgemisch (Standardbedingungen). Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

### 3.2.6 Generierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen

Um murine pDC zu generieren, wurde Mäusen zunächst wie in 3.2.4.1 beschrieben Femora und Tibiae zur Gewinnung von Knochenmark entnommen. Unter sterilen Bedingungen wurden die Knochen an den Epiphysen mit einer Schere eröffnet. Mit 27 G-Kanülen wurden die Knochen mit PBS ausgespült und durch ein 40 µm-Zellsieb gefiltert. Nach einem Waschschrift wurde das Pellet in 4 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abstoppen der Lyse-Reaktion durch Auffüllen auf 50 ml, einem weiteren Zentrifugationsschritt und Verwerfen des Überstandes wurden die Knochenmarkszellen in pDC-Medium aufgenommen und gezählt. Erst jetzt wurde immer frisch β-Mercaptoethanol sowie Flt3-Ligand zugegeben. In einer Konzentration von 2 bis 3 x 10<sup>6</sup>/ml wurden die Zellen

in kleine Zellkulturflaschen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen für 8 Tage unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden die maturierten Knochenmarkszellen geerntet und in Falcon-Tubes umgefüllt. Die Zellen wurden gewaschen und in StemCell-Puffer für Positivsort resuspendiert, gezählt und in FACS-Tubes umgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 50 µl magnetisch markierten anti-B220/CD45R-Antikörpern pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. Eine halbe Stunde lang wurde das Zell-Antikörper-Gemisch im Kühlschrank inkubiert, danach wurde das Tube mit 2,5 ml StemCell-Puffer für Positivsort aufgefüllt. Weiter verfahren wurde wie für den StemCell Positivsort in 3.2.4.5.2 beschrieben. Schließlich wurden die gewonnenen pDC gezählt, gewaschen und in pDC-Medium aufgenommen. Zusätzlich wurde die Reinheit der pDC durchflusszytometrisch bestimmt, wobei die Ausprägung von B220 >90 % war.

### **3.2.7 Generierung von Überständen aktivierter Zellen**

Um den Einfluss von löslichen Stoffen wie Zytokinen im Medium aktivierter Zellen zu untersuchen, wurden Überstände der entsprechenden Zellen unter verschiedenen Konditionen hergestellt. Dazu wurden Splenozyten von Wildtypmäusen ebenso wie aufgereinigte pDC auf 24-Well-Platten zu je  $10^6$  Zellen/ml und pro Well ausplattiert. Die Hälfte der ausplattierten Zellen wurde für 2,5 h mit 6 µg/ml CpG unter Standardbedingungen inkubiert. Daraufhin wurden in 3 gründlichen Waschsritten CpG und das alte Medium entfernt und jeweils 1 ml frisches pDC-Medium zugegeben. Die Zellen wurden also für 2,5 h durch CpG aktiviert, dieses wurde danach entfernt und die Zellen wieder in den Brutschrank gestellt, um in dieser Zeit entsprechende Zytokine nach CpG-Aktivierung zu produzieren. Nach 48 h wurden die Überstände abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **3.2.8 Induktion von Zellapoptose und -nekrose**

Um in Zellen Apoptose auszulösen, wurden die entsprechenden Zellen in kleine Petrischalen ausplattiert und für 10 min bei  $10 \text{ J/cm}^2$  bestrahlt. Durch DNA-Schädigung

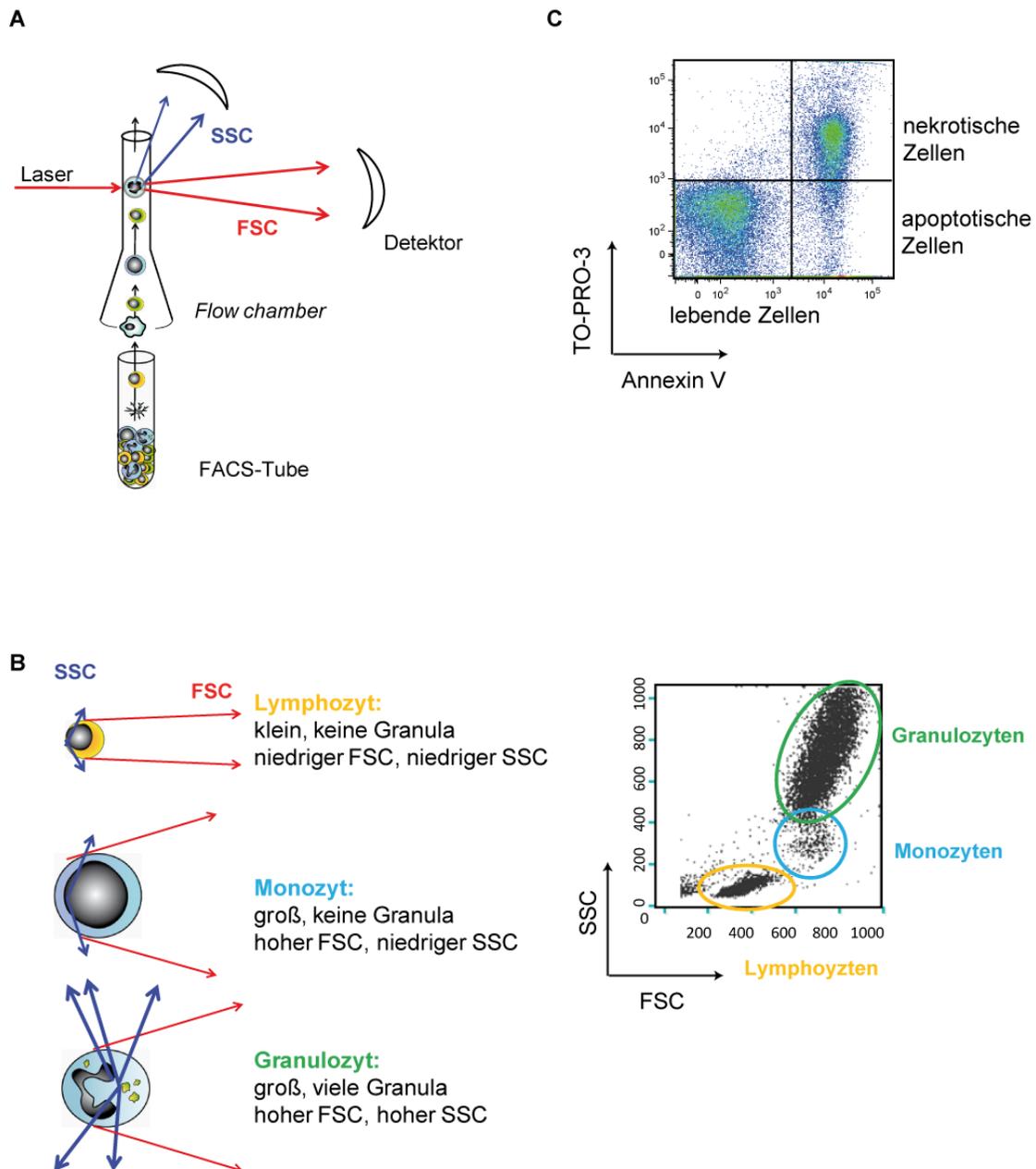
war ein Großteil der Zellen wenige Stunden nach dieser Prozedur apoptotisch (durchflusszytometrisch Annexin V<sup>+</sup>/TO-PRO 3<sup>+</sup>, vgl hierzu 3.2.9).

Zur schnellen Induktion von Nekrose wurden Zellen bei -80 °C eingefroren und im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Dieses Vorgehen wurde 2 bis 3 Mal wiederholt. Lichtmikroskopisch waren daraufhin kaum mehr vollständige Zellen zu erkennen.

### 3.2.9 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie kann die unterschiedliche Expression von Oberflächenmarkern sowie Verschiebungen von Oberflächenmarkern auf verschiedenen Zelltypen sichtbar gemacht werden. Unsere durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem FACS Canto II von BD Biosciences (San Diego, USA) vorgenommen.

Um die Expression von Oberflächenmarkern zu bestimmen, werden die Zellen zunächst einzeln in die sog *Flow chamber* gesaugt und dort einem Laserstrahl unterschiedlicher Wellenlänge ausgesetzt (**Abbildung 6 A**). Die Zellen streuen das auf sie eintreffende Licht sowohl nach vorne als auch zur Seite, was als FSC (*forward scatter*) bzw. SSC (*sideward scatter*) bezeichnet wird. FSC und SSC hängen von der Größe bzw. der Granularität und Komplexität der Zelle ab. So haben beispielsweise kleine, nichtgranuläre Zellen wie T-Zellen einen kleinen FSC sowie einen kleinen SSC. Große, granuläre Zellen wie Granulozyten haben einen hohen FSC und auch einen hohen SSC. FSC und SSC werden in Form eines *Dotplots* dargestellt (**Abbildung 6 B**). Sollen nun innerhalb einer Population von hinsichtlich Größe und Granularität gleichartigen Zellen Unterscheidungen getroffen oder bestimmte Oberflächenantigene auf den Zellen untersucht werden, so werden zusätzlich zu FSC und SSC fluoreszenzmarkierte Antikörper benötigt, die sich gegen das gesuchte Antigen richten. Hierfür stehen etliche „Farben“ zur Verfügung, z.B. PE, APC, PerCP, FITC, die jeweils von unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden. In unserem FACS Canto II von BD stehen hierfür ein blauer, ein roter sowie ein violetter Laser zur Verfügung, die mit unterschiedlicher Wellenlänge (blau: 488 nm; rot: 633 nm, violett: 405 nm) unterschiedliche Farbstoffe aktivieren können, die dann wiederum Licht einer bestimmten Wellenlänge aussenden und im Durchflusszytometer über verschiedene Filter detektiert werden.



### Abbildung 6: Prinzipien der Durchflusszytometrie

- A** Aus dem FACS-Tube werden Zellen vereinzelt ins Durchflusszytometer gesaugt und von einem Laser angestrahlt. Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*=FSC) und Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*=SSC) sowie Fluoreszenzen von eingesetzten Markern werden detektiert.
- B** FSC und SSC werden durch Größe und Granularität der Zellen bestimmt (links). Von FSC und SSC ist wiederum die Darstellung im *Dotplot* (rechts) abhängig. Gezeigt sind beispielhaft die Erscheinung von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im *Dotplot*.
- C** Beispiel einer Kombinationsfärbung mit Annexin V und TO-PRO-3 im *Dotplot*. Lebende Zellen stellen sich als Annexin V- / TO-PRO-3 - dar, frühapoptotische Zellen als Annexin V+ / TO-PRO-3 -, spätapoptotische sowie nekrotische Zellen als Annexin V+ / TO-PRO-3 +.

Für unsere Versuche wurden häufig Färbungen mit sechs oder mehr fluoreszenzmarkierten Antikörpern verwendet, da wir die Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene untersucht haben. Dabei entsteht das Problem, dass die drei Emissionsspektren der drei Fluoreszenzen sich teilweise überschneiden. Dies muss korrigiert werden, indem mit Einzelfärbungen die Fluoreszenz der einzelnen Farbstoffe gemessen wird und dann die überlappenden Anteile subtrahiert werden. Diesen Vorgang nennt man Kompensation und stand am Anfang jeder durchgeführten FACS-Messung.

Zur Bestimmung von Apoptose und Nekrose von Zellen wurde eine Annexin V/TO-PRO-3-Färbung verwendet. Annexin V ist ein Marker, der an das in der Zellmembran vorkommende Phosphatidylserin bindet. Dieses wird bei der Apoptose, dem „programmierten Zelltod“ von der Innenseite der Zellmembran nach außen transloziert und ist hier detektierbar. Annexin V ist demnach ein Marker für die frühe Apoptose. Aber auch bei spätapoptotischen und nekrotischen Zellen kann Annexin V durch die zerstörte Zellmembran in die Zelle eindringen und hier an Phosphatidylserin binden, in der durchflusszytometrischen Messung erscheinen auch solche Zellen Annexin V<sup>+</sup>. Um Apoptose von Nekrose unterscheiden zu können, ist also noch ein zweiter Marker wie TO-PRO-3 Iodid nötig, der nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also nekrotischen Zellen, eindringt. Mit einer Kombination beider Farbstoffe kann demnach zwischen lebenden Zellen (Annexin V/ TO-PRO-3<sup>-</sup>), frühapoptotischen Zellen (Annexin V<sup>+</sup>/ TO-PRO-3<sup>-</sup>) sowie spätapoptotischen und nekrotischen Zellen (Annexin V<sup>+</sup>/ TO-PRO-3<sup>+</sup>) unterschieden werden (**Abbildung 6 C**).

Die Durchführung einer durchflusszytometrischen Messung gestaltete sich wie folgt: 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> der zu untersuchenden Zellen wurden in 100 µl PBS oder FACS-Puffer aufgenommen. Daraufhin wurden die Zellen mit einem zuvor zusammengestellten Antikörpercocktail versehen (0,5 µl/100 µl von jeder Farbe; PE zuvor 1:10 verdünnt). Nach kurzem Vortexen zur besseren Verteilung des Antikörpers wurden die Proben für 30 min im Kühlschrank inkubiert, damit die Antikörper binden konnten. Nach 3 Waschschritten mit PBS wurden die gefärbten Zellen in ca. 200 µl PBS aufgenommen, auf Eis gelagert und zügig am FACS-Gerät ausgemessen. Die Annexin V-Färbung wurde in 100 µl calciumhaltigem Annexinpuffer durchgeführt. TO-PRO-3 wurde zu jeder Probe direkt vor der Messung einzeln zugegeben.

Messungen erfolgten stets in Triplikaten. Ausgewertet wurden die am FACS generierten Daten mit der FlowJo-Software von TreeStar (Ashland, OR, USA). Bei der

Auswertung wurde zunächst ein *Live-Gate* gesetzt, um Zelldebris und restliche magnetische Nanopartikel als Residuen der Zellaufreinigung auszuschließen und nur lebende Zellen und ihre Fluoreszenzen auszuwerten. Daraufhin wurden Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen ausgewählt und auf diesen die Fluoreszenzintensität der verschiedenen Marker mittels *median fluorescence intensity* (MFI) gemessen. Wahlweise wurde der prozentuale Anteil an MDSC, die den gesuchten Marker exprimieren, angegeben.

### 3.2.10 *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

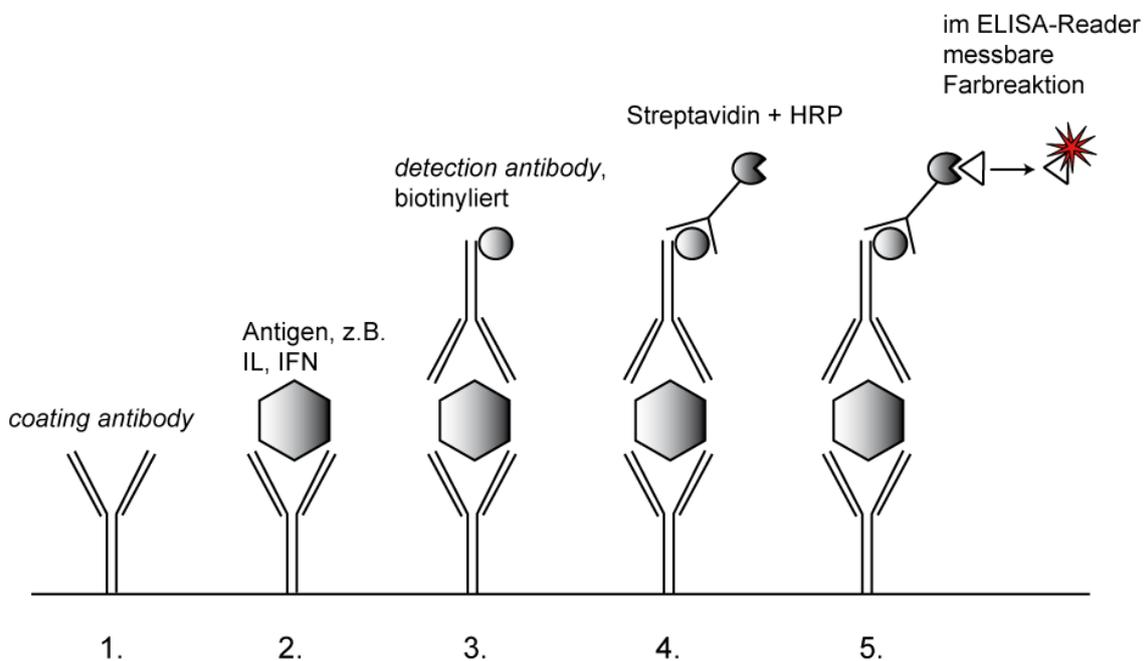
#### 3.2.10.1 Standard-ELISA

Mit Hilfe des ELISA können Zytokine in einer Farbreaktion indirekt sichtbar gemacht werden. Gleichzeitig wird eine Standardreihe mit aufsteigenden, bekannten Konzentrationen des gesuchten Zytokins angelegt. Dadurch kann dann die Menge des untersuchten Zytokins in der Probe quantifiziert werden.

In **Abbildung 7** sind die wichtigsten Schritte bei der Durchführung eines ELISA dargestellt. Zunächst wird eine Platte über Nacht mit Antikörpern (*coating antibody*) beschichtet (1.), die für das gesuchte Antigen, in unserem Fall Zytokine, spezifisch sind. Danach wird die Platte mit *assay diluent* geblockt, um unspezifische Bindungen bei Zugabe des nächsten Antikörpers zu vermeiden, die zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten. Im nächsten Schritt wird die zu untersuchende Probe auf die Platte gegeben (2.), ebenso wie die vorbereitete Standardreihe. Die in der Probe vorhandenen Antigene binden nun an den Antikörper auf der Platte. Daraufhin wird ein weiterer Antikörper zugegeben (*detection antibody*, 3.), der an ein anderes Epitop des gesuchten Antigens bindet als der erste Antikörper. Zudem ist dieser zweite Antikörper biotinyliert, besitzt also eine weitere Bindungsstelle für das vom Bakterium *Streptomyces avidinii* gebildete Molekül Streptavidin. Zwischen den bisherigen einzelnen Schritten muss die Platte mit *wash buffer* jeweils mehrfach gut gewaschen werden, um überschüssigen Antikörper zu entfernen. Wird im nächsten Schritt ein an Streptavidin gekoppeltes Enzym, beispielsweise Meerrettichperoxidase (*horseradish-peroxidase*) als Konjugat auf die Platte hinzugegeben (4.), so bindet dies wiederum an den biotinylierten *detection antibody*. Die Bindung zwischen Biotin (Vitamin H) und Streptavidin führt zu einer sehr starken biologischen Bindung zwischen Antigen und Antikörper. Die Peroxidase kann nun in einer enzymatischen Farbreaktion ein chromogenes Substrat, z.B. Tetramethylbenzidin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umwandeln, wobei ein

Farbumschlag entsteht (5.). Je mehr des gesuchten Antigens in der Probe war, desto deutlicher zeigt sich der Farbumschlag. Um die Reaktion zu stoppen, wird nach ca. 20 min Inkubation im Dunkeln  $H_2SO_4$  zugegeben. Daraufhin wird die Platte im ELISA-Reader mit einer passenden Wellenlänge ausgelesen.

Für unsere Versuche wurde zur Messung des Zytokins IL-2 ein OptEIA™-ELISA von BD Biosciences sowie ein IFN- $\alpha$ -ELISA mit Antikörpern von PBL Interferon Source verwendet, wobei nach Empfehlungen und Vorgaben der Hersteller vorgegangen wurde.



**Abbildung 7: Schema des Sandwich-ELISA**

Nach Binden des *coating antibodies* auf einer 96-Well-Platte (1.), Binden des gesuchten Antigens (2.), des biotinylierten *detection antibodies* (3.) sowie von Streptavidin und HRP (*horseradisch-peroxidase*, 4.) kann durch Zugabe eines Substrates eine im ELISA-Reader messbare Farbreaktion ausgelöst werden (5.). Dadurch kann die Menge an Antigen in der ursprünglichen Probe quantifiziert werden.

### 3.2.10.2 BrdU-Suppressions-Assay

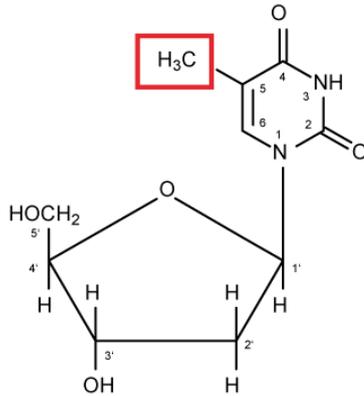
Um die Suppressivität von MDSC zu bestimmen, wurde ein BrdU-Suppressions-Assay verwendet. Dieses Verfahren beruht auf der Tatsache, dass sich bei Stimulation von Zellen und dementsprechend erhöhten Zellteilungsraten auch die Gesamtmenge an

DNA vergrößert. Wird zu den proliferierenden Zellen das DNA-Alkylans 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) zugegeben, so wird dieses anstatt der normalen, strukturell dem BrdU sehr ähnlichen Base Thymidin in die DNA eingebaut, wodurch die DNA-Synthese nicht beeinträchtigt wird (**Abbildung 8 A**). Das Pyrimidin-Analogon BrdU kann nun indirekt mittels eines Immunoassays (vgl. ELISA) detektiert werden und damit die absolute und relative Zellproliferation gemessen werden.

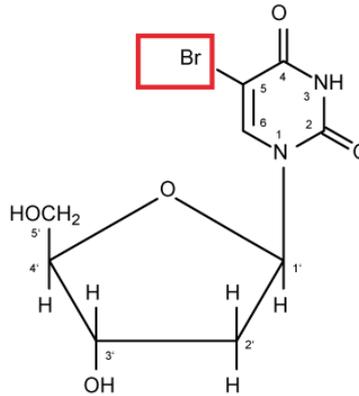
Standardmäßig waren die MDSC-Hemmversuche folgendermaßen aufgebaut: MDSC wurden wie in 3.2.4.5.2 beschrieben, aufgereinigt und auf Titrierungen mit absteigender Konzentration gebracht, sodass gezeigt werden konnte, dass die Zielzellen mit steigender Anzahl zugegebener MDSC stärker in ihrer Proliferation gehemmt werden. In einer weißen, undurchsichtigen 96-Well-Platte (um bei dieser sensiblen Methode Einstrahlungen aus anderen Wells zu verhindern) wurden nun jeweils 100 000 Splenozyten (SC)/100 µl ausplattiert. Dabei wurde darauf geachtet, die Randwells freizulassen, da hier erfahrungsgemäß immer die größten Standardabweichungen aufgetreten waren. Wenn nicht anders angegeben, wurde immer mit Triplikaten gearbeitet. Daraufhin wurden die verschiedenen MDSC-Mengen zur Koinkubation dazugegeben. Da hauptsächlich die T-Zellen innerhalb des Splenozytengemisches proliferieren und damit das Hauptsignal im Assay darstellen, wurden die Zellen zusätzlich noch mit CD3/CD28-Mikropartikeln im Verhältnis 1:75 versetzt. Diese Partikel simulieren eine Stimulation der T-Zellen durch DC und führen daher zu T-Zell-Proliferation. 100 000 Splenozyten, die nur zusammen mit CD3/CD28-Mikropartikeln inkubiert wurden, stellten in jedem Versuch die Positivkontrolle dar. Ergebnisse wurden prozentual zu diesem Maximalwert angegeben (% Proliferation). Je mehr die Proliferation also durch MDSC oder andere Faktoren gehemmt wurde, desto geringer war letztlich der gemessene Wert. Nachdem die Platten für ca. 48 h im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert worden waren, wurde BrdU (15 µl des nach Herstellerangaben hergestellten Stocks auf 200 µl im Well) zum Ansatz hinzugefügt und noch einmal über Nacht im Brutschrank belassen. In dieser Zeit konnte sich das BrdU in die DNA der Zellen bei Zellteilung einbauen. Je mehr die Zellen zuvor proliferiert hatten, desto mehr des Stoffes konnte sich in die DNA einbauen und desto mehr fluoreszierte die Probe im Nachhinein.

A

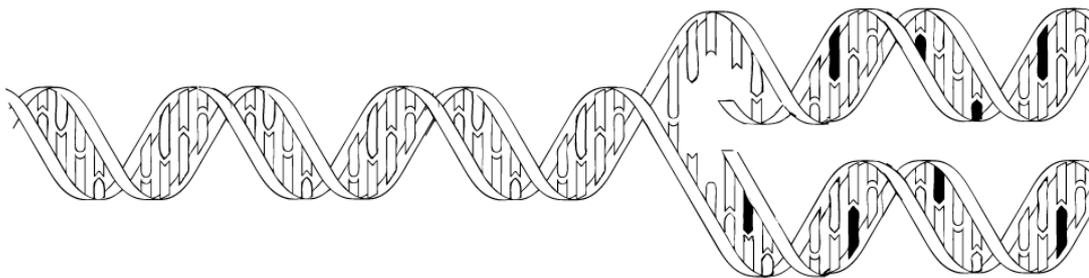
**Thymidin**  
5-Methyluracil-2-Desoxyribose



**5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU)**  
5-Bromouracil-2-Desoxyribose



B



**Einbau von BrdU bei der  
DNA-Replikation**

**Messung im ELISA-Reader**

### Abbildung 8: Prinzip des BrdU-Suppressions-Assays

- A** Chemische Struktur von Thymidin und dem Nukleosid-Analogon 5-Bromo-2-Desoxyuridin. Der  $\text{CH}_3$ -Rest an Kohlenstoffatom 5 der Base Thymin ist bei BrdU durch Brom (Br) ausgetauscht.
- B** Einbau von BrdU in die DNA bei der DNA-Replikation. Die mit BrdU (schwarze Basen) markierten DNA-Stränge können mittels BrdU-ELISA fotometrisch sichtbar und dadurch die Proliferation der zu Grunde liegenden Zellpopulation quantifiziert werden.

