

Aus der Medizinische Klinik und Poliklinik IV
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Martin Reincke

und der

Abteilung für Klinische Pharmakologie
Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Stefan Endres

**Einfluss der PD-1/PD-L1-Achse auf Phänotyp und Funktion
Myeloider Suppressorzellen (MDSCs) im murinen
Pankreaskarzinommodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Iris Ritter
aus Buchen/Odw.

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Max Schnurr

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Stefan Böck

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. Philipp Metzger, PhD
PD Dr. Peter Düwell

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Pankreaskarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Therapie	1
1.1.2.1 Kurative Therapie.....	2
1.1.4.2 Palliative Therapie.....	2
1.1.4.3 Supportive Therapie.....	3
1.1.5 Immuntherapie	3
1.1.5.1 Stellenwert der Immuntherapie	3
1.1.5.2 Immunoediting.....	4
1.1.5.3 Passive Immuntherapie.....	5
1.1.5.4 Aktive Immuntherapie	6
1.1.6 Murine Pankreaskarzinommodelle.....	6
1.1.6.1 Transplantationsmodelle	6
1.1.6.2 Genetically engineered mouse models (GEMMs)	7
1.2 Myeloide Suppressorzellen	8
1.2.1 Definition	8
1.2.2 Klassifikation	10
1.2.3 Funktion.....	10
1.2.3.1 Mechanismen der Immunsuppression.....	10
1.2.3.2 Rolle im Tumormilieu und MDSCs als Zielzellen der Immuntherapie.....	12
1.3 Checkpointblockade.....	13
1.3.1 Grundlagen.....	13
1.3.2 <i>Programmed Cell Death 1</i> (PD-1) und <i>Programmed Cell Death 1 Ligand 1</i> (PD-L1).....	14
1.3.3 Checkpointblockade in der Therapie des Pankreaskarzinoms.....	15
1.4 Fragestellung	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Reagenzien, Materialien und Geräte	17
2.1.2 Software	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Zellulär-immunologische Methoden	21
2.2.1.1 Zellkultur.....	21
2.2.1.2 Aufreinigung von Zellpopulationen.....	22
2.2.1.4 Durchflusszytometrie.....	23
2.2.1.5 T-Zell-Suppressionsassay.....	24
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.2.1 Extraktion zytoplasmatischer RNA.....	24

2.2.2.2 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR).....	25
2.2.2.3 Prä-Amplifikation von cDNA.....	26
2.2.3 Tierversuche.....	27
2.2.3.1 Mauslinien.....	27
2.2.3.2 Tumorinduktion.....	27
2.2.3.3 Immunzellisolation.....	28
2.2.3.4 Intraperitoneale Injektion.....	28
2.2.4 Statistische Analyse.....	28
3. Ergebnisse	30
3.1 PD-1-Blockade im murinen Pankreaskarzinommodell.....	30
3.1.1 Überleben nach α PD-1-basierter Checkpointblockade im orthotopen Panc02-Tumormodell.....	30
3.1.2 Überleben nach α PD-1-basierter Checkpointblockade im orthotopen T110299-Tumormodell.....	30
3.2 PD-1- und PD-L1-Expression auf Tumorzellen, T-Zellen und MDSCs.....	32
3.2.1 Analyse der Expression von PD-1 und PD-L1 auf Tumorzellen und Immunzellen.....	32
3.2.2 Stimulation von Tumorzellen mit IFN γ steigert PD-L1-Expression.....	33
3.2.3 T-Zellen aus dem Tumor zeigen eine höhere PD-1-Expression als T-Zellen aus Milz und Blut.....	33
3.2.4 MDSCs aus dem Tumor zeigen eine höhere PD-L1-Expression als MDSCs aus der Milz.....	33
3.3 Effekte der α PD-1-Blockade auf Verteilung und Phänotyp von MDSCs.....	35
3.3.1 Reduktion von PMN-MDSCs im Tumor nach α PD-1-basierter Therapie.....	36
3.3.2 Keine signifikante Veränderung der Proteinexpression phänotypischer und funktioneller Marker von MDSCs nach α PD-1-basierter Therapie.....	36
3.4 Effekte der α PD-1-basierten Therapie auf Genexpression relevanter Suppressions- und Funktionsmarker von MDSCs.....	39
3.4.1 mRNA-Expression relevanter Suppressions- und Funktionsmarker von MDSCs nach α PD-1-basierter Therapie.....	39
3.5 Effekte der α PD-1-basierten Therapie auf die T-Zell-Suppression durch MDSCs ...	43
3.5.1 Einfluss einer Inkubation von MDSCs mit α PD-1-Antikörpern auf deren T-Zell-Suppressivität in MDSC/T-Zell-Kokulturen.....	43
4. Diskussion	46
4.1 Einfluss einer α PD-1-basierten Therapie auf das Überleben und die Immunantwort im murinen Pankreaskarzinommodell.....	46
4.1.1 Überleben im orthotopen Panc02- und T110299-Tumormodell.....	46
4.1.2 Immunvermittelte Tumorkontrolle im orthotopen Panc02-Tumormodell.....	47
4.2 Expression von Checkpointmolekülen auf Tumorzellen, T-Zellen und MDSCs in murinen PDAC-Modellen.....	48
4.2.1 Steigerung der basalen PD-L1-Expression auf Tumorzellen durch IFN γ	48

4.2.2 Hochregulation von PD-1 bzw. PD-L1 auf T-Zellen und MDSCs im Tumormilieu	49
4.3 Einfluss einer α PD-1-basierten Therapie auf Anzahl, Phänotyp und Funktionalität von MDSCs.....	50
4.3.1 Reduktion von PMN-MDSCs im Tumor nach α PD-1-basierter Therapie	50
4.3.2 Expression phänotypischer und funktioneller Marker von MDSCs	52
4.3.3 T-Zell-Suppression durch MDSCs nach α PD-1-basierter Therapie <i>in vitro</i>	53
4.4 Unterschiedliche Wirksamkeit einer α PD-1-basierten Therapie in murinen Tumormodellen.....	54
4.4.1 Heterogenität der Studienlage bezüglich Versuchsaufbau und Antikörperwahl ..	54
4.4.2 Das Tumormilieu als Variable des Therapieerfolgs einer α PD-1-basierten Therapie.....	56
4.5 Ausblick	58
4.5.1 Weiterführende Versuche	58
5. Zusammenfassung	60
6. Literaturverzeichnis	61
7. Verzeichnis der Abkürzungen/Akronyme	68
Anhang	71
Eidesstattliche Versicherung	77
Erklärung zu Daten in zwei Dissertationen	78

Meinen Eltern
In Liebe und Dankbarkeit

1. Einleitung

1.1 Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) stellt mit über 95 % aller Pankreaskarzinome die häufigste Form maligner Pankreasneoplasien dar. In Deutschland treten jährlich 10 bis 15 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner auf [1]. Trotz der vergleichsweise geringen Inzidenz stand das Pankreaskarzinom 2016 an vierter Stelle der Krebstodesursachen nach Lungen-, Darm- und Prostata- bzw. Brustkrebs und wird Schätzungen zufolge bis 2025 Prostata- und Brustkrebs als dritthäufigste Krebstodesursache in der EU abgelöst haben [2] [3]. Der Altersgipfel der erkrankten Patienten liegt zwischen dem 6. und 8. Lebensjahrzehnt [4]. Da die Krankheit im Anfangsstadium meist asymptomatisch oder mit unspezifischen Symptomen verläuft, erfolgt die Diagnosestellung häufig erst in einem lokal fortgeschrittenen Stadium oder nach dem Auftreten von Fernmetastasen, was eine schlechte Prognose nach sich zieht [5]. Früherkennungsuntersuchungen mittels laborchemischer, molekularbiologischer oder bildgebender Methoden sind bisher nicht etabliert oder ausreichend validiert [6] [7]. Das mediane Überleben beträgt sechs bis neun Monate, das relative 5-Jahresüberleben liegt lediglich bei 9 % [2]. Somit weist das Pankreaskarzinom die niedrigste Überlebensrate aller Krebserkrankungen auf [2].

Im Gegensatz zu den Überlebensraten anderer Tumorentitäten, die durch Fortschritte in Diagnostik und Therapie kontinuierlich angestiegen sind, blieb das mittlere Überleben von Pankreaskarzinompatienten in den letzten Jahrzehnten nahezu unverändert [7] [8]. Aufgrund der demographischen Veränderungen, mit denen sich Deutschland und viele andere Länder konfrontiert sehen, ist mit einer steigenden absoluten Zahl der Neuerkrankungen und Sterbefälle zu rechnen [1] [2].

Aus der infausten Prognose der Erkrankung und der zunehmenden gesellschaftlichen Relevanz ergibt sich die Notwendigkeit der Erprobung neuer Therapiekonzepte.

1.1.2 Therapie

Die aktuellen Therapieempfehlungen zur Behandlung des Pankreaskarzinoms unterscheiden zwischen einer kurativen und einer palliativen Behandlungsintention [1].

1.1.2.1 Kurative Therapie

Operative Therapie

Die vollständige operative Entfernung des Tumors im Gesunden (R₀-Resektion), welche bei weniger als 20 % der Patienten indiziert ist, stellt aktuell die einzige potentiell kurative Therapieoption dar [4] [5]. Aufgrund der ansteigenden Anzahl von Patienten mit Pankreaskarzinomen in fortgeschrittenem Alter werden bestehende Komorbiditäten als Kontraindikation für große viszeralchirurgische Eingriffe eine zunehmende Rolle spielen [1].

Adjuvante/neoadjuvante Therapie

Auch nach Tumorresektion liegt das 5-Jahres-Überleben lediglich bei etwa 10 bis 20 % [9]. Um das Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen zu reduzieren, ist ein multimodaler Therapieansatz sinnvoll.

In der Regel erfolgt eine adjuvante respektive additive Chemotherapie, abhängig von Komorbiditäten und Allgemeinzustand des Patienten, mit Gemcitabin oder 5-Fluoruracil und Folinsäure für sechs Monate binnen sechs Wochen nach Operation [1].

Radiotherapie, Hyperthermie, *targeted therapy*, Immuntherapie oder neoadjuvante Chemotherapie sollten im Rahmen von Studien erfolgen. Bislang gibt es keine ausreichend validierten prädiktiven Marker, die ein Therapieansprechen vorhersehen und die Therapieentscheidung beeinflussen können [1] [8].

1.1.4.2 Palliative Therapie

Chemotherapie

Eine palliative Chemotherapie soll unmittelbar bei Nachweis von Metastasen begonnen werden [1]. Die Erstlinientherapie erfolgt mit Gemcitabin alleine, Gemcitabin in Kombination mit Erlotinib oder nab-Paclitaxel, oder nach dem FOLFIRINOX-Schema, einer Kombination aus Folinsäure mit den Chemotherapeutika 5-Fluoruracil, Irinotecan und Oxaliplatin [10]. Hierbei sind Kombinationstherapien wirksamer als eine reine Monotherapie mit Gemcitabin. Das Ansprechen auf Kombinationstherapien von etwa 30 % stellt einen großen Fortschritt dar [11]. Allerdings verlängert die kombinierte Chemotherapie das mediane Überleben nur um zwei bis vier Monate und ist mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden, weshalb sie nur für Patienten in einem sehr guten Allgemeinzustand in Frage kommt [12].

Strahlentherapie

Eine Indikation zur Strahlentherapie besteht bei Pankreaskarzinompatienten nur bei drohender oder manifester Symptomatik durch invasives Wachstum des Primärtumors oder von Metastasen. Behandlungsziel ist in diesem Fall die Symptomkontrolle, beispielsweise bei tumorbedingten Schmerzen.

1.1.4.3 Supportive Therapie

Die Lebensqualität von Pankreaskarzinompatienten ist oft erheblich eingeschränkt [13]. Um die Symptomlast der Patienten zu reduzieren, spielen Schmerztherapie, Ernährungsberatung, Substitution von Pankreasfermenten bzw. Insulin als Therapie einer exokrinen bzw. endokrinen Pankreasinsuffizienz, sowie die Beseitigung und Behandlung von Cholestase und Obstruktionen eine wichtige Rolle [1] [13].

1.1.5 Immuntherapie

1.1.5.1 Stellenwert der Immuntherapie

Bereits 1891 legte William B. Coley den Grundstein für die heutige Immuntherapie. Er beobachtete nach intratumoraler Injektion von Bakterien in inoperable Sarkome bei einigen Patienten eine Größenregredienz der Tumore, was nach heutigem Erkenntnisstand auf eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort zurückgeführt werden kann [14].

Über 120 Jahre später wurde die Immuntherapie zur Behandlung von Krebserkrankungen von der Fachzeitschrift *Science* als wissenschaftlicher Durchbruch des Jahres 2013 betitelt [15]. Im Oktober 2018 wurde der Nobelpreis für Medizin an James Allison und Tasuku Honjo für ihre Erforschung der Checkpointmoleküle *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (CTLA-4) und *Programmed Cell Death 1* (PD-1), die an der Immunkontrolle von Tumoren zentral beteiligt sind, verliehen [16].

Die genomische Instabilität vieler Tumore limitiert die Anwendung von Chemotherapeutika und *targeted therapies*, da sich die Zielstrukturen durch Mutationen dem Therapeutikum entziehen können [17] [18]. Der Behandlungsschwerpunkt liegt bei der Immuntherapie nicht mehr auf dem Tumor an sich (sog. „Tumorzentrismus“), sondern auf dem komplexen Zusammenspiel zellulärer und löslicher Komponenten im Tumormilieu sowie dem Immunsystem des Patienten [19]. Immuntherapie ist ein

vielversprechender und nachhaltiger Ansatz, da durch die Langzeit-Gedächtnis-Funktion der Immunzellen auch Rezidive der Erkrankung verhindert werden könnten [17].

Immuntherapeutika sollen die Balance von einem immunsuppressiven hin zu einem immunogenen Tumormilieu verschieben, um dem Immunsystem eine effektive antitumorale Antwort zu ermöglichen [20]. Die Ergebnisse bisheriger Studien zum Einsatz von Immuntherapeutika in der Therapie des PDAC sind leider ernüchternd. So führt eine Monotherapie mit Checkpointinhibitoren oder dem therapeutischen Vakzin GVAX zu keinem signifikant verlängerten Überleben, mögliche Kombinationstherapien werden erprobt. Der Einsatz genetisch veränderter T-Zellen sowie von Stromamodulatoren, die das Tumorgewebe zugänglicher für Wirkstoffe und Immunzellen machen sollen, ist aktuell Gegenstand der Forschung [21].

1.1.5.2 Immunoediting

Wie andere solide Malignome auch, generiert das PDAC ein immunsuppressives Umfeld (*tumor microenvironment* = TME) und entgeht der Überwachung und Beseitigung durch das Immunsystem [22].

Die Interaktion von Immunsystem und Tumorzellen lässt sich in drei Phasen gliedern und wird als *Immunoediting* bezeichnet [23]. In der ersten Phase, der Eliminierung, erkennt und eliminiert das Immunsystem entartete Zellen. Während der zweiten Phase, der Gleichgewichtsphase (= Equilibrium), entgehen bereits einige selektierte Tumorzellen der Elimination und etablieren ein immunsuppressives Milieu, um dann in der dritten Phase (= Escape) zu expandieren, ohne vom Immunsystem erkannt zu werden (Abb. 1.1.) [22] [17].

Beispielhafte Mechanismen und somit Angriffspunkte für Immuntherapien sind die Rekrutierung von immunsuppressiven Zellen in das TME, die verstärkte Expression immuninhibitorischer Liganden auf der Zelloberfläche von Immunzellen und Tumorzellen, die Sekretion von angiogenetischen Faktoren, die die Blutversorgung des Tumors verbessern, sowie die Produktion von tumorfördernden Zytokinen [17] [22]. Die rigide Architektur des Tumorstromas mit dichter extrazellulärer Matrix (Desmoplasie), die durch chronische Wundheilungsprozesse gefördert wird, stellt eine Barriere für infiltrierende Immunzellen und applizierte Therapeutika dar [11] [24] [25].