Nach weiteren 12 h wurden die Zellen zunächst noch einmal resuspendiert, damit sich die Zellen homogen verteilen konnten. Dadurch konnten die Standardabweichungen stark verringert werden. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Überstände mithilfe einer Multikanal-Pipette abgenommen und bei -20 °C eingefroren, um später für verschiedene ELISA zur Verfügung zu stehen. Danach wurden die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand abgekippt, um restliches Medium zu entfernen. Die Platten wurden nun für ca. 15 min mit einem haushaltsüblichen Fön komplett getrocknet. Danach wurden die Platten entweder für maximal eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt oder gleich weiterverarbeitet. Dazu wurde wie im Protokoll angegeben für 30 min 100 µl/well FixDenat hinzugegeben, wodurch die Zellen aufgebrochen wurden und die markierte DNA frei wurde. FixDenat wurde nach Ende der Inkubationszeit durch leichtes Ausklopfen der Platten entfernt. Daraufhin wurden 50 µl vom anti-BrdU-POD zugegeben. Dieser Antikörper bindet nun an das BrdU. Nach 90 bis 120 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Platten mehrfach mit PBS gewaschen und leicht abgeklopft, um den letzten Antikörper zu entfernen. Nun wurden Substrat-Komponente A und B im Verhältnis 1:100 miteinander gemischt und jeweils 50 µl davon in jedes Well gegeben. Substrat A zusammen mit Substrat B enthalten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Luminol sowie 4-Iodophenol. Diese ergeben zusammen das Substrat für die folgende Reaktion, die vom Enzym Peroxidase katalysiert wird: Das Diazylhydrazid Luminol wird in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert, wodurch ein Reaktionsprodukt entsteht, das sich in einem angeregten Zustand befindet. Im Folgenden kehrt dieses wieder in den ursprünglichen Zustand zurück und emittiert dabei Licht. Dieses wiederum kann nach 15 min Inkubationszeit im ELISA-Reader detektiert und quantifiziert werden. Schematisch dargestellt ist der Einbau von BrdU in die DNA bei Proliferation in **Abbildung 8 B**.

### 3.2.11 Arginase-Assay

Um die Arginaseaktivität und damit die Ausprägung von einem Hemmmechanismus von MDSC zu bestimmen, wurde das QuantiChrom Arginase-Assay Kit von BioAssay Systems verwendet. Jeweils 10<sup>6</sup> Zellen wurden in Eppendorfgläsern für 10 min in 100 µl Lysepuffer für Arginase-Assay lysiert. Nach längerem Vortexen der Zellen wurden die Proben bei 20 000 g für 10 min und 4 °C abzentrifugiert. 40 µl der Überstände wurden zu jeweils Triplikaten in eine 96-Well-Flachbodenplatte ausgesät, ebenso wie reines Wasser als Negativ- sowie 1 mM Harnstoff als Positivkontrollen. Danach wurden 10 µl Argininpuffer (pH 9,5) zu den Proben gegeben, wodurch die Arginase-Reaktion

gestartet wurde. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 20 µl Urea-*reagent* gestoppt. Um die finale Harnstoffkonzentration berechnen zu können, wurden von jeder Probe zusätzliche Kontrollen angelegt, zu der der Argininpuffer erst nach der Inkubationszeit zugegeben wurde. Diese Kontrollen („*blank*“) stellen die Hintergrundaktivität dar, die später von den richtigen Proben abgezogen wird. Die Arginase-Aktivität wurde schließlich colorimetrisch bei 540 nm im ELISA-Reader gemessen. Durch die Formel  $(OD_{\text{sample}} - OD_{\text{blank}}) / (OD_{\text{standard}} - OD_{\text{water}}) \times 10,4$  (U/L) wird die Aktivität angegeben. 1 Unit (U) Arginase wird definiert als die Menge an Enzym, die pro Minute (pH 9,5 and 37°C) 1 µmol L-Arginin zu Ornithin und Harnstoff verstoffwechselt.

### 3.2.12 Statistische Analyse

Für die statistischen Analysen wurde der Zweistichproben t-Test verwendet. Die Tests wurden mit der Software GraphPad Prism 5 von GraphPad Software (San Diego, CA, USA) oder Excel 2007 von Microsoft (Redmond, WA, USA) durchgeführt. Ergebnisse werden angezeigt als Mittelwert und Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM). Ergebnisse mit einem p-Wert von <0,05 wurden als signifikant gewertet, Werte von <0,001 als hochsignifikant. Abbildungen wurden mittels GraphPad Prism 5, Powerpoint 2007 von Microsoft (Redmond, WA, USA) und Adobe Illustrator CS4 von Adobe Corporation (San Jose, CA, USA) erstellt, Texte und Tabellen mit Word 2007 von Microsoft (Redmond, WA, USA) sowie Excel 2007.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Methodische Voraussetzungen

Wie in Material und Methoden bereits angeschnitten, gibt es verschiedene Möglichkeiten zur Aufreinigung von MDSC. Bevor wir mit unseren Versuchen bzgl. der Auswirkung von CpG-Therapie auf MDSC beginnen konnten, mussten wir erst klären, welche Aufreinigungsmethode für unsere Zwecke die effektivste ist. In der gängigen Literatur ist zudem beschrieben, dass durch das Binden von Gr1-Antikörpern auf MDSC Signalkaskaden in den Zellen aktiviert werden können. Bei jedem Positivsort findet genau dies statt: Gr1 bindet an den Gr1-Rezeptor der MDSC, die dann über diese Bindung meist magnetisch heraussortiert werden. Bisher wurden die Induktion von STAT-Kaskaden sowie apoptotische Wege beschrieben (Ribechini et al., 2009). Die Beeinflussung von MDSC durch Gr1-Antikörper ist bisher noch wenig erforscht und wir wollten aus diesem Grund ausschließen, dass unsere Aufreinigungsmethoden durch Aktivierung oder auch durch Induktion von Apoptose der MDSC die Funktion dieser Zellen beeinflussen. Zudem besteht beim Gr1-Positivsort das Problem, dass auch andere Zellen, beispielsweise Ly6C-exprimierende T-Zellen, mitaufgereinigt werden und die Gr1-positiven MDSC verunreinigen können. Ein Negativsort könnte durch Abtrennen dieser T-Zellen dieses Problem beheben. In allen unseren Versuchen ist die richtige Messung der Immunsuppression von T-Zellen durch MDSC von größter Bedeutung und so untersuchten wir im Folgenden auch die Ausprägung der suppressiven Eigenschaften der mit verschiedenen Methoden aufgereinigten MDSC im Vergleich.

#### 4.1.1 Die Wahl der richtigen Aufreinigungsmethode: Vergleich von MACS Gr1-Positiv-sort, StemCell Gr1-PE-Positiv-sort und StemCell Negativ-sort

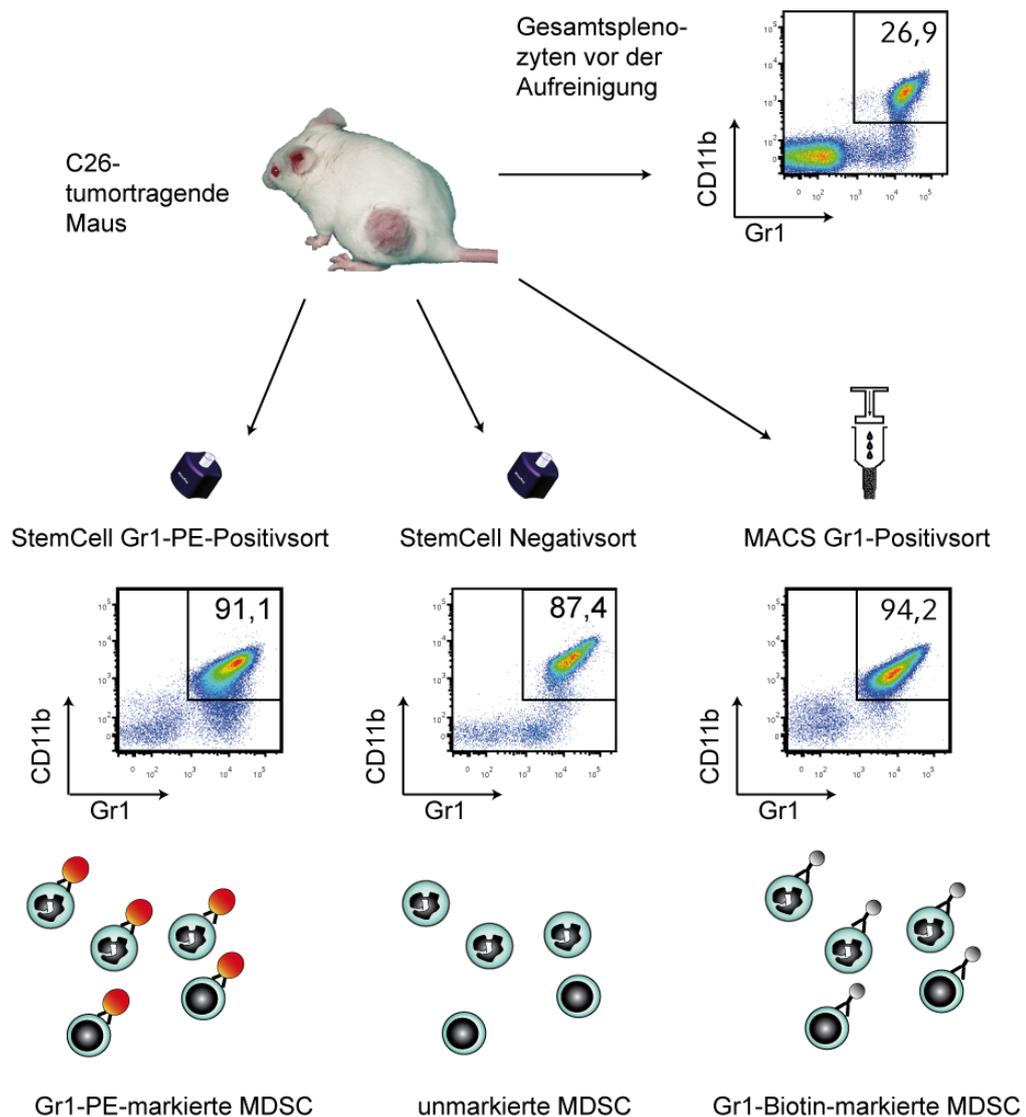
Die in der Literatur am gängigsten gebrauchte Methode zur Aufreinigung von MDSC ist ein Gr1-Positivsort mit dem MACS-System von Miltenyi (Miltenyi et al., 1990). Wie in 3.2.4.5.1 beschrieben werden die Zellen mit Gr1-Antikörpern sowie magnetisch markiert und dann durch eine Säule gedrückt. Nach längerer Arbeit mit diesem System häuften sich die Hinweise, dass die Passage durch die Säule dafür verantwortlich sein

könnte, dass viele MDSC nach dem Sort schnell sterben (sichtbar in Trypanblau-Färbungen), ihre Viabilität war eingeschränkt. Da auch die Reinheit der MACS-Sorts immer mehr zu wünschen übrig ließ, testeten wir ein neues System, das EasySep®-System von StemCell Technologies. Neben dem schonenderen Verfahren der Aufreinigung, da die Passage durch magnetische Säulen entfällt, ergab sich durch dieses System eine ganz neue Möglichkeit, nämlich die des Negativsorts. Wir erhofften uns einen Vorteil dadurch, dass wir damit MDSC gewinnen konnten, die nicht - wie bei allen Positivsorts – mit Antikörpern benetzt waren. Im Folgenden untersuchten wir also die verschiedenen Aufreinigungsmethoden hinsichtlich ihrer Ergebnisse in Reinheit und Viabilität. Für die weiteren Experimente wurden dann die hier am besten abschneidenden Methoden verwendet.

#### 4.1.1.1 Reinheit

Von drei Wochen alten C26-tumortragenden Mäusen wurde eine Einzelzellsuspension der Milzen gewonnen. Diese wurde zu gleichen Teilen aufgeteilt und für die drei untersuchten Aufreinigungssysteme verwendet. Wie in Material und Methoden beschrieben (siehe 3.2.4.5), wurden die MDSC aufgereinigt und dann auf ihre Reinheit hin durchflusszytometrisch analysiert. Wie immer bei der Bestimmung der Reinheit der Zellen wurde auch eine Probe der Gesamtsplenozyten vor der Aufreinigung analysiert, um die Größe der MDSC-Ausgangspopulation festzulegen.

Wie in **Abbildung 9** ersichtlich, war der Ausgangswert an Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen in den Milzen der tumortragenden Tiere mit 26,9 % bereits sehr hoch. Dies ist optimale Voraussetzung für eine erfolgreiche Aufreinigung: Je höher die gesuchte Population im Ausgangsmaterial, desto höher ist die Ausbeute nach dem Sort. In dieser Versuchsanordnung wurden sehr gute, vergleichbare Reinheiten erreicht. Das MACS-System schnitt am besten ab, mit 94,2 % aller Zellen im Eluat, die Gr1 und CD11b exprimierten. Mit dem StemCell Gr1-PE-Positivsort erzielten wir eine Reinheit von 91,1 %, gefolgt vom StemCell Negativsort mit 87,4 % Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen. In **Abbildung 9** ist zudem dargestellt, wie die Zellen nach der jeweiligen Aufreinigung markiert sind. Allein mit dem StemCell Negativsort erhalten wir unmarkierte MDSC, in den beiden Positivsorts sind die aufgereinigten MDSC mit Gr1-Antikörpern markiert, an denen zusätzlich magnetische Mikro- bzw. Nanopartikel hängen. Obwohl nur mit Gr1 und nicht mit CD11b-Antikörpern aufgereinigt wurde, exprimierten in unseren Versuchen Gr1<sup>+</sup>-Zellen zu ca. 90 % auch CD11b.



**Abbildung 9: Verschiedene Aufreinigungsmethoden im Vergleich**

Einzelzellsuspensionen von Milzen von C26-tumortragende Mäuse ( $n=4$ ) wurden gepoolt und in gleichen Teilen für die drei Aufreinigungssysteme StemCell Gr1-PE-Positivsort, StemCell Negativsort (beide von StemCell Technologies) sowie MACS Gr1-Positivsort (Miltenyi Biotech) verwendet. Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie sind dargestellt als *Dotplots* und zeigen den prozentualen Anteil Gr1+/CD11b+ Zellen (MDSC) bezogen auf alle lebenden Zellen. Zudem wird schematisch gezeigt, wie die MDSC nach dem Aufreinigungsprozess markiert sind.

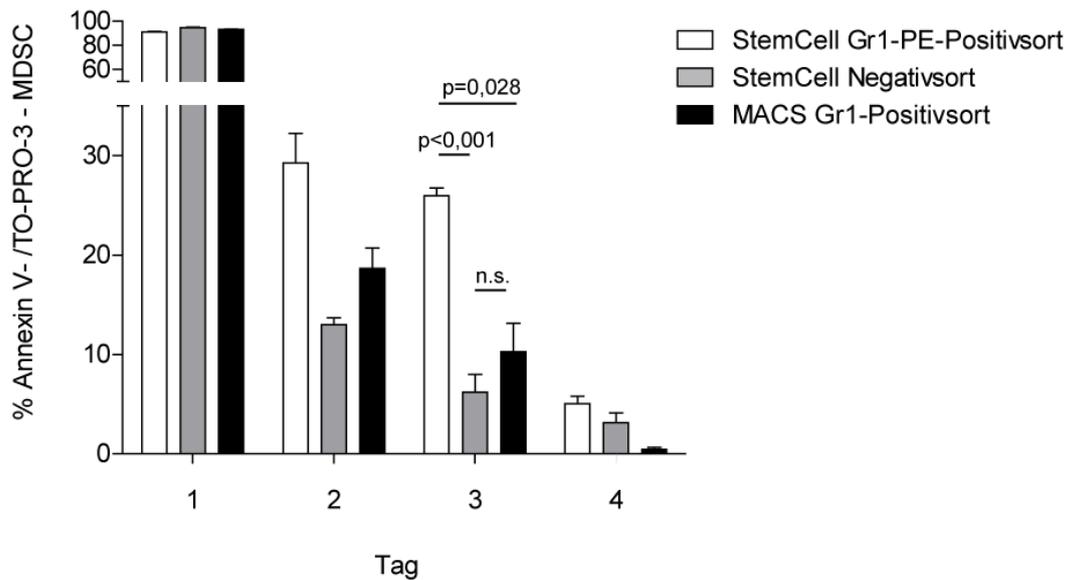
#### 4.1.1.2 Viabilität

Neben der Reinheit untersuchten wir auch die Viabilität der MDSC unter den verschiedenen Sortbedingungen. Die MDSC wurden unverzüglich nach der Aufreinigung durchflusszytometrisch auf Apoptosemarker untersucht. Die restlichen Zellen wurden auf 96-Well Platten ausgesät und ohne zusätzlichen Stimulus bei Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert und schließlich an Tag 2, 3 sowie 4 geerntet und ebenfalls durchflusszytometrisch auf Apoptosemarker untersucht.

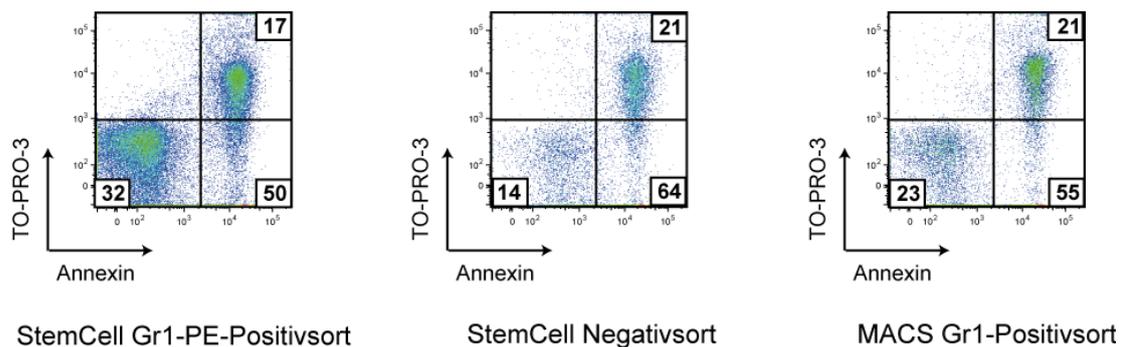
Direkt nach dem Sort (Tag 1), waren die Zellen sehr vital, bis zu 90 % wurden weder durch Annexin V noch TO-PRO-3 (Apoptose- bzw. Nekrosemarker) angefärbt. In den folgenden Tagen zeigte sich der generelle Befund, dass MDSC ohne zusätzlichen Stimulus durch andere Zellen oder direkt zugegebene Stoffe sehr schnell zugrunde gehen. Schon an Tag 2 waren nur noch 15 bis 30 % der MDSC am Leben. Innerhalb der verschiedenen Sortbedingungen konnten sich große Unterschiede feststellen lassen: Wie vermutet, wiesen MACS-gesortete Zellen eine geringere Vitalität auf als solche aus dem StemCell Gr1-PE-Positivsort (**Abbildung 10**). Dies könnte durch den mechanischen Stress bei der Passage durch die Säule erklärt werden. Interessanterweise und für uns überraschend, schnitt der StemCell Negativsort bezüglich der Viabilität am schlechtesten ab. Unmarkierte Zellen starben in diesem Fall signifikant schneller als Gr1-markierte Zellen.

Wir zogen aus diesen Versuchen die Konsequenz, im Folgenden das MACS-System komplett zu verlassen und auf den Positiv- wie Negativsort von StemCell Technologies zurückzugreifen. Zwar schnitt der MACS Gr1-Positivsort in der Reinheit etwas besser ab als der Sort von StemCell, jedoch war für unsere BrdU-Versuche, die sich über 3 Tage erstrecken, insbesondere auch die Viabilität von größter Bedeutung. Obwohl der StemCell Negativsort sowohl in Reinheit als auch Viabilität am schlechtesten abschnitt, behielten wir diese Methode für bestimmte Versuche bei, da sie für uns die einzigartige Möglichkeit darstellte, unversehrte MDSC ohne jede Markierung zu gewinnen und zu vergleichen, welchen Einfluss der Gr1-Antikörper auf MDSC haben kann.

A



B



### Abbildung 10: Viabilität von MDSC nach maximal drei Tagen

MDSC wurden mittels StemCell Gr1-PE-Positivsort (weiß), StemCell Negativsort (grau) sowie MACS Gr1-Positivsort (schwarz) aufgereinigt. Jeweils 100 000 Zellen wurden pro Well ausplattiert und ohne Stimulus unter Standardbedingungen im Brutschrank maximal 3 Tage inkubiert. Direkt nach dem Sort (Tag 1) sowie an 3 darauf folgenden Tagen wurden MDSC durchflusszytometrisch auf die Expression von Apoptosemarkern analysiert.

**A** AnnexinV -/TO-PRO-3 - Zellen in der Gr1+/CD11b+ Auswahl wurden als lebende MDSC definiert. Signifikanzen sind exemplarisch für Tag 3 angegeben.

**B** Annexin-TO-PRO-3-Färbung mit den Anteilen vitaler (AnnexinV -/TO-PRO-3 -), frühapoptotischer (AnnexinV +/TO-PRO-3 -) sowie spätapoptotischer (AnnexinV +/TO-PRO-3 +) MDSC im *Dotplot* an Tag 2.

n.s.: nicht signifikant

#### 4.1.2 Die Auswirkung von Apoptose auf die Suppression im BrdU-Assay

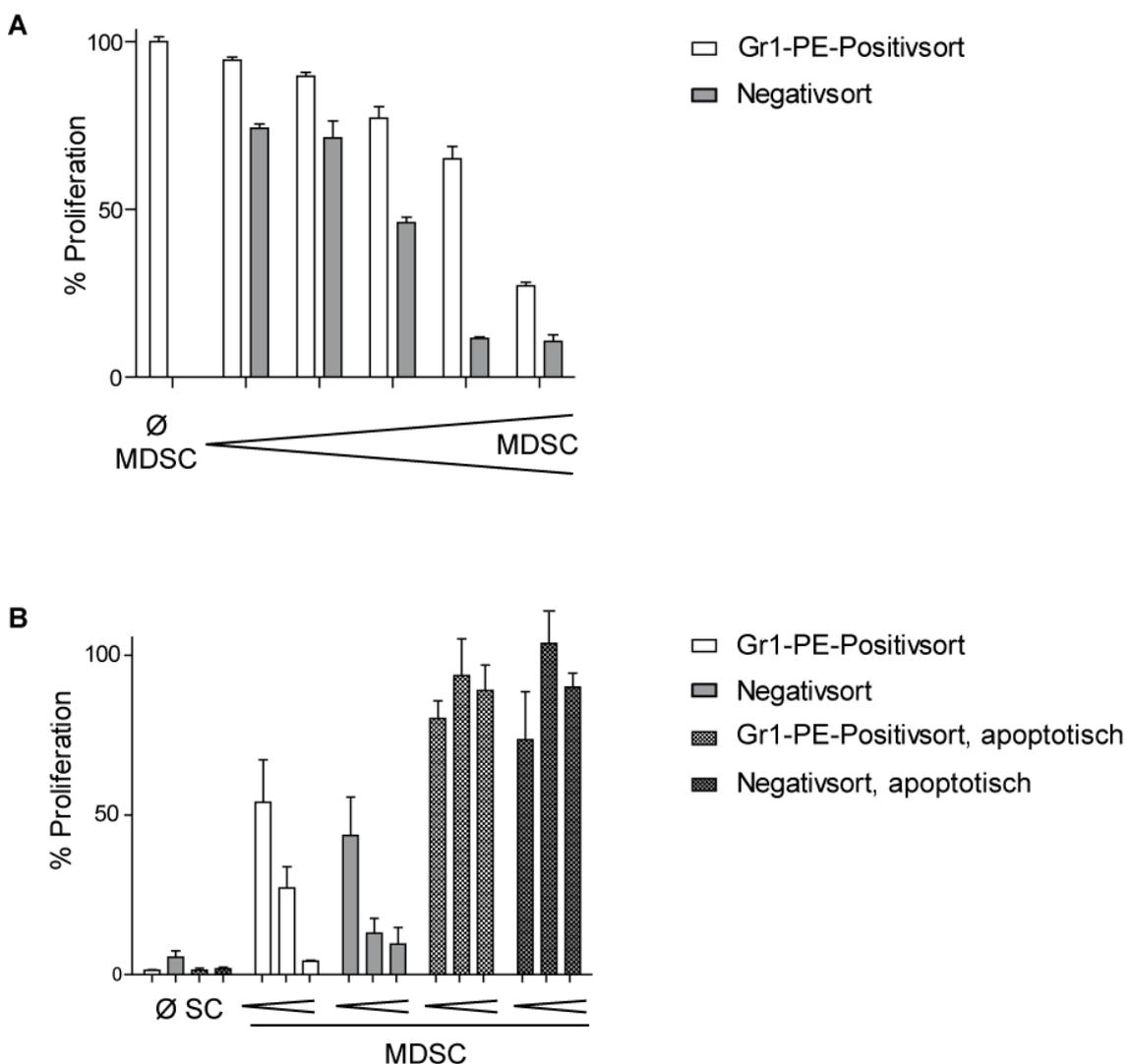
Unsere Feststellung, dass die Viabilität von negativ aufgereinigten MDSC deutlich schlechter war als die von positiv aufgereinigten MDSC, führte uns zu der Fragestellung, ob denn auch die Suppressivität der MDSC durch die Aufreinigungsmethode beeinflusst wird. Eine Konsequenz daraus wäre, dass wir in unseren später folgenden Versuchen mit mehreren Bedingungen nicht willkürlich positiv und negativ aufgereinigten MDSC nebeneinander benutzen könnten, sondern immer nur entweder die eine oder die andere Methode in einem Ansatz benutzen dürften.

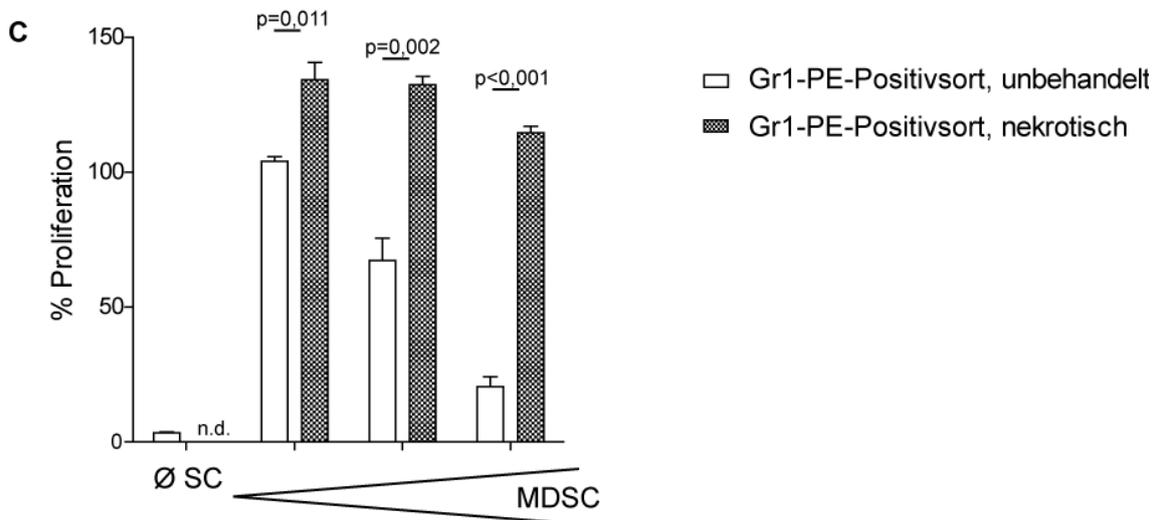
Wir reinigten also MDSC sowohl mit Negativ- als auch mit Positivsort von StemCell Technologies auf und verglichen die MDSC im BrdU-Suppressions-Assay direkt miteinander. Dabei konnten wir feststellen, dass die Proliferation der Splenozyten im Assay durch die Zugabe negativ aufgereinigter MDSC geringer ausfiel als durch Zugabe von positiv gesorteten MDSC. Wie in **Abbildung 11 A** ersichtlich, waren die MDSC im StemCell Negativsort also deutlich suppressiver als die MDSC aus dem Positivsort. Dies konnte in mehreren unabhängigen Experimenten gezeigt werden. Zur Interpretation eines BrdU-Suppressions-Assays sei auch auf 3.2.10.2 hingewiesen.

Es stellt sich nun die Frage, woran der Unterschied in der Suppressivität der Zellen bei verschiedenen Aufreinigungsmethoden liegt. Zunächst ist die geringere Reinheit der negativ gesorteten MDSC sicherlich ein zugrundeliegender Faktor, es können z.B. hemmende Makrophagen vorhanden sein, die wir mit unserem Negativsort nicht abfangen konnten. Allein diese Verunreinigungen können den beobachteten Effekt jedoch nicht hinreichend erklären. Da wir in unserem Viabilitäts-Assay herausgefunden hatten, dass negativ gesortete MDSC auch schneller in Apoptose gehen als positiv gesortete, vermuteten wir, dass Apoptose zu einer artifiziellen Suppression in unseren Assays führen könnte, vielleicht durch die fehlende Stimulation der MDSC durch lösliche Faktoren von anderen Zellen. Wir untersuchten also in einem weiteren Experiment, wie sich apoptotische MDSC in unseren Standard-BrdU-Assays in Kokultur mit Splenozyten verhalten würden. Nach unserer Hypothese könnten tote Zellen eine stärkere hemmende Wirkung ausüben als lebende Zellen.

Im folgenden Versuch bestrahlten wir sowohl positiv als auch negativ aufgereinigte MDSC mit UV-Licht und untersuchten, wie sich daraufhin die Suppressivität der MDSC verändern würde. Durch die UV-Bestrahlung wurde erreicht, dass ein großer Anteil an

MDSC apoptotisch wurde, dies wurde in vorangehenden FACS-Analysen mit Annexin V/TO-PRO-3-Färbungen gezeigt. Auch in diesem Versuch zeigte sich zunächst der Trend, dass negativ aufgereinigte MDSC stärker proliferationshemmend waren als positiv aufgereinigte MDSC. In diesem Ansatz wurde sichtbar, dass die Bestrahlung der MDSC unter beiden Sortbedingungen zu einer vollständigen Aufhebung der Suppressivität führte (**Abbildung 11 B**). Der gleiche Trend zeigte sich, wenn Nekrose von MDSC durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen der Zellen induziert wurde. Wurden die so behandelten toten MDSC mit Splenozyten koinkubiert, so zeigte sich ebenso, dass die hemmende Wirkung komplett aufgehoben wird (**Abbildung 11 C**).





**Abbildung 11: Einfluss von Apoptose und Nekrose auf MDSC-Suppressivität**

- A** Standard BrdU-Suppressions-Assay von durch StemCell Gr1-PE-Positivsort (weiß) bzw. durch StemCell Negativsort gewonnenen (grau) MDSC aus C26-tumortragenden Mäusen im Vergleich (n=5). Jeweils 100 000 Splenozyten wurden ausplattiert und zusammen mit MDSC und CD3/CD28-Mikropartikeln inkubiert. MDSC:SC-Verhältnis: 1:32, 1:16, 1:8, 1:4, 1:2.
- B** Standard BrdU-Suppressions-Assay mit durch StemCell Gr1-PE-Positivsort (weiß) sowie durch StemCell Negativsort (hellgrau) gewonnenen MDSC von C26-tumortragenden Mäusen (n=4). MDSC wurden zunächst in die verschiedenen Titrationsstufen (MDSC:SC-Verhältnis 1:8, 1:4, 1:2) gebracht. Gr1-PE-positiv sowie negativ gesortete MDSC wurden für 10 min bei 10 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt (dunkelgraue und schwarze Balken). Die dadurch apoptotisch gewordenen Zellen wurden danach ausplattiert und zusammen mit Splenozyten und CD3/CD28-Mikropartikeln inkubiert.
- C** Standard BrdU-Suppressions-Assay von gesunden (weiß) und nekrotischen (schwarz) MDSC aus C26-tumortragenden Mäusen (n=5). MDSC wurden mittels StemCell Gr1-PE-Positivsort aufgereinigt. MDSC:SC-Verhältnis 1:16, 1:4, 1:2. Induktion von Nekrose wurde durch wiederholtes Einfrieren bei -80 °C und Auftauen erzielt.

Werte sind jeweils bezogen auf 100 % Proliferation von aktivierten Splenozyten.

Ø MDSC: keine MDSC

Ø SC: keine Splenozyten, also nur MDSC

n.d.: in Ermangelung an Material nicht durchgeführt

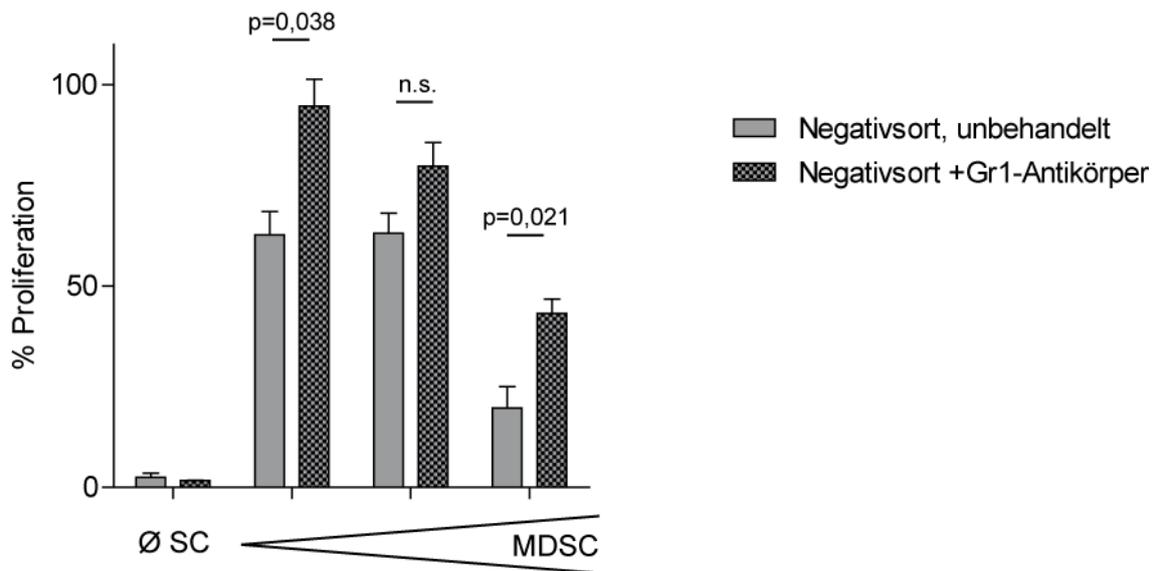
Allein die Tatsache, dass MDSC apoptotisch werden, kann also nicht die Ursache für eine erhöhte Suppressivität in unseren Assays darstellen. Ganz im Gegenteil konnten wir zeigen, dass eine Suppressivität in apoptotischen bzw. nekrotischen MDSC nicht mehr nachweisbar ist. Die Ergebnisse dieser Versuche sprechen dafür, dass unsere Befunde in den Suppressions-Assays nicht einfach nur artifiziell durch sterbende Zellen

bedingt sind, sondern durch lebende MDSC und deren Hemmmechanismen zustande kommen. Unsere „Todeshypothese“ konnte damit entkräftet werden.

#### 4.1.3 Die Bindung von Gr1-Antikörpern und die Auswirkung auf MDSC

Wir konnten in unseren bisherigen Versuchen zeigen, dass die Reinheit der verschiedenen Aufreinigungsmethoden ähnlich gut ist, wobei der Negativsort grundsätzlich schlechter abschnitt als der Positivsort. Auch die Viabilität der Zellen war im Negativsort deutlich schlechter als im Positivsort. Aufgrund dieser Ergebnisse vermuteten wir, dass die Bindung des Gr1-Antikörpers, die ja nur beim Positivsort stattfindet, einen Einfluss auf das Überleben und die suppressive Aktivität von MDSC hat. Auch andere Arbeitsgruppen hatten bereits herausgefunden, dass die Bindung von Antikörpern an Gr1 bestimmte STAT-Signalkaskaden auslöst, Myelopoese induziert und die Aktivität von MDSC beeinflusst (Ribechini et al., 2009). Hier wurde gezeigt, dass die Bindung von Gr1-Antikörpern an MDSC im Knochenmark zur Expansion der Zellen führt und ihre Suppressivität verringert, in Neutrophilen des Peritoneums dagegen Apoptose auslösen konnte. Im Knochenmark sind auf vielen Vorläuferzellen antiapoptotische Proteine wie *induced myeloid leukemia cell differentiation protein* (Mcl-1) ausgeprägt, wodurch diese Zellen nicht in Apoptose gingen.

Wir untersuchten die Auswirkung von direkter Gr1-Antikörpergabe zu negativ aufgereinigten MDSC und stellten fest, dass die Zugabe von Gr1-Antikörpern die Suppressivität der splenischen MDSC verringert (**Abbildung 12**). Wir konnten also die Ergebnisse von Ribechini et al für MDSC aus dem Knochenmark für MDSC aus der Milz bestätigen.



**Abbildung 12: MDSC-Suppressivität nach Zugabe von Gr1-Antikörper *in vitro***

Standard BrdU-Suppressions-Assay von MDSC von C26-tumortragenden Mäusen (n=4). Graue Balken stellen Kokulturen von Splenozyten und mittels StemCell Negativsort aufgereinigten MDSC dar. Schwarze Balken zeigen Kokulturen von Splenozyten und mittels StemCell Negativsort aufgereinigten MDSC, die mit der normalerweise im MACS-Sort verwendeten Konzentration an Anti-Gr1-Biotin (20 µl/ml) markiert wurden (schwarz). Nach 10-minütiger Inkubation wurde überschüssiger Antikörper durch einen Waschschrift entfernt. Jeweils 100 000 Splenozyten wurden ausplattiert und zusammen mit MDSC und CD3/CD28-Mikropartikeln inkubiert (MDSC:SC-Verhältnis: 1:8, 1:4, 1:2). Werte sind bezogen auf 100 % Proliferation von aktivierten Splenozyten.

Die Bindung des Gr1-Antikörpers an MDSC hat also Auswirkungen auf die Aktivität von MDSC und muss stets berücksichtigt werden, wenn mit einem Positivsort gearbeitet wird. Obwohl die Suppressivität der positiv aufgereinigten MDSC durch die Gr1-Bindung geringer ausfällt als für rein negativ aufgereinigte MDSC, so reicht die Suppressivität der Gr1-Sorts doch aus, um die proliferationshemmende Aktivität von MDSC gut darzustellen. Da in unseren Versuchen die relative Suppression unter verschiedenen Bedingungen verglichen wurde und die absolute Suppression nicht bewertet wurde, ist der absolute Verlust an Suppression durch Gr1-Antikörperbindung für unsere Versuchsanordnungen vernachlässigbar, muss aber natürlich bei weitergehenden Interpretationen stets bedacht werden.

#### 4.1.4 Konsequenzen für folgende Versuche

Bevor wir zu unseren Hauptexperimenten schreiten konnten, versuchten wir zunächst optimale methodische Voraussetzungen zu schaffen. Darunter versteht sich die Wahl der effektivsten Aufreinigungsmethode für MDSC hinsichtlich Reinheit und Viabilität der Zellen sowie Ausschluss bzw. Aufdeckung und Beachtung von Artefakten in den aufwändigen Suppressions-Assays.

Wir stellten fest, dass für unsere geplanten Versuche vor allem der StemCell Gr1-PE-Positivsort aufgrund seiner hohen Reinheit und Viabilität geeignet war und wählten ihn demzufolge als Standard für all unsere Suppressions-Assays aus. Im Folgenden wird er meist nur noch als Gr1-PE-Positivsort bezeichnet. Der MACS Gr1-Positivsort wurde für die weiteren Untersuchungen nicht mehr weiter verwendet. Trotz relativ schlechten Abschneidens des StemCell Negativsorts behielten wir uns diese Aufreinigungsmethode für die *in vitro*-Versuche vor, damit unsere Ergebnisse nicht von durch Gr1 induzierte Signalkaskaden und entsprechenden Markerverschiebungen beeinflusst würden. Im Folgenden wird der StemCell Negativsort meist nur noch als Negativsort bezeichnet.

Unsere Versuche zeigten zudem, dass Apoptose oder Nekrose von MDSC keine verstärkte Suppressivität in unseren Assays zur Folge hat, sondern die Suppression quasi vollständig aufhebt. Zelltod führt also nicht zu einer artifiziellen Suppressivität von MDSC in unseren Assays. Wir konnten außerdem feststellen, dass die Zugabe von Gr1-Antikörpern *in vitro* zu einer verminderten suppressiven Wirkung von MDSC führen kann und diese Tatsache bei allen Versuchen stets bedacht werden muss, auch wenn sie bei unseren relativen Darstellungen der Zellproliferation in den Suppressions-Assays glücklicherweise nicht stark ins Gewicht fällt.

## 4.2 CpG-Immuntherapie, MDSC und die Rolle von IFN- $\alpha$

Nachdem wir die verschiedenen Aufreinigungsmethoden ausführlich untersucht hatten und eine artifizielle Suppression im BrdU-Suppressions-Assay durch Apoptose ausgeschlossen hatten, widmeten wir uns der Kernfrage dieser Doktorarbeit. Welchen Einfluss hat eine CpG-Therapie auf MDSC und wenn ja, welche Mechanismen stecken dahinter?

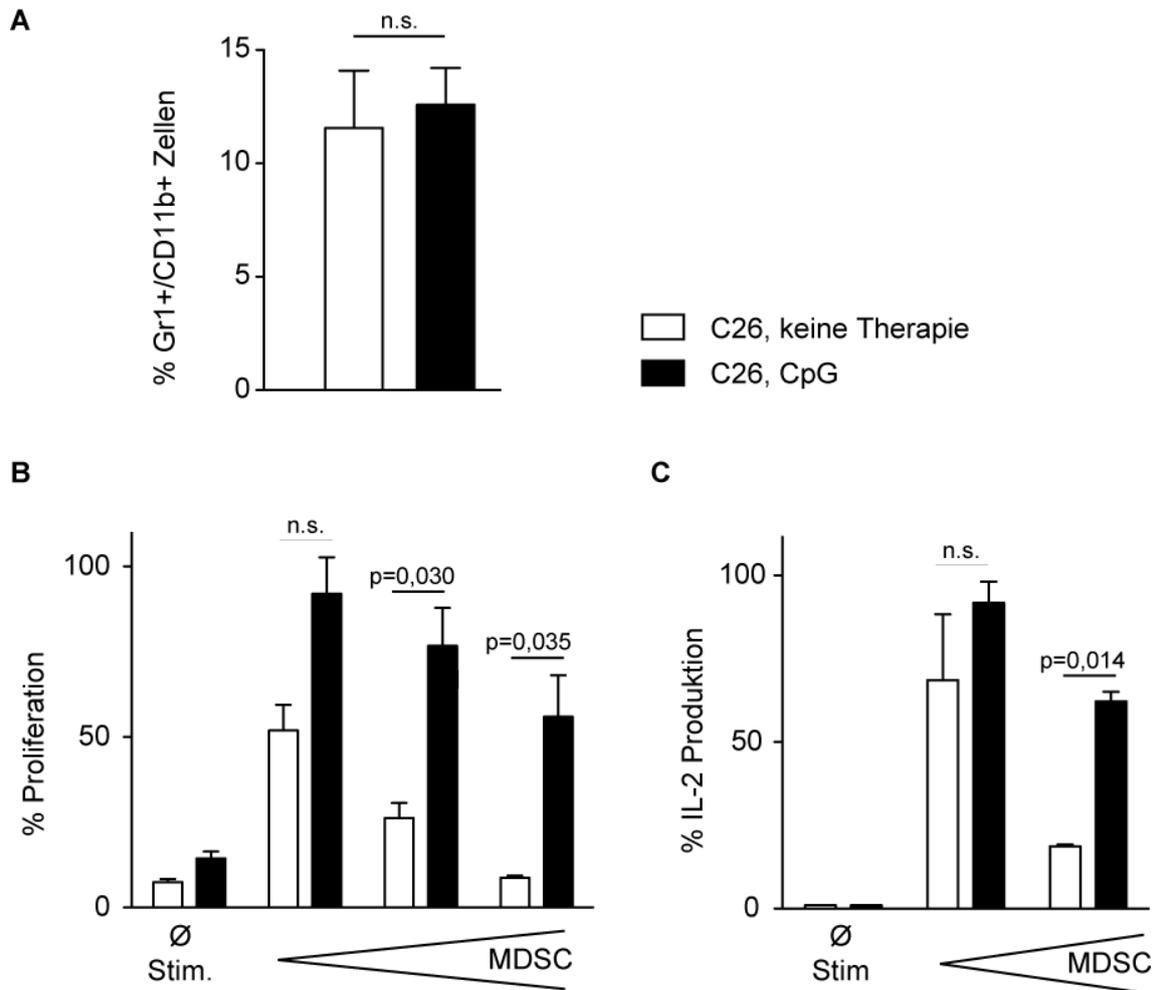
In vielen früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte beobachtet werden, dass Mäuse, denen C26-Tumoren induziert und danach mehrmals mit CpG therapiert wurden, länger überlebten und geringere Tumorgrößen aufwiesen als unbehandelte tumortragende Tiere. Gleichzeitig ist in der Literatur beschrieben, dass in tumorfreien Tieren unter CpG-Therapie MDSC-ähnliche Zellen expandieren und akkumulieren, was ganz im Gegensatz zu dem von uns beobachteten antitumoralen Effekt steht.

Unsere Hypothese war es, dass möglicherweise MDSC, die in tumortragenden Tieren im Gegensatz zu gesunden Tieren sowohl in Milz als auch im Knochenmark akkumulieren, durch CpG in ihrer Funktion beeinflusst werden könnten und so die antitumorale Wirkung von CpG trotz Expansion von MDSC erklärt werden könnte.

#### **4.2.1 Der Effekt von *in vivo*-CpG-Therapie auf MDSC in subkutanen Tumoren**

Um die Frage zu beantworten, ob und wie sich MDSC nach CpG-Therapie *in vivo* verändern, therapierten wir C26-tumortragende Mäuse mit CpG und untersuchten splenische MDSC auf ihre suppressive Funktion und ihren Phänotyp.

Im Vergleich zu gesunden Balb/c Mäusen haben C26-tumortragende Tiere eine stark erhöhte Zahl an MDSC, dies wurde bereits vielfach beschrieben. Auch in unseren Versuchen war diese Akkumulation von MDSC in tumortragenden Tieren stets der Fall. Nach CpG-Therapie von C26-tumortragenden Mäusen beobachteten wir, wie sich die MDSC-Zahlen in der Therapie- im Vergleich zur Kontrollgruppe veränderten. Von Vaknin et al. wurde für tumorfreie Tiere unter chronischer CpG-Therapie ein Anstieg von MDSC beschrieben (Vaknin et al., 2008). Wider Erwarten führte die CpG-Therapie bei unserem Versuch jedoch nicht zu einer signifikanten weiteren Expansion von MDSC (**Abbildung 13 A**).



**Abbildung 13: Anzahl und Funktion von C26-MDSC nach CpG-Therapie**

C26-Mäuse (Tumorgroße  $>25\text{mm}^2$ ) wurden an Tag 14 und 17 nach Tumorinduktion mit CpG therapiert ( $n=5$  pro Gruppe), der Kontrollgruppe wurde PBS im gleichen Volumen verabreicht. 2 Tage nach der letzten Therapie wurden die Milzen der Tiere entnommen und durchflusszytometrisch untersucht oder zur MDSC-Aufreinigung weiter verwendet. Milzsuspensionen der einzelnen Tiere wurden innerhalb der Gruppen gepoolt und dienten in dieser Form der Aufreinigung der MDSC mittels StemCell Gr1-PE-Positivsort.

- A** Akkumulation von MDSC in der Milz von untherapierten (weiß) sowie von mit CpG therapierten (schwarz) C26-tumortragender Mäusen. Gezeigt sind durchflusszytometrisch ermittelte, prozentuale Anteile von Gr1+/CD11b+ Zellen bezogen auf alle lebenden Zellen.
- B** Standard BrdU-Suppressions-Assay mit splenischen MDSC von untherapierten (weiß) und CpG-therapierten (schwarz) C26-tumortragenden Mäusen, die mittels Gr1-PE-Positivsort aufgereinigt wurden. Zu je 100 000 Splenozyten von Wildtyp-Mäusen wurden entsprechend unterschiedliche Mengen an MDSC zugegeben (MDSC:SC-Verhältnis: 1:10, 1:5, 1:1,25) und mit CD3/CD28-Mikropartikeln aktiviert. Nach 2 Tagen wurde BrdU zugegeben. Am nächsten Tag wurde die Proliferation der Zellen im ELISA-Reader gemessen. Werte sind bezogen auf 100 % Proliferation von aktivierten Splenozyten.
- C** IL-2 ELISA der Überstände von **B** nach 3 Tagen MDSC-Splenozyten-Kokultur. Werte sind bezogen auf 100 % IL-2-Produktion von aktivierten Splenozyten.

Ø Stim: keine Stimulation durch CD3/CD28-Mikropartikel zur T-Zellaktivierung bei MDSC:SC-Verhältnis von 1:1,25

Um den Effekt von CpG-Therapie auf die Funktion der MDSC nachzuweisen, untersuchten wir zunächst die Gesamtsuppressivität der MDSC in einem BrdU-Suppressions-Assay. Wir konnten dabei deutliche Unterschiede zwischen der behandelten und der unbehandelten Gruppe feststellen. MDSC von therapierten Tieren waren dabei signifikant weniger suppressiv als MDSC der Kontrollgruppe (**Abbildung 13 B**). Wir nutzten die Überstände der BrdU-Suppressions-Assays nach der zweitägigen Inkubation, um den IL-2-Gehalt der Proben zu messen. IL-2 wird innerhalb der Splenozyten hauptsächlich von aktivierten T-Zellen produziert und gibt an, wie gut die T-Zellen in unserer Kultur proliferiert haben. Je mehr IL-2 produziert wurde, desto weniger wurden die T-Zellen von MDSC gehemmt. In unserem Experiment erhielten wir auch im IL-2-ELISA der Überstände Ergebnisse, die mit denen des Suppressions-Assay korrelierten: Kokultur von Splenozyten mit MDSC von mit CpG-therapierten Tieren führte zu erhöhter IL-2-Produktion der T-Zellen als mit MDSC von unbehandelten Tieren (**Abbildung 13 C**). T-Zellen konnten also mit MDSC von mit CpG-therapierten Tieren besser proliferieren als mit den stark suppressiven MDSC von unbehandelten Tieren.

Wir untersuchten zudem die Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern, die Indizien für den Reifegrad von MDSC sein können. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits im Vorfeld gezeigt werden, dass MDSC von tumorfreien Tieren, die einen weniger suppressiven Phänotyp aufweisen als MDSC von tumortragenden Tieren, diese Marker in signifikant höherem Maße exprimieren. Es zeigte sich zudem, dass in der therapierten Gruppe einige dieser Marker (Ly6C, Sca1, CD11c, F4/80, MHC II, CD86, CD80) auf splenischen MDSC signifikant stärker exprimiert wurden als in der Kontrollgruppe (Zoglmeier et al., 2011). Auf die Bedeutung der einzelnen Marker wird in 5.2.3. genauer eingegangen.