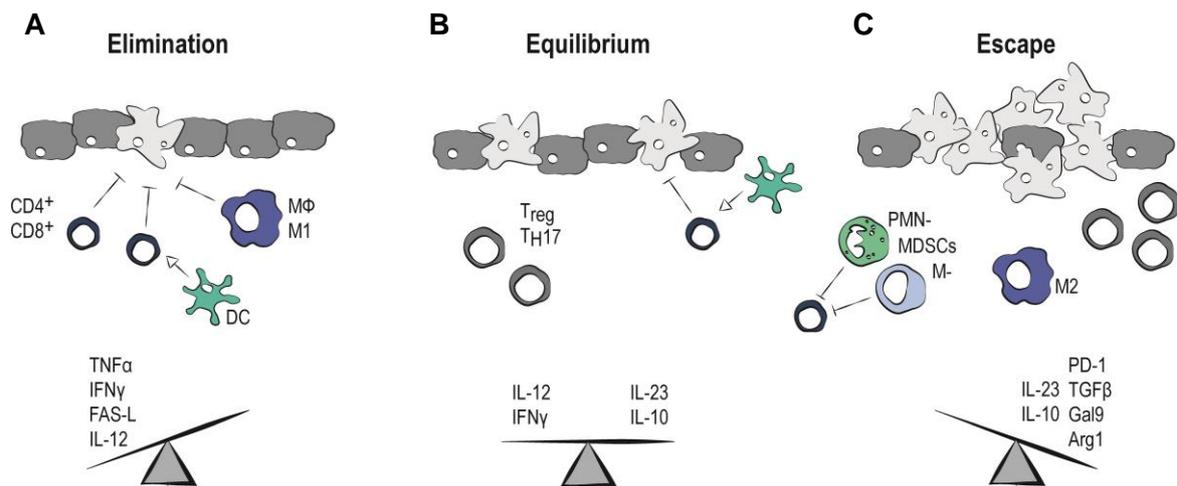


Abb. 1.1. Die drei Phasen des Immunoediting

A Elimination: Das Immunsystem erkennt und eliminiert entartete Zellen frühzeitig und verhindert so die Manifestation einer Tumorerkrankung. **B** Equilibrium: Tumorzellen entgehen der Erkennung durch das Immunsystem. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Tumorzellelimination und Tumorwachstum ein. **C** Escape: Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten einer ungehinderten Tumorzellproliferation. Das Tumormilieu wird durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und suppressive Immunzellen aufrechterhalten.

Arg1 = Arginase 1; CD4⁺/CD8⁺ = CD4⁺/CD8⁺-T-Zelle; DC = Dendritische Zelle; FAS-L = FAS-Ligand; Gal9 = Galectin 9; IFNγ = Interferon γ; IL-10/12/23 = Interleukin 10/12/23; M1/2 = Makrophagen Phänotyp M1/2; MΦ = Monozyt; M-/PMN-MDSC = monozytische/polymorphnukleäre MDSC; PD-1 = *Programmed Cell Death 1*, T_H17 = T-Helferzelle 17; TGFβ = *Transforming Growth Factor β*; TNFα = *Tumor Necrosis Factor α*; T_{reg} = regulatorische T-Zelle

Quelle: Abbildung adaptiert nach [26].

1.1.5.3 Passive Immuntherapie

Der Begriff der passiven Immuntherapie beschreibt, dass körpereigene Immunzellen nicht direkt am Therapieeffekt beteiligt sind. Die Effekte können beispielsweise durch Antikörper, *small molecules* oder Antikörper-Wirkstoff-Konjugate vermittelt sein und Tumorantigene, immunstimulatorische Moleküle, Checkpointmoleküle oder Tyrosinkinase als Zielstruktur nutzen. Ein weiteres Beispiel sind T-Zell-vermittelte Immuntherapeutika, die unter anderem eine höhere Anzahl tumorspezifischer T-Zellen im Tumormilieu, eine verstärkte Immunantwort oder eine erhöhte Affinität tumorantigenspezifischer T-Zell-Rezeptoren bewirken sollen [27] [28].

1.1.5.4 Aktive Immuntherapie

Im Rahmen einer aktiven Immuntherapie wird die körpereigene Immunantwort neu initiiert oder eine bereits bestehende Immunantwort verstärkt. Tumor-assoziierte Antigene sollen, z.B. nach Applikation von Impfstoffen, von Immunzellen schneller erkannt und Tumorzellen eliminiert werden. Erhoffter Vorteil von aktiven Immuntherapien ist neben der direkten Elimination von Tumorzellen das Verhindern von Tumorrezidiven durch Induktion eines immunologischen Gedächtnisses [27] [28].

1.1.6 Murine Pankreaskarzinommodelle

Komplexe zellbiologische und immunologische Zusammenhänge, insbesondere das TME und dessen Beeinflussung des Immunsystems, können mit *in vitro* Modellen nicht suffizient erfasst werden. Tiermodelle stellen eine Annäherung an die Gegebenheiten im menschlichen Organismus dar und sollen im Idealfall biologische, genetische, etiologische, immunologische und therapeutische Charakteristika des humanen Tumors abbilden [29]. Sie sind unverzichtbar zum Verständnis der molekularen und zellulären Grundlagen einer Tumorentität. Ebenso dienen sie der rationalen Entwicklung neuer Therapieansätze im Rahmen präklinischer Studien [30].

1.1.6.1 Transplantationsmodelle

Im *Xenograft*-Tumormodell werden von Patienten stammende humane Pankreaskarzinom-Zelllinien oder explantiertes Gewebe in immundefiziente Mäuse implantiert. Die Implantation kann hierbei beispielsweise subkutan, intraperitoneal, intravenös oder orthotop erfolgen [30]. Zwar wird die Biologie des Tumors hiermit gut abgebildet, allerdings müssen Forschungsergebnisse insbesondere aus dem Bereich der Tumorimmunologie durch die fehlende Immunkompetenz der Versuchstiere kritisch hinterfragt werden [31].

Für syngene Tumormodelle erfolgt die Implantation von *in vitro* passagierten murinen Pankreaskarzinom-Zelllinien in immunkompetente Mäuse desselben Mausstamms (z.B. C57BL/6). In der Mehrzahl der präklinischen Forschungsarbeiten finden diese Modelle Anwendung. Sie entsprechen der menschlichen Tumorbiologie in einigen Aspekten jedoch nur unzureichend, wie zum Beispiel in Bezug auf Tumorentwicklung und tumorinduzierte Immuntoleranz. Durch häufige Passagen der Zelllinien sind diese laufend Veränderungen unterworfen und unterscheiden sich bisweilen stark von der

Ausgangszelllinie, was zudem eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen erschwert. Ein Beispiel für ein syngenes Pankreaskarzinommodell, das in dieser Arbeit Verwendung findet, ist die Panc02-Zelllinie, die durch chemische Induktion mit 3-Methylcholanthren in C57BL/6 Mäusen generiert wurde [32].

1.1.6.2 Genetically engineered mouse models (GEMMs)

Pankreaskarzinome zeichnen sich durch eine chromosomale Instabilität und häufige Mutationen in bestimmten Gruppen von Genen (z.B. KRAS, TP53, SMAD4, CDKN2A und ARID1A) aus [33]. Verglichen mit anderen soliden Tumoren, wie beispielsweise dem malignen Melanom oder Lungenkarzinomen, weist das Pankreaskarzinom relativ wenige somatische Mutationen auf [34].

Die zwei häufigsten *Driver*-Mutationen, also Mutationen, die entscheidend zur Tumorentstehung beitragen, betreffen das KRAS-Protoonkogen (80 bis 90 % aller humanen Pankreaskarzinome) und das TP53-Tumorsuppressorgen (50 bis 75 %) [35] [36]. Im *LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre*- oder KPC-Tumormodell, einem seit 2005 etablierten murinen Tumormodell, tragen die Versuchstiere diese beiden Mutationen in pankreatischen Progenitorzellen und entwickeln bereits nach wenigen Monaten spontan zunächst auf das Epithel begrenzte Vorläuferläsionen, sogenannte intraepitheliale Neoplasien (PanIN) [36] [37]. Je nach Modell lässt sich innerhalb von 3 bis 6 Monaten ein lokal invasives Pankreaskarzinom mit konsekutiver Metastasierung nachweisen. Das KPC-Modell entspricht den klinischen und histopathologischen Merkmalen des humanen Pankreaskarzinoms in vielerlei Hinsicht und erlaubt durch die klassischen Progressionsstadien eine Beurteilung von Therapieeffekten in den verschiedenen Stadien der Erkrankung [24]. Die Versuchsmäuse sind immunkompetent und erlauben dadurch eine Beurteilbarkeit immunologischer Mechanismen und Therapieansätze. Durch die spontane Entwicklung der Tumore zu unterschiedlichen Zeitpunkten ergeben sich Schwierigkeiten bezüglich Überwachung, Vergleichbarkeit und Heterogenität der Versuchsgruppen [38].

Neuere Arbeiten kombinieren genetische mit syngenem Modellen, indem primäre Tumorzelllinien aus GEMMs, wie beispielsweise dem KPC-Modell, ortho- oder heterotop in syngene C57BL/6 Mäuse implantiert werden [30] [39]. Ein Beispiel hierfür sind Modelle basierend auf der T110299-Zelllinie, die aus dem KPC-Modell stammt und für diese Arbeit ausgesucht wurde [40].

1.2 Myeloide Suppressorzellen

1.2.1 Definition

Myeloide Suppressorzellen (*Myeloid Derived Suppressor Cells*, im Folgenden MDSCs genannt) stellen eine unreife, heterogene Zellpopulation myeloider Abstammung dar, die durch die Unterdrückung des angeborenen sowie adaptiven Immunsystems das Gleichgewicht zwischen Immunaktivierung und Immunsuppression beeinflussen [41]. Im Rahmen von malignen Erkrankungen, jedoch auch anderen chronischen Entzündungsgeschehen, Traumata oder Autoimmunerkrankungen, kommt es zu einer abnorm gesteigerten und pathologisch aktivierten Myelopoese [42]. MDSCs reichern sich in Blut, Milz und am Ort der Inflammation an.

Generiert werden MDSCs im Knochenmark aus einer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle, von der auch reife, terminal differenzierte myeloide Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen oder Granulozyten abstammen (Abb. 1.2.) [42] [43]. Von hier migrieren die Zellen im tumortragenden Organismus in lymphatische Organe und den Tumor. Als Akkumulationssignale dienen Wachstumsfaktoren wie Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) und Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), die von Tumorzellen und Zellen des Tumorstromas sezerniert werden [44] [41]. Als Signale, die eine pathologische Aktivierung der Myelopoese in Gang setzen, werden diverse Interleukine, wie IL-6, IL-1 β oder IL-13/4, sowie Zytokine, beispielsweise TNF α und IFN γ , diskutiert [41].

Klassische vs. pathologische Aktivierung

Die klassische Aktivierung der Myelopoese stellt eine Antwort auf relativ starke, aber zeitlich begrenzte Stimuli durch *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) oder *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), wie sie beispielsweise im Rahmen einer bakteriellen oder viralen Infektion vorkommen, dar [45]. Dies führt zur Expansion myeloider Zellen mit robuster phagozytischer Aktivität, zur Sekretion inflammatorischer Zytokine und zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (sog. respiratorischer *burst*). Im Gegensatz dazu ist die pathologische Aktivierung eine Folge von schwächeren, aber persistierenden Stimuli, wie sie durch chronische Entzündungen oder Tumorerkrankungen hervorgerufen werden. Dies resultiert in der Expansion immunsuppressiver myeloider Zellen [46] [45].

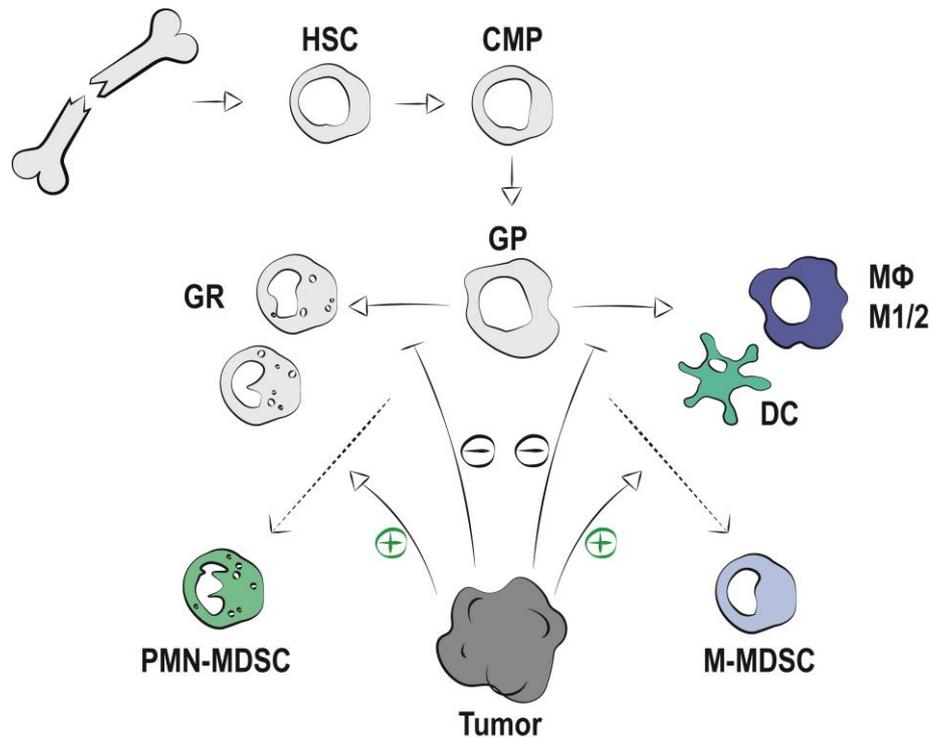


Abb. 1.2. Myelopoese und Entstehung von MDSCs

Abgebildet sind die physiologische Myelopoese und die Entstehung von MDSCs aus myeloischen Vorläuferzellen durch pathologische Aktivierung, wie beispielsweise im Rahmen einer Tumorerkrankung.

CMP = gemeinsame myeloische Vorläuferzelle (*common myeloid progenitor*); DC = Dendritische Zelle; GMP = granulozytäre/makrophagische Vorläuferzelle (*granulocyte/macrophage progenitor*); GP = granulozytäre Vorläuferzelle (*granulocyte progenitor*); GR = Granulozyt; HSC = hämatopoetische Stammzelle (*hematopoietic stem cell*); M1/2 = Makrophagen Phänotyp M1/2; MΦ = Monozyt

Quelle: Abbildung adaptiert nach [47].

MDSCs stellen keine distinkte und klar abgrenzbare Zellpopulation dar, sondern ein Kontinuum von Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien mit phänotypischer, morphologischer und funktioneller Heterogenität. Die Namensgebung bezieht sich auf den myeloiden Ursprung der Zellen und deren immunsuppressive Funktion. In frühen Studien wurden murine MDSCs mit zum Teil uneinheitlicher Nomenklatur vor allem durch die gemeinsame Expression der Oberflächenmoleküle CD11b und Gr1 (Ly6C/Ly6G) definiert [42].

Bronte et al. schlagen einen Algorithmus vor, um MDSCs einheitlich zu definieren und eine Vergleichbarkeit wissenschaftlicher Arbeiten zu gewährleisten [42]. Diese Definitionen und Kriterien, auf die in dieser Arbeit Bezug genommen wird, werden im Folgenden erläutert.

1.2.2 Klassifikation

Als Grundbedingung muss eine Expansion des myeloiden Kompartiments im Vergleich zur Kontrollbedingung vorliegen. MDSCs werden anhand phänotypischer, funktioneller und molekularer Charakteristika klassifiziert [42].

Man unterscheidet innerhalb der Gesamtpopulation der MDSCs (definierende Marker CD11b⁺, Gr1⁺) nach phänotypischen Gesichtspunkten zwischen polymorphnukleären MDSCs (PMN-MDSCs), die mit gelapptem Kern eine Ähnlichkeit zu Granulozyten aufweisen, und monozytären MDSCs (M-MDSCs) [41]. Anhand der exprimierten Oberflächenmarker werden PMN-MDSCs als CD11b⁺, Ly6G⁺, Ly6C^{lo} und M-MDSCs als CD11b⁺, Ly6G⁻, Ly6C^{hi} definiert.