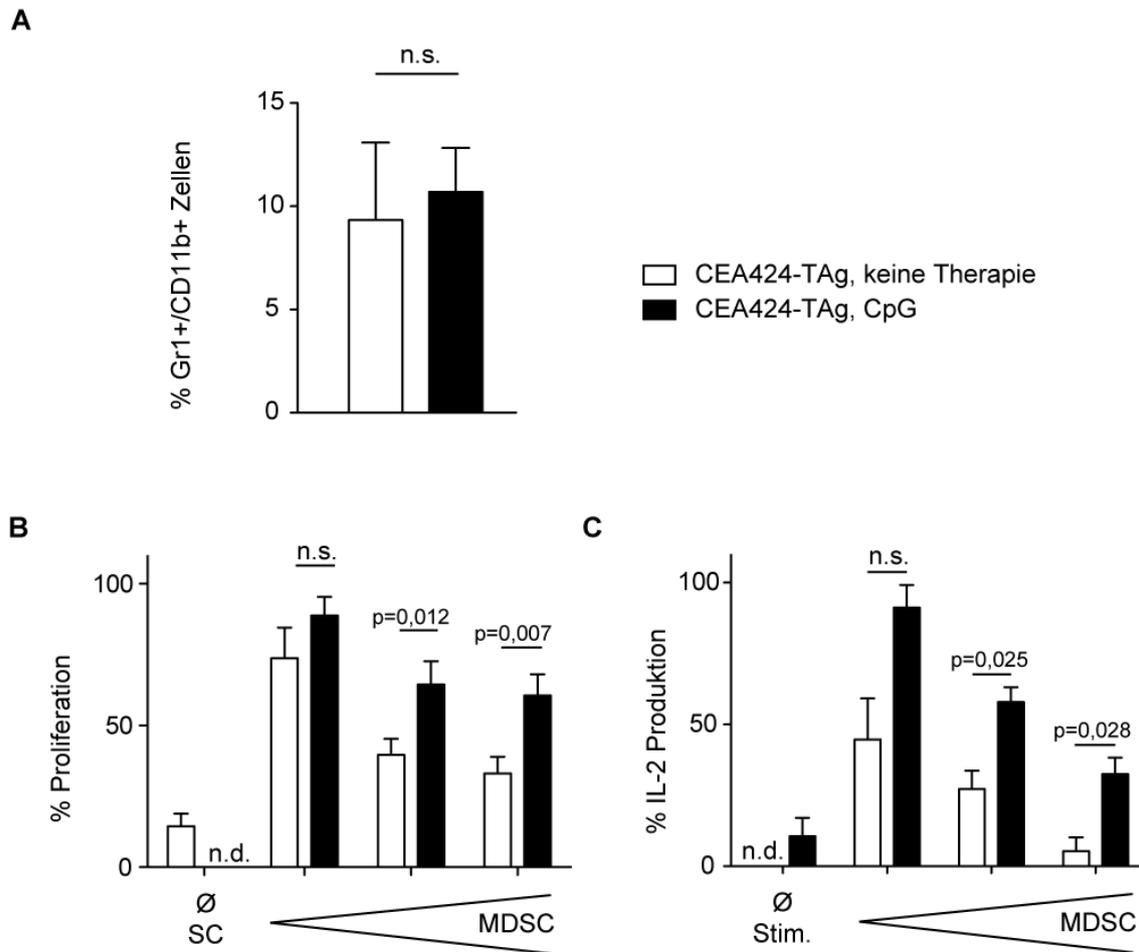
Wie bereits erwähnt, verringert sich die Tumorgroße bei C26-Tieren signifikant durch CpG-Therapie. Unter diesem Gesichtspunkt betrachtet, stellte sich bei unseren Ergebnissen im C26-Modell nun die Frage, ob der beobachteten verminderten Suppressivität der MDSC nicht einfach die Reduktion der Tumormasse zugrunde liegen könnte. Mit verringerter Tumorgroße entfallen viele immunsupprimierende Faktoren wie beispielsweise vom Tumor sezernierte, protumoral wirkende Zytokine – dies könnte sich ebenfalls auf die Funktion und den Phänotyp von MDSC auswirken.

#### 4.2.2 Der Effekt von *in vivo*-CpG-Therapie auf MDSC in orthotopen Tumoren

Um sicherzustellen, dass es wirklich die Wirkung von CpG auf MDSC ist, die unsere Beobachtungen erklären, wählten wir ein zweites, diesmal orthotopes, gastrisches Tumormodell (siehe 5.1.3). Bei diesen CEA424-TAg-Tieren, die spontan Magentumoren entwickeln, konnte in Vorversuchen keine signifikante Reduktion der Tumorgroße durch CpG-Therapie festgestellt werden.

Im CEA424-TAg -Modell wiederholten wir also den vorigen Versuchsansatz und kamen zu ähnlichen, wenn auch nicht ganz so signifikanten Ergebnissen wie im C26-Modell. Zunächst konnten wir wiederum feststellen, dass sich durch CpG-Therapie die reine Anzahl der MDSC in der Milz der tumortragenden Tiere nicht veränderte (**Abbildung 14 A**). Im BrdU-Suppressions-Assay sowie im IL-2-ELISA konnte wie im C26-Modell eine verminderte Fähigkeit der MDSC, T-Zell-Proliferation zu unterdrücken, festgestellt werden, wenn die Tiere zuvor mit CpG behandelt worden waren (**Abbildung 14 B, C**).

Analog zum C26-Modell ergibt sich durch CpG-Therapie auch im CEA424-TAg-Modell ein Shift in der Expression von Maturierungs- und Aktivierungsmarkern in Richtung eines reiferen Phänotyps der MDSC sowohl in MDSC der Milz als auch des Knochenmarks (**Tabelle 1, Abbildung 15**), jedoch nicht für alle Marker gleichermaßen. Für die Marker Sca1 und MHC II konnte in der Milz z.B. keine signifikante Hochregulation festgestellt werden im Gegensatz zum C26-Modell, wo diese Marker hochsignifikant bzw. signifikant hochreguliert wurden. Wir untersuchten im CEA424-TAg-Modell auch die Ausprägung der Maturierungsmarker auf MDSC des Knochenmarks und konnten auch hier eine signifikante Hochregulation der Marker Ly6C, CD11c, CD86 sowie CD80 nachweisen. Sca1 wurde hier zwar hochreguliert, jedoch nicht statistisch signifikant. Für die Marker F4/80 sowie MHC II konnte keine Veränderung festgestellt werden.



#### Abbildung 14: Anzahl und Funktion von CEA424-TAg-MDSC nach CpG-Therapie

90-100 Tage alte CEA424-TAg-Mäuse wurden 3 Mal im Abstand von jeweils 3 Tagen mit CpG therapiert (n=4 pro Gruppe). 2 Tage nach der letzten Therapie wurden die Milzen der Tiere entnommen und durchflusszytometrisch untersucht oder zur MDSC-Aufreinigung weiter verwendet.

- A** Akkumulation von MDSC in der Milz von untherapierten (weißer Balken) sowie von mit CpG therapierten (schwarze Balken) CEA424-TAg-Mäusen. Gezeigt sind durchflusszytometrisch ermittelte, prozentuale Anteile von Gr1+/CD11b+ Zellen bezogen auf alle lebenden Zellen.
- B** Standard BrdU-Suppressions-Assay mit splenischen MDSC von untherapierten (weiße Balken) und CpG-therapierten (schwarze Balken) CEA424-TAg-Mäusen, die mittels Gr1-PE-Positivsort aufgereinigt wurden. Zu je 100 000 Splenozyten von Wildtyp-Mäusen wurden entsprechend unterschiedliche Mengen an MDSC zugegeben (MDSC:SC-Verhältnis: 1:16, 1:8, 1:4) und mit CD3/CD28-Mikropartikeln aktiviert. Nach 2 Tagen wurde BrdU zugegeben. Am nächsten Tag wurde die Proliferation der Zellen im ELISA-Reader gemessen. Werte sind bezogen auf 100 % Proliferation von aktivierten Splenozyten.
- C** IL-2 ELISA der Überstände von **B** nach 3 Tagen MDSC-Splenozyten-Kokultur. Werte sind bezogen auf 100 % IL-2-Produktion von aktivierten Splenozyten.

Ø Stim: keine Stimulation durch CD3/CD28-Mikropartikel zur T-Zellaktivierung bei MDSC:SC-Verhältnis von 1:4

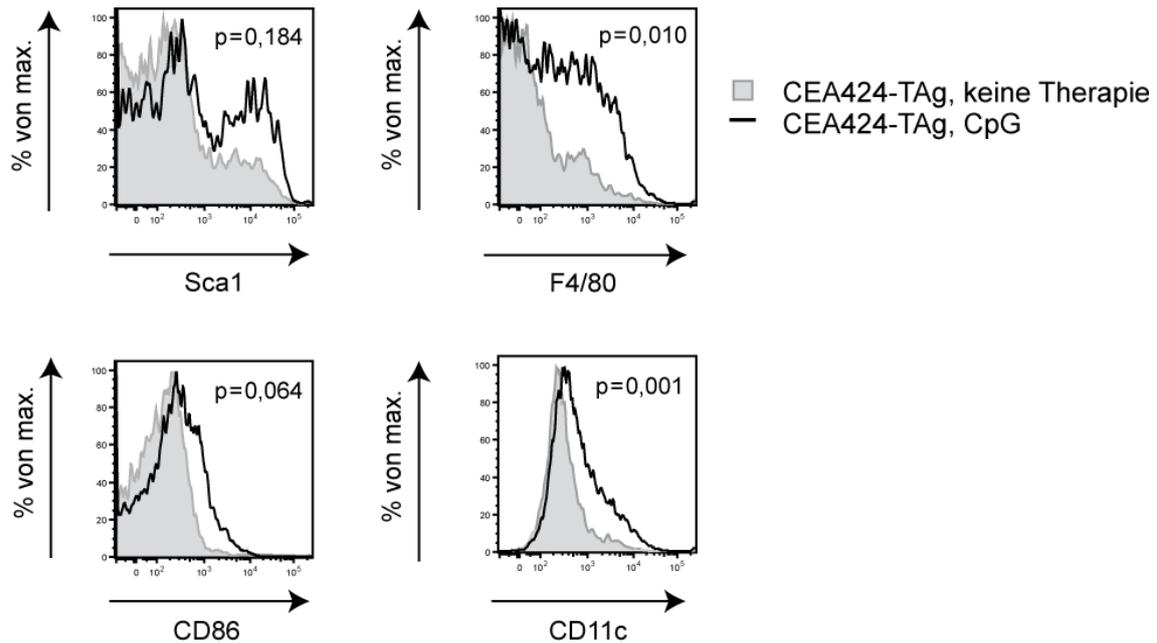
n.d. in Ermangelung an Material nicht durchgeführt

<b>CEA424-TAg-tumortragende Mäuse</b>				
	<b>Knochenmark</b>		<b>Milz</b>	
<b>Marker</b>	<b>nach CpG</b>	<b>Signifikanz (p)</b>	<b>nach CpG</b>	<b>Signifikanz (p)</b>
<b>Ly6C</b>	+	0,025	+	0,006
<b>Ly6G</b>	-	0,022	(-)	0,094
<b>Sca1</b>	(+)	0,079	0	0,184
<b>CD11c</b>	+	0,033	+	0,001
<b>F4/80</b>	0	0,440	+	0,010
<b>MHC II</b>	0	0,152	0	0,115
<b>CD86</b>	+	0,027	(+)	0,064
<b>CD80</b>	+	0,034	+	0,004

**Tabelle 1: Expression von Maturierungsmarkern auf CEA424-TAg-MDSC nach CpG-Therapie**

Veränderungen in der medianen Expression von Maturierungs- und Aktivierungsmarkern auf Gr1+CD11b+ Zellen des Knochenmarks und der Milz nach CpG-Therapie von CEA424-TAg-Mäusen (n=4 pro Gruppe).

- + signifikante Hochregulation ( $p < 0.05$ )
- (+) Hochregulation ( $p < 0.1$ )
- signifikante Herabregulation ( $p < 0.05$ )
- (-) Herabregulation ( $p < 0.1$ )
- 0 keine signifikante Änderung ( $p > 0.1$ )



**Abbildung 15: Expression von Maturierungsmarkern auf CEA424-TAg-MDSC nach CpG-Therapie (Histogramme)**

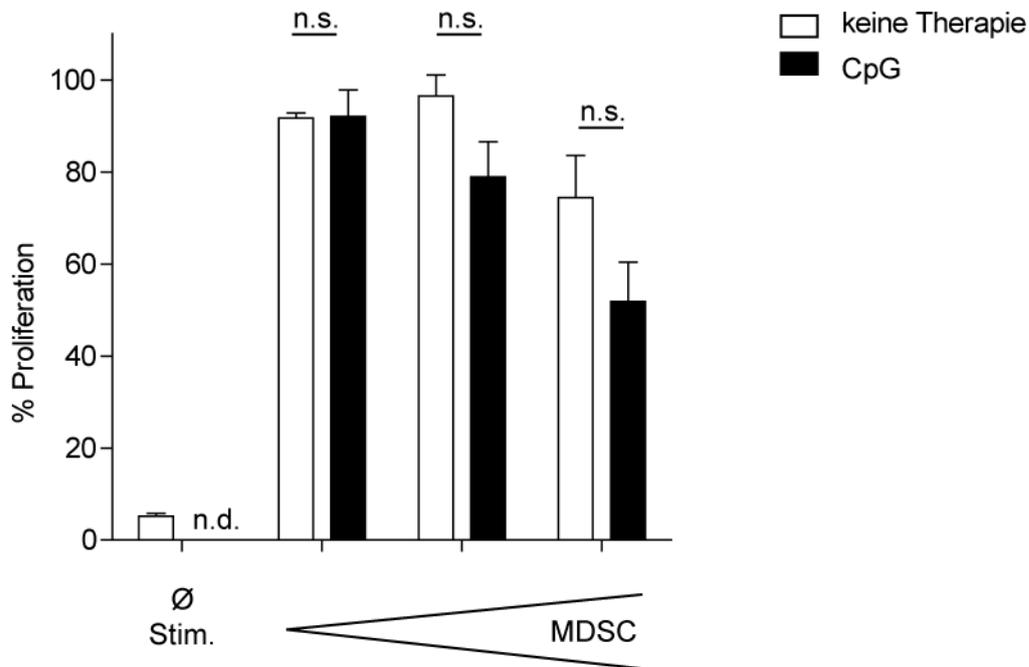
Ausgewählte, repräsentative Histogramme zur Markerauspression von splenischen Gr1+/CD11b+ MDSC einzelner CEA424-TAg-Mäusen in der Durchflusszytometrie. P zeigt die Unterschiede in der medianen Markerauspression zwischen den gepoolten splenischen MDSC von unbehandelten (grau) und mit CpG-therapierten (schwarz) CEA424-TAg-Mäusen (n=4 pro Gruppe).

#### 4.2.3 Der Effekt von *in vitro*-CpG-Therapie auf MDSC

Zum ersten Mal konnten wir mit den vorigen Versuchen zeigen, dass die Suppressivität von MDSC in der Milz sowohl in einem subkutanen als auch in einem orthotopen Tumormodell durch CpG-Therapie abnimmt. Diese Ergebnisse führten uns zu der Frage, wodurch genau dieser Effekt zustande kommt. Wirkt CpG direkt auf die MDSC oder handelt es sich um einen indirekten Effekt, bei dem noch andere Faktoren eine Rolle spielen?

Um zu untersuchen, ob CpG einen direkten Effekt auf MDSC hat, behandelten wir MDSC von C26-tumortragenden Mäusen *in vitro* mit CpG. Im BrdU-Suppressions-Assay stellten wir entgegen unserer Erwartungen fest, dass die Suppressivität der MDSC nicht abnahm (**Abbildung 16**). Würde CpG direkt auf MDSC wirken, dann hätte

die Suppressivität wie in der *in vivo*-Therapie auch hier sinken, die Proliferation der Splenozyten im Assay also ansteigen müssen.



#### Abbildung 16: Suppressions-Assay von MDSC nach *in vitro*-CpG-Therapie

MDSC wurden aus Milzen von C26-tumortragenden Mäusen mittels Gr1-PE- Positivsort aufgereinigt (n=4). MDSC wurden in aufsteigender Konzentration ausplattiert und für 2 h mit 6 µg/ml CpG inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Medium wurden jeweils 100 000 Splenozyten von Wildtyp-Mäusen zugegeben und mit CD3/CD28-Mikropartikeln aktiviert. MDSC:SC-Verhältnis: 1:16, 1:8, 1:4, 1:2. Schwarze Balken entsprechen mit CpG behandelten MDSC, weiße Balken unbehandelten MDSC. Nach 2 Tagen wurde BrdU zugegeben. Am nächsten Tag wurde die Proliferation der Zellen im ELISA-Reader gemessen. Werte sind bezogen auf 100 % Proliferation von aktivierten Splenozyten.

In unserem Versuchsansatz befanden sich zunächst nur aufgereinigte MDSC sowie CpG, keine zusätzlichen Zellen. Da kein signifikanter Effekt erzielt werden konnte, stellte sich für uns die Frage, ob MDSC überhaupt TLR9, den Rezeptor für CpG exprimieren. In einem in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Experiment konnten wir zeigen, dass MDSC kaum TLR9 exprimieren, dafür in mittlerem Maß TLR4, den Rezeptor für LPS. Die fehlende Expression von TLR9 auf MDSC erklärte, weshalb wir in unseren *in vitro*-Versuchen mit CpG keinen Erfolg hatten und führte uns zu der

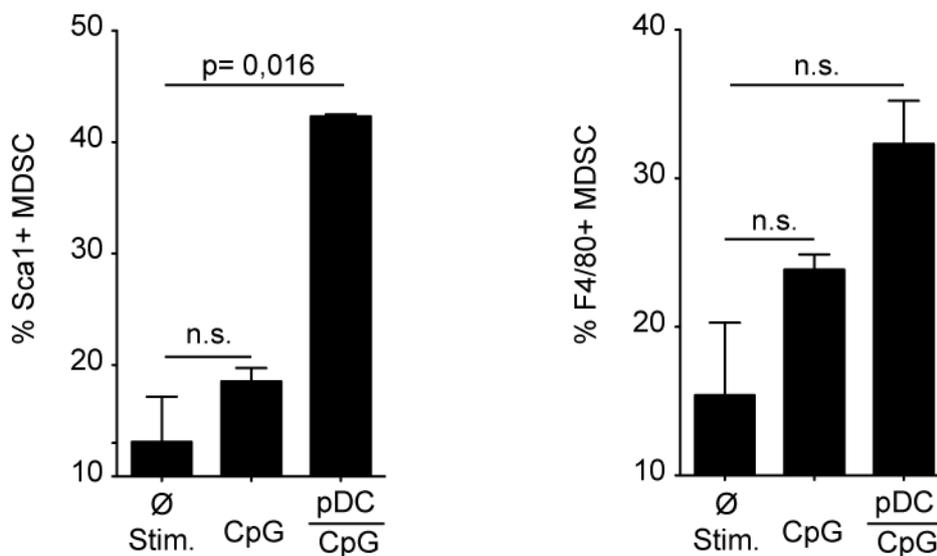
neuen Hypothese, dass der Effekt, den wir bei *in vivo*-Therapie bei MDSC beobachteten, ein indirekter Effekt unter Beteiligung anderer Zellarten sein musste.

#### 4.2.4 Überstandsversuche und die Rolle von plasmazytoiden dendritischen Zellen

Es ist bekannt, dass der intrazelluläre Rezeptor TLR9 von B-Zellen (Kline et al., 1998), in hohem Maße aber vor allem von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) exprimiert wird (Schreibelt et al., 2010). Wir stellten die Hypothese auf, dass die von uns durchgeführte CpG-Therapie von tumortragenden Mäusen nicht direkt auf MDSC wirkte, sondern indirekt andere Zellen stimuliert würden, wodurch die von uns beobachtete Verminderung der suppressiven Eigenschaften sowie eine phänotypische Ausreifung der MDSC zu erklären wäre. Wir konzentrierten uns daher im Folgenden auf die Wirkung von mit CpG aktivierten pDC auf MDSC.

Plasmazytoide dendritische Zellen wurden aus Knochenmark von C57/BL6 Mäusen generiert und daraufhin Überstände von nicht aktivierten pDC sowie von mit CpG aktivierten pDC hergestellt. Wir isolierten MDSC mit dem StemCell Negativsort aus Splenozyten von CEA424-TAg-tumortragenden Tieren. Diese wurden in Triplikaten zu je 100 000 MDSC/Well ausplattiert. MDSC wurden alleine oder mit Überständen von mit CpG aktivierten pDC inkubiert oder direkt mit CpG in einer Konzentration von 6 µg/ml stimuliert. Diese Versuchsanordnung wurde für 40 h im Brutschrank inkubiert, damit die verschiedenen Zytokine in den Überständen sowie CpG auf die MDSC wirken konnten. Nach dieser Zeit ernteten wir die MDSC und untersuchten sie durchflusszytometrisch auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker. Exemplarisch sind in **Abbildung 17** die Ergebnisse für den Marker Sca1 sowie den Makrophagenmarker F4/80 dargestellt. Wir konnten erkennen, dass MDSC, die ohne Stimulus ausplattiert wurden, nur eine geringe Expression dieser Maturierungsmarker aufwiesen und auch bei direkter CpG-Zugabe ergab sich kein signifikanter Unterschied, jedoch ging der Trend zu einer etwas höheren Expression. Behandelten wir die MDSC dagegen mit den Überständen von mit CpG aktivierten pDC, so erhielten wir signifikante Ergebnisse für den Marker Sca1, für den Marker F4/80 war der Wert zwar nicht signifikant aber der Trend zur Hochregulation doch deutlich erkennbar. Wir konnten damit unsere Hypothese untermauern, dass pDC, die durch CpG aktiviert worden waren, Substanzen ausschütten, die für die Hochregulation von Maturierungsmarkern bei MDSC verantwortlich waren.

Wir verzichteten in dieser Versuchsanordnung auf BrdU-Suppression-Assays, da wir vermuteten, dass die Viabilität der MDSC nicht für weitere drei Tage, die nach der Inkubation mit den Überständen benötigt worden wären, ausgereicht hätte. Dementsprechend können wir keine Aussage treffen, ob durch die Überstände auch Suppressivitätsunterschiede entstanden wären. Aus diesem Grund mehrten sich zwar die Hinweise auf einer Rolle der pDC und von ihnen produzierte Faktoren, diese Hypothese musste aber dringend weiter geprüft werden.



**Abbildung 17: Markerverschiebungen auf MDSC durch Überstände von aktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen**

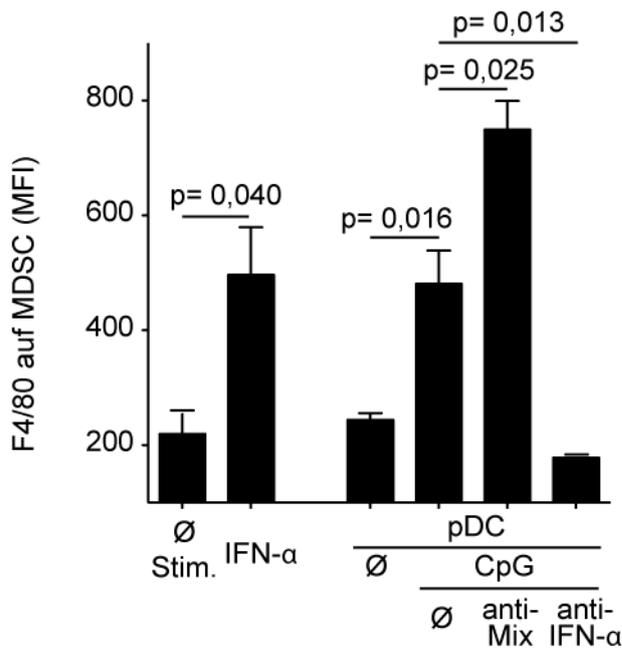
MDSC wurden mittels Negativsort aus Milzen von CEA424-TAg-Mäusen (n=3) aufgereinigt und für 40 h in Medium alleine, Medium, dem direkt CpG zugesetzt wurde oder mit Überständen von pDC, die mit CpG aktiviert worden waren, inkubiert. Die Expression von Sca1 und F4/80 auf MDSC (i.e. Gr1+/CD11b+ Zellen bezogen auf alle lebenden Zellen) wurde durchflusszytometrisch analysiert und werden dargestellt als prozentualer Anteil an MDSC, die den entsprechenden Marker exprimieren.

#### 4.2.5 Der Effekt von *in vitro*-IFN- $\alpha$ -Therapie auf MDSC

In der Literatur ist bekannt, dass pDC bei TLR9-Aktivering große Mengen an IFN- $\alpha$  produzieren (Gilliet et al., 2008). Auch in eigenen IFN- $\alpha$ -ELISAs konnten wir bestätigen, dass unsere Überstände von pDC, die mit CpG aktiviert wurden im Gegensatz zu Überständen von unstimulierten pDC oder Splenozyten, die mit CpG aktiviert wurden, IFN- $\alpha$  enthalten (Daten nicht gezeigt).

Wir untersuchten also im Folgenden, ob IFN- $\alpha$  einen direkten Einfluss auf MDSC haben kann. Dazu wurden mittels Negativsort aufgereinigte MDSC wiederum mit Überständen von mit CpG aktivierten pDC inkubiert und schließlich die Expression von Oberflächenmarkern durchflusszytometrisch bestimmt. Um den Effekt von IFN- $\alpha$  zu bestimmen und die Wirkung anderer Zytokine in den Überständen auszuschließen, wurden in einigen Bedingungen neutralisierende Antikörper zugegeben. In einer Bedingung waren diese Antikörper gegen die proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-6 und IL-12 sowie gegen das antiinflammatorische IL-10 gerichtet. In einer Bedingung wurde direkt IFN- $\alpha$  durch Zugabe des entsprechenden neutralisierenden Antikörpers geblockt.

Wie schließlich in **Abbildung 18** ersichtlich wird, konnten wir zunächst zeigen, dass die direkte Zugabe von IFN- $\alpha$  eine signifikante Hochregulation des Makrophagenmarkers F4/80 auf MDSC zur Folge hat. Ein sogar noch stärkerer Effekt konnte bei MDSC, die mit Überständen von mit CpG aktivierten pDC inkubiert wurden, beobachtet werden. Wurden neutralisierende Antikörper gegen die pro- und antiinflammatorischen Interleukine hinzugegeben, so kam es zu einer signifikanten weiteren Hochregulation in der Expression von F4/80. Wurde hingegen IFN- $\alpha$  durch Zugabe des IFN- $\alpha$ -Inhibitors geblockt, so wurde die Hochregulation von F4/80 signifikant unterdrückt. Wir konnten mit diesem Versuch also nachweisen, dass IFN- $\alpha$  insofern einen entscheidenden Einfluss auf MDSC hat, als es allein zu einer Maturierung von MDSC hin zu einem reiferen Phänotyp führen kann.



**Abbildung 18: Markerverschiebung auf MDSC nach IFN- $\alpha$ -Gabe in vitro**

MDSC wurden mittels Negativsort aus den Milzen von C26-tumortragenden Mäusen (n=3) isoliert und für 40 h in Medium ohne Stimulus (Ø Stim.), mit IFN- $\alpha$  oder mit Überständen von pDC oder von pDC, die mit CpG aktiviert worden waren, inkubiert. In den letzten beiden Bedingungen wurden neutralisierende Antikörper gegen IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 (anti-Mix) bzw. IFN- $\alpha$  (anti-IFN- $\alpha$ ) zugegeben. Die Expression von F4/80 auf MDSC (i.e. Gr1+/CD11b+ Zellen bezogen auf alle lebenden Zellen) wurde durchflusszytometrisch analysiert und ist als *median fluorescence intensity* (MFI) dargestellt.

#### 4.2.6 Der Effekt von *in vivo*-IFN- $\alpha$ -Therapie auf MDSC

Die Effekte der *in vitro*-Therapie mit IFN- $\alpha$  auf den Phänotyp von MDSC ließ uns vermuten, dass auch *in vivo* IFN- $\alpha$  den Einfluss von CpG-Therapie auf MDSC erklären könnte. Wir therapierten also C26-tumortragende Tiere an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 10  $\mu$ g rekombinantem IFN- $\alpha$ . 24 Stunden nach der letzten IFN- $\alpha$ -Gabe wurden den Tieren Milz, Knochenmark sowie Tumorgewebe entnommen. Wie bei Therapie mit CpG wurden auch in diesem Experiment die MDSC aus den gepoolten Milzen der IFN- $\alpha$ -Therapiegruppe sowie der untherapierten Kontrollgruppe mittels des Gr1-PE-Positivsorts gewonnen. Milz, Knochenmark sowie Tumorgewebe wurden jeweils als Einzelproben pro Tier durchflusszytometrisch auf die Expression von Maturierungs- sowie Aktivierungsmarkern untersucht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in Milz und Knochenmark die untersuchten phänotypischen Marker signifikant bis hochsignifikant nach oben reguliert wurden. Allein im Tumor fällt die Hochregulation nur für Sca1 signifikant aus – dies könnte durch das Tumormikromilieu erklärt werden, das Therapieeffekte auf MDSC vermindern könnte. Wie schon nach CpG-Therapie festgestellt, ist von den untersuchten Markern vor allem das Antigen Sca1 hervorzuheben, dessen Funktion noch nicht hinreichend bekannt ist. Auf MDSC von unbehandelten Tieren kaum vorhanden, wird es nach IFN- $\alpha$ -Therapie um den Faktor Fünf verstärkt exprimiert. Ähnlich verhält es sich mit dem Makrophagen-Marker F4/80. Eine Auflistung der Markerveränderungen in Milz, Knochenmark und Tumorgewebe findet sich in **Tabelle 2**, in **Abbildung 19** sind für Milz sowie Tumorgewebe exemplarische Histogramme der Markerexpression von MDSC in gewohnter Weise dargestellt.

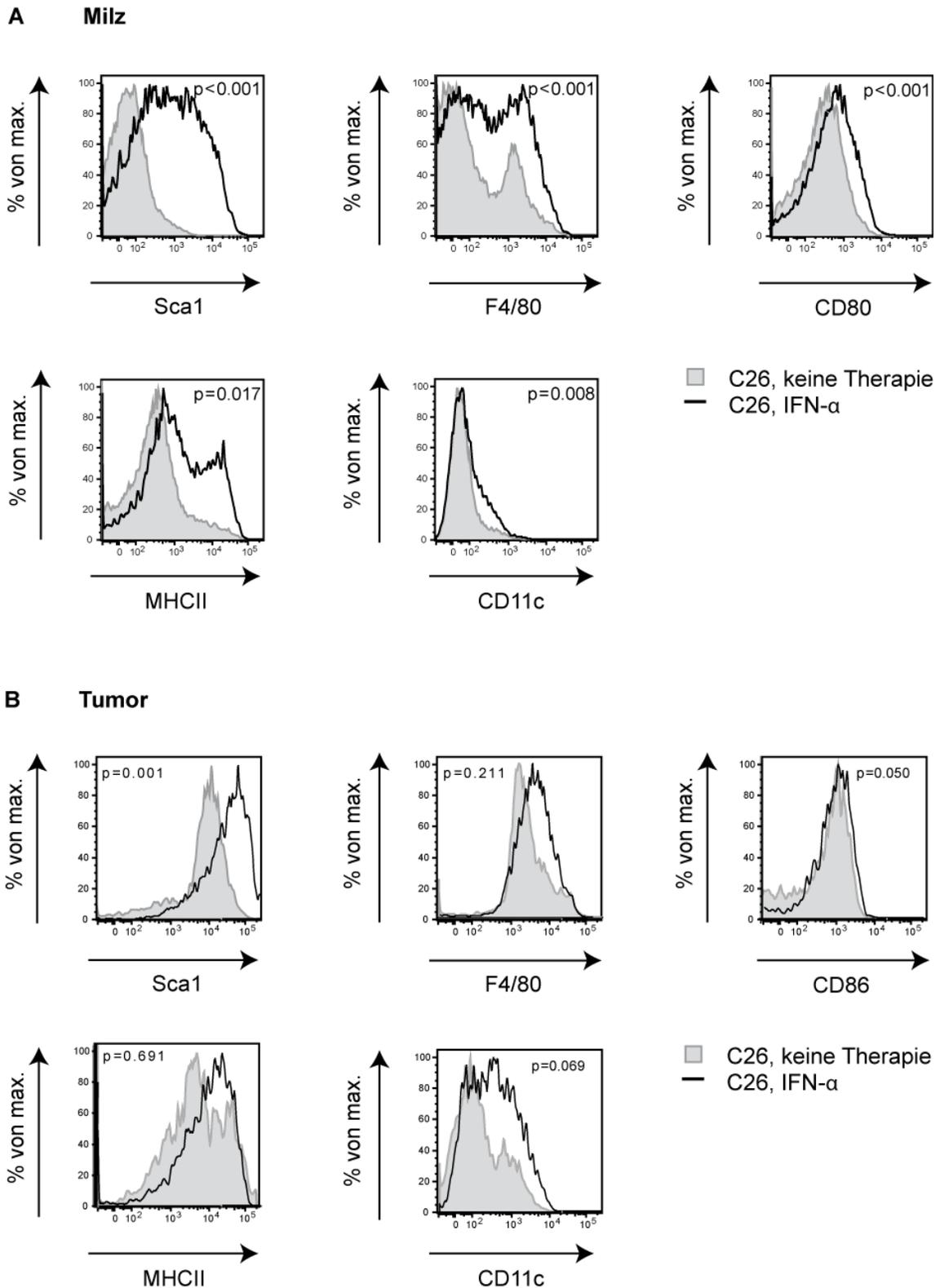
Neben dieser Markerexpression wurden zudem wieder die suppressiven Eigenschaften der MDSC miteinander verglichen. Auch hier korreliert das Ergebnis nach IFN- $\alpha$ -Therapie mit denen aus der CpG-Therapie: Die Suppressivität von MDSC aus mit IFN- $\alpha$  therapierten Tieren fällt geringer aus als die von MDSC aus unbehandelten C26-tumortragenden Tieren. Derselbe Trend zeigt sich auch wieder im IL-2-ELISA, wenn auch nicht in allen Titrationsstufen gleichermaßen (**Abbildung 20**).

C26-tumortragende Mäuse						
Marker	Milz		Knochenmark		Tumor	
	nach IFN- $\alpha$	Signifikanz (p)	nach IFN- $\alpha$	Signifikanz (p)	nach IFN- $\alpha$	Signifikanz (p)
<b>Ly6C</b>	+	<0.001	+	0,032	+	0,013
<b>Ly6G</b>	0	0,930	-	0,044	(-)	0,052
<b>Sca1</b>	+	<0,001	+	<0,001	+	0,001
<b>CD11c</b>	+	0,008	+	0,033	(+)	0,069
<b>F4/80</b>	+	<0.001	+	<0,001	0	0,211
<b>MHC II</b>	+	0,017	0	0,114	0	0,691
<b>CD86</b>	+	0,013	+	0,002	(+)	0,050
<b>CD80</b>	+	<0.001	+	0,007	0	0,404

**Tabelle 2: Expression von Maturierungsmarkern auf C26-MDSC nach IFN- $\alpha$ -Therapie**

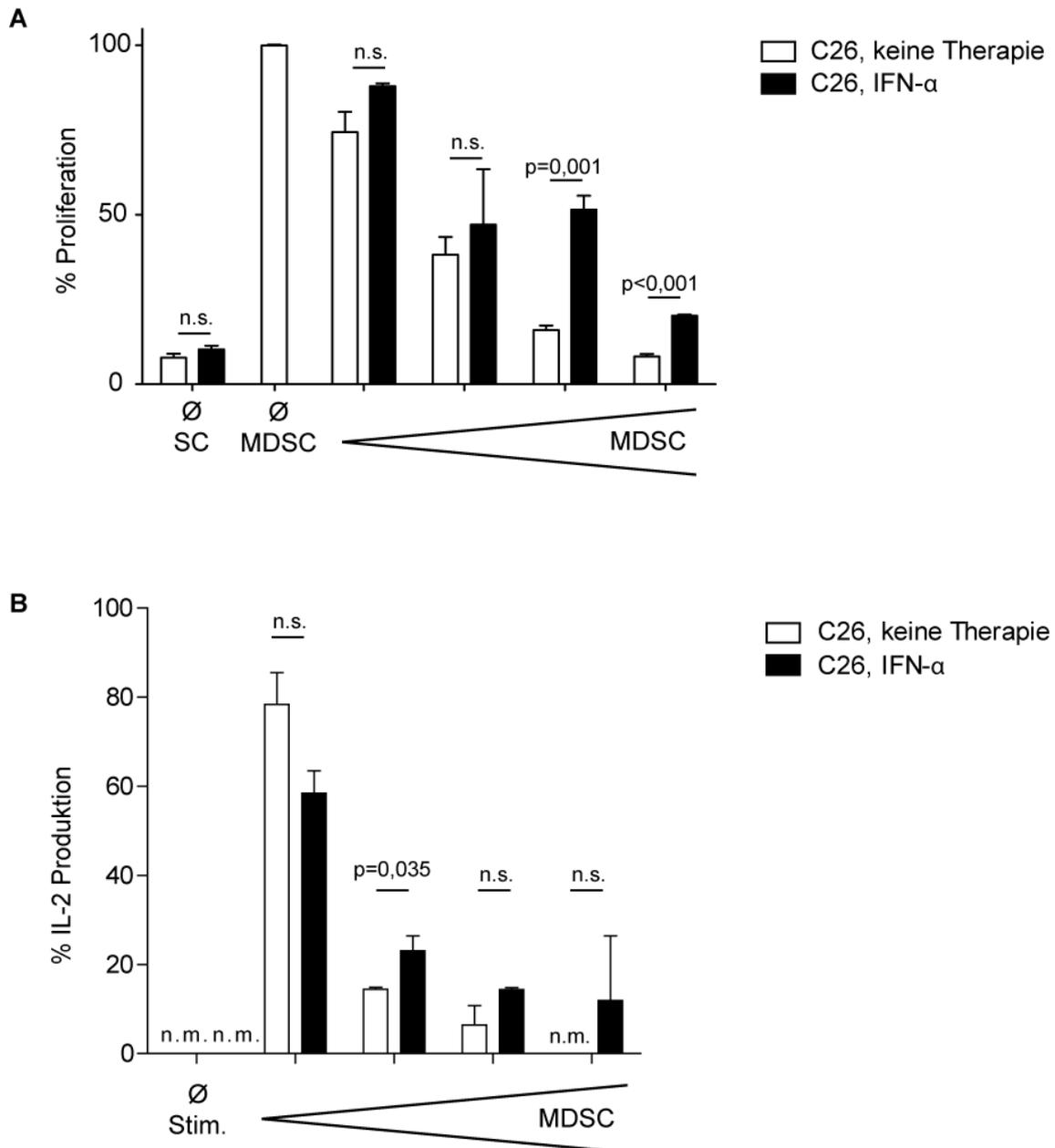
Mäuse mit großen C26-Tumoren (Tumorgröße > 100 mm<sup>2</sup>) wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit einer i.p. Injektion IFN- $\alpha$  therapiert, die Kontrollgruppe erhielt PBS i. p. (n = 5 pro Gruppe). Ein Tag nach der letzten IFN- $\alpha$ -Gabe wurden Milz, Knochenmark und Tumorgewebe entnommen und durchflusszytometrisch untersucht oder zur Aufreinigung von MDSC weiter verwendet. Veränderungen in der medianen Expression von Maturierungs- und Aktivierungsmarkern auf Gr1+CD11b+ Zellen der Milz, des Knochenmarks und des Tumorgewebes nach IFN- $\alpha$ -Therapie von C26-tumortragenden Tieren sind hier tabellarisch dargestellt.

- + signifikante Hochregulation (p<0.05)
- (+) Hochregulation (p<0.1)
- signifikante Herabregulation (p<0.05)
- (-) Herabregulation (p<0.1)
- 0 keine signifikante Änderung (p>0.1)



**Abbildung 19: Expression von Maturierungsmarkern auf C26-MDSC nach IFN- $\alpha$ -Therapie *in vivo* (Histogramme)**

Ausgewählte, repräsentative Histogramme zur Markerexpression von splenischen (A) und intratumoralen (B) Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> MDSC einzelner C26-Mäusen in der Durchflusszytometrie. P zeigt die Unterschiede in der medianen Markerexpression zwischen den gepoolten MDSC von unbehandelten (grau) und mit IFN- $\alpha$  therapierten (schwarz) C26-Mäusen (n = 5 pro Gruppe).



**Abbildung 20: Funktion von C26-MDSC nach IFN- $\alpha$ -Therapie *in vivo***

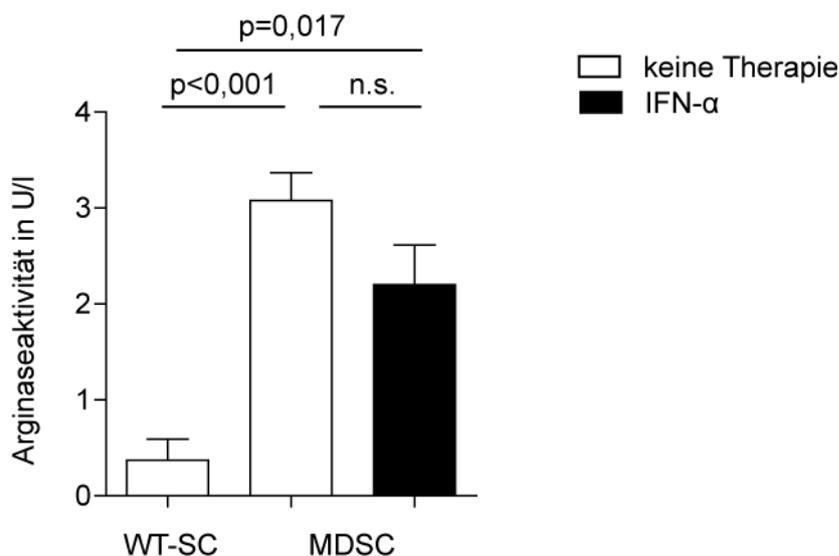
**A** Standard BrdU-Suppressions-Assay mit splenischen MDSC von untherapierten (weiße Balken) und IFN- $\alpha$ -therapierten (schwarze Balken) C26-tumortragenden Mäusen, die mittels Gr1-PE-Positivsort aufgereinigt wurden. Zu je 100 000 Splenozyten von Wildtyp-Mäusen wurden entsprechend unterschiedliche Mengen an MDSC zugegeben (MDSC:SC-Verhältnis: 1:16, 1:8, 1:4, 1:2) und mit CD3/CD28-Mikropartikeln aktiviert. Nach 2 Tagen wurde BrdU zugegeben. Am nächsten Tag wurde die Proliferation der Zellen im ELISA-Reader gemessen. Werte sind bezogen auf 100 % Proliferation von aktivierten Splenozyten.

**B** IL-2 ELISA der Überstände von A nach 3 Tagen MDSC-Splenozyten-Kokultur. Werte sind bezogen auf 100 % IL-2-Produktion von aktivierten Splenozyten.

$\emptyset$  Stim: keine Stimulation durch CD3/CD28-Mikropartikel zur T-Zellaktivierung bei MDSC:SC-Verhältnis von 1:2

n.m.: nicht messbar = unterhalb der Nachweisgrenze

Wie einleitend beschrieben, besitzen MDSC verschiedene Möglichkeiten, um T-Zellproliferation zu hemmen. Neben dem Enzym iNOS spielt auch Arginase-1 dabei eine entscheidende Rolle. Neben dem Befund, dass mit IFN- $\alpha$  therapierte MDSC weniger hemmend sind als unbehandelte, untersuchten wir im gleichen Versuch auch, ob sich durch IFN- $\alpha$ -Therapie die Arginaseaktivität veränderte. Bestätigt werden konnte mit diesem Versuch zunächst, dass alle aufgereinigten MDSC eine signifikant höhere Arginaseaktivität besitzen als die gleiche Anzahl von WT-SC im Vergleich. Das Ergebnis bezüglich Arginaseaktivität zwischen Therapie- und Kontrollgruppe ist in diesem Setting war nicht signifikant, ein Trend ist aber eindeutig erkennbar: IFN- $\alpha$ -MDSC haben eine geringere Arginaseaktivität als MDSC der Kontrollgruppe (**Abbildung 21**). Dieser Mechanismus trägt vermutlich zu der geringeren Suppressionsfähigkeit der IFN- $\alpha$ -MDSC im Vergleich zu Kontroll-MDSC bei.



**Abbildung 21: Arginase-Aktivität von C26-MDSC nach IFN- $\alpha$ -Therapie *in vivo***

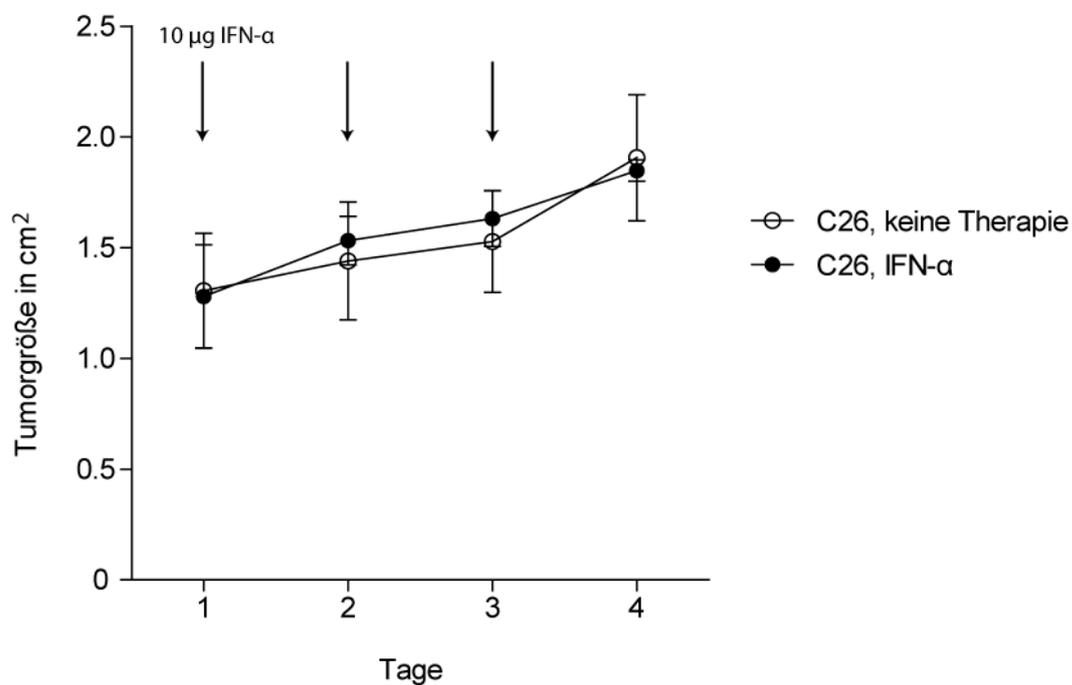
Arginase-Aktivität von jeweils  $10^6$  Splenozyten einer Wildtyp-Maus (WT-SC), MDSC der untherapierten Gruppe (n=5) sowie MDSC der mit IFN- $\alpha$  therapierten Gruppe (n=5) im Vergleich.

Arginaseaktivität wird angegeben in U/L.

Um einen möglichen Einfluss der Tumorgröße auf die MDSC auszuschließen, wurden die C26-tumortragenden Mäuse vor Therapiebeginn so in zwei Gruppen aufgeteilt, dass beide Gruppen dieselbe durchschnittliche Tumorgröße aufwiesen. Vor jeder Therapie sowie am Tag der Organentnahme wurden die Tumoren gemessen. Dabei

konnte festgestellt werden, dass sich die durchschnittliche Tumorgröße zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant veränderte (**Abbildung 22**).

Mit diesen abschließenden Versuchen konnten wir zeigen, dass eine Therapie von C26-tumortragenden Tieren mit IFN- $\alpha$  ausreicht, um die Effekte hinsichtlich der Funktion und des Phänotyps von MDSC, die wir unter CpG-Therapie beobachtet hatten, zu reproduzieren. Wir konnten außerdem zeigen, dass diese Effekte weitgehend unabhängig von der Tumorgröße waren.



**Abbildung 22: Tumorgröße von C26-tumortragenden Mäusen nach IFN- $\alpha$ -Therapie**

Gezeigt ist die durchschnittliche Tumorgößen von C26-tumortragenden Tieren, die mit jeweils 10  $\mu$ g IFN- $\alpha$  i. p. an drei aufeinander folgenden Tagen therapiert wurden (Pfeile, n=5), sowie der Kontrollgruppe (n = 5), die PBS i. p. verabreicht bekamen. Tumorgößen wurden mit Hilfe eines Messschiebers als Produkt der zwei größten zueinander senkrecht stehenden Durchmesser des Tumors bestimmt.



## 5 Diskussion

### 5.1 Methodisches und Grundsätzliches

#### 5.1.1 Aufreinigung und Antikörpereinfluss auf MDSC

Bevor wir uns unseren Hauptexperimenten zur Untersuchung der Effekte von TLR-Liganden auf MDSC und den dazugehörigen Mechanismen widmen konnten, mussten wir zunächst unsere vorhandenen Methoden optimieren und mögliche, durch die Aufreinigung hervorgerufene Effekte auf MDSC ausschließen. Die Aufreinigungsmethode von MDSC mit magnetischen Partikeln nach dem Miltenyi-System (Miltenyi et al., 1990), bei dem die Zellen durch Markierung mit magnetischen Partikeln und Passage einer magnetischen Säule aufgereinigt werden, stellte uns mehrfach vor das Problem einer mangelnden Viabilität der MDSC. Dies erschien uns zur Untersuchung der Aktivität der MDSC für unsere dreitägigen BrdU-Suppressions-Assays nicht hinnehmbar. Nach ausführlicher Testung und Optimierung des EasySep®-Verfahrens der Firma StemCell Technologies unter Wegfall der magnetischen Säulen, entschieden wir uns schließlich aufgrund der hohen Reinheit von durchschnittlich 90 % Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen und guter Viabilität für den StemCell Gr1-PE-Positivsort als Hauptaufreinigungsmethode. Trotz durchschnittlich um einige Prozentpunkte geringerer Reinheit und um bis zu 50% schlechterer Viabilität des StemCell Negativsorts im Vergleich zum StemCell Gr1-PE-Positivsort, behielten wir uns auch diese Aufreinigungsmethode vor, da sie uns die einzigartige Möglichkeit bot, komplett unmarkierte MDSC zu isolieren.

Ribechini et al. konnten zum ersten Mal zeigen, dass allein die Bindung von Gr1-Antikörpern selbst zu STAT3-Signalkaskaden und im Knochenmark zu Myelopoese und Hochregulation von Makrophagenmarkern führen kann (Ribechini et al., 2009). Aus diesem Grund war der Negativsort unabdingbar für unsere *in vitro*-Versuche, bei denen wir die Expression von Oberflächenmarkern nach CpG- bzw. IFN- $\alpha$ -Zugabe auf isolierte MDSC untersuchten. Hier musste ausgeschlossen werden, dass durch Gr1-induzierte Signalkaskaden Änderungen in der Markerexpression der Zellen stattfand. Zudem war die Inkubationszeit dieser Versuche bzgl. der Markerexpression kürzer als die der Standard-Suppressions-Assays, sodass auch die geringere Viabilität der negativ aufgereinigten MDSC in Kauf genommen werden konnte. Nichtsdestotrotz konnte bei Experimenten mit negativ aufgereinigten MDSC eine Verunreinigung mit DC oder Makrophagen nicht komplett ausgeschlossen

werden, da mit unseren Möglichkeiten nur T-Zellen, B-Zellen sowie Erythrozytenreste zuverlässig entfernt werden konnten. Obwohl der Anteil an Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> MDSC in den meisten Versuchen auch beim Negativsort bei >85 % lag, muss diese Möglichkeit der Verunreinigung und der Interaktionen mit anderen Zelltypen bei den Ergebnissen stets berücksichtigt werden.

Unsere Entdeckung, dass negativ aufgereinigte MDSC eine geringere Viabilität und zugleich eine stärkere Suppressivität als die mit Gr1-PE aufgereinigten MDSC aufwiesen, schürte unsere Sorge, dass apoptotische Zellen in unseren Suppressions-Assays zu artifiziellen Werten führen könnten. Diese Hypothese konnte jedoch durch Vergleiche der Suppressivität von apoptotischen, nekrotischen und gesunden MDSC entkräftet werden.

Ribechini et al. stellten ebenfalls fest, dass die Applikation von Gr1-Antikörpern in MDSC des Knochenmarks zu einer Expansion und einer Verringerung der Suppressivität dieser Zellen führt. Uns stellte sich daraufhin die Frage, ob dies auch für MDSC der Fall sein könnte, die unter pathologischen Bedingungen in der Peripherie akkumulieren. Unsere Versuche zeigten, dass die Zugabe von Gr1-Antikörpern *in vitro* in den meisten Fällen zu einer tendenziell verminderten suppressiven Wirkung von splenischen MDSC führen kann. Allerdings waren die Ergebnisse in diesen Versuchen nicht durchgehend eindeutig, was u. U. auf die schon oben angesprochenen möglichen Verunreinigungen der negativ aufgereinigten MDSC mit DC und Makrophagen zurückzuführen sein könnte. In unseren Darstellungen der Suppressivität wird die prozentuale Proliferation der Zellen bezogen auf einen Maximalwert gezeigt, dementsprechend fällt eine leicht veränderte Gesamtsuppressivität der MDSC hier nicht stark ins Gewicht, sollte jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden.