Nach der Bestimmung des Phänotyps soll die immunsuppressive Aktivität der Zellen mittels funktioneller Tests, beispielsweise durch den Nachweis einer Hemmung der T-Zell-Proliferation oder verminderten T-Zell-Zytokin-Produktion, überprüft werden. Lässt sich die immunsuppressive Funktionalität der Zellen nicht nachweisen, liegen jedoch die phänotypischen und biochemischen Kriterien für MDSCs vor, spricht man von *MDSC-like-cells* [42].

1.2.3 Funktion

Die ursprüngliche physiologische Funktion immunsupprimierender Zellen ist der Schutz des Organismus vor extensivem Gewebeschaden durch unkontrollierte Immunreaktionen, hervorgerufen beispielsweise durch Entzündungen oder Infektionen. Der Tumor nutzt dies aus und amplifiziert diese suppressive Aktivität, um sich vor der Elimination durch das Immunsystem zu schützen [42].

MDSCs nutzen je nach Rahmenbedingungen und Lokalisation verschiedene Mechanismen zur Suppression anderer Immunzellen [46].

1.2.3.1 Mechanismen der Immunsuppression

Die grundlegenden Mechanismen der MDSC-vermittelten Immunsuppression lassen sich vereinfacht in vier Untergruppen gliedern (Abb. 1.3.). Nachfolgend sind neben den allgemeinen Suppressionsmechanismen auch konkret die in dieser Arbeit untersuchten, für die Funktionalität von MDSCs relevanten Moleküle beschrieben.

Nährstoffdepletion und oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies sind hochreagibel, fungieren selbst als *second messenger* und verändern Struktur und Funktion von Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden [48]. Durch die Depletion von Nährstoffen wie der Aminosäure L-Arginin wird die Funktionalität von T-Zellen beeinträchtigt.

Arg1/2	Hydrolyse von L-Arginin zu Ornithin und Harnstoff [49]
Nos2	Metabolisierung von L-Arginin zu Citrullin und NO
Nox	membrangebundener Enzymkomplex, katalysiert die Produktion von Superoxid (O_2^-) und Peroxynitrit, Nitrierung und Nitrosylierung

Arg1/2 = Arginase 1/2; Nos2= *Nitric oxide synthase 2*; Nox = *NADPH-Oxidase*

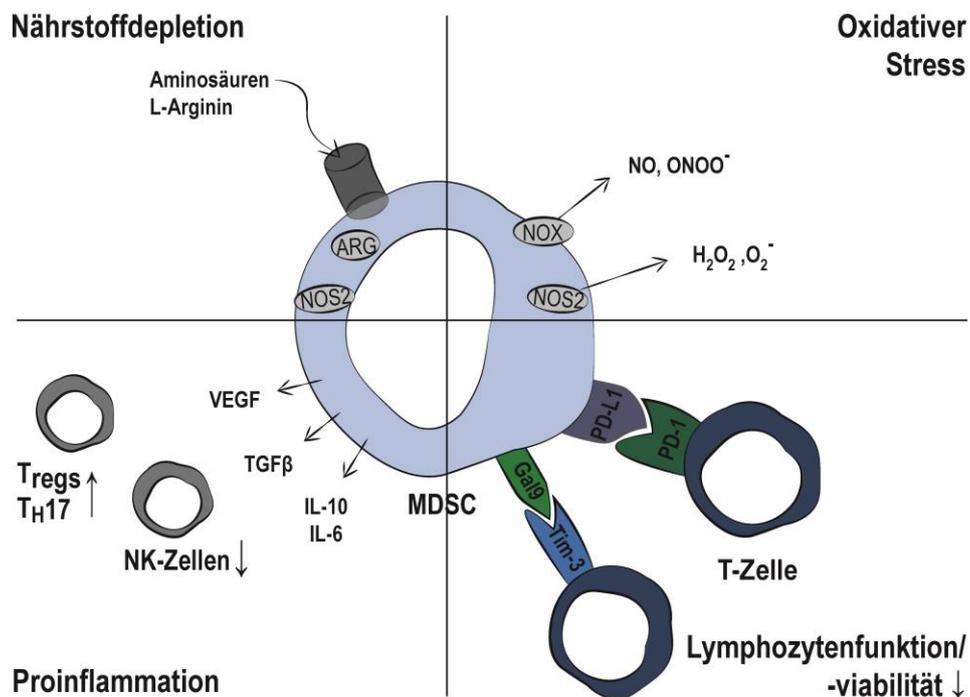


Abb. 1.3. MDSC-vermittelte Immunsuppression

MDSCs wirken durch verschiedene Mechanismen immunsuppressiv. Dargestellt sind die Depletion von für die T-Zell-Funktion relevanten Nährstoffen, oxidativer Stress durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, die Sekretion immunsuppressiv wirkender Botenstoffe und die Beeinträchtigung der Lymphozytenfunktion.

Arg = Arginase; Gal9 = Galectin 9; IL-6/10 = Interleukin 6/10; NK-Zellen = Natürliche Killerzellen; Nos2 = *Nitric oxide synthase 2*; Nox = *NADPH-Oxidase*; PD-1 = *Programmed Cell Death 1*, PD-L1 = *Programmed Cell Death 1 Ligand 1*; TGFβ = *Transforming Growth Factor β*, TH17 = T-Helferzelle 17; Tim-3 = *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*; Treg = regulatorische T-Zelle; VEGF = *Vascular Endothelial Growth Factor*

Quelle: Abbildung adaptiert nach [50].

Lymphozytenfunktion und -viabilität

Funktion und Viabilität sowie Migration und Differenzierung von Lymphozyten werden durch zahlreiche Oberflächenproteine, Zytokine und Enzyme beeinflusst.

Gal9	Expansion von MDSCs und eingeschränkte T _H 1-Funktion durch Bindung von Gal9 an Tim-3 auf T-Zellen [50] [51] [52]
IL-6	Induktion suppressiver T _H 17-Zellen, gestörte T _H 1-Entwicklung
IL-10	Induktion suppressiver regulatorischer T-Zellen und Makrophagen vom suppressiven M2-Phänotyp, gestörte DC-Funktion [43] [53] [54]
FAS	Bindung FAS-Ligand (auf T-Zellen exprimiert) und Induktion des programmierten Zelltods der rezeptortragenden Zelle über Caspasen-Aktivierung [55]
MHC-I	Antigenpräsentation durch körpereigene, kernhaltige Zellen. Es wird eine antigenspezifische, von MHC-I abhängige Suppression von CD8 ⁺ T-Zellen durch MDSCs-diskutiert [56]

Gal9 = Galectin 9; Tim-3 = *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*; IL-6 = Interleukin 6; IL-10 = Interleukin 10; FAS = FAS-Rezeptor; MHC-I = *Major histocompatibility complex class I*

Immunsuppressives Tumormilieu

MDSCs halten das immunsuppressive Milieu beispielsweise durch Sekretion von Wachstumsfaktoren aufrecht und haben neben den direkten Auswirkungen auf andere Immunzellen auch Einfluss auf Tumorprogression, Angiogenese, Desmoplasie und Metastasierung [57].

TGFβ	Induktion suppressiver T _H -17 Zellen und regulatorischer T-Zellen, NK-Zell-Anergie [43] [55]
VEGF	Steigerung der Tumervaskularisation durch Neoangiogenese, gestörte DC-Entwicklung und MDSC-Akkumulation. MDSCs exprimieren einen Rezeptor für VEGF und steigern so durch einen autokrinen Regelkreis die eigene Akkumulation [43]

TGFβ= *Transforming growth factor β*; VEGF= *Vascular endothelial growth factor*

1.2.3.2 Rolle im Tumormilieu und MDSCs als Zielzellen der Immuntherapie

Die Akkumulation von MDSCs im Tumormilieu verstärkt ihre immunsuppressive Funktion und beschleunigt Tumorwachstum und Metastasierung. Während das Vorkommen zytotoxischer T-Zellen in verschiedenen soliden Tumoren mit einer guten Prognose assoziiert ist, korreliert die Anhäufung myeloider Zellen im Tumor mit einem schlechteren Outcome [27].

Das Verhältnis von PMN-MDSCs zu M-MDSCs unterscheidet sich in den verschiedenen Tumorentitäten und könnte eine Rolle für das Ausmaß der Immunsuppression im Tumormilieu spielen. Auch funktionell scheint es einen Unterschied zwischen den beiden

Subtypen zu geben; M-MDSCs wurden in der Literatur als suppressiver im Vergleich zu PMN-MDSCs beschrieben, wobei dies möglicherweise vom Tumormodell abhängig ist [58]. So zeigte sich im murinen Pankreaskarzinommodell in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe eine potentere T-Zell-Inhibition durch PMN-MDSCs [40].

Es ergeben sich verschiedene Strategien, um MDSCs im Rahmen einer Immuntherapie als Angriffspunkt zu nutzen [57]. Eine Depletion von MDSCs oder Inhibierung der Gewebemigration hat Einfluss auf die Quantität immunsuppressiver Zellen im Tumormilieu. Durch Inhibition der suppressiven Mechanismen von MDSCs ließe sich deren immunsuppressive Aktivität reduzieren. Weitere Angriffspunkte sind eine direkte Beeinflussung der MDSC-Entstehung sowie eine Förderung der Ausdifferenzierung zu weniger suppressiven myeloischen Zellen durch funktionelle Umprogrammierung [40].

1.3 Checkpointblockade

1.3.1 Grundlagen

Die physiologische Funktion sogenannter Checkpointmoleküle besteht darin, den Grad der Entzündung am Ort einer Antigenexpression zu regulieren, um normales Gewebe vor Schäden durch eine Überreaktion des Immunsystems zu schützen [20]. Damit die T-Zell-vermittelte Immunantwort nicht unkontrolliert abläuft, exprimieren T-Lymphozyten auf ihrer Oberfläche Checkpointmoleküle, welche bei Interaktion mit ihrem Liganden die Aktivierung der T-Zelle hemmen. Im Rahmen vieler Tumorerkrankungen ist die Expression dieser inhibitorischen Checkpointmoleküle sowie deren Liganden auf Immun- und Tumorzellen hochreguliert. Dadurch wird eine effektive antitumorale Immunantwort verhindert und das immunsuppressive Tumormilieu unterhalten [19].

Die derzeit am intensivsten beforschten Checkpointmoleküle sind die T-Zelloberflächenmoleküle *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (CTLA-4) und *Programmed Cell Death 1* (PD-1) bzw. dessen Ligand *Programmed Cell Death 1 Ligand 1* (PD-L1), der auf Immunzellen, aber auch Tumorzellen selbst exprimiert wird (Abb. 1.4.). Der Einsatz von Checkpointinhibitoren ist bereits im klinischen Alltag der Onkologie angekommen. Monoklonale Antikörper, die sich gegen CTLA-4, PD-1 bzw. PD-L1 richten, sind unter anderem zur Therapie des malignen Melanoms, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms, Nierenzellkarzinoms, Blasenkarzinoms und Hodgkin-Lymphoms zugelassen [20].

1.3.2 Programmed Cell Death 1 (PD-1) und Programmed Cell Death 1 Ligand 1 (PD-L1)

Der Oberflächenrezeptor PD-1 (CD279) gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und wird vor allem auf T- aber auch B-Lymphozyten sowie Monozyten im Anschluss an deren Aktivierung exprimiert [59]. Er wurde erstmals 1992 von Ishida, Agate et al. beschrieben [60]. Die Expression der Liganden PD-L1 und PD-L2 auf anderen Immunpopulationen wie MDSCs sowie Tumorzellen wird durch proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise IFN γ , das von aktivierten T-Zellen sezerniert wird, gesteigert [43] [61]. Die Affinität von PD-1 zu PD-L1 ist etwa drei Mal höher als die von PD-1 zu PD-L2, sodass PD-L2 im Rahmen der Tumorummunsuppression bisher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint [17]. PD-L1 bindet zudem an B7-1 (CD80), das von antigenpräsentierenden Zellen wie beispielsweise dendritischen Zellen, B-Lymphozyten oder Makrophagen exprimiert wird und als co-stimulatorisches Signal an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist [62] [61].

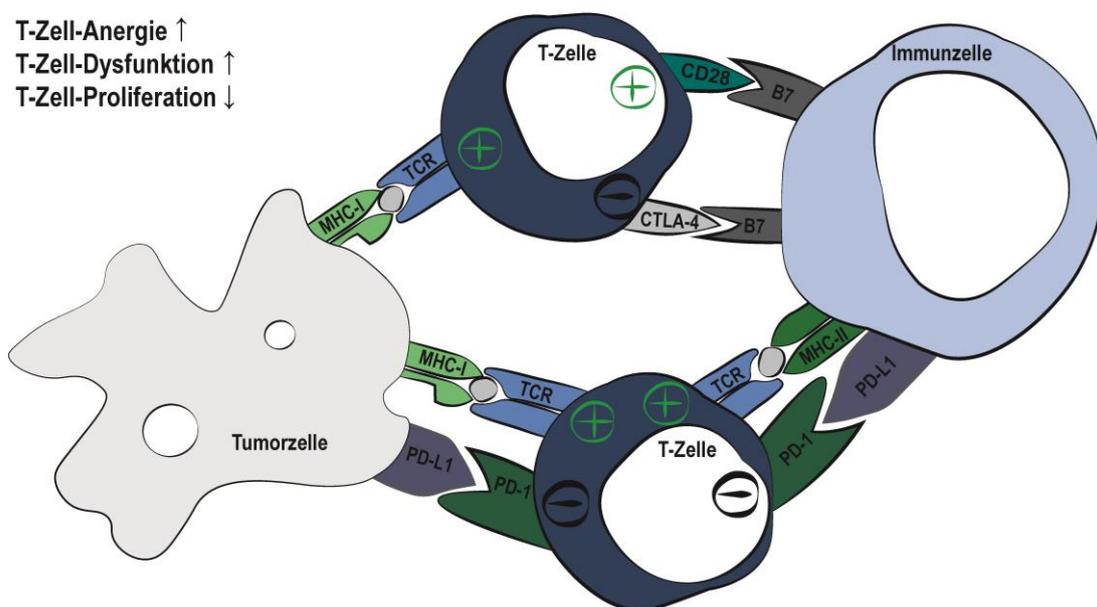


Abb. 1.4. Checkpointmoleküle CTLA-4 und PD-1

Expression der Checkpointmoleküle CTLA-4 und PD-1 auf T-Zellen. Die Bindung der Liganden B7 und PD-L1, die von Tumor- und Immunzellen exprimiert werden, beeinträchtigt T-Zell-Funktion und -Proliferation und führt zur Immunsuppression.

B7 = Leukozyten-Aktivierungsantigene CD80/86; CTLA-4 = *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*; PD-1 = *Programmed Cell Death 1*, PD-L1 = *Programmed Cell Death 1 Ligand 1*; MHC-I/II = *Major Histocompatibility Complex I/II*; TCR = T-Zell-Rezeptor

Quelle: Abbildung adaptiert nach [63].

Die Interaktion von PD-1 mit seinen Liganden führt zur Anergie und Dysfunktion der T-Zelle. Durch Dephosphorylierung des T-Zell-Rezeptors kommt es zu einer geringeren Aktivierung verschiedener Signalwege und in Folge zu einer verminderten Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-2 oder IFN γ . Ebenso bewirkt eine eingeschränkte Zellzyklusprogression einen Proliferationsstop der T-Zellen [20] [64].

1.3.3 Checkpointblockade in der Therapie des Pankreaskarzinoms

Eine gesteigerte Expression von PD-L1 und PD-L2 im Tumorgewebe von Pankreaskarzinompatienten ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert [65] [66] [67]. Das Pankreaskarzinom spricht jedoch nicht oder nur unzureichend auf eine Therapie mit Checkpointinhibitoren an [68] [17]. Eine Ausnahme hiervon stellt möglicherweise die kleine Subgruppe der Pankreaskarzinome mit einer *mismatch-repair*-Defizienz dar. Diese Defekte im DNA-Reparatursystem führen zu einer erhöhten somatischen Mutationslast und somit höheren Anzahl an Neoantigenen, die von Immunzellen erkannt werden können. Die dadurch gesteigerte Immunogenität des Tumors ist eine mögliche Erklärung für ein Ansprechen auf eine Checkpointblockade in dieser seltenen Subgruppe [69].