### **5.1.2 Gesamt-MDSC versus MDSC-Subpopulationen**

Obwohl MDSC seit Jahren erforscht werden, so besteht immer noch keine absolute Klarheit über die Definition dieser stets sogenannten „heterogenen Zellpopulation“. Die Oberflächenmarker, über die sie definiert werden, sind z.T. die gleichen, die auch von normalen Neutrophilen oder sogenannten inflammatorischen Monozyten exprimiert werden (Gabrilovich et al., 2012; Youn and Gabrilovich, 2010). Dennoch können MDSC aufgrund ihrer Markerexpression in Zusammenschau mit ihren hemmenden

Eigenschaften - diese stellen zusammen noch immer den wichtigsten Faktor dar, um MDSC von Neutrophilen und Granulozyten zu unterscheiden - in verschiedene Subpopulationen eingeteilt werden. Dabei sind monozytäre (MO-) und granulozytäre (PMN-) MDSC die wichtigsten Untergruppen, allerdings werden zunehmend weitere Unterpopulationen gefunden (Ribechini, Greifenberg et al. 2010; Zhou, French et al. 2010). Um die Unterscheidung zwischen den MDSC-Populationen einfacher zu machen, werden zudem immer mehr potentielle neue Marker für MDSC gesucht und gefunden (Movahedi et al., 2008; Ribechini et al., 2010; Zhou et al., 2010).

In allen Experimenten dieser Arbeit wurden nur Gesamt-MDSC untersucht, also Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> MDSC, die alle Unterpopulationen enthalten. Diese Vorgehensweise bietet den Vorteil, ein realitätsnäheres Bild der Vorgänge *in vivo* zu zeigen. Denn sowohl in der Maus als auch im Menschen sind diese Subpopulationen nicht voneinander separiert, sondern tragen zusammen zu der immunsupprimierenden Wirkung von MDSC bei. Natürlich ist es auch interessant zu beobachten, wie sich MO- und PMN-MDSC jeweils unabhängig voneinander TLR-Agonisten gegenüber verhalten. Diese Fragestellung wurde bereits von anderen Doktoranden in unserer Arbeitsgruppe behandelt und deshalb in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt (Zoglmeier et al., 2011).

### 5.1.3 Subkutane und autochthone Tumormodelle in der Maus

In unseren Versuchen wurden zwei unterschiedliche Tumormodelle untersucht, das subkutane C26-Tumormodell sowie das orthotope gastrische CEA424-TAg-Tumormodell. Die meisten bisher untersuchten murinen Tumormodelle sind subkutane Modelle, d.h. den Tieren werden *in vitro* gezüchtete Tumorzellen subkutan injiziert. Daraufhin wächst ein Tumor, der von außen sichtbar ist, sodass durch das Messen der Tumorgöße festgestellt werden kann, ob beispielsweise eine Therapie des Tieres anschlägt (vgl. hierzu das auch beim Menschen angewendete RECIST-Schema oder die TNM-Klassifikation. In beiden Fällen ist die Ausdehnung des Tumors ein ausschlaggebender Faktor bei der Effektivitätsbeurteilung von Krebsmedikamenten bzw. des Tumorstagings (Eisenhauer et al., 2009)).

Die von uns vorwiegend verwendete C26-Zelllinie (auch als CT26--Zelllinie bekannt) wurde 1980 aus chemisch induzierten, transplantierbaren Kolontumoren entwickelt (Brattain et al., 1980), (Griswold and Corbett, 1975) und in den folgenden Jahren

weiterentwickelt (Sato et al., 1981). Es handelt sich um einen sehr schnell wachsenden, sehr aggressiven Tumor mit hoher Metastasierungs- und Letalitätsrate. Die C26-Zelllinie wurde damals als eine der ersten Zelllinien solider Tumoren, neben z.B. dem B16-Melanom, gezüchtet, um innerhalb kurzer Zeit genügend Material und gleichbleibende, kontrollierbare Konditionen für Experimente in der Tumorthherapie zur Verfügung zu haben. Nachteil dieser Tumormodelle ist sicherlich, dass sie trotz ihres zellulären Ursprungs aus echten Tumoren viele artifizielle Eigenschaften aufweisen, was sich beispielsweise im sehr schnellen Wachstum der Tumoren zeigt, wohingegen körpereigene Tumoren sich über Jahrzehnte entwickeln können bis sie klinisch apparent werden.

Aus diesem Grund wurden verschiedene orthotope murine Tumormodelle entwickelt, wobei darauf abgezielt wurde, möglichst realistische Bedingungen zu schaffen, wie sie auch bei natürlich im Menschen entstehenden Tumoren herrschen. Dabei wird auch das *microenvironment* des Tumors mit einbezogen, das eine kritische Rolle für die Tumorentwicklung spielt, wie bereits einleitend in 2.5 erläutert. Neben präklinischen Studien an den einfach handzuhabenden subkutanen Tumormodellen wird deshalb gefordert, zunehmend Studien an orthotopen Modellen sowie an Modellen mit spontaner Metastasenbildung für die Testung von Krebsmedikamenten durchzuführen (Talmadge et al., 2007).

Um unsere eigenen Ergebnisse im C26-Modell zu validieren, bedienten wir uns eines solchen orthotopen gastrischen Tumormodells, des CEA424-T-Antigen-Tumormodells. In diesen von Thompson et al. entwickelten Mäusen, entstehen spontan Magentumoren. Das SV40-T-Antigen dieser Mäuse steht unter der Kontrolle des Promotors für das *carcinoembryonic antigen* (CEA), das im Menschen auch als Tumormarker für gastrointestinale Tumoren verwendet wird, wodurch die Tiere schon früh, etwa ab Tag 40, Tumoren in der Pylorusregion entwickeln. 100 % der Tiere erkranken und haben eine Lebenserwartung von etwa 100 bis 130 Tagen, bis sie an einer Obstruktion des Magenausgangs versterben (Thompson et al., 2000). In beiden Modellen konnte eine Akkumulation von MDSC in der Milz sowie im Tumorgewebe bei Progression des Tumors festgestellt werden, was eine Grundvoraussetzung für die Untersuchung der MDSC darstellte.

Durch die Verwendung dieser zwei ganz unterschiedlichen gastrointestinalen Tumormodelle konnten wir also untersuchen, wie unsere CpG-Therapie auf MDSC sowohl in einem subkutanen als auch in einem orthotopen Tumormodell wirken würde

und ermöglichte uns zudem eine Berücksichtigung der Einflüsse des *tumormicroenvironment* auf MDSC im orthotopen Modell.

## 5.2 MDSC unter TLR-Therapie

### 5.2.1 Abhängigkeit zwischen Expansion und Aktivität von MDSC

MDSC akkumulieren unter pathologischen Bedingungen im Blut, lymphoiden Organen, Knochenmark und bei Tumorerkrankungen auch im Tumorgewebe selbst. Ob die Akkumulation und Aktivierung von MDSC von einem einzigen Signal abhängt oder durch mehrere Faktoren ausgelöst wird, ist noch nicht geklärt. Im Moment wird allerdings das „*two-signal-model*“ bevorzugt, wonach es zunächst zur Expansion und erst durch einen weiteren Stimulus zur Aktivierung der MDSC kommt (Condamine and Gabrilovich, 2011).

Studien haben gezeigt, dass die chronische Aktivierung von TLR2, 3, 4 und 9 mit in Mikrovesikeln verpackten Liganden ebenfalls zu einer Expansion von MDSC in gesunden Mäusen und dadurch vermittelter Immunsuppression in Form von CD3- $\zeta$ -Ketten-Herabregulation kommt. Gleichzeitig wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch der Stimulus zur Aktivierung der MDSC von TLR-Liganden stammen könnte (Vaknin et al., 2008). Dies wurde bisher allerdings nur für den TLR4-Liganden LPS in der Kombination mit IFN- $\gamma$  (Greifenberg et al., 2009), sowie für den körpereigenen TLR2-Liganden *heat shock protein 72 (Hsp72)* über Aktivierung von STAT3-Kaskaden gezeigt (Chalmin et al., 2010), nicht allerdings für endosomale TLR wie TLR7, 8 oder 9.

Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen, nämlich dass TLR-Liganden die Zahl immunsupprimierender MDSC in gesunden Tieren steigen lässt, steht die widersprüchliche Beobachtung, dass TLR-Liganden durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems eine gute antitumorale Wirkung zeigen können. Für TLR9-Agonisten konnte dies in vielen präklinischen und klinischen Studien sowohl in der Monotherapie als auch in Kombinationstherapie mit Tumorstoffen, Antikörpern und anderen Immuntherapien, antiangiogenetischen Substanzen, Strahlentherapie, Kryotherapie und einigen Chemotherapien am Patienten bestätigt werden (Krieg, 2008).

Die antitumorale Wirkung von TLR9-Agonisten konnte auch für CpG im C26-Tumormodell nachgewiesen werden (Heckelsmiller et al., 2002). Wir stellten aus diesen Beobachtungen unter Berücksichtigung des *“two-signal-models“* zu Expansion und Aktivierung von MDSC die Hypothese auf, dass CpG nicht nur einen Einfluss auf die Zahl der MDSC haben könnte, sondern auch auf die Aktivität der MDSC. Im Gegensatz zu Vaknin et al., die gesunde Mäuse unter chronischer CpG-Therapie untersuchten und eine Expansion von MDSC beobachteten, führten wir unsere Versuche in zwei unterschiedlichen Tumormodellen durch und untersuchten die Auswirkungen von relativ kurzer CpG-Gabe auf die Anzahl und die suppressive Aktivität von MDSC.

### **5.2.2 Verlust der suppressiven Aktivität der MDSC unter CpG-Therapie *in vivo***

Unsere Versuche bzgl. der Suppressivität von MDSC zeigten, dass bei C26-tumortragenden Mäusen sowie im CEA424-TAg-Tumormodell eine dreimalige Injektion von CpG zu keinem weiteren Anstieg der durch die Tumoren ohnehin schon sehr hohen Zahl von MDSC und dementsprechend zu keiner zusätzlichen Immunsuppression durch erhöhte MDSC-Zahlen führte. Ganz im Gegenteil konnten wir in unseren Suppressions-Assays zeigen, dass MDSC von mit CpG therapierten Mäusen eine signifikant geringere suppressive Aktivität gegenüber Splenozyten aufweisen als MDSC von untherapierten Mäusen. Diese Ergebnisse konnten im IL-2-ELISA bestätigt werden, in dem Splenozyten, die mit MDSC von CpG-therapierten Mäusen koinkubiert wurden, mehr IL-2 produzierten als die Kontrollen. Dies spricht für eine höhere Proliferationsrate unter den T-Zellen innerhalb der Splenozyten und dementsprechend für eine geringere suppressive Aktivität von MDSC.

In unseren *in vitro*-Experimenten, in denen MDSC von tumortragenden Mäusen mit CpG inkubiert wurden und danach auf ihre hemmende Aktivität untersucht wurden, konnten wir keine verminderte Suppressivität feststellen. Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass MDSC im Gegensatz zu DC nur in sehr geringem Maße TLR9 ausbilden und dementsprechend nicht auf einen direkten TLR-Liganden reagieren können (Zoglmeier et al., 2011) Wir stellten daraufhin die Hypothese auf, dass die beobachteten Effekte auf MDSC indirekt durch eine andere Zellpopulation hervorgerufen werden müssen, die schließlich als pDC und von ihnen produziertes IFN- $\alpha$  entschlüsselt wurde (siehe 5.2.4).

Wir konnten also zeigen, dass MDSC nach CpG-Therapie *in vivo* eine reduzierte suppressive Aktivität aufweisen. Es muss allerdings noch berücksichtigt werden, dass die CpG-Therapie nach unserem Schema im C26-Modell eine starke Reduktion der Tumormasse zur Folge hat. Unsere Beobachtung hätte also auch darauf zurückzuführen sein können, dass durch die Verringerung der Tumormasse weniger Tumorfaktoren gebildet werden, sodass es nicht zu einer tumorinduzierten Aktivierung der MDSC kommt (Serafini et al., 2006). In unserem autochthonen gastrischen Tumormodell konnte bereits im Vorfeld nachgewiesen werden, dass sich die Tumormasse unter CpG-Therapie nicht vermindert und dennoch beobachteten wir ähnliche Effekte auf MDSC wie im subkutanen C26-Modell, wenn auch weniger stark ausgeprägt. Dies könnte auf die Einflüsse des natürlichen *tumor microenvironments* im orthotopen Modell zurückzuführen sein. Die Unabhängigkeit unserer Ergebnisse von der Tumorgröße bestätigte sich auch unter IFN- $\alpha$ -Therapie, unter der ebenfalls keine Änderung in der Tumorgröße und dennoch signifikante Veränderungen hinsichtlich Funktion und Phänotyp von MDSC zu erkennen waren.

Vor kurzem zeigten Shirota et al. ähnlich unserer eigenen Studien, dass MDSC durch CpG-Stimulation einen reiferen Phänotyp erlangen und an Suppressivität einbüßen (Shirota et al., 2012), sodass eine weitere Arbeit unsere Ergebnisse unterstützt. Im Gegensatz zu unseren eigenen Studien (Zoglmeier et al., 2011) wird hier allerdings berichtet, dass monozytäre MDSC (MO-MDSC) unter CpG-Therapie direkt, ohne die Mitwirkung anderer Zellen, zu einem reiferen Phänotyp ausdifferenzieren können. Zudem wird berichtet, dass MO-MDSC verschiedene TLR, darunter TLR 2, 3, 4, 7, 8 und 9 exprimieren, was den direkten CpG-Effekt erklären kann. PMN-MDSC dagegen exprimierten in dieser Studie nur in geringem Maße TLR9, was unsere Arbeitsgruppe für die Gesamtpopulation der Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> MDSC ebenfalls nachgewiesen hatte. Shirota et al. verwendeten wie wir das C26-Kolonkarzinommodell, im Gegensatz zu unseren manuell aufgereinigten MDSC standen ihnen jedoch FACS-gesortete Subpopulation zur Verfügung.

Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuche konzentrieren sich auf die Gesamtpopulation der Gr1<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> MDSC und nicht immer wurde differenziert, in welchem Verhältnis die Subpopulationen darin vertreten waren. Möglich ist daher, dass in unseren Versuchsanordnungen mit Gesamt-MDSC vorwiegend PMN-MDSC vorhanden waren, die nur eine geringe TLR9-Expression aufweisen und daher nicht direkt über CpG aktiviert werden können. Shirota et al. konnten die Ausdifferenzierung der MDSC allerdings nur für MO-MDSC nachweisen, nicht wie unsere Arbeitsgruppe

hauptsächlich für PMN-MDSC. Die Diskrepanz hinsichtlich dieser Befunde zeigt, wie schwierig es noch immer ist, die genaue biologische Wirkungsweise der einzelnen MDSC-Subpopulationen genau zu erfassen und macht weitere Studien bzgl. deren Aktion und Interaktion notwendig.

### 5.2.3 Maturierung von MDSC

Eine der Hauptgemeinsamkeiten aller unter dem Oberbegriff MDSC zusammengefassten myeloiden Zellen ist neben ihren suppressiven Eigenschaften ihr unreifer, nicht differenzierter Status. Eine Ausdifferenzierung von MDSC wurde als eine von mehreren Möglichkeiten zur Aufhebung der Immunsuppression durch MDSC, die in 5.3 noch ausführlich beleuchtet werden, postuliert (Gabilovich and Nagaraj, 2009; Umansky and Sevko, 2013). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Wirksamkeit von *all-trans-retinoic-acid* (ATRA), deren chemische Struktur sich vom Vitamin A ableitet, als Adjuvans in der Therapie von Tumoren unter anderem darauf beruht, dass MDSC zu reifen DC, Makrophagen und Granulozyten ausdifferenzieren (Kusmartsev et al., 2003; Mirza et al., 2006).

In unseren beiden Tumormodellen analysierten wir durchflusszytometrisch, ob sich die Expression von Maturierungs- und Aktivitätsmarkern auf MDSC unter CpG-Therapie veränderte. Wir untersuchten MDSC auf die Ausprägung von Markern, die normalerweise von reifen DC exprimiert werden wie CD11c und MHC II, den Makrophagen-Differenzierungsmarker F4/80, die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie Sca1 (Ly6A/E), einen Marker aus der Linie der Ly6-Antigene, der bisher als Marker von hämatopoetischen Vorläuferzellen sowie für T-Zellaktivierung gebraucht wurde und einen sehr sensitiven Marker für IFN- $\alpha$  Exposition darstellt (Broomfield et al., 2009; Dumont and Coker, 1986). Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass die meisten dieser Aktivierungs- und Maturierungsmarker sowohl in der Milz, als auch in Knochenmark und Tumorgewebe nach CpG- bzw. IFN- $\alpha$ -Therapie signifikant hochreguliert wurden.

Im *tumor microenvironment* sind tumorassoziierte Makrophagen (TAM) eine wichtige Zellpopulation, die immunsupprimierend wirkt (Sica and Mantovani, 2012). Es wurde vermutet, dass MDSC im *tumor microenvironment* zu TAM differenzieren können. Tumorferne Makrophagen wie splenische oder peritoneale Makrophagen wirken im Gegensatz zu TAM allerdings nicht immunsupprimierend (Kusmartsev and Gabilovich,

2005; Rodriguez et al., 2013). Unsere MDSC exprimieren ebenfalls F4/80, vor allem in MDSC der Milz wird dieser Marker nach CpG- und IFN- $\alpha$ -Therapie stark hochreguliert. Im Tumor findet sich allerdings keine signifikante Hochregulation dieses Markers, was darauf schließen lässt, dass sich MDSC hier nicht zu immunsupprimierenden TAM differenzieren.

Die extreme Hochregulation des Markers Sca1 muss differenziert beleuchtet werden. Einerseits korreliert er sehr stark mit der von uns beobachteten Ausdifferenzierung der MDSC, die daraufhin einen maturierten und weniger suppressiven Phänotyp aufweisen. Auf unbehandelten und stark suppressiven MDSC ist er hingegen kaum vorhanden (eigene Daten sowie (Movahedi et al., 2008)). Dennoch ist dieser Marker bisher vorwiegend dafür bekannt, auf unreifen, hämatopoetischen Vorläuferzellen und Stammzellen exprimiert zu sein (Spangrude et al., 1988). Diese Zellen haben ein enormes Potential, in Makrophagen, Granulozyten und reife DC auszdifferenzieren. Die erneute Ausprägung von Sca1 könnte dementsprechend die Voraussetzung für MDSC sein, ihren Maturierungs-Block zu überwinden und in reife, nicht länger suppressive Zellen auszdifferenzieren.

Sowohl im C26-Modell als auch im CEA424-TAg-Modell konnten wir insgesamt eine ausgeprägte Hochregulation der Aktivierungs- und Maturierungsmarker bei unseren Therapieversuchen feststellen, wobei die Unterschiede insbesondere für F4/80 und Sca1 z.T. hochsignifikant ausfielen. Wir zeigen damit zum ersten Mal, dass CpG und IFN- $\alpha$  zu einer starken Ausdifferenzierung von MDSC führt, die die verminderten suppressiven Eigenschaften der MDSC nach CpG- sowie IFN- $\alpha$ -Therapie erklären kann. Zudem entdeckten wir den bisher in der MDSC-Forschung kaum beachtetem Marker Sca1 als einen sehr sensitiven Marker für die Differenzierung und den Aktivitätsstatus von MDSC.

#### **5.2.4 Die zentrale Bedeutung von plasmazytoiden dendritischen Zellen und IFN- $\alpha$**

IFN- $\alpha$  übt multiple Effekte sowohl auf das angeborene als auch das erworbene Immunsystem aus, die fast alle Zelltypen und Zellfunktionen betreffen. Ein Haupteffekt ist die Aktivierung von DC, die mit einer Hochregulation von MHC-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 und Zytokinrezeptoren verbunden ist (Swiecki and Colonna, 2010). Zudem wird die Makrophagenentwicklung und -

aktivierung gesteigert (Baccala et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass IFN- $\alpha$  ein wichtiges Signal für die Differenzierung und Aktivierung von DC darstellt; so können beispielsweise humane Monozyten, die mit IFN- $\alpha$  behandelt wurden, in hoch aktive DC ausdifferenziert werden (Santini et al., 2000).

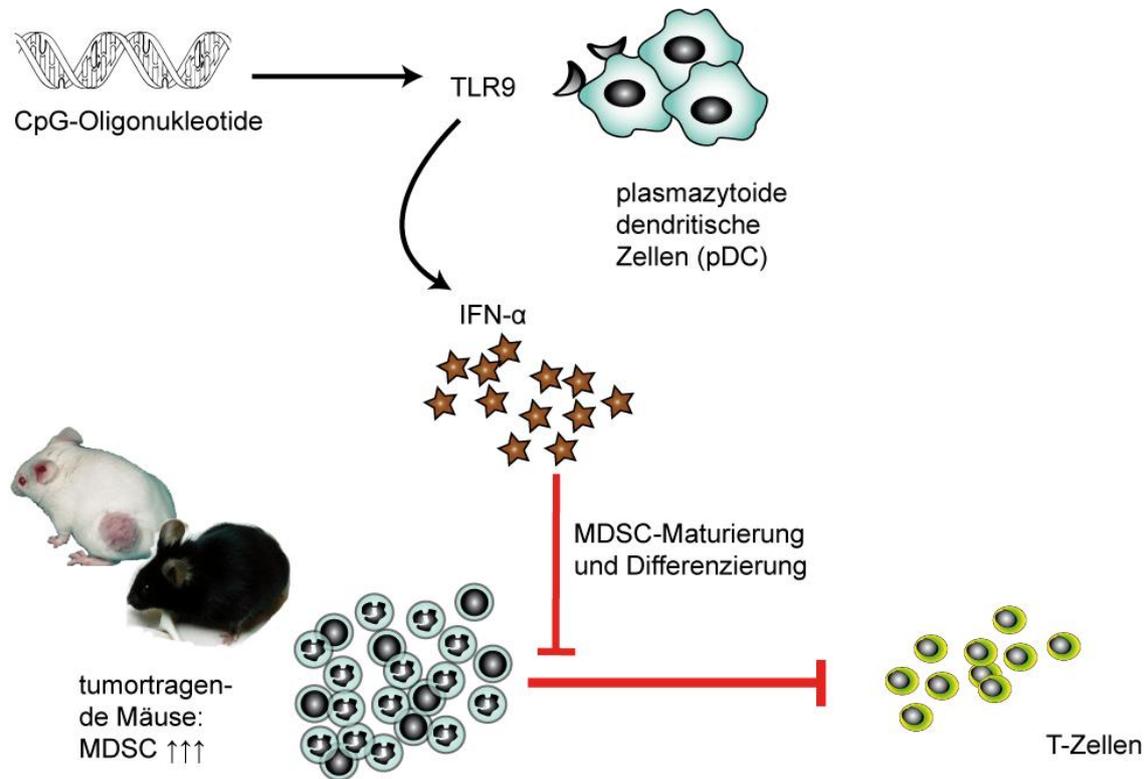
Vor allem pDC exprimieren TLR wie die endosomalen Rezeptoren TLR7 und TLR9 (Gilliet et al., 2008). Werden diese TLR z.B. bei Infektionen aktiviert, so werden große Mengen IFN- $\alpha$  freigesetzt, bis zu 200 bis 1000 Mal mehr als durch andere Zellen des Blutes, wodurch das gesamte Immunsystem durch verschiedene, einleitend besprochene Mechanismen aktiviert wird (siehe 2.4 sowie (Ferrantini et al., 2007; Ito et al., 2005)). Speziell für TLR7-Liganden wurde vor kurzem die wichtige Rolle von IFN- $\alpha$  für die Wirksamkeit dieser Adjuvantien in der Tumormimmuntherapie beschrieben und die Hypothese aufgestellt, dass IFN- $\alpha$  mit seinen vielfältigen Wirkungen einen unabdingbaren Faktor für effektive Immuntherapien darstellt (Rajagopal et al., 2010).

Nachdem unsere *in vitro*-CpG-Therapie keinen Effekt auf MDSC gezeigt hatte, vermuteten wir, dass eine andere Zellpopulation für die Effekte, die wir mit CpG *in vivo* beobachten konnten, verantwortlich waren und MDSC indirekt in ihrer Suppression gehemmt wurden. Unsere Überstandsversuche bestätigten, dass MDSC vermehrt Aktivierungs- und Maturierungsmarker exprimierten, wenn sie mit Überständen von mit CpG aktivierten pDC inkubiert worden waren. Unsere Vermutung, dass von pDC nach CpG-Therapie produziertes IFN- $\alpha$  diesen Effekt verursacht, konnte durch direkte IFN- $\alpha$  Applikation *in vitro* sowie Inhibition anderer Zytokine und mittels neutralisierender Antikörper gegen IFN- $\alpha$  bestätigt werden.

Schließlich konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass allein eine *in vivo*-Therapie mit IFN- $\alpha$  ausreicht, um MDSC ausdifferenzieren zu lassen und sie in einen reiferen Phänotyp übergehen zu lassen, sodass ihre Fähigkeit zur Immunsuppression stark beeinträchtigt wurde. In **Abbildung 23** ist der Zusammenhang zwischen von pDC produziertem IFN- $\alpha$  und der Maturierung von MDSC und ihrer dadurch verminderten Suppressivität schematisch dargestellt.

Es gilt zu erwähnen, dass in unseren Versuchen mit CpG-Therapie CpG1826 der Klasse B verwendet wurde, von dem bekannt ist, dass es hauptsächlich in B-Zellen und in geringerem Maße in pDC zur Ausschüttung von IFN- $\alpha$  führt. Andere CpG-Arten, z.B. der Klasse A, induzieren eine viel höhere IFN- $\alpha$ -Antwort auf TLR9-Stimulation in

humanen pDC, wodurch vielleicht noch bessere Effekte auf MDSC erzielt werden könnten (Krieg, 2006).



**Abbildung 23: Schematische Zusammenfassung der Befunde**

CpG blockt die Suppressivität von akkumulierten MDSC in tumortragenden Mäusen. Dies wird ausgelöst durch IFN- $\alpha$ , das von pDC nach TLR9-Aktivierung gebildet wird und die Maturierung und Differenzierung von MDSC zur Folge hat. Dies führt zu einer verminderten Suppression von T-Zellaktivität.

### 5.2.5 MDSC-Hemmmechanismen nach CpG- und IFN- $\alpha$ -Therapie

MDSC unterdrücken T-Zellantworten durch unterschiedliche Mechanismen, darunter die Depletion von für T-Zellen essentielle Aminosäuren wie Arginin und Cystein, ROS-Bildung durch das Enzym NOS sowie Induktion von regulatorischen T-Zellen. Alle diese Mechanismen führen zur Immunsuppression durch MDSC, wobei innerhalb der

Subpopulationen die verschiedenen Mechanismen mehr oder weniger stark ausgeprägt sind (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

Die Gesamtsuppressivität von Gr1<sup>+</sup>/DC11b<sup>+</sup> MDSC nach CpG- sowie IFN- $\alpha$ -Therapie wurde von uns in Suppressions-Assays mit Splenozyten als Zielzellen gemessen. In dieser Arbeit konnte neben dem Effekt von CpG und IFN- $\alpha$  auf die Gesamtsuppressivität der MDSC auch der Effekt von IFN- $\alpha$  auf die Aktivität von Arginase-1, einem der Hauptsuppressionsmechanismen von MDSC gezeigt werden. Wir konnten mit unseren Versuchen zunächst bestätigen, dass MDSC von C26-tumortragenden Mäusen signifikant mehr Arginaseaktivität zeigen als die gleiche Zahl normaler Splenozyten. Zusätzlich konnten wir Hinweise darauf finden, dass die Arginaseaktivität in MDSC von mit IFN- $\alpha$  behandelten tumortragenden Tieren sinkt, was mit der Maturierung der Zellen sowie einer verminderten Gesamtsuppressivität einhergeht. Diese Ergebnisse sind nicht signifikant, zeigen aber einen eindeutigen Trend und passen sehr gut zu den Befunden, die wir hinsichtlich Maturierung und Gesamtsuppressivität der MDSC erheben konnten.

Da MDSC durch so viele und unterschiedliche Mechanismen T-Zellproliferation unterdrücken können, ist ein nicht signifikantes Ergebnis für einen Hemmmechanismus allein durchaus verständlich. Auch die ROS-Produktion von MDSC nach CpG-Therapie wurde in unserer Arbeitsgruppe untersucht (Daten nicht gezeigt), auch hier fanden sich Hinweise darauf, dass die ROS-Produktion durch unsere Therapien eingeschränkt wurde. Insgesamt betrachtet, beruht unsere Beobachtung des Verlustes der Gesamtsuppressivität der MDSC nach CpG- und IFN- $\alpha$ -Therapie also auf Beeinträchtigung mehrerer Hemmmechanismen der MDSC, ausgelöst durch die Maturierung und Differenzierung der MDSC.

### **5.3 MDSC als therapeutisches Ziel in der Tumorimmuntherapie**

Es gibt viele verschiedene Ansätze, wie man MDSC als therapeutisches Ziel in der Tumorimmuntherapie nutzen könnte. Vorgeschlagen wurde beispielsweise, MDSC an ihrer Expansion, die u.a. von Faktoren gefördert wird, die vom Tumor gebildet werden, zu hindern. MDSC direkt in ihrer Funktion zu hemmen ist ein weiterer therapeutischer Ansatz, ebenso wie die totale Elimination dieser suppressiven Zellen. Einer der am meisten versprechenden Ansätze ist, MDSC vom unreifen in den reifen Zustand

übergehen zu lassen, damit sie dadurch ihre suppressiven Eigenschaften verlieren (Gabrilovich et al., 2012; Waldron et al., 2013). Einige der bisher erprobten Strategien und ihre Wirkmechanismen sind in **Tabelle 3** dargestellt, wobei nur ausgewählte Substanzen im Folgenden besprochen werden sollen.

Eines der Hauptprobleme in der Tumorummuntherapie ist die kurzandauernde Wirkung der Therapie bei soliden Tumoren. Schon kurz nach dem Ende der Therapie kommt es zu Rezidiven, was mit einer Supprimierung des Immunsystems und der Verhinderung einer tumorspezifischen Immunantwort in Verbindung steht. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass durch die Ausdifferenzierung von MDSC in reife DC, Makrophagen und Granulozyten durch die Gabe von ATRA als Adjuvans in der Immuntherapie die rezidivfreie Zeit deutlich verlängert werden konnte (Kusmartsev et al., 2003). Im Gegensatz zu ATRA vermittelt Vitamin D3 seine Wirkung auf MDSC auf indirektem Wege, nämlich durch Reduktion der vom Tumor produzierten Tumorfaktoren (Young et al., 1996).

Eine Reduktion der Anzahl von MDSC kann durch die zytostatischen Substanzen 5-Fluorouracil, Gemcitabin oder auch durch das natürlich vorkommende, antitumoral wirksame Curcumin erreicht werden. Vor kurzem wurde der Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Nlrp3-Inflammasoms und IL-1 $\beta$ -Produktion unter Therapie mit 5-Fluorouracil und Gemcitabin entdeckt, die zur vermehrten Angiogenese des Tumors führt. Eine Kombinationstherapie aus Inhibitoren des Nlrp3-Inflammasoms und IL-1 $\beta$  und 5-Fluorouracil wird hier zur Optimierung der Therapie vorgeschlagen (Bruchard et al., 2013).

Eine Änderung in der Funktionsweise der MDSC wird beispielsweise durch PDE5-Inhibitoren erreicht. Ihre Gabe verringert die Expression von Arginase-1 und NOS und die Herabregulation des Rezeptors IL-4Ra führt zu einer verminderten Induktion von regulatorischen T-Zellen (Serafini et al., 2008). Aktuell wird gerade eine Phase II Studie bei Patienten mit Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich durchgeführt, in der die Wirkung einer zusätzlichen Gabe des PDE5-Inhibitors Tadalafil auf MDSC und regulatorische T-Zellen unter konventioneller Therapie untersucht wird ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), ID NCT01697800). Ziel ist es, die Immunsuppression durch MDSC und regulatorische T-Zellen dadurch aufzuheben.

Diese neuen Therapieansätze und ihre Erfolge zeigen die enorme Bedeutung von MDSC und generell der gesamten Mechanismen des *tumor-escapes*, die ein ständiges

Hindernis für effiziente Tumorimmuntherapien darstellen. Durch die auch von uns durch CpG- sowie IFN- $\alpha$ -Therapie erreichte Ausdifferenzierung der MDSC und der dadurch zumindest zum Teil wiederhergestellten *immunosurveillance* im Körper könnte ein essentieller Beitrag geleistet werden, damit Immuntherapien gegen Tumoren ihr Ziel erreichen können.

<b>Therapeutische Substanz</b>	<b>Wirkmechanismus</b>	<b>Referenz</b>
	<b>Differenzierung/ Maturierung</b>	
ATRA	Ausdifferenzierung von MDSC durch Neutralisation von ROS	(Mirza et al., 2006; Nefedova et al., 2007)
Vitamin D3	Erhöht die MHC II-Expression und reduziert CD34+ Zellen	(Lathers et al., 2004; Wiers et al., 2000)
STAT3-Inhibitoren	Inhibition verschiedener Signalwege, darunter Inhibition antiapoptotischer, proliferativer, angiogenetischer Gene und ROS-Produktion	(Nefedova et al., 2005)
Nukleosidanaloga: 5-Aza-2'-deoxycytidin	Differenzierung in reife F4/80/CD11c/MHC II-positive APC	(Daurkin et al., 2010)
Aminobisphosphonate	Reduktion von CD11b <sup>+</sup> /Gr1 <sup>+</sup> /F4/80 <sup>+</sup> Zellen im Tumorstroma	(Melani et al., 2007)
TK-Inhibitoren, z.B. Sunitinib	Inhibition verschiedener Signalwege, Reduktion von T <sub>reg</sub> -Induktion, Vermehrte T <sub>h</sub> 1-Antwort, Mögliche STAT3-Inhibition	(Ko et al., 2009; Xin et al., 2009)

	<b>Akkumulation</b>	
5-Fluorourazil	Reduktion der Anzahl Gr1 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup> Zellen	(Vincent et al., 2010)
Gemcitabin	Reduktion der Anzahl Gr1 <sup>+</sup> /CD11b <sup>+</sup> Zellen	(Suzuki et al., 2005)

Docetaxel	Apoptose von MDSC,	(Kodumudi et al., 2010)
Doxorubicin	Apoptose von MDSC	(Diaz-Montero et al., 2009)
Curcumin	Inhibiert Expansion, induziert Apoptose und Differenzierung	(Tu et al., 2012)

	<b>Funktion</b>	
PDE5-Inhibitoren	Inhibition von Arginase-1 und NOS; IL-4Ra-Herabregulation führt zu geringerer T <sub>reg</sub> -Induktion	(Serafini et al., 2008)
COX2-Inhibitoren	Blockierung von Arginase-1 und NOS-Expression	(Rodriguez et al., 2005; Sinha et al., 2007)
Synthetische Triterpenoide	ROS-Blockade	(Nagaraj et al., 2010)
NO-freisetzendes Aspirin (Nitroaspirin)	Inhibition von Arginase-1 und NOS	(De Santo et al., 2005)

**Tabelle 3: Möglichkeiten zur Ausschaltung MDSC-induzierter Immunsuppression**

Gezeigt werden tabellarisch sowohl die therapeutischen Substanzen als auch deren Wirkung auf MDSC. Zusätzlich sind die Referenzen der einzelnen zugehörigen Studien angegeben. Nach (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Greten et al., 2011; Ugel et al., 2009; Waldron et al., 2013)

#### 5.4 MDSC als therapeutisches Ziel in der gesamten Medizin

MDSC wurden in den Anfängen zu ihrer Erforschung vorwiegend in murinen Tumormodellen und in Patienten mit Krebs nachgewiesen und erforscht. Bis heute, auch in der vorliegenden Arbeit, liegt ein Hauptforschungsinteresse bzgl. MDSC im Gebiet der Krebsforschung. MDSC akkumulieren aber unter diversen pathologischen Bedingungen, nicht nur bei Tumorerkrankungen, sondern auch unter traumatischen Bedingungen, Transplantationen, parasitären Infektionen und Sepsis. Auch bei chronischem Alkoholkonsum, einer weiteren pathologischen Bedingung, konnte in Mäusen eine Akkumulation von MDSC festgestellt werden (Zhang and Meadows,

2010), was die erhöhte Anfälligkeit von Alkoholkranken für Tumorerkrankungen sowie erhöhte Metastasierungs- und geringeren Überlebensraten durch eine generelle Immunsuppression durch MDSC erklären könnte. Ebenso scheint allein psychologischer Stress auszureichen, um die Zahl von MDSC bei Patientinnen mit Mammakarzinom ansteigen zu lassen und das Immunsystem zu supprimieren (Mundy-Bosse et al., 2011).

In den letzten Jahren wurde die MDSC-Forschung auch auf dem Gebiet der parasitären Infektionen verstärkt (Van Ginderachter et al., 2010), ebenso wie auf dem Gebiet der Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise der Multiplen Sklerose oder Autoimmunhepatitiden (Cripps and Gorham, 2011; Ioannou et al., 2012). Auf diesen Gebieten ist noch nicht eindeutig geklärt, welche Rolle MDSC hier in der Pathogenese der Erkrankungen spielt und wie genau sie therapeutisch genutzt werden können. Bei Autoimmunerkrankungen beispielsweise können aus dem erkrankten Gewebe MDSC isoliert werden, die *in vitro* effektiv T-Zellantworten hemmen können. *In vivo* allerdings zeigen sich die endogenen MDSC nicht effektiv, können bisweilen gar zur Exazerbation der Erkrankung führen (King et al., 2009). Im Gegensatz dazu haben exogen durch adoptiven Transfer zugeführte MDSC aber bereits zu therapeutischen Erfolgen in einigen Mausmodellen geführt. Weitere Forschung ist hier dringend nötig, um das therapeutische Potential von MDSC auch in diesen Erkrankungen nutzen zu können.

Auch IFN- $\alpha$ , das wir als einen wichtigen Faktor in der Ausdifferenzierung und damit Funktionsminderung der MDSC identifiziert haben, spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung von autoimmunologischen Vorgängen. Es ist bekannt, dass IFN- $\alpha$  zur Bildung von Autoantikörpern und Autoimmunkrankheiten wie Hypothyreose, systemischen Lupus erythematoses, systemischer Sklerose, rheumatoider Arthritis, Dermato- und Polymyositis und zum Sjögren Syndrom führen kann (Sozzani et al., 2010). Diese autoimmunologischen Phänomene, bei denen sich der Körper gegen körpereigene Zellen wendet, können zugleich mit einem verbesserten Outcome bei Krebspatienten und insbesondere bei Melanompatienten, bei denen IFN- $\alpha$  als adjuvante Therapie eine besonders gute Wirkung entfaltet, in Verbindung gebracht werden (Gogas et al., 2006).

Die durch IFN- $\alpha$  ausgelösten Autoimmunantworten können durch die starke Aktivierung des Immunsystems durch IFN- $\alpha$ -induzierte DC- und T-Zellaktivierung erklärt werden. Unsere Studien liefern Hinweise darauf, dass nicht nur die direkte Aktivierung des

Immunsystems durch IFN- $\alpha$ , sondern auch die Ausschaltung von immunsupprimierenden Faktoren wie MDSC zur Bildung von Autoimmunphänomenen beitragen könnte. Weitere Studien in diesem Feld sind allerdings nötig und sollten Aufschluss über den Zusammenhang zwischen IFN- $\alpha$ , Autoimmunerkrankungen und MDSC geben.

Das vermehrte Auftreten von MDSC und ihre negativen Auswirkungen auf das Immunsystem bei den verschiedensten Krankheitsbildern zeigt die große Bedeutung dieser immer noch nicht hinreichend beschriebenen und erforschten Zellpopulation. In unserer Studie wurden bisher nur MDSC von Mäusen untersucht und wie sie sich nach TLR9-Stimulation sowie auf IFN- $\alpha$ -Gabe verhalten. Unsere positiven Ergebnisse hinsichtlich der Verminderung der Suppressivität durch Maturierung der MDSC in murinen Tumormodellen liefern weitere Hinweise dafür, dass MDSC eine entscheidende Rolle in der Tumorentstehung und -progression spielen und ein wichtiges therapeutisches Ziel in der Tumorummuntherapie darstellen. Die Forschung der nächsten Jahre, in denen die Studien der Mausmodelle auf den Menschen übertragen werden, sollten Aufschluss darüber geben, wie man MDSC im Menschen in der Tumorthherapie und der Therapie vieler anderer pathologischer Zustände optimal nutzbar machen kann.



## 6 Abkürzungsverzeichnis und Glossar

AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
Annexin V	Ein Marker für frühapoptotische Zellen
anti-BrdU-POD	Antikörper, der an BrdU bindet und gleichzeitig mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist
APC	Allophycocyanin (ein FACS-Farbstoff) bzw. Antigenpräsentierende Zelle
APC-Cy7	FACS-Konjugatfarbstoff aus Allophycocyanin und Cyanin 7
ATRA	<i>All-trans-retinoic-acid</i> , chemisch verwandt mit Vitamin A
Balb/c	Eine viel verwendete Mauslinie mit weißen, genetisch identischen Tieren
Br	Brom
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzgl.	Bezüglich
C26	Kolonkarzinomzelllinie mit Balb/c Hintergrund
C57BL/6	„C57 Black 6“, ebenfalls ein weit verbreiteter Mausstamm mit schwarzen, genetisch identischen Tieren
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD11b	Ein Marker für MDSC
CD11c	Ein Marker für DC und myeloide Zellen
CD14	Monozyten- und Makrophagenmarker; dient zur Einteilung humaner MDSC
CD19	Ein Marker für B-Zellen
CD28	Rezeptor auf T-Zellen für CD80 und CD86, wichtig zur Aktivierung von Lymphozyten
CD3	Ein Marker für T-Zellen
CD3/CD28 -Mikropartikel	Synthetisch hergestellte Partikel, die eine Stimulation von T-Zellen durch DC simulieren und zu T-Zellproliferation führen
CD33	Ein Rezeptor auf Zellen der myeloiden Linie, ein Marker für humane MDSC
CD34	Ein Zelladhäsionsmolekül; zudem Marker für eine immunsuppressive Zellpopulation des Knochenmarks

CD3-ζ-Kette	CD3-zeta-Kette, zur vollständigen Synthese des CD3-T-Zell-Rezeptors und damit zur Funktionsfähigkeit von T-Zellen wichtig
CD4	Ein Marker für T-Zellen und DC
CD45R/B220	Ein Marker für B-Zellen
CD5	Ein Marker für B- und T-Zellen
CD62L	L-Selektin, ein Zelladhäsionsmolekül
CD69	Ein sensitiver Aktivierungsmarker für Lymphozyten, z.B. nach IFN-α -Stimulation auf B-Zellen nachweisbar
CD80	Aktivierungsmarker; kostimulatorisches Molekül, das zur Aktivierung von T-Zellen benötigt wird
CD86	Aktivierungsmarker; kostimulatorisches Molekül, das zur Aktivierung von T-Zellen benötigt wird
CEA424-TAg	<i>Carcinoembryonic antigen 424 T-Antigen</i> , ein murines, orthotopes Magenkarzinommodell
COX2	Cyclooxygenase 2, Enzym des Arachidonsäurestoffwechsels
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CpG-ODN	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Oligonukleotid
d.h.	Das heißt
DC	Dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid, organisches Lösungsmittel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	<i>Double-stranded</i> (Doppelstrang)-DNA
dsRNA	<i>Double-stranded</i> (Doppelstrang)-RNA
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
F4/80	Ein Marker für die Maturierung von Makrophagen
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat (ein FACS-Farbstoff)
Flt3-Ligand	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i> -Ligand (unabdingbarer Ligand zur pDC-Entwicklung (Shortman and Naik, 2007))
FSC	<i>Forward scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
Gr1	Granulozyten-Antigen 1, ein MDSC-Marker
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethanschwefelsäure, eine Puffersubstanz
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
Hsp72	<i>Heat shock protein 72</i>
HSV	Herpes-simplex Virus
i.e.	<i>Id est</i> , das heißt
IFN-α	Interferon-alpha
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IL-10	Antiinflammatorisches Zytokin, das durch Hemmung der CD28-Signalübertragung die Produktion proinflammatorischer Zytokine hemmt
IL-12	Ein proinflammatorisches Zytokin
IL-1β	Interleukin-1 beta, ein proinflammatorisches Zytokin
IL-2	proinflammatorisches Zytokin, das zu Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten führt
IL-4Ra	Interleukin-4-Rezeptor-alpha
IL-6	Proinflammatorisches Zytokin, das Lymphozyten stimuliert
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IPC	<i>Type I interferon-producing cells</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factors</i>
ISG	<i>Interferon-stimulated genes</i>
IU	<i>International units</i>
JAK	<i>Janus activated Kinase</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6A/E	Siehe Sca1
Ly6C	Ein Epitop von Gr1, vorwiegend von MO-MDSC exprimiert
Ly6G	Ein Epitop von Gr1, vorwiegend von PMN-MDSC exprimiert
Mac-1	<i>Macrophage-antigen 1</i> , Synonym für CD11b
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAP-Kinase	<i>Mitogen-activated protein-Kinase</i>
Mcl-1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MCMV	Murines Zytomegalie-Virus
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i> (Suppressorzellen myeloiden Ursprungs)
MEM-NEAA	<i>Minimum essential medium with non-essential amino acids</i>

MFI	<i>Median fluorescence intensity</i>
MHC I	<i>Major histocompatibility complex, class I</i> , ein Molekül auf nahezu allen kernhaltigen Zellen
MHC II	<i>Major histocompatibility complex, class II</i> , ein Molekül antigenpräsentierender Zellen
min	Minute(n)
MO-MDSC	Monozytäre MDSC
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nlrp3-Inflammasom	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing-3 protein (Nlrp3)</i> Komplex, der Caspase-1 aktivieren und damit IL-1β-Produktion induziert
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
NU	<i>Neutralizing units</i>
OD	Optische Dichte
p53	Ein Tumorsuppressorgen
PacBlue	<i>Pacific Blue</i> (ein FACS-Farbstoff)
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PDE5	Phosphodiesterase 5
PE	Phycoerythrin (ein FACS-Farbstoff)
PE-Cy7	FACS-Konjugatfarbstoff aus Phycoerythrin und Cyanin7
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (ein FACS-Farbstoff)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PMN-MDSC	Polymorphonukleäre (granulozytäre) MDSC
PRR	<i>Pathogen recognition receptor</i>
PTO	<i>Phosphorothioate</i>
RECIST	<i>Response evaluation criteria in solid tumors</i> , ein Schema zur Beurteilung der Effektivität von Krebsmedikamenten

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i>
s.c.	Subkutan
SC	Splenozyten
Sca1	<i>Stem cell-antigen 1</i> , gleichbedeutend mit Ly6A/E
sog.	Sogenannt
SSC	<i>Sideward scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
ssRNA	<i>Single-stranded</i> (Einzelstrang)-RNA
STAT(3)	<i>Signal transducers and activators of transcription (3)</i> ; wichtiger Transkriptionsfaktor hinsichtlich Zellwachstum und -proliferation. Konstante Expression wirkt proinflammatorisch und steht im Zusammenhang mit der Suppression antitumoraler Immunantworten (Yu et al., 2009)
TAM	<i>Tumor-associated macrophage</i>
Ter119	Ein Antikörper gegen erythroide Zellen
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
T <sub>h</sub> 1	T-Helferzelle Typ 1
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor-like domain</i>
TIRAP	<i>TIR-containing adaptor protein</i>
TK	Tyrosinkinase
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Klassifikation, die Tumoren durch Betrachtung der Art des Tumors (T), der Lymphknotenbeteiligung ( <i>nodes</i> : N) sowie der Metastasierung (M) in Stadien einteilt
TO-PRO-3	Ein Marker für spätapoptotische und nekrotische Zellen
T <sub>reg</sub> -Zellen	Regulatorische T-Zellen
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
Tris-HCL	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid (eine Pufferlösung)
TZM	T-Zell-Medium
U	<i>Units</i>
u. a.	Unter anderem
v. a.	Vor allem
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

vgl.	Vergleiche
VLE	<i>Very low endotoxin</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
WT-SC	Splenozyten von Wildtypmäusen
z. T.	Zum Teil

## 7 Literaturverzeichnis

### Literatur:

Agrawal, S., and Kandimalla, E.R. (2003). Modulation of Toll-like Receptor 9 Responses through Synthetic Immunostimulatory Motifs of DNA. *Ann N Y Acad Sci* 1002, 30-42.

Baccala, R., Kono, D.H., and Theofilopoulos, A.N. (2005). Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity. *Immunol Rev* 204, 9-26.

Benencia, F., Sprague, L., McGinty, J., Pate, M., and Muccioli, M. (2012). Dendritic cells the tumor microenvironment and the challenges for an effective antitumor vaccination. *J Biomed Biotechnol* 2012, 425476.

Bermel, R.A., and Rudick, R.A. (2007). Interferon-beta treatment for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 4, 633-646.

Bogdan, C. (2000). The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol* 12, 419-424.

Borden, E.C., Sen, G.C., Uze, G., Silverman, R.H., Ransohoff, R.M., Foster, G.R., and Stark, G.R. (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6, 975-990.

Bourquin, C., Schreiber, S., Beck, S., Hartmann, G., and Endres, S. (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, 2790-2795.

Brattain, M.G., Strobel-Stevens, J., Fine, D., Webb, M., and Sarrif, A.M. (1980). Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res* 40, 2142-2146.

Brody, J., Kohrt, H., Marabelle, A., and Levy, R. (2011). Active and passive immunotherapy for lymphoma: proving principles and improving results. *J Clin Oncol* 29, 1864-1875.

Brody, J.D., Ai, W.Z., Czerwinski, D.K., Torchia, J.A., Levy, M., Advani, R.H., Kim, Y.H., Hoppe, R.T., Knox, S.J., Shin, L.K., *et al.* (2010). In situ vaccination with a TLR9 agonist induces systemic lymphoma regression: a phase I/II study. *J Clin Oncol* 28, 4324-4332.

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

Broomfield, S.A., van der Most, R.G., Prosser, A.C., Mahendran, S., Tovey, M.G., Smyth, M.J., Robinson, B.W., and Currie, A.J. (2009). Locally administered TLR7

agonists drive systemic antitumor immune responses that are enhanced by anti-CD40 immunotherapy. *J Immunol* 182, 5217-5224.

Bruchard, M., Mignot, G., Derangere, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Vegran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L., *et al.* (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med* 19, 57-64.

Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1, 779-786.

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

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

Cripps, J.G., and Gorham, J.D. (2011). MDSC in autoimmunity. *Int Immunopharmacol*.

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

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., *et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10, 942-949.

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

De Santo, C., Serafini, P., Marigo, I., Dolcetti, L., Bolla, M., Del Soldato, P., Melani, C., Guiducci, C., Colombo, M.P., Iezzi, M., *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, 4185-4190.

Delano, M.J., Scumpia, P.O., Weinstein, J.S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K.M., O'Malley, K.A., Wynn, J.L., Antonenko, S., Al-Quran, S.Z., *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, 1463-1474.

Diaz-Montero, C.M., Salem, M.L., Nishimura, M.I., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J., and Montero, A.J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 58, 49-59.

Dumont, F.J., and Coker, L.Z. (1986). Interferon-alpha/beta enhances the expression of Ly-6 antigens on T cells in vivo and in vitro. *Eur J Immunol* 16, 735-740.

Eisenhauer, E.A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L.H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., *et al.* (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45, 228-247.