1.4 Fragestellung

Die anhaltend schlechte Prognose und die gravierenden Einschränkungen der Lebensqualität von Patienten mit Pankreaskarzinom verdeutlichen den akuten Forschungsbedarf im Bereich der Tumorthherapie dieser Erkrankung. Zudem entwickelt sich das Pankreaskarzinom aufgrund demographischer Veränderungen zu einem wachsenden gesellschaftlichen Problem. Der Aufschwung der Immuntherapie und insbesondere der klinische Erfolg der Checkpointblockade in der Therapie einiger Tumorentitäten stehen im Kontrast zur ernüchternden Studienlage in Bezug auf das Pankreaskarzinom. Ein Verständniszugewinn der Mechanismen, die zur Therapieresistenz führen, und eine Analyse der beteiligten Akteure im Tumormilieu ist von entscheidender Bedeutung für die Verbesserung der Therapie. Die Rolle von MDSCs als Vermittler einer tumorinduzierten Immunsuppression wird zunehmend besser verstanden. Dies macht MDSCs zu einem vielversprechenden Angriffspunkt für Immuntherapeutika. Welchen Einfluss eine Checkpointblockade und konkret der Einsatz von α PD-1-Antikörpern auf Phänotyp und Funktion von MDSCs im PDAC hat, soll in dieser Arbeit anhand muriner Pankreaskarzinommodelle näher untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien, Materialien und Geräte

Technische Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Axiovert 25/40 C Inverse Mikroskope	Zeiss, Deutschland
FACS Aria II	BD Bioscience, Deutschland
FACS Calibur	BD Bioscience, Deutschland
FACS Canto II	BD Bioscience, Deutschland
gentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotech, Deutschland
LightCycler 480 II	Roche, Deutschland
MACS Separator, LS/MS Columns	Miltenyi Biotech, Deutschland
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Pipetec	Hirschmann, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra, Deutschland
Thermoschüttler	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Votexer Lab dancer	IKA, Deutschland
Zellkultur CO ₂ Inkubator (BBD 6220)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Zellkultur Laminar Flow	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Zentrifuge (Multifuge 3L-R)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Zentrifuge 5425 und 5415R	Eppendorf, Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Deutschland

Reagenzien, Chemikalien und Puffer

Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)-Puffer: 2 mM EDTA, 2 % FCS, 0,1 % NaN₃ in PBS

Fixationspuffer: 1 % PFA in PBS/FACS-Puffer

Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)-Puffer: 2 mM EDTA, 0,2 % BSA

Zellkulturmaterialien und -medien

Bezeichnung	Hersteller
Ciprofloxacin	Fresenius Kabi, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deutschland
DNase I	Roche, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</i>	Lonza, Belgien

<i>Dulbecco's PBS</i>	Lonza, Belgien
<i>Dynabeads® Mouse T activator CD3/CD28</i>	life technologies, Deutschland
EDTA 0,5 M	Fluka/Sigma-Aldrich, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Roth, Deutschland
Kollagenase D	Roche, Deutschland
L-Glutamin 20 mM	Biochrom/Merck Millipore, Deutschland
<i>MycoAlert Mycoplasma Detection Assay</i>	Lonza, Belgien
Natriumpyruvat 100 mM	Biochrom/Merck Millipore, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren	Life technologies, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Biochrom/Merck Millipore, Deutschland
<i>Pharm Lyse Lysing Buffer</i>	BD Biosciences, USA
Rekombinantes murines Interferon γ (IFN γ)	Immunotools, Deutschland
<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium</i>	Lonza, Belgien
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypsin-EDTA 10x	Lonza, Belgien
β -Mercaptoethanol	Roth, Deutschland

Sonstige Reagenzien, Chemikalien und Kits

Bezeichnung	Hersteller
7-Aminoactinomycin D	Sigma-Aldrich, USA
Chloroform	Roth, Deutschland
<i>Dynabeads® Mouse T activator CD3/CD28</i>	life technologies, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>Fixable Viability Dye</i>	Life technologies, Deutschland
<i>Invitrogen™ TRIzol™ Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific, USA
<i>Invitrogen™ UltraComp eBeads™ Compensation Beads</i>	Thermo Fisher Scientific, USA
Isopropanol	Applichem, Deutschland
<i>KAPA PROBE FAST qPCR Kit</i>	peqlab, Deutschland
<i>Pan T Cell Isolation Kit II, mouse</i>	Miltenyi Biotec, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>RealTime ready cDNA Pre-Amp Master</i>	Roche, Deutschland
<i>RealTime ready cDNA Pre-Amp Primer Pool</i>	Roche, Deutschland
<i>RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit</i>	Thermo Fisher Scientific, USA
Saponin	Sigma-Aldrich, Deutschland

Material Tierversuche

Bezeichnung	Hersteller
Alzane (Atipamezol)	Pfizer, USA
Bepanthen (Augen-/Nasensalbe)	Bayer, Deutschland
Buprenovet (Buprenorphin)	Bayer, Deutschland
Dorbene vet (Medetomidin)	Zoetis, Deutschland
Flumazenil	Hikma, Deutschland
Heparinisierte Kapillaren	Hirschmann, Deutschland
Isofluran	CP-Pharma, Deutschland
Midazolam	HamelN, Deutschland
Naloxon	Inresa, Deutschland
Prolene® 4-0 Nahtmaterial	Ethicon, Deutschland
U100 – Insulinspritze	BD, Deutschland

Antikörper primär konjugiert für Durchflusszytometrie

Spezifität	Fluorochrom	Spezies/Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller
Arg1	APC	Schaf/IgG	polyklonal	1:100	R&D
CD11b	BV 510	Ratte/IgG2b, κ	M1/70	1:200	BioLegend
CD3	PE-Cy7	Hamster/IgG	145-2C11	1:200	BioLegend
CD4	PerCP	Ratte/IgG2a	RM4-5	1:200	BioLegend
CD4	PE	Ratte/IgG2b κ	GK1.5	1:200	BD Pharmingen
CD45	PE-Cy7	Ratte/IgG2b, κ	30-F11	1:200	BioLegend
CD8	APC	Ratte/IgG2a, κ	53-6.7	1:200	BioLegend
CD8	BV 711	Ratte/IgG2a, κ	53-6.7	1:200	BioLegend
CD8	PB	Ratte/IgG2a	53-6.7	1:200	BioLegend
FAS	PE-Cy7	Hamster/IgG2, λ2	Jo2	1:200	BD Pharmingen
Gal9	PE	Ratte/IgG2a, κ	108A2	1:200	BioLegend
Gr-1	PE	Ratte/IgG2b, κ	RB6-8C5	1:200	BioLegend
Gr-1	Pacific Blue	Ratte/IgG2b, κ	RB6-8C5	1:200	BioLegend
Isotypkontrolle	APC	Armenischer Hamster IgG	HTK888	1:200	BioLegend
Isotypkontrolle	FITC	Armenischer Hamster IgG	HTK888	1:200	BioLegend
Isotypkontrolle	PE	Ratte/IgG2, κ	RTK2758	1:200	BioLegend
Isotypkontrolle	PE-Cy7	Ratte/IgG2, κ	RTK2758	1:200	BioLegend
Ly-6C	FITC	Ratte/IgG2c, κ	HK1.4	1:200	BioLegend
MHC-I	APC	Maus/IgG2a, κ	AF6-88.5.5.3	1:200	ThermoFisher Scientific
Nos	Alexa Fluor 488	Ratte/IgG2a, κ	CXNFT	1:100	ThermoFisher Scientific

Nox	Alexa Fluor 647	Kaninchen/IgG	polyklonal	1:100	Bioss
PD-1	PE	Ratte/IgG2a, κ	29F1A12	1:200	BioLegend
PD-L1	APC	Ratte/IgG2b, κ	10F9G2	1:200	BioLegend
VEGFα	Alexa Fluor 488	Kaninchen/IgG	polyklonal	1:100	Bioss

Antikörper unkonjugiert

Spezifität	Funktionalität	Spezies/Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller
CD279 (PD-1)	blockierend	Ratte/IgG2a, κ	RMP1-14	4-11mg/ml	Bio X Cell
CD279 (PD-1)	blockierend	Hamster/IgG	J43	5 µg/ml	eBioscience
CD279 (PD-1)	blockierend	Ratte/IgG2a	RMP1-14	1 mg/ml	BioLegend
Isotypkontrolle	-	Ratte/IgG2a, κ	2A3	4-11mg/ml	Bio X Cell
<i>Purified anti-mouse CD16/32 Antibody,</i>	blockierend	Ratte/IgG2a, λ	93	0,5 mg/ml	eBioscience

Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
1,5 ml/2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Deutschland
Injektionsnadel 27G	Becton Dickinson, USA
MACS® SmartStrainers (30 µm, 70 µm, 100 µm)	Miltenyi Biotec, Deutschland
PCR-Tubes Biozym	Hess, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarsted, Deutschland; Eppendorf, Deutschland; Gilson, USA
<i>Polystyrene Roundbottom Tubes</i>	Becton Dickinson, USA
Skalpell No 22	Feather, Japan
Spritzen (1 ml)	B. Braun, Deutschland
Spritzen (5 ml, 20 ml)	Becton Dickinson, USA
Zellkulturflaschen (175 cm ² , 75 cm ²)	Greiner, Deutschland
Zellkulturplatten 6-/12-/24-/48-/96-well Flachboden	Becton Dickinson, USA
Zellkulturplatten 96-well Rundboden	Greiner, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Deutschland

2.1.2. Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Illustrator v.22/23	Adobe Inc., USA
Citavi v.6.1	Swiss Academic Software, Schweiz

FACSDiva	BD Bioscience, Deutschland
FlowJo v.10.07	Tree Star, USA
Graphpad Prism v.5-v.9	Graphpad Software, USA
LightCycler480 SW v.1.5	Roche, Deutschland
Microsoft Office	Microsoft, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellulär-immunologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

Zelllinien

Die murine Tumorzelllinie Panc02 (Adenokarzinom des Pankreas) stammt ursprünglich aus einem mit 3-Methylcholanthren induzierten Tumor einer weiblichen C57BL/6-Maus [32]. Sie wurde von Prof. Dr. med. C. Bruns (Chirurgische Klinik der LMU München, Deutschland) bereitgestellt.

T110299-Zellen (Adenokarzinom des Pankreas) wurden von Prof. Dr. med. J. Siveke (Klinikum rechts der Isar, München, aktuell Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt [40]. Diese Zelllinie stammt aus Primärtumoren des KPC-Mausmodells, in welchem die Tiere durch pankreas-spezifische Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen (Pdx1-Cre; K-Ras^{+LSLG12D}; p53^{R172H/+}) nach wenigen Wochen spontan intraepitheliale Neoplasien des Pankreas (PanIN) und sukzessive duktale Adenokarzinome (PDAC) entwickeln.

In regelmäßigen Abständen erfolgten Tests auf Mykoplasmenkontamination mittels Biolumineszenzanalyse gemäß Herstellerprotokoll (*MycoAlert Mycoplasma Detection Kit*, Lonza).

Allgemeine Kulturbedingungen

Kultiviert wurden die Zellen im Inkubator in einem stabilen Milieu von 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit. Alle Kultivierungsarbeiten erfolgten mit sterilen Reagenzien auf einer Sicherheitswerkbank. Zellzahl und Viabilität wurden mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung ermittelt.

Insofern nicht anders angegeben, erfolgte das Zentrifugieren von Zellsuspensionen für 5 Minuten bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (RCF) von 400 g und einer Temperatur von 4 °C.

Zellkulturmedien

Tumorzellmedium:

10 % FCS

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

0,1 mg/ml Streptomycin

bzw.

Ciprofloxacin 1:200

in DMEM

T-Zell-Medium:

10 % FCS

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin

0,1 mg/ml Streptomycin

bzw.

Ciprofloxacin 1:200

1 mM Natriumpyruvat

1 % nicht-essentielle AS

50 µM β-Mercaptoethanol

in RPMI 1640

2.2.1.2 Aufreinigung von Zellpopulationen

Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)

Mittels MACS werden Zellpopulationen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle sortiert. Hierzu wurden Einzelzellsuspensionen gemäß Herstellerprotokoll mit an Antikörper gekoppelten Magnetpartikeln inkubiert und anschließend mithilfe eines starken Magnetfeldes in verschiedene Populationen aufgetrennt. Hierbei unterscheidet man zwischen positiver Selektion (Zielzellen mit Magnetpartikeln markiert, restliche Zellen unmarkiert) und negativer Selektion (Zielzellen unmarkiert, restliche Zellen mit Magnetpartikeln markiert). Zur Qualitätskontrolle wurde die Reinheit der erhaltenen Zellpopulationen durchflusszytometrisch überprüft.

Zellisolation mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Einzelzellsuspensionen wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Eine Sortierung der Zellen in bis zu vier definierte Zellpopulationen wurde mit dem Fluss-Sortierer FACS Aria II (BD Bioscience) in Kooperation mit PD Dr. med. Michael Hristov (Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, LMU München) vorgenommen. Die Reinheit der erhaltenen Zellpopulationen wurde direkt im Anschluss durchflusszytometrisch ermittelt.

2.2.1.4 Durchflusszytometrie

Allgemeines

Die Analyse der Zellen erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACSCanto II der Firma BD Bioscience. Das Gerät verfügt über drei Laser (blau, 488 nm; rot, 633 nm; violet, 405 nm) und kann die Emission von bis zu acht verschiedenen, mit Antikörpern gekoppelten Fluorochromen detektieren. Zusätzlich erhält man durch Streulicht Informationen über das Zellvolumen (Vorwärtsstreuung) und die Zellgranularität (Seitwärtsstreuung). Zur rechnerischen Korrektur von überlappenden Emissionsspektren bei Mehrfarbenfluoreszenzanalyse erfolgte eine Kompensation mithilfe einfarbiger Kompensationskontrollen.

Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Molekülen

Zur Analyse von Oberflächenantigenen wurden Zellen als Einzelzellsuspension in FACS-Puffer mit primären Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern im Verhältnis Antikörper : Puffer = 1:200 (Oberflächenmoleküle) bzw. 1 : 100 (intrazelluläre Moleküle) für 30 Minuten bei 4 °C in Dunkelheit gefärbt. Vor der Färbung intrazellulärer sekretierter Antigene wurden Zellen in Kultur für 4 bis 6 Stunden mit 1 µg/ml Brefeldin A inkubiert, um den zelleigenen Proteintransport zu blockieren. Fixiert wurden die Zellen mit 1 % Paraformaldehyd, zur Permeabilisierung der Zellen wurde eine Lösung aus 0,5 % Saponin angewandt. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern an auf der Zelloberfläche exprimierte Fc-Rezeptoren zu verhindern, wurde vor Beginn der Färbeschritte 1 µg eines blockierenden anti-CD16/32-Antikörpers pro 1×10^6 Zellen hinzugegeben (sog. „Fc-Block“). Um zwischen lebenden und toten Zellen zu differenzieren, wurde der Viabilitätsfarbstoff *Fixable Viability Dye* eFluor® 780 (eBioscience) gemäß Herstellerprotokoll angewandt. Alternativ erfolgte die Erkennung toter Zellen mittels Propidiumiodid- oder 7-Aminoactinomycin D-Färbung (Nukleinsäureinterkalatoren, für die eine intakte Zellmembran impermeabel ist).

Als Negativkontrollen dienten ungefärbte Einzelzellsuspensionen sowie Einzelzellsuspensionen, die mit an dasselbe Fluorochrom wie der Testantikörper gekoppelten Isotyp-Kontrollantikörpern inkubiert wurden.

Proliferationsmessung

Die Proliferationsmessung von T-Lymphozyten erfolgte nach Anfärbung der Einzelzellen mit 2 µM des fluoreszierenden Farbstoffs *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE)

für 4 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 10 ml FCS zum Abstoppen der Reaktion hinzugegeben. CFSE bindet an Lysin-Reste intrazellulärer Moleküle, sodass die Fluoreszenzintensität, die mittels Durchflusszytometrie bestimmt wird, mit jeder erfolgten Zellteilung um die Hälfte abnimmt und somit eine Quantifizierung der Zellproliferation erlaubt.

2.2.1.5 T-Zell-Suppressionsassay

Um die Suppressivität von MDSCs zu messen, wurden murine T-Zellen aus Splenozyten mittels MACS gemäß Herstellerprotokoll negativ selektioniert, mit CFSE gefärbt und mit aktivierenden *beads* (*Dynabeads Mouse T-Activator CD3/CD28*, Thermo Fisher Scientific) im Verhältnis 1 µl/100 µl Medium stimuliert. 5×10^4 T-Zellen und MDSCs in unterschiedlichen Relationen wurden in 96-well Rundboden-Zellkulturplatten in 100 µl T-Zell-Medium co-kultiviert und die Proliferation der T-Zellen nach 3 Tagen durchflusszytometrisch erfasst. Als Positivkontrolle diente hierbei die Proliferation von mit *beads* stimulierten T-Zellen ohne Zugabe von MDSCs, als Negativkontrolle wurden unstimulierte T-Zellen herangezogen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Extraktion zytoplasmatischer RNA

Die Extraktion zytoplasmatischer RNA aus Einzelzellsuspensionen erfolgte nach dem abteilungsinternen Protokoll unter Anwendung der *acid-guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform*-Methode (TRIzol™ Reagent, Invitrogen). Zellen wurden unter einem Laborabzug mit 500 µl TRIzol-Reagenz in einem Reaktionsgefäß lysiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Chloroform hinzugegeben, das Reaktionsgefäß händisch gut geschüttelt und für 2 bis 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugierung (15 Minuten, max. 12.000 g, 4 °C) wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Zum Ausfällen der RNA wurden 250 µl Isopropanol hinzugefügt. Nach Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur und erneuter Zentrifugierung (10 Minuten, max. 12.000 g, 4 °C) wurde der Überstand abpipettiert, in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, mit 500 µl Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 Minuten, max. 7.500 g, 4 °C). Der Überstand wurde komplett abgenommen und verworfen, das im Reaktionsgefäß verbleibende RNA-Pellet 5 Minuten auf Eis und

anschließend 5 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und im Anschluss in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Konzentration und Reinheit der RNA wurde anschließend mit einem Mikrovolumen Spektralphotometer überprüft.

2.2.2.2 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Das Prinzip der qRT-PCR basiert auf der Vervielfältigung von Nukleinsäuren mittels Polymerase-Kettenreaktion. Bei der qRT-PCR kann mithilfe von Fluoreszenzmessungen in Echtzeit (d.h. nach jedem PCR-Zyklus) eine Quantifizierung der Nukleinsäuren vorgenommen werden. Um die Genexpression spezifischer Gene einer Zellpopulation zu beurteilen, wurde zunächst die zytoplasmatische RNA extrahiert. Die RNA wurde dann gemäß Herstellerprotokoll (*RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit*, Thermo Fisher Scientific) zu *copy*-DNA (cDNA) umgeschrieben, um die Amplifikation mittels PCR durch DNA-Polymerasen zu ermöglichen.

Die PCR-Primer wurden mithilfe des *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (Roche) entworfen und von Eurofins Scientific SE generiert. Die Reagentien für die PCR wurden nach Herstellerprotokoll angewandt. Als Referenz-Gene wurden Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) und β -Actin herangezogen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der LightCycler® 480 Software v1.5 (Roche).

PCR-Programm qRT-PCR

Anzahl Zyklen	Schritt	Zieltemperatur	Dauer
1	Prä-Inkubation	90 °C	10 Minuten
45	Denaturierung	95 °C	10 Sekunden
	Hybridisierung	60 °C	30 Sekunden
	DNA-Synthese	72 °C	1 Sekunde
1	Kühlung	4 °C	30 Sekunden

Primersequenzen qRT-PCR und Prä-Amplifikation

Gen		Sequenz 5' → 3'
Actb	rechts	GGAGCAGAAGGAGATTACTGC
	links	CCACCGATCCACACAGAGTA
Adam17	rechts	TGTGGTTATTTAAATGCAGATAGTGA
	links	TCTCTTCACTCGACGAACAAAC
Arg1	rechts	GCAGCACTGAGGAAAGCTG
	links	CCGTGGTCTCTCACGTCAT
Arg2	rechts	CATTTGATCGGCTGATTGG
	links	CTGGAGCCAGTTTAGGGTCA
Ccl17	rechts	TGCTTCTGGGGACTTTTCTG
	links	GAATGGCCCTTTGAAGTAA
Ccl2	rechts	CAGCAAGATGATCCCAATGA
	links	CCTCTCTTGAGCTTGGTGA
Ccl5	rechts	CCTACTCCCCTCGGTCTCT
	links	TTTCTTGGGTTTGCTGTGC
CD274 (PD-L1)	rechts	GGAGCTGATCATCCCAGAAC
	links	AGCACCCAGTGAGTCCTGTT

Cxcl10	rechts links	ATCAGCACCATGAACCCAAG CCTATGGCCCTCATTCTCAC
Ddx58 (RIG-I)	rechts links	AGCCAGAGTGTGAGAATCTCAGT GGGCTGTGTAATTATTAGAAGACG
Gal9	rechts links	TCCCCTGAGATAGAAGAGATGG TCCAGTAAAGGGGATGATCG
Ifih1 (MDA5)	rechts links	CTTGTCACGAACGAGATAGCC CCAGGACATACGTGCTTTCA
Ifna	rechts links	GGATGTGACCTTCCTCAGACTC TCCAAAGTCCTTCCTGTCCTT
Ifnb1	rechts links	TCCAGAATGTCTTTCTTGTCTTCA GACGTACAACAATAGTCTCATTCCA
Ifng	rechts links	CATTCAGAGCTGCAGTGACC CTGTCTGGCCTGCTGGTTAAA
Il10	rechts links	TGGTGTCTTTCAATTGCTCT TCTGAGCTGCTGCAGGAAT
Il12b (Il-12p40)	rechts links	GCGCAAGAAAGAAAAGATGAA TTGCATTGGACTTCGGTAGA
Il13	rechts links	TGTAGCCTCCAGGTCTCACC CGTGGCAGACAGGAGTGTT
Il1b	rechts links	TGAGCACCTTCTTTTCCTTCA CATCTCGGAGCCTGTAGTGC
Il23a	rechts links	GGCAAGGACACCATTATTAAGAG TTCTCCAGCTCCTTTCTCTAGC
Il6	rechts links	TGATGGATGCTACCAAAGTGG TTCATGTAAGTCCAGGTAGCTATGG
Mrc1 (CD206)	rechts links	GGACGAGCAGGTGCAGTT CAACACATCCCGCCTTTC
Myd88	rechts links	TGGCCTTGTTAGACCGTGA AAGTATTCTGGCAGTCCTCCTC
Nos2	rechts links	TGAACTTGAGCGAGGAGCA TTCATGATAACGTTTCTGGCTCT
Stat3	rechts links	GTCTGCAGAGTTCAAGCACCT TCCTCAGTCACGATCAAGGAG
Stat5b	rechts links	GGCAAGGACACCATTATTAAGAG TTCTCCAGCTCCTTTCTCTAGC
Tfgeb1	rechts links	GACAGCAAAGATAACAAACTCCAC CCATGAGGAGCAGGAAGG
Tnf	rechts links	ACTCCAGGCGGTGCCTAT GGAGGCCATTTGGGAACT
Vegfa	rechts links	GGACCCTGGCTTTACTGCT TCTGCTCTCCTTCTGTCGTG

2.2.2.3 Prä-Amplifikation von cDNA

Um trotz geringer Mengen an cDNA eine Aussage über die Expression einer größeren Anzahl an Genen (sog. *targets*) treffen zu können, wurde diese, vor Analyse mittels qRT-PCR, vervielfältigt (prä-amplifiziert). Dies ist insbesondere bei Versuchen mit kleinen Zellpopulationen und begrenztem Ausgangsmaterial von Vorteil. Es wurde in enger Zusammenarbeit mit dem Hersteller (Roche, Deutschland) ein arbeitsgruppenspezifisches Protokoll erarbeitet und die *template*-cDNA mittels Primern (korrespondierend zu den für die qRT-PCR angewandten Primern) in einer 12-Zyklus-PCR amplifiziert. Als Endprodukt erhält man uniforme, doppelsträngige *target*-cDNA-Abschnitte, die bei -20 °C für mehrere Wochen aufbewahrt werden können.

In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 10 µl *RealTime ready Pre-Amp Master* (5x conc.), 12,5 µl *RealTime ready Pre-Amp Primer Pool* (4x conc.) und 1 bis 250 ng der

template-cDNA in einem Volumen von 1 bis 5 µl mit aufgereinigtem Wasser ad 50 µl sorgfältig gemischt. Die anschließende PCR erfolgte nach nachfolgendem Programm in einem *Thermocycler*.

PCR-Programm Prä-Amplifikation

Anzahl Zyklen	Schritt	Zieltemperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	95 °C	1 Minute
12	Prä-Amplifikation	95 °C 60 °C	15 Sekunden 4 Minuten
1	Kühlung	4 °C	∞

2.2.3 Tierversuche

2.2.3.1 Mauslinien

Weibliche C56BL/6-Mäuse im Alter zwischen fünf und sechs Wochen wurden über JANVIER LABS, Frankreich, bezogen. Die Tierversuche wurden nach Genehmigung gemäß den Richtlinien der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) durchgeführt (Tierversuchsnummer 55.2-1-54-2532-175-12).

2.2.3.2 Tumorinduktion

Subkutane Tumore

Für die Induktion subkutaner Tumore wurden unter inhalativer Isoflurannarkose 5×10^5 (Panc02) bzw. 2×10^5 (T110299) Tumorzellen resuspendiert in 200 µl PBS in die rechte Flanke der Tiere injiziert. Das Tumorstadium wurde manuell und per Messschieber überwacht. Sobald die Tumorstadiumgröße 10 mm x 10 mm überschritt, wurden die Mäuse aus dem Versuch genommen.

Orthotope Tumore

Die orthotope Tumorinduktion erfolgte unter Vollnarkose (intraperitoneale Injektion von 100 µl Narkose-Mix aus Hypnotikum, Analgetikum und Sedativum) mittels Injektion von 2×10^5 Tumorzellen in 25 µl PBS nach lateraler Laparotomie und vorsichtiger Luxation der Milz direkt in das Pankreasgewebe. Peritoneal- und Hautschnitte wurden nach Rückverlagerung aller Organe mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Antagonisierung der Narkose erfolgte durch Applikation von je 100 µl Antagonisten-Mix intraperitoneal und subkutan.

Narkose-Mix (ad 3,2 ml):

Mizdazolam 10 mg
Buprenorphin 0,3 mg
Medetomidin 0,2 mg

Antagonisten-Mix (ad 8,5 ml):

Flumazenil 0,5 mg
Naloxon 1,2 mg
Atipamezol 2,5 mg

2.2.3.3 Immunzellisolation

Gewinnung von Immunzellen aus Tumor und Milz

Nach zervikaler Dislokation der Versuchstiere wurden Tumor sowie Milz für *ex vivo* Untersuchungen entnommen. Die Entnahme der subkutanen Tumore erfolgte je nach Tumorgröße 14 bis 49 Tage nach Tumorinduktion, spätestens jedoch bei Erreichen einer Tumorgröße von 10 mm x 10 mm. Tumorgewebe wurde zerkleinert und für 30 Minuten bei 37 °C unter Agitation durch Zugabe von 1,5 mg/ml Collagenase D und 50 U/ml DNase verdaut. Einzellzellsuspensionen wurden durch Filtration über sterile Zellsiebe (40-100 µm) generiert.

Gewinnung von Blutproben

Blutproben wurden durch Punktion des retrobulbären Venenplexus gewonnen. Hierzu wurde der Plexus unter Isofluran-Kurzarkose der Mäuse mittels einer heparinisierten Kapillare am inneren Augenwinkel unter drehenden Bewegungen punktiert.

2.2.3.4 Intraperitoneale Injektion

Zur intraperitonealen (i.p.) Injektion von Antikörpern wurden 250 µg des Antikörpers in 200 µl sterilem PBS gelöst. Um eine versehentliche Punktion der Abdominalorgane zu vermeiden, wurde die Maus manuell in etwa 30° Kopftieflage an Nackenhaut und Schwanzwurzel fixiert. Die Injektion erfolgte mit einer sterilen Kanüle (27 G) nach Desinfektion der Injektionsstelle am Bauch des Tieres paramedian im unteren Bauchdrittel.

2.2.4 Statistische Analyse

Deskriptive Daten wurden als Mittelwert plus Standardabweichung (SD) oder Mittelwert plus Standardfehler (SEM) gemäß Abbildungsbeschriftung abgebildet. Daten zur Fluoreszenzintensität durchflusszytometrischer Daten wurden als Median (MFI) angegeben. Als parametrischer Test für unabhängige Variablen wurde der *Student's-t-*

Test verwendet. Die Analyse von Überlebensversuchen im orthotopen Tumormodell erfolgte mittels Mantel-Cox-Test. Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt:

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$.

3. Ergebnisse

3.1 PD-1-Blockade im murinen Pankreaskarzinommodell

3.1.1 Überleben nach α PD-1-basierter Checkpointblockade im orthotopen Panc02-Tumormodell

Als Ausgangspunkt für diese Arbeit wurde zunächst der therapeutische Effekt einer PD-1-Blockade auf das Überleben der Versuchstiere im orthotopen murinen Panc02-Pankreaskarzinommodell untersucht.

Versuchsmäuse wurden nach orthotoper Tumorinduktion mit Panc02-Zellen wie in Abb. 3.1.A gekennzeichnet mit α PD-1-Antikörpern in der Therapiegruppe respektive einer Isotypkontrolle in der Kontrollgruppe behandelt. Das Überleben zeigte sich in der α PD-1-Therapiegruppe signifikant verlängert ($p = 0,0011$). Bei 50 % der Tiere konnte nach 100 Tagen palpatorisch kein Tumor festgestellt werden, diese galten somit als geheilt (Abb. 3.1.A).

Am Tag 114 nach orthotoper Tumorinduktion erfolgte bei den überlebenden Mäusen eine Tumorreexposition (*rechallenge*) mittels subkutaner Injektion von Panc02-Tumorzellen, um zu untersuchen, ob sich bei den vom Tumor geheilten Tieren ein immunologisches Gedächtnis ausgebildet hat. Als Kontrollgruppe dienten gesunde, unbehandelte Mäuse. Bei zwei von vier Mäusen aus der α PD-1-Therapiegruppe fand sich kein erneutes Tumorstadium, was auf eine immunvermittelte Tumorkontrolle hinweist. Hingegen konnte bei allen Kontrollmäusen ein Anwachsen des subkutanen Tumors festgestellt werden (Abb. 3.1.B).

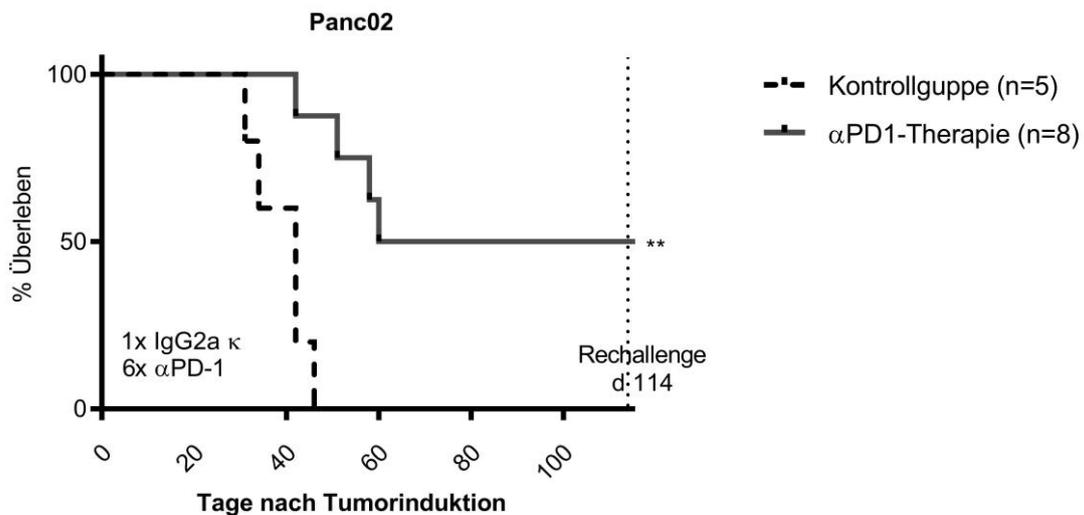
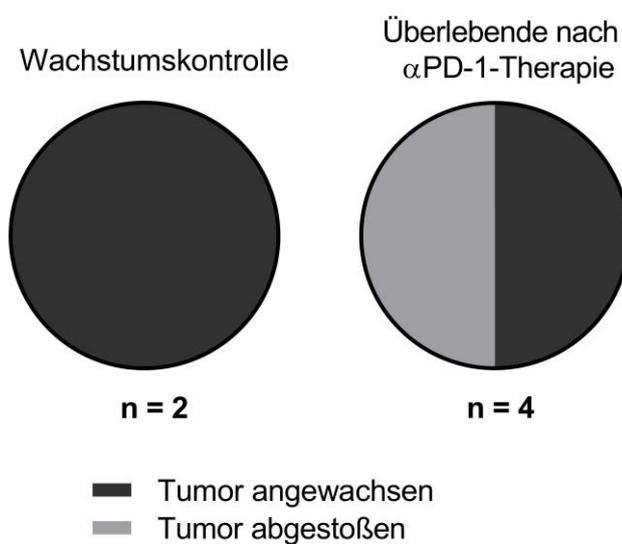
3.1.2 Überleben nach α PD-1-basierter Checkpointblockade im orthotopen T110299-Tumormodell

Als nächstes wurde die Effektivität der α PD-1-Therapie im T110299-Tumormodell untersucht. T110299-Tumorzellen wurden aus sog. KPC-Mäusen generiert, welche pankreasspezifische Mutationen in den Genen K-ras und p53 aufweisen, die häufig im humanen PDAC nachzuweisen sind und die histologisch-pathologischen Eigenschaften des Pankreaskarzinoms am besten widerspiegeln [36].

Versuchsmäuse wurden nach orthotoper Tumorinduktion mit T110299-Zellen wie gekennzeichnet mit α PD-1-Antikörpern in der Therapiegruppe behandelt. Tiere der Kontrollgruppe erhielten keine Therapie. Das Überleben war in der

α PD-1-Therapiegruppe signifikant verlängert, jedoch fanden sich im Gegensatz zum Panc02-Modell keine Langzeitüberlebenden ($p < 0,0001$) (Abb. 3.1.C).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit α PD-1-Antikörpern das Überleben der Versuchstiere in syngen PDAC-Modellen signifikant verlängert, wobei im T110299-Tumormodell das therapeutische Ansprechen deutlich geringer ausfällt als im Panc02-Tumormodell, was auf eine geringere Immunität hinweisen könnte.

A**B**

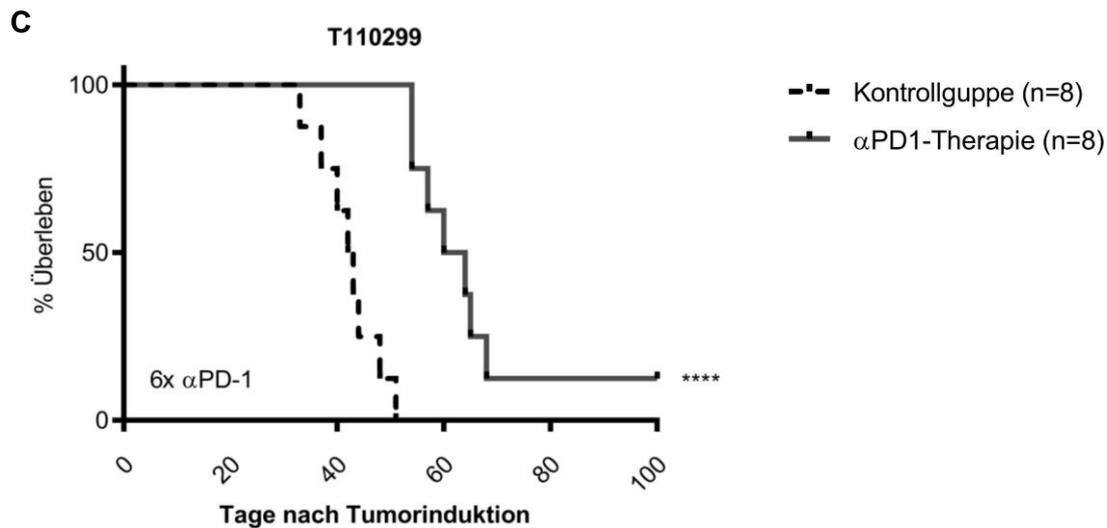


Abb. 3.1. αPD-1-basierte Checkpointinhibition verlängert das Überleben in orthotopen PDAC-Mausmodellen

A. C57BL/6-Mäuse erhielten an den Tagen 6, 10, 14, 17, 20 und 24 nach orthotoper Tumorinduktion mit Panc02-Zellen intraperitoneale Injektionen mit αPD-1-Antikörper (Klon: RMP1-14) bzw. IgG2a κ-Isotypkontrolle. Darstellung des Überlebens als Kaplan-Meier-Kurve. **B.** An Tag 114 nach Tumorinduktion erfolgte eine Reexposition mittels subkutaner Injektion von Panc02-Tumorzellen in vier der überlebenden Mäuse der αPD-1-Therapiegruppe sowie in unbehandelten Kontrollmäusen. **C.** C57BL/6-Mäuse erhielten an den Tagen 6, 10, 13, 17, 20 und 24 nach orthotoper Tumorinduktion mit T110299-Zellen intraperitoneale Injektionen mit αPD-1-Antikörper (Klon: RMP1-14) bzw. keine Therapie in der Kontrollgruppe. Darstellung des Überlebens als Kaplan-Meier-Kurve.

** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,0001$

3.2 PD-1- und PD-L1-Expression auf Tumorzellen, T-Zellen und MDSCs

3.2.1 Analyse der Expression von PD-1 und PD-L1 auf Tumorzellen und Immunzellen

Nachdem in den vorherigen Versuchen ein Ansprechen auf eine Therapie mit dem αPD-1-Antikörper gezeigt werden konnte, wurde darauf aufbauend ein möglicher Einfluss der PD-1/PD-L1-Achse auf die Funktionalität von MDSCs sowie die Interaktion von MDSCs, T-Zellen und Tumorzellen evaluiert. Als Grundlage dieser Arbeit wurde die Expression von PD-1 auf der Oberfläche von T-Zellen beziehungsweise von PD-L1 auf der Oberfläche der murinen Pankreaskarzinomzelllinien Panc02 und T110299 sowie auf MDSCs aus Tumoren und Milzen tumortragender Mäuse untersucht. Die Expression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.2.2 Stimulation von Tumorzellen mit IFN γ steigert PD-L1-Expression

Um zu bestätigen, dass PD-1 und PD-L1 in den hier angewandten Tumormodellen exprimiert werden, wurde zunächst die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen in Zellkulturen untersucht. Panc02- und T110299-Tumorzellen zeigten basal keine durchflusszytometrisch nachweisbare Expression von PD-L1. Da es sich bei PD-L1 um ein durch IFN γ induzierbares Gen handelt, wurden die Zellen für 16 Stunden mit 1000 U/ml IFN γ stimuliert. Hierdurch zeigte sich eine signifikante Hochregulation der PD-L1-Expression der Tumorzellen ($p < 0.0001$) (Abb. 3.2.A).

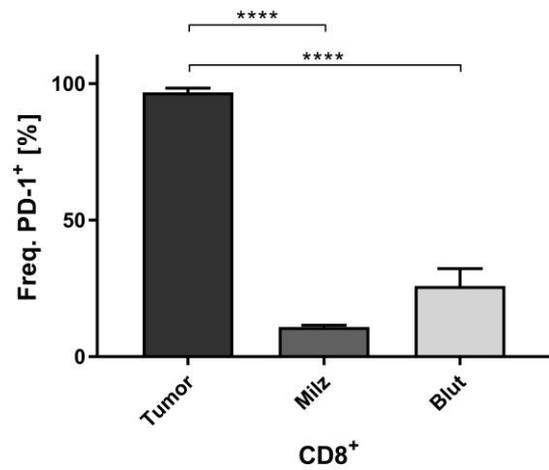
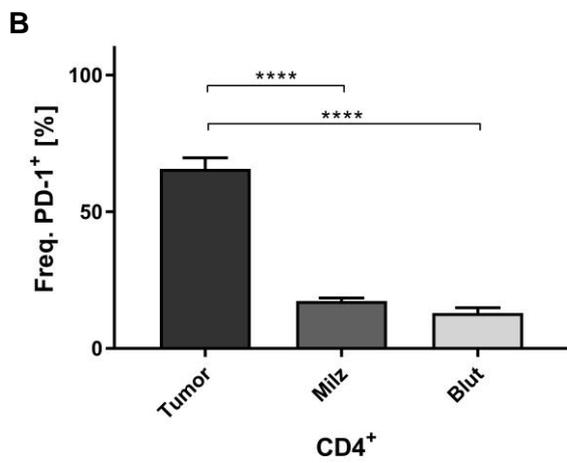
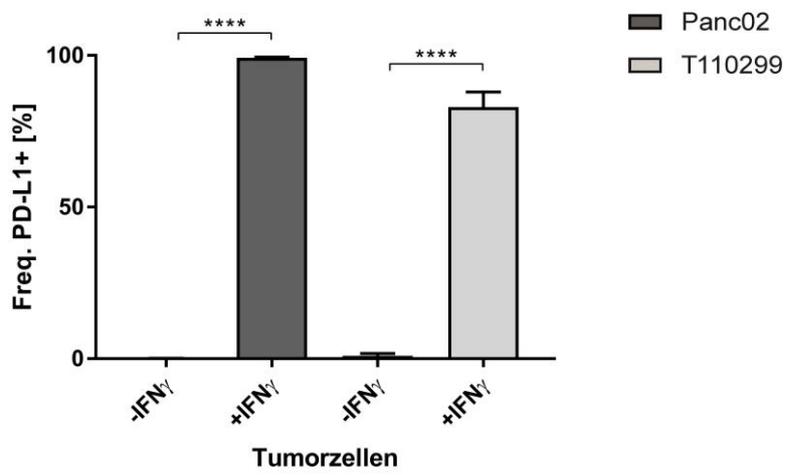
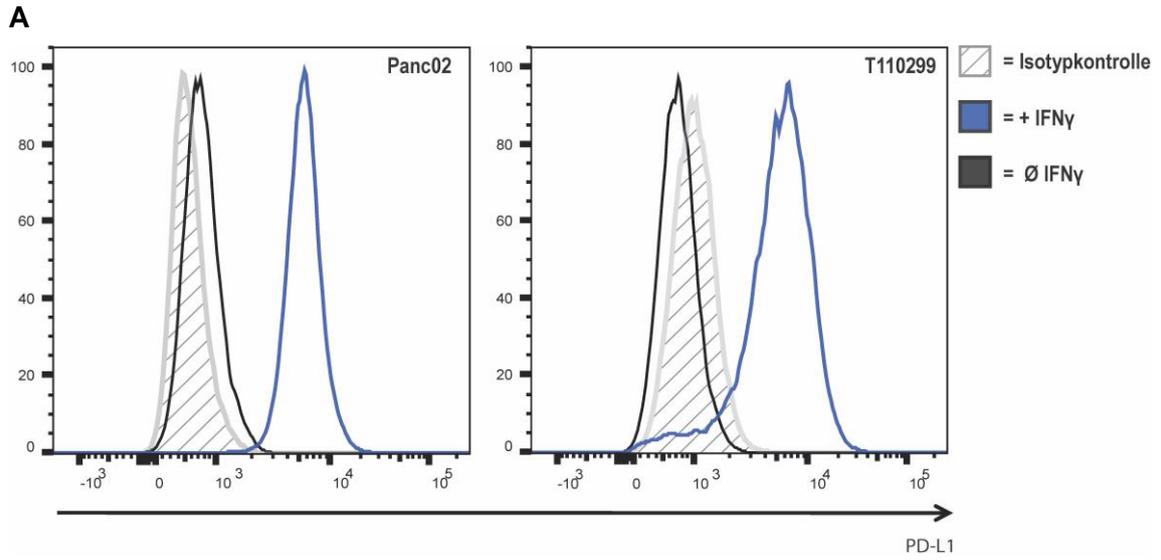
3.2.3 T-Zellen aus dem Tumor zeigen eine höhere PD-1-Expression als T-Zellen aus Milz und Blut

Tumore, Milzen und Blutproben von Mäusen wurden nach Tumorinduktion mit T110299-Zellen entnommen und gemäß Protokoll aufbereitet. Durchflusszytometrisch zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an PD-1⁺ T-Zellen aus dem Tumor im Vergleich zu T-Zellen aus der Milz (CD4: $p < 0,0001$, CD8: $p < 0,0001$) sowie im Vergleich zu T-Zellen aus dem Blut (CD4: $p < 0,0001$, CD8: $p < 0,0001$) (Abb. 3.2.B). Somit scheint das Mikromilieu im Tumor die PD-1 Expression auf T-Zellen zu induzieren.

3.2.4 MDSCs aus dem Tumor zeigen eine höhere PD-L1-Expression als MDSCs aus der Milz

Tumore und Milzen von Mäusen wurden nach subkutaner Tumorinduktion mit Panc02- bzw. T110299-Zellen entnommen und gemäß Protokoll aufbereitet. Durchflusszytometrisch zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an PD-L1⁺ PMN-MDSCs sowie M-MDSCs aus Panc02-Tumoren (PMN-MDSCs: $p = 0.0024$; M-MDSCs $p < 0.0001$) bzw. T110299-Tumoren (PMN-MDSCs $p = 0.0013$; M-MDSCs $p = 0.0009$) im Vergleich zu PMN-MDSCs und M-MDSCs aus der Milz (Abb.3.2.C).

Zusammenfassend konnte die Expression der Checkpointmoleküle PD-1 bzw. PD-L1 auf T-Zellen bzw. Tumorzellen und MDSCs gezeigt werden. Zudem fand sich eine Hochregulation der Expression von PD-1 auf T-Zellen und von PD-L1 auf MDSCs im Tumor. Somit werden die Zielstrukturen für eine PD-1-Blockade in beiden Tumormodellen in vergleichbarem Umfang exprimiert.



C

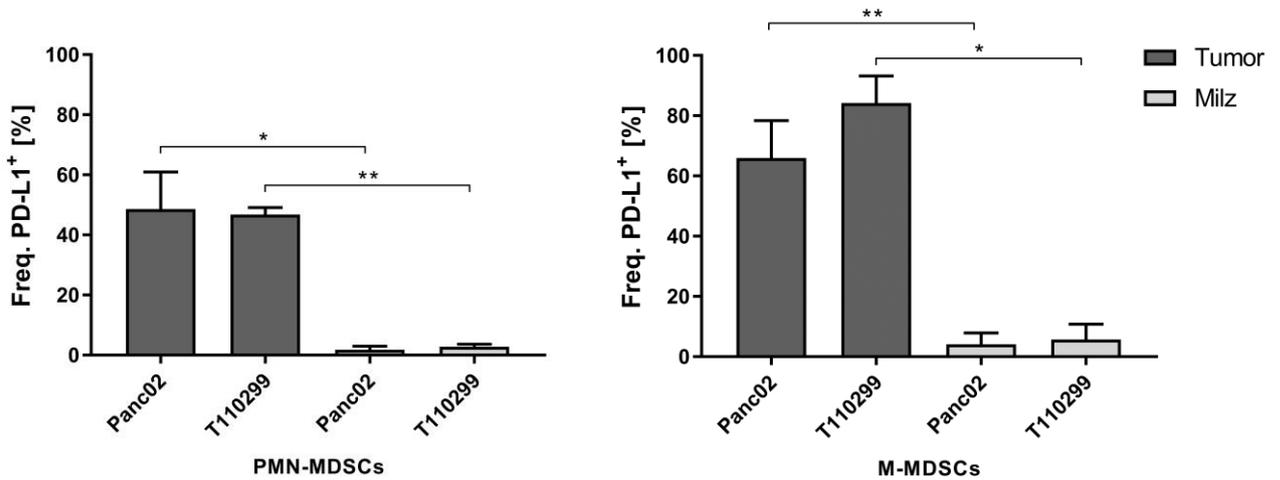


Abb. 3.2. PD-1 und PD-L1-Expression auf Tumorzellen, T-Zellen und MDSCs

A. Tumorzellen wurden in An- bzw. Abwesenheit von IFN γ (1000 U/ml) für 16 h kultiviert und die Expression von PD-L1 durchflusszytometrisch erfasst. Dargestellt sind Mittelwerte + SD aus zwei unabhängigen Versuchen bzw. repräsentative Histogramme. **B.** Tumore, Milzen und Blutproben von C57BL/6-Mäusen wurden nach subkutaner Tumorinduktion mit T110299-Zellen bei Erreichen einer Tumorgroße von 100 mm² entnommen und die Expression von PD-1 auf T-Zellen durchflusszytometrisch erfasst. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM (n=5). **C.** Tumore und Milzen von C57BL/6-Mäusen wurden nach subkutaner Tumorinduktion bei Erreichen einer Tumorgroße von 100 mm² entnommen und die PD-L1-Expression auf MDSCs durchflusszytometrisch erfasst. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM von Duplikaten eines repräsentativen Experimentes aus zwei (T110299) bzw. drei (Panc02) unabhängigen Versuchen.

* = p < 0,05, ** = p < 0,01, **** = p < 0,0001

3.3 Effekte der α PD-1-Blockade auf Verteilung und Phänotyp von MDSCs

Nachdem in vorherigen Experimenten das Überleben nach α PD-1-Therapie im murinen Pankreaskarzinommodell sowie die Expression von Checkpointmolekülen auf den Zielzellen untersucht wurden, wurden in den folgenden Versuchen die Effekte einer α PD-1-Therapie auf Anzahl und Expression phänotypischer und funktioneller Marker von MDSCs im subkutanen Panc02-Tumormodell *in vivo* untersucht. Die Therapie erfolgte gemäß dem dargestellten Schema (Abb. 3.3.A.)

3.3.1 Reduktion von PMN-MDSCs im Tumor nach α PD-1-basierter Therapie

Tumore und Milzen wurden entnommen, aufgearbeitet und der Anteil von PMN- bzw. M-MDSCs von allen CD45⁺-Zellen nach α PD-1-basierter Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe durchflusszytometrisch bestimmt. Im Tumor verringerte sich der Anteil von PMN-MDSCs nach α PD-1-Therapie signifikant im Vergleich zur Isotypkontrolle ($p = 0,0323$), während sich keine Veränderung des Anteils an M-MDSCs zeigte (Abb. 3.4.B). In den Milzen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der prozentualen MDSC-Anteile durch die Therapie.

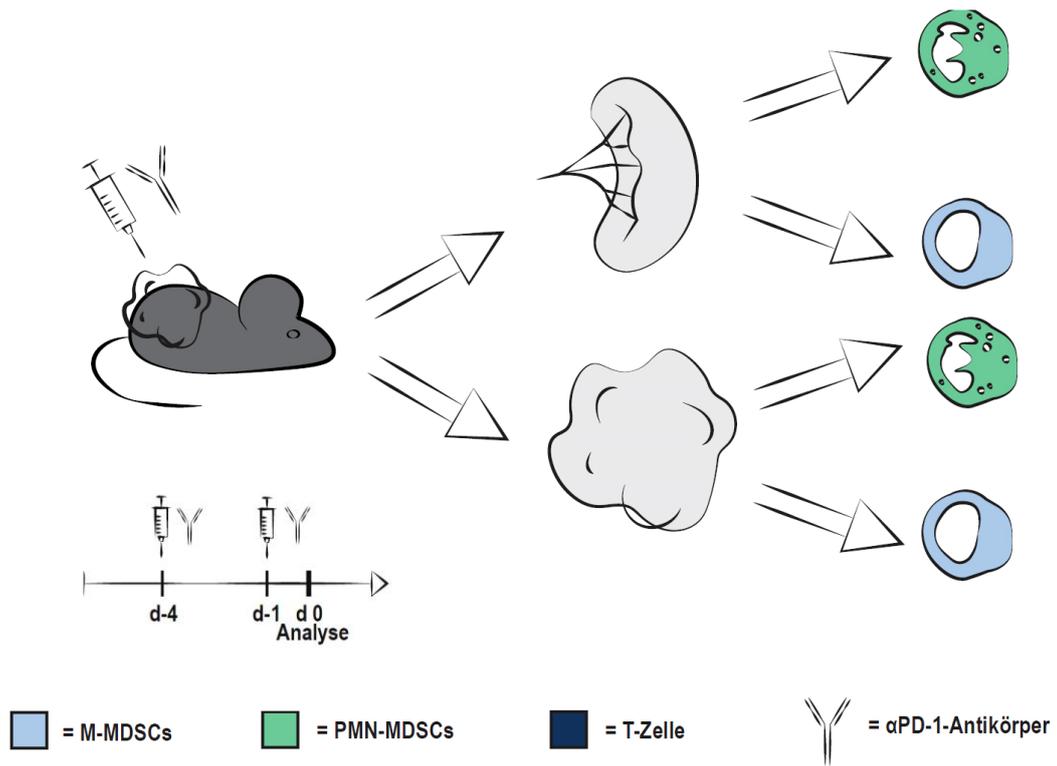
3.3.2 Keine signifikante Veränderung der Proteinexpression phänotypischer und funktioneller Marker von MDSCs nach α PD-1-basierter Therapie

Um Veränderungen im Phänotyp von MDSCs in Bezug auf ihre Suppressivität zu untersuchen, wurden Marker mit Relevanz für deren suppressive Funktion durch Nährstoffdepletion, oxidativen Stress, Beeinträchtigung von Lymphozytenfunktion und -viabilität sowie die Etablierung und Aufrechterhaltung eines immunsuppressiven Tumormilieus herangezogen.

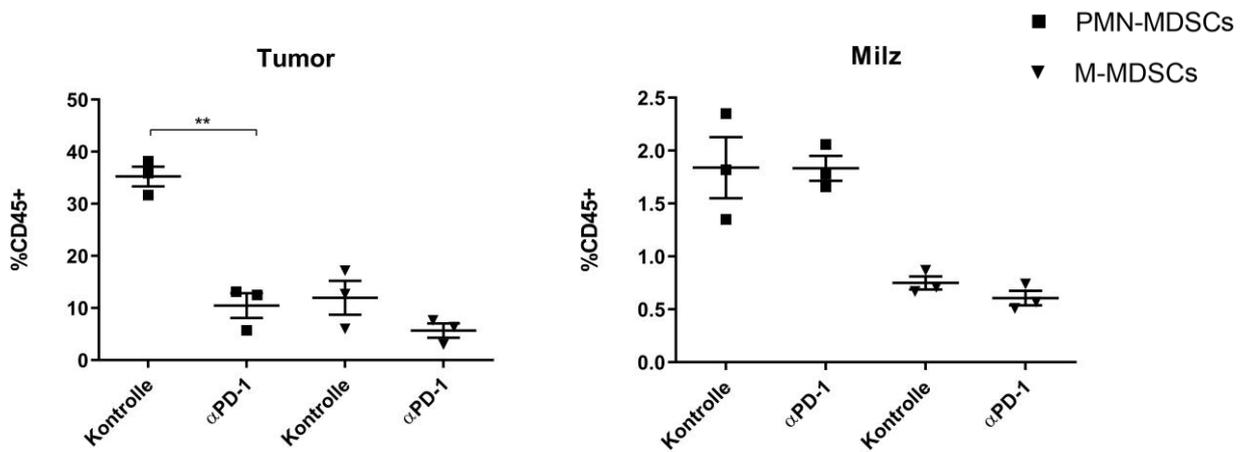
Die Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Molekülen von PMN-MDSCs und M-MDSCs aus der Milz nach α PD-1-basierter Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der medianen Fluoreszenzintensität der für die Suppressivität von MDSCs relevanten untersuchten Marker Arginase 1 (Arg1), Fas-Rezeptor (FAS), Galectin 9 (Gal9), *Major Histocompatibility Complex-I* (MHC-I), NO-Synthase (Nos), NADPH-Oxidase (Nox), PD-L1 und *Vascular Endothelial Growth Factor α* (VEGF α) zwischen Therapie- und Kontrollgruppe (Abb. 3.4.C). Zell-spezifische Unterschiede waren hingegen augenscheinlich. Im Vergleich zu PMN-MDSCs exprimierten M-MDSCs mehr ARG1, FAS, GAL9, MHC-I und PD-L1. PMN-MDSCs hingegen exprimierten höhere Level von NOX, NOS und VEGF α .

Zusammenfassend weisen diese Versuche zellspezifische Unterschiede in der Expression immunsuppressiver Marker zwischen PMN- und M-MDSCs auf. Die Expression dieser Marker scheint zumindest auf Proteinebene nicht durch die therapeutische PD1-Blockade beeinflusst zu werden.

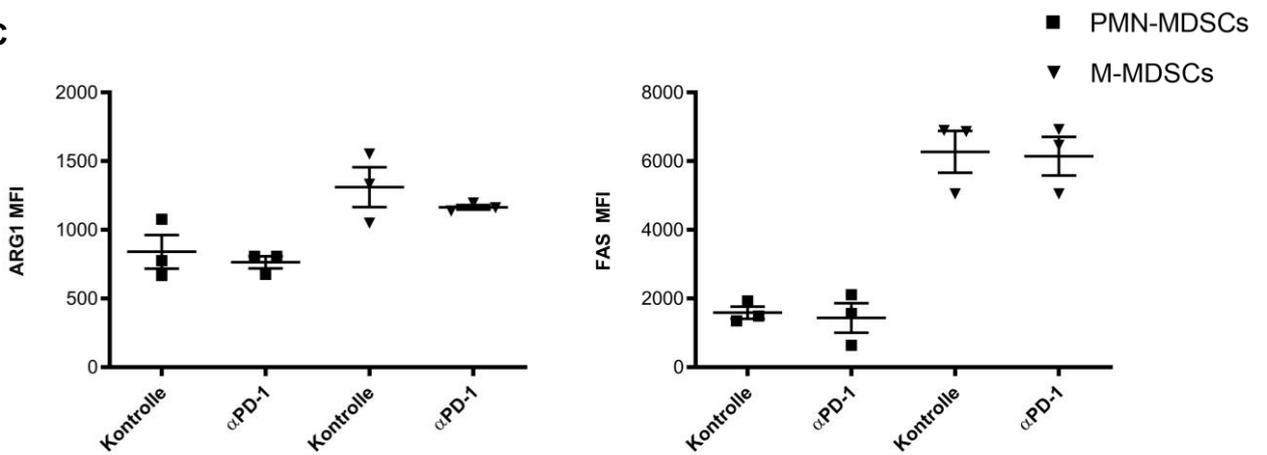
A



B



C



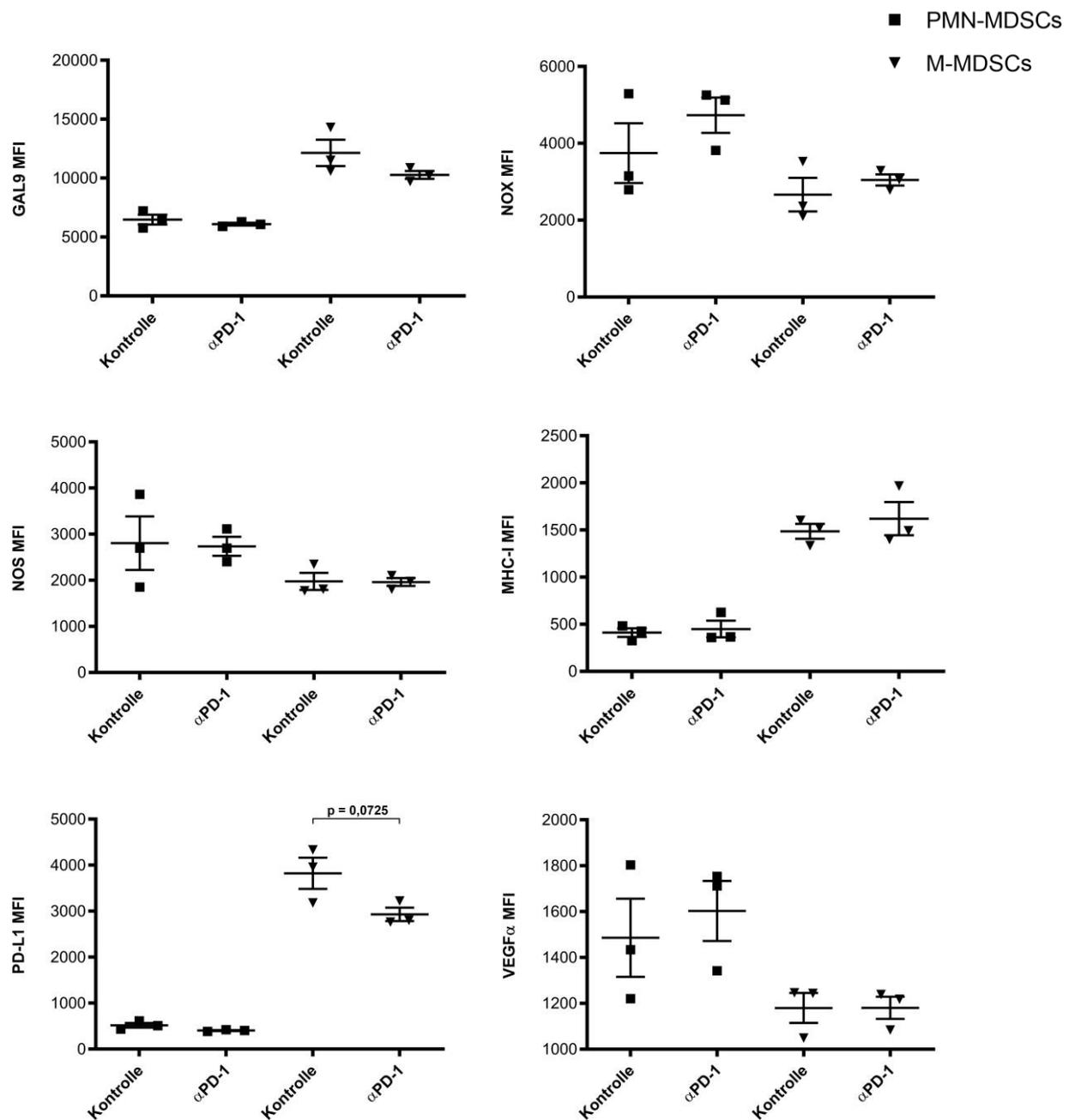


Abb. 3.3. α PD-1-Therapie hat keinen Einfluss auf die Proteinexpression ausgewählter Suppressionsmarker von MDSCs im subcutanen Panc02-Mausmodell

A-C. C57BL/6-Mäuse erhielten nach subcutaner Tumorinduktion mit Panc02-Zellen intraperitoneale Injektionen mit 2x250 μ g α PD-1-Antikörper bzw 2x250 μ g IgG2a κ -Isotypkontrolle vier Tage und einen Tag vor Organentnahme. Tumore und Milzen wurden entnommen und aufgearbeitet. **B.** Die Anteile von PMN- und M-MDSCs an CD45⁺ Immunzellen wurden durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM. **C.** Die Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Molekülen von PMN-MDSCs und M-MDSCs aus der Milz wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM.

3.4 Effekte der α PD-1-basierten Therapie auf Genexpression relevanter Suppressions- und Funktionsmarker von MDSCs

3.4.1 mRNA-Expression relevanter Suppressions- und Funktionsmarker von MDSCs nach α PD-1-basierter Therapie

Um einen potenziellen Einfluss der α PD-1-Therapie auf die immunsuppressiven Eigenschaften von MDSCs detaillierter zu analysieren, wurde ein Panel von bekannten immunmodulierenden Molekülen in aufgereinigten MDSC-Populationen mittels qRT-PCR untersucht. Hierzu wurden Tumore und Milzen entnommen, aufgearbeitet und die magnetisch angereicherte CD11b⁺ myeloide Zellsuspension durchflusszytometrisch in PMN-MDSCs und M-MDSCs sortiert (FACS). Durch das kombinierte Aufreinigungsverfahren von MACS und FACS konnte ein hoher Reinheitsgrad der MDSC-Populationen erzielt werden (Abb. 3.4.A).

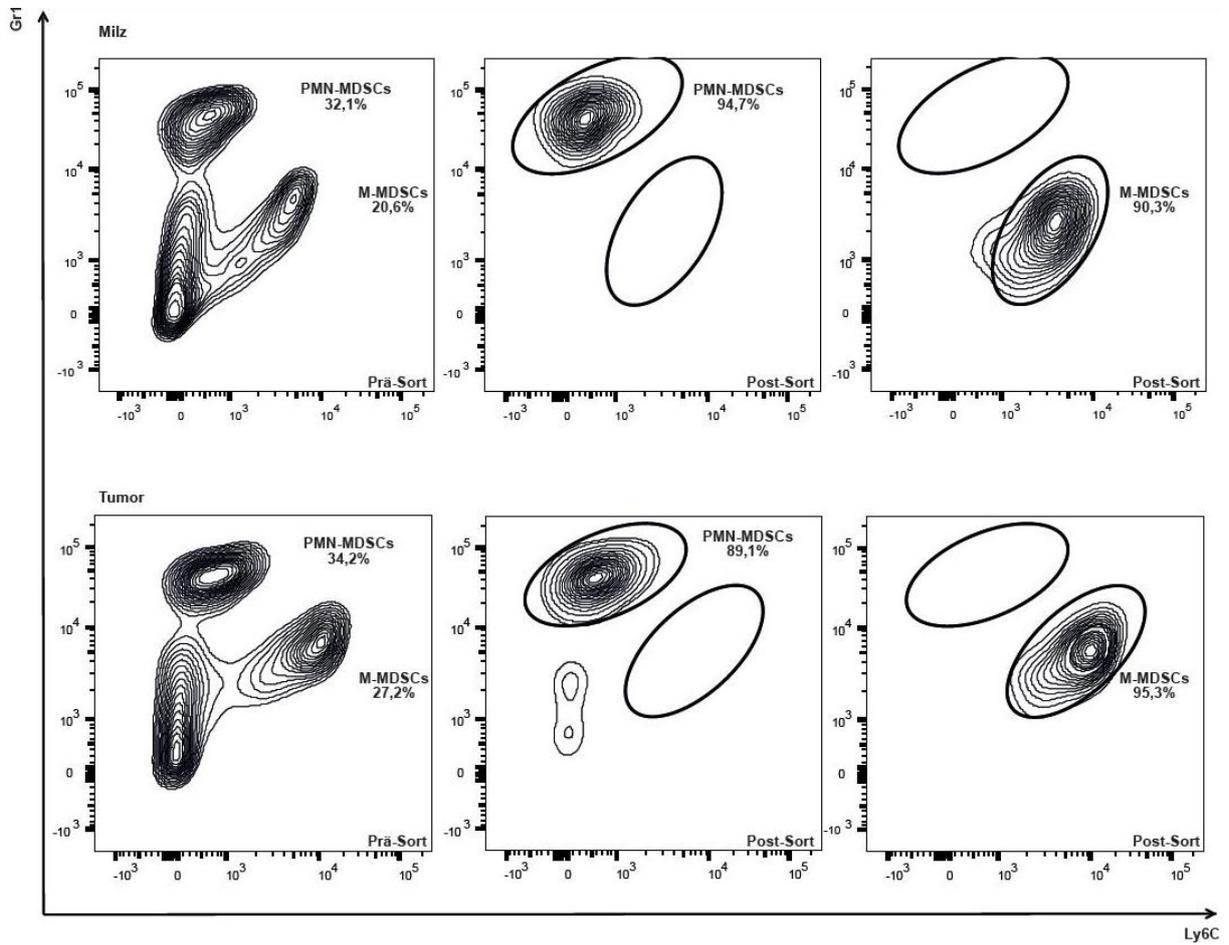
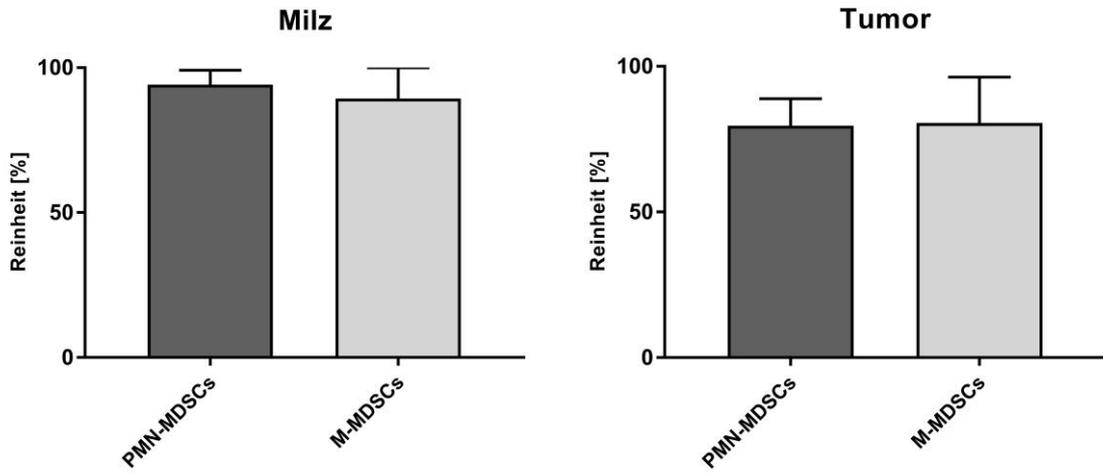
Im Anschluss wurde die mRNA isoliert und in cDNA transkribiert. Aufgrund der relativ geringen mRNA Ausbeute aus den hochaufgereinigten MDSC-Populationen wurde eine im Labor bereits etablierte und validierte Präamplifikation der cDNA durchgeführt. Die relative Genexpression der suppressiven Marker auf mRNA-Ebene wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Eine Gruppierung der untersuchten Gene erfolgte in die Kategorien Apoptose, Chemotaxis/Inflammation, IFN-Signalweg und Immunregulation (siehe Tabelle 3.4). Bezüglich der relativen Genexpression der untersuchten Gene bezogen auf β -Actin bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe (Abb. 3.4.B und suppl. Abb. 1 im Anhang).

Tab. 3.4: Relevante Suppressions- und Funktionsmarker von MDSCs

Apoptose	Chemotaxis/Inflammation	IFN-Signalweg	Immunregulation
FAS	ADAM17	IFN $\alpha/\beta/\gamma$	Arg1/2
FAS-L	CCL 2/5/17	MDA5	CD206
	CXCL10	RIG-I	Gal9
	IL-1 β /6/10/13/23 α	STAT3/5B	Nos2
	Myd88		PD-L1
			TGF β 1
			VEGF α

ADAM17 = A *disintegrin and metalloproteinase domain 17*; Arg1/2 = Arginase 1/2; CCL 2/5/17 = C-C *motif chemokine ligand 2/5/17*; CD206 = Mannose Rezeptor; CXCL10 = C-X-C *motif chemokine ligand 10*; FAS/FAS-L = Fas-Rezeptor/ Fas-Ligand; Gal9 = Galectin 9; IL-1 β /6/10/13/23 α = Interleukin 1 β /6/10/13/23 α ; MDA5 = Melanom-Differenzierungsantigen 5; Myd88 = *myeloid differentiation primary response 88*; Nos2 = *Nitric oxide synthase 2*; PD-L1 = *Programmed cell death 1 ligand 1*; RIG-I = *retinoic acid inducible gene I*; STAT3/5B = *Signal transducer and activator of transcription 3/5B*; TGF β 1 = *Transforming Growth Factor β 1*; TNF = Tumornekrosefaktor; VEGF α = *Vascular Endothelial Growth Factor α*

A

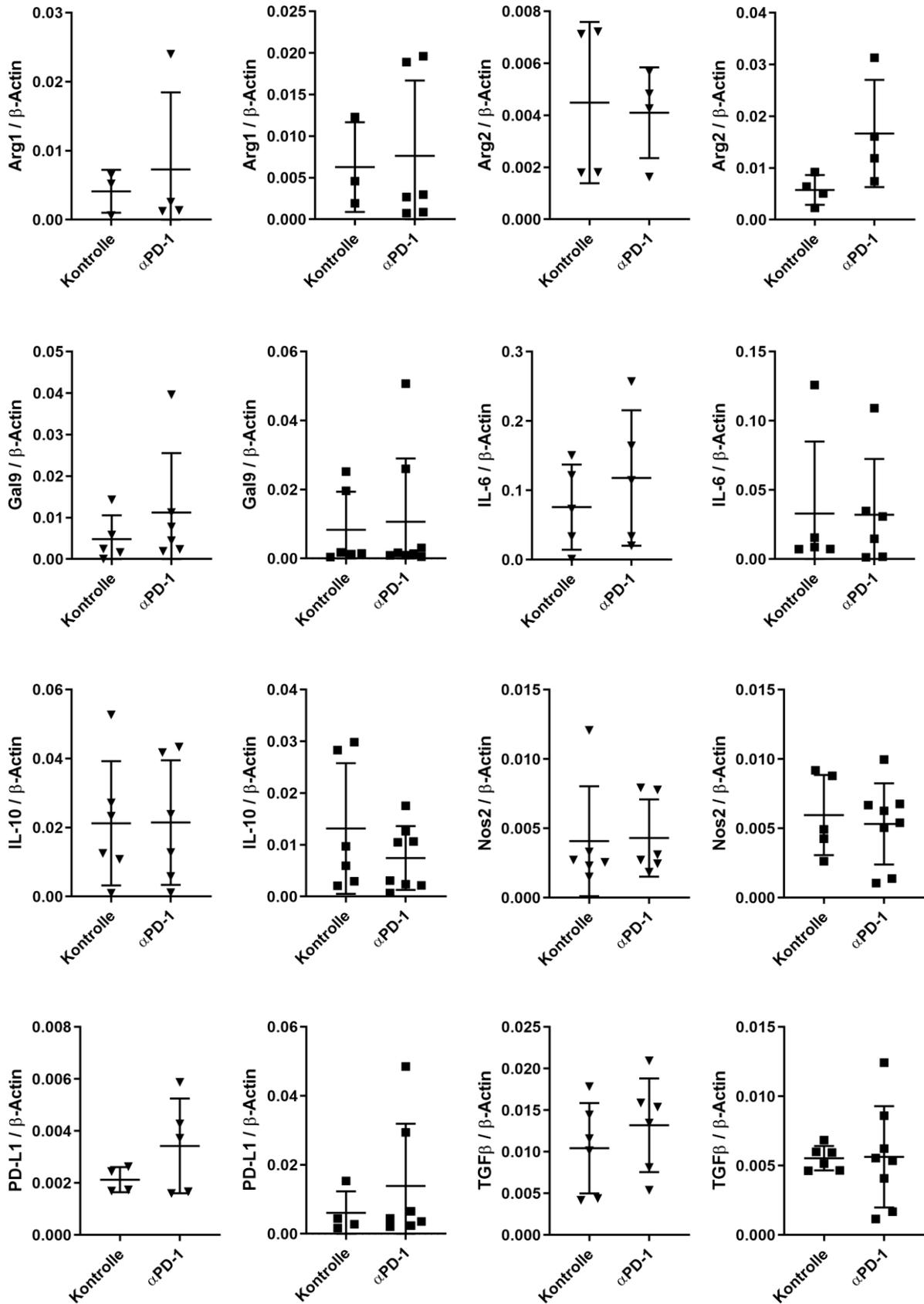


B

Tumor

▼ M-MDSCs

■ PMN-MDSCs



Milz

▼ M-MDSCs

■ PMN-MDSCs

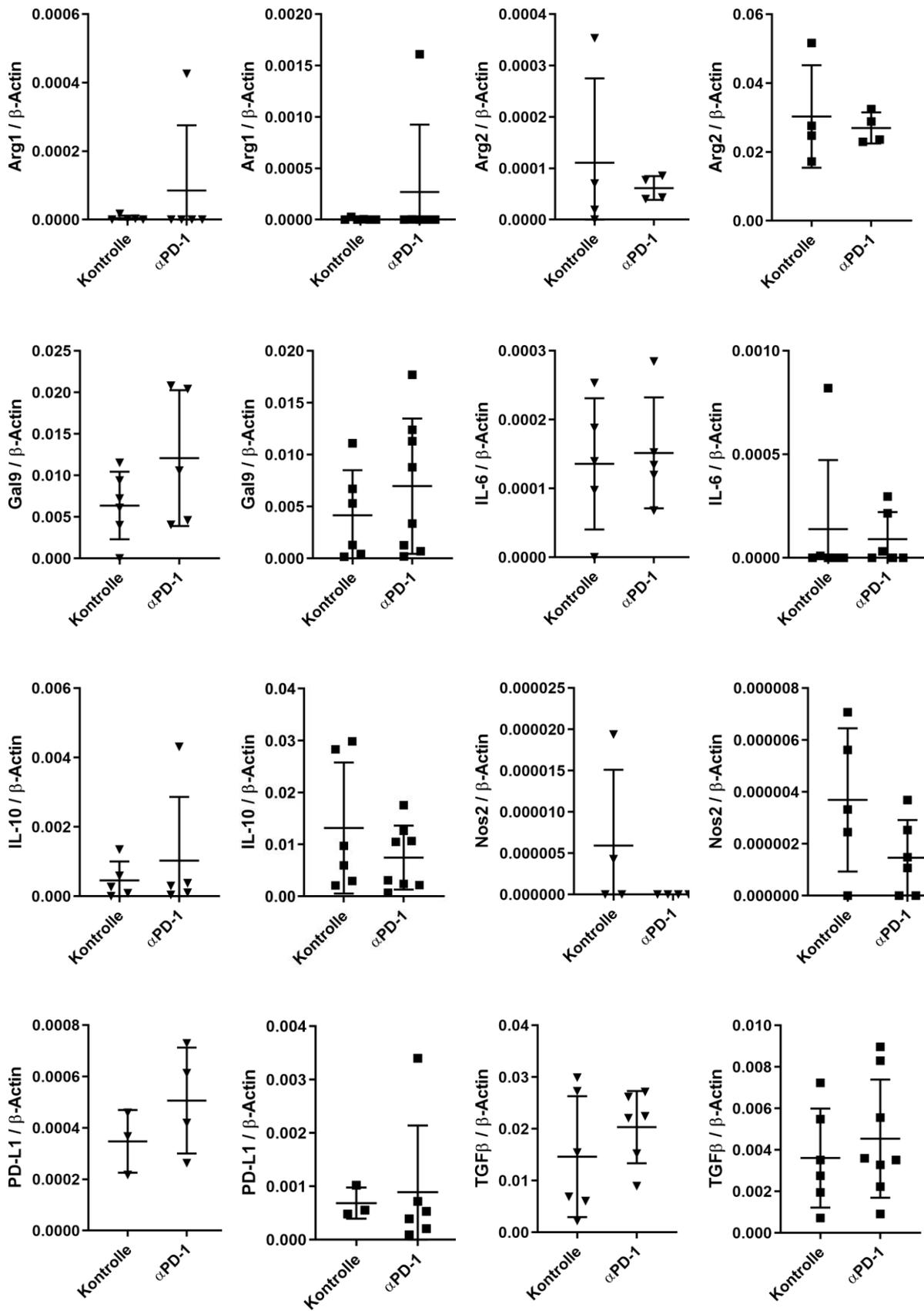


Abb. 3.4. α PD-1-Therapie hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression ausgewählter Suppressionsmarker im subkutanen Panc02-Mausmodell

A. Dargestellt ist die Reinheit von PMN- und