Ferrantini, M., Capone, I., and Belardelli, F. (2007). Interferon-alpha and cancer: mechanisms of action and new perspectives of clinical use. *Biochimie* 89, 884-893.

Gabrilovich, D.I., Bronte, V., Chen, S.H., Colombo, M.P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., and Schreiber, H. (2007). The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67, 425; author reply 426.

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

Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12, 253-268.

Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 594-606.

Gogas, H., Ioannovich, J., Dafni, U., Stavropoulou-Giokas, C., Frangia, K., Tsoutsos, D., Panagiotou, P., Polyzos, A., Papadopoulos, O., Stratigos, A., *et al.* (2006). Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med* 354, 709-718.

Greifenberg, V., Ribechini, E., Rossner, S., and Lutz, M.B. (2009). Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development. *Eur J Immunol* 39, 2865-2876.

Gresser, I., Bourali, C., Levy, J.P., Fontaine-Brouty-Boye, D., and Thomas, M.T. (1969). Increased survival in mice inoculated with tumor cells and treated with interferon preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63, 51-57.

Greten, T.F., Manns, M.P., and Korangy, F. (2011). Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *Int Immunopharmacol*.

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

Gupta, G.K., and Agrawal, D.K. (2010). CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: therapeutic application in allergy and asthma. *BioDrugs* 24, 225-235.

Gutierrez-Dalmau, A. (2007). Immunosuppressive therapy and malignancy in organ transplant recipients: a systematic review. *Drugs* 67, 1167-1198.

Gutterman, J.U. (1994). Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1198-1205.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Heckelsmiller, K., Rall, K., Beck, S., Schlamp, A., Seiderer, J., Jahrsdorfer, B., Krug, A., Rothenfusser, S., Endres, S., and Hartmann, G. (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, 3892-3899.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., *et al.* (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.

Horton, C.G., Pan, Z.J., and Farris, A.D. (2010). Targeting Toll-like receptors for treatment of SLE. *Mediators Inflamm* 2010.

Huang, B., Pan, P.Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M., and Chen, S.H. (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, 1123-1131.

Ioannou, M., Alissafi, T., Lazaridis, I., Deraos, G., Matsoukas, J., Gravanis, A., Mastorodemos, V., Plaitakis, A., Sharpe, A., Boumpas, D., *et al.* (2012). Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. *J Immunol* 188, 1136-1146.

Isaacs, A., and Burke, D.C. (1958). Mode of action of interferon. *Nature* 182, 1073-1074.

Ishii, K.J., and Akira, S. (2007). Toll or toll-free adjuvant path toward the optimal vaccine development. *J Clin Immunol* 27, 363-371.

Ito, T., Wang, Y.H., and Liu, Y.J. (2005). Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol* 26, 221-229.

Jain, V.V., Kitagaki, K., and Kline, J.N. (2003). CpG DNA and immunotherapy of allergic airway diseases. *Clin Exp Allergy* 33, 1330-1335.

Kanwar, S.S., Poolla, A., and Majumdar, A.P. (2012). Regulation of colon cancer recurrence and development of therapeutic strategies. *World J Gastrointest Pathophysiol* 3, 1-9.

King, I.L., Dickendesh, T.L., and Segal, B.M. (2009). Circulating Ly-6C+ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 113, 3190-3197.

- Kline, J.N., Waldschmidt, T.J., Businga, T.R., Lemish, J.E., Weinstock, J.V., Thorne, P.S., and Krieg, A.M. (1998). Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* *160*, 2555-2559.
- Ko, J.S., Zea, A.H., Rini, B.I., Ireland, J.L., Elson, P., Cohen, P., Golshayan, A., Rayman, P.A., Wood, L., Garcia, J., *et al.* (2009). Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* *15*, 2148-2157.
- Kodumudi, K.N., Woan, K., Gilvary, D.L., Sahakian, E., Wei, S., and Djeu, J.Y. (2010). A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res* *16*, 4583-4594.
- Krieg, A.M. (2004). Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Curr Oncol Rep* *6*, 88-95.
- Krieg, A.M. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* *5*, 471-484.
- Krieg, A.M. (2008). Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene* *27*, 161-167.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., and Hartmann, G. (1999). Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory cpG DNA. *Pharmacol Ther* *84*, 113-120.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M., *et al.* (2001). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* *31*, 3026-3037.
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* *420*, 1-16.
- Kusmartsev, S., Cheng, F., Yu, B., Nefedova, Y., Sotomayor, E., Lush, R., and Gabilovich, D. (2003). All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res* *63*, 4441-4449.
- Kusmartsev, S., and Gabilovich, D.I. (2005). STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol* *174*, 4880-4891.
- Kusmartsev, S., Nagaraj, S., and Gabilovich, D.I. (2005). Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol* *175*, 4583-4592.
- Lathers, D.M., Clark, J.I., Achille, N.J., and Young, M.R. (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*, 422-430.

Leget, G.A., and Czuczman, M.S. (1998). Use of rituximab, the new FDA-approved antibody. *Curr Opin Oncol* 10, 548-551.

Lesterhuis, W.J., de Vries, I.J., Adema, G.J., and Punt, C.J. (2004). Dendritic cell-based vaccines in cancer immunotherapy: an update on clinical and immunological results. *Ann Oncol* 15 *Suppl* 4, iv145-151.

Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., and Cao, X. (2009). Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* 182, 240-249.

Lin, E.Y., Gouon-Evans, V., Nguyen, A.V., and Pollard, J.W. (2002). The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 147-162.

Love, W.E., Bernhard, J.D., and Bordeaux, J.S. (2009). Topical imiquimod or fluorouracil therapy for basal and squamous cell carcinoma: a systematic review. *Arch Dermatol* 145, 1431-1438.

Manegold, C., Gravenor, D., Woytowicz, D., Mezger, J., Hirsh, V., Albert, G., Al-Adhami, M., Readett, D., Krieg, A.M., and Leichman, C.G. (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, 3979-3986.

Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., and Ferrone, S. (2000). Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74, 181-273.

Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173, 89-97.

Melani, C., Sangaletti, S., Barazzetta, F.M., Werb, Z., and Colombo, M.P. (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, 11438-11446.

Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480, 480-489.

Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., and Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11, 231-238.

Mirza, N., Fishman, M., Fricke, I., Dunn, M., Neuger, A.M., Frost, T.J., Lush, R.M., Antonia, S., and Gabrilovich, D.I. (2006). All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res* 66, 9299-9307.

Movahedi, K., Guillems, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J.A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111, 4233-4244.

Mundy-Bosse, B.L., Thornton, L.M., Yang, H.C., Andersen, B.L., and Carson, W.E. (2011). Psychological stress is associated with altered levels of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer patients. *Cell Immunol* 270, 80-87.

Murad, Y.M., and Clay, T.M. (2009). CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists: therapeutic applications in cancer. *BioDrugs* 23, 361-375.

Nagaraj, S., Youn, J.I., Weber, H., Iclozan, C., Lu, L., Cotter, M.J., Meyer, C., Becerra, C.R., Fishman, M., Antonia, S., *et al.* (2010). Anti-inflammatory triterpenoid blocks immune suppressive function of MDSCs and improves immune response in cancer. *Clin Cancer Res* 16, 1812-1823.

Nefedova, Y., Fishman, M., Sherman, S., Wang, X., Beg, A.A., and Gabrilovich, D.I. (2007). Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67, 11021-11028.

Nefedova, Y., Nagaraj, S., Rosenbauer, A., Muro-Cacho, C., Sebti, S.M., and Gabrilovich, D.I. (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, 9525-9535.

Neuringer, I.P. (2013). Posttransplant lymphoproliferative disease after lung transplantation. *Clin Dev Immunol* 2013, 430209.

Ng, D., and Gommerman, J.L. (2013). The Regulation of Immune Responses by DC Derived Type I IFN. *Front Immunol* 4, 94.

Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1593-1600.

Pak, A.S., Wright, M.A., Matthews, J.P., Collins, S.L., Petruzzelli, G.J., and Young, M.R. (1995). Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 1, 95-103.

Perera, F.P. (1997). Environment and cancer: who are susceptible? *Science* 278, 1068-1073.

Pestka, S., Krause, C.D., and Walter, M.R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202, 8-32.

Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5, 375-386.

Porter, D.L., Levine, B.L., Kalos, M., Bagg, A., and June, C.H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365, 725-733.

Punglia, R.S., Morrow, M., Winer, E.P., and Harris, J.R. (2007). Local therapy and survival in breast cancer. *N Engl J Med* 356, 2399-2405.

Rajagopal, D., Paturel, C., Morel, Y., Uematsu, S., Akira, S., and Diebold, S.S. (2010). Plasmacytoid dendritic cell-derived type I interferon is crucial for the adjuvant activity of Toll-like receptor 7 agonists. *Blood* 115, 1949-1957.

Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 57-63.

Raychaudhuri, B., Rayman, P., Ireland, J., Ko, J., Rini, B., Borden, E.C., Garcia, J., Vogelbaum, M.A., and Finke, J. (2011). Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol* 13, 591-599.

Reiche, E.M., Nunes, S.O., and Morimoto, H.K. (2004). Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 5, 617-625.

Reis e Sousa, C. (2004). Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 16, 21-25.

Ribechini, E., Greifengberg, V., Sandwick, S., and Lutz, M.B. (2010). Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Med Microbiol Immunol* 199, 273-281.

Ribechini, E., Leenen, P.J., and Lutz, M.B. (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, 3538-3551.

Rodriguez, D., Silvera, R., Carrio, R., Nadji, M., Caso, R., Rodriguez, G., Iragavarapu-Charyulu, V., and Torroella-Kouri, M. (2013). Tumor microenvironment profoundly modifies functional status of macrophages: Peritoneal and tumor-associated macrophages are two very different subpopulations. *Cell Immunol* 283, 51-60.

Rodriguez, P.C., Hernandez, C.P., Quiceno, D., Dubinett, S.M., Zabaleta, J., Ochoa, J.B., Gilbert, J., and Ochoa, A.C. (2005). Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* 202, 931-939.

Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A.H., Piazuelo, M.B., Delgado, A., Correa, P., Brayer, J., Sotomayor, E.M., *et al.* (2004). Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* 64, 5839-5849.

Santini, S.M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Di Pucchio, T., and Belardelli, F. (2000). Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 191, 1777-1788.

Sato, N., Michaelides, M.C., and Wallack, M.K. (1981). Characterization of tumorigenicity, mortality, metastasis, and splenomegaly of two cultured murine colon lines. *Cancer Res* 41, 2267-2272.

Savage, P., Horton, V., Moore, J., Owens, M., Witt, P., and Gore, M.E. (1996). A phase I clinical trial of imiquimod, an oral interferon inducer, administered daily. *Br J Cancer* 74, 1482-1486.

Schreibelt, G., Tel, J., Sliepen, K.H., Benitez-Ribas, D., Figdor, C.G., Adema, G.J., and de Vries, I.J. (2010). Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1573-1582.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565-1570.

Schuler, G. (2010). Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol* 40, 2123-2130.

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

Serafini, P., Mgebroff, S., Noonan, K., and Borrello, I. (2008). Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res* 68, 5439-5449.

Shi, S., Wang, R., Chen, Y., Song, H., Chen, L., and Huang, G. (2013). Combining antiangiogenic therapy with adoptive cell immunotherapy exerts better antitumor effects in non-small cell lung cancer models. *PLoS One* 8, e65757.

Shirota, Y., Shirota, H., and Klinman, D.M. (2012). Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 188, 1592-1599.

Shortman, K., and Naik, S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7, 19-30.

Shurin, G.V., Ma, Y., and Shurin, M.R. (2013). Immunosuppressive mechanisms of regulatory dendritic cells in cancer. *Cancer Microenviron* 6, 159-167.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787-795.

Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (1999). The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-1837.

Simonsson, B., Hjorth-Hansen, H., Bjerrum, O.W., and Porkka, K. (2011). Interferon alpha for treatment of chronic myeloid leukemia. *Curr Drug Targets* 12, 420-428.

Sinha, P., Clements, V.K., Fulton, A.M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 67, 4507-4513.

Smith, E.B., Schwartz, M., Kawamoto, H., You, X., Hwang, D., Liu, H., and Scherr, D.S. (2007). Antitumor effects of imidazoquinolines in urothelial cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 177, 2347-2351.

Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., and Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86, 1065-1073.

Solito, S., Falisi, E., Diaz-Montero, C.M., Doni, A., Pinton, L., Rosato, A., Francescato, S., Basso, G., Zanovello, P., Onicescu, G., *et al.* (2011). A human promyelocytic-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 118, 2254-2265.

Sozzani, S., Bosisio, D., Scarsi, M., and Tincani, A. (2010). Type I interferons in systemic autoimmunity. *Autoimmunity* 43, 196-203.

Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62.

Srivastava, M.K., Sinha, P., Clements, V.K., Rodriguez, P., and Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res* 70, 68-77.

Strober, S. (1984). Natural suppressor (NS) cells, neonatal tolerance, and total lymphoid irradiation: exploring obscure relationships. *Annu Rev Immunol* 2, 219-237.

Subiza, J.L., Vinuela, J.E., Rodriguez, R., Gil, J., Figueredo, M.A., and De La Concha, E.G. (1989). Development of splenic natural suppressor (NS) cells in Ehrlich tumor-bearing mice. *Int J Cancer* 44, 307-314.

Sun, Z., Smyth, K., Garcia, K., Mattson, E., Li, L., and Xiao, Z. (2013). Nicotine Inhibits Memory CTL Programming. *PLoS One* 8, e68183.

Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A.S., Kaiser, L.R., and Albelda, S.M. (2005). Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* 11, 6713-6721.

Swiecki, M., and Colonna, M. (2010). Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev* 234, 142-162.

Tagawa, M., Kawamura, K., Li, Q., Tada, Y., Hiroshima, K., and Shimada, H. (2011). A possible anticancer agent, type III interferon, activates cell death pathways and produces antitumor effects. *Clin Dev Immunol* 2011, 479013.

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

Talmadge, J.E., Singh, R.K., Fidler, I.J., and Raz, A. (2007). Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am J Pathol* 170, 793-804.

Thompson, J., Epting, T., Schwarzkopf, G., Singhofen, A., Eades-Perner, A.M., van Der Putten, H., and Zimmermann, W. (2000). A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy. *Int J Cancer* 86, 863-869.

Tosi, D., Valenti, R., Cova, A., Sovena, G., Huber, V., Pilla, L., Arienti, F., Belardelli, F., Parmiani, G., and Rivoltini, L. (2004). Role of cross-talk between IFN-alpha-induced monocyte-derived dendritic cells and NK cells in priming CD8+ T cell responses against human tumor antigens. *J Immunol* 172, 5363-5370.

Tu, S.P., Jin, H., Shi, J.D., Zhu, L.M., Suo, Y., Lu, G., Liu, A., Wang, T.C., and Yang, C.S. (2012). Curcumin induces the differentiation of myeloid-derived suppressor cells and inhibits their interaction with cancer cells and related tumor growth. *Cancer Prev Res (Phila)* 5, 205-215.

Ugel, S., Delpozzi, F., Desantis, G., Papalini, F., Simonato, F., Sonda, N., Zilio, S., and Bronte, V. (2009). Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol* 9, 470-481.

Umansky, V., and Sevko, A. (2013). Tumor microenvironment and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Microenviron* 6, 169-177.

Vacchelli, E., Galluzzi, L., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012). Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 1, 894-907.

Vajdic, C.M., and van Leeuwen, M.T. (2009). Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer* 125, 1747-1754.

Vaknin, I., Blinder, L., Wang, L., Gazit, R., Shapira, E., Genina, O., Pines, M., Pikarsky, E., and Baniyash, M. (2008). A common pathway mediated through Toll-like receptors leads to T- and natural killer-cell immunosuppression. *Blood* 111, 1437-1447.

Van Ginderachter, J.A., Beschin, A., De Baetselier, P., and Raes, G. (2010). Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections. *Eur J Immunol* 40, 2976-2985.

Vergati, M., Intrivici, C., Huen, N.Y., Schlom, J., and Tsang, K.Y. (2010). Strategies for cancer vaccine development. *J Biomed Biotechnol* 2010.

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2010). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol*.

Vilcek, J. (2006). Fifty years of interferon research: aiming at a moving target. *Immunity* 25, 343-348.

Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rebe, C., and Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil selectively kills

tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* 70, 3052-3061.

Waldron, T.J., Quatromoni, J.G., Karakasheva, T.A., Singhal, S., and Rustgi, A.K. (2013). Myeloid derived suppressor cells: Targets for therapy. *Oncoimmunology* 2, e24117.

Whiteside, T.L. (2006). Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol* 16, 3-15.

Wiers, K.M., Lathers, D.M., Wright, M.A., and Young, M.R. (2000). Vitamin D3 treatment to diminish the levels of immune suppressive CD34+ cells increases the effectiveness of adoptive immunotherapy. *J Immunother* 23, 115-124.

Wood, C., and Harrington, W., Jr. (2005). AIDS and associated malignancies. *Cell Res* 15, 947-952.

Wooldridge, J.E., Ballas, Z., Krieg, A.M., and Weiner, G.J. (1997). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood* 89, 2994-2998.

Wu, L., Du, H., Li, Y., Qu, P., and Yan, C. (2011). Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Stat3C) Promotes Myeloid-Derived Suppressor Cell Expansion and Immune Suppression during Lung Tumorigenesis. *Am J Pathol*.

Xin, H., Zhang, C., Herrmann, A., Du, Y., Figlin, R., and Yu, H. (2009). Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res* 69, 2506-2513.

Yaguchi, T., Sumimoto, H., Kudo-Saito, C., Tsukamoto, N., Ueda, R., Iwata-Kajihara, T., Nishio, H., Kawamura, N., and Kawakami, Y. (2011). The mechanisms of cancer immunoescape and development of overcoming strategies. *Int J Hematol* 93, 294-300.

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

Young, M.R., Lozano, Y., Ihm, J., Wright, M.A., and Prechel, M.M. (1996). Vitamin D3 treatment of tumor bearers can stimulate immune competence and reduce tumor growth when treatment coincides with a heightened presence of natural suppressor cells. *Cancer Lett* 104, 153-161.

Young, M.R., Newby, M., and Wepsic, H.T. (1987). Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res* 47, 100-105.

Yu, H., Pardoll, D., and Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9, 798-809.

Zhang, H., and Meadows, G.G. (2010). Chronic alcohol consumption enhances myeloid-derived suppressor cells in B16BL6 melanoma-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1151-1159.

Zhou, Z., French, D.L., Ma, G., Eisenstein, S., Chen, Y., Divino, C.M., Keller, G., Chen, S.H., and Pan, P.Y. (2010). Development and function of myeloid-derived suppressor cells generated from mouse embryonic and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 28, 620-632.

Zoglmeier, C., Bauer, H., Norenberg, D., Wedekind, G., Bittner, P., Sandholzer, N., Rapp, M., Anz, D., Endres, S., and Bourquin, C. (2011). CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clin Cancer Res* 17, 1765-1775.

Internet:

<http://www.clinicaltrials.gov>, zuletzt geöffnet am 10.11.2013



## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Die Familie der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren und ihre Liganden	7
Abbildung 2: IFN- $\alpha$ -Produktion durch plasmazytoide dendritische Zellen	10
Abbildung 3: Murine MDSC-Subpopulationen	15
Abbildung 4: Hemmung und Differenzierung von MDSC	17
Abbildung 5: Prinzipien der Zellaufreinigung	34
Abbildung 6: Prinzipien der Durchflusszytometrie	38
Abbildung 7: Schema des Sandwich-ELISA	41
Abbildung 8: Prinzip des BrdU-Suppressions-Assays	43
Abbildung 9: Verschiedene Aufreinigungsmethoden im Vergleich	49
Abbildung 10: Viabilität von MDSC nach maximal drei Tagen	51
Abbildung 11: Einfluss von Apoptose und Nekrose auf MDSC-Suppressivität	54
Abbildung 12: MDSC-Suppressivität nach Zugabe von Gr1-Antikörper <i>in vitro</i>	56
Abbildung 13: Anzahl und Funktion von C26-MDSC nach CpG-Therapie	59
Abbildung 14: Anzahl und Funktion von CEA424-TAg-MDSC nach CpG-Therapie	62
Abbildung 15: Expression von Maturierungsmarkern auf CEA424-TAg-MDSC nach CpG-Therapie (Histogramme)	64
Abbildung 16: Suppressions-Assay von MDSC nach <i>in vitro</i> -CpG-Therapie	65
Abbildung 17: Markerverschiebungen auf MDSC durch Überstände von aktivierten plasmazytoiden dendritischen Zellen	67
Abbildung 18: Markerverschiebung auf MDSC nach IFN- $\alpha$ -Gabe <i>in vitro</i>	69
Abbildung 19: Expression von Maturierungsmarkern auf C26-MDSC nach IFN- $\alpha$ -Therapie <i>in vivo</i> (Histogramme)	72
Abbildung 20: Funktion von C26-MDSC nach IFN- $\alpha$ -Therapie <i>in vivo</i>	73
Abbildung 21: Arginase-Aktivität von C26-MDSC nach IFN- $\alpha$ -Therapie <i>in vivo</i>	74
Abbildung 22: Tumorgröße von C26-tumortragenden Mäusen nach IFN- $\alpha$ -Therapie	75
Abbildung 23: Schematische Zusammenfassung der Befunde	87

Tabelle 1:	Expression von Maturierungsmarkern auf CEA424-TAg-MDSC nach CpG-Therapie	63
Tabelle 2:	Expression von Maturierungsmarkern auf C26-MDSC nach IFN- $\alpha$ -Therapie	71
Tabelle 3:	Möglichkeiten zur Ausschaltung MDSC-induzierter Immunsuppression	91

## 9 Publikationen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender internationaler Fachzeitschrift als Originalarbeit 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 Apr 1;17(7):1765-75. Epub 2011 Jan 13. JIF 7.3

Siehe Kommentar: Lechner M, Epstein A. A new mechanism for blocking myeloid-derived suppressor cells by CpG.

Clinical Cancer Research 2011 Apr 1;17(7):1645-8.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen in Form eines Posters vorgestellt und als Abstract veröffentlicht:

**Bauer H.**, Zoglmeier C., Noerenberg D., Wedekind G., Endres S., Bourquin C.

*CpG blocks immune suppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice*

Poster auf dem Internationalen Kongress "Regulatory Myeloid Cells", Arlington, VA, USA, 21.-24. Oktober 2010

**Bauer H.**, Zoglmeier C., Nörenberg D., Wedekind G., Bittner P., Endres S., Bourquin C.

*The TLR9 ligand CpG reduces the suppressive function of myeloid-derived suppressor cells via interferon alpha*

Poster auf dem "8<sup>th</sup> Annual Meeting of the Association of Cancer Immunotherapy", Mainz, 26.-28. Mai 2010

**Bauer H.**, Nörenberg D., Wedekind G., Bittner P., Endres S., Bourquin C, Zoglmeier C.

Einfluss von therapeutischen Oligonukleotiden auf Myeloid-derived suppressor cells in der Tumortherapie – ein Effekt von Interferon alpha?

Poster auf den „Doktorarbeitstagen Medizin – DoktaMed 2010“, München Großhadern, 11.-12. Mai 2010

Nörenberg D., **Bauer H.**, Wedekind G., Bittner P., Sandholzer N., Zimmermann W., Endres S., Bourquin C, Zoglmeier C.

The impact of TLR ligands on the function and phenotype of myeloid-derived suppressor cell subpopulations

Poster auf dem Internationalen Kongress „Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis - TSIS 2010“, München Großhadern, 9.-13. März 2010

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen auf folgenden Kongressen in Form eines Vortrages vorgestellt:

**Bauer H.**, Zoglmeier C., Noerenberg D., Wedekind G., Endres S., Bourquin C.

CpG blocks immune suppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice

Vortrag auf dem Internationalen Kongress “Regulatory Myeloid Cells”, Arlington, VA, USA, 21.-24. Oktober 2010

**Bauer H.**, Zoglmeier C., Endres S., Bourquin C.

TLR9 activation inhibits the suppressivity of myeloid-derived suppressor cells through Interferon alpha

Vortrag auf dem „5<sup>th</sup> Annual Retreat of the Graduiertenkolleg 1202 – Oligonucleotides in cell biology and therapy“, Sylvenstein, 9.-10. Juni 2010

## 10 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Stefan Endres für seine unermüdliche Unterstützung und Förderung und die hervorragende Leitung der gesamten Abteilung für Klinische Pharmakologie bedanken.

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Dr. Bourquin danke ich nicht nur für die ausgezeichnete Betreuung während meiner gesamten Laborzeit, sondern auch für ihre Mentorenschaft davor und danach und die vielen hilfreichen und motivierenden Gespräche mit ihr. Für ihre Zeit als Professorin in Fribourg in der Schweiz wünsche ich ihr alles Gute!

Meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Christine Zoglmeier danke ich ganz herzlich für die gute Einführung in die Laborarbeit und die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit danach sowie für viele wertvolle Tips und Erklärungen aus biologischer Sicht, die einem Mediziner sonst manchmal verwehrt bleiben.

Allen Mitarbeitern der Abteilung möchte ich für das so angenehme Arbeitsklima danken, das durch die Freundlichkeit, die Hilfsbereitschaft und den Humor aller Mitarbeiter entstehen konnte und so viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Insbesondere danke ich Herrn Stephan Eiber für die stets gute Labornachbarschaft sowie Frau M.sc. Nina Suhartha für seelische Unterstützung in schweren Versuchszeiten. Meinen Vordoktoranden Philip Bittner, Georg Wedekind und Daniel Nörenberg sowie unserer MTA Nadja Sandholzer danke ich ganz herzlich für die Hilfe während der Einarbeitungszeit und bei vielen langen und anstrengenden Großversuchen.

Schließlich möchte ich ganz besonders meiner Familie danken, die mir immerfort den nötigen Rückhalt gegeben hat und mir mit steter Geduld, Rat und Tat zur Seite gestanden hat.



---

# Eidesstattliche Versicherung

**Bauer, Helen Johanna**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit den Thema

**„Der Effekt einer durch *Toll-like*-Rezeptor-Liganden induzierten Interferon- $\alpha$ -Produktion auf myeloide Suppressorzellen“**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 18.11.2013

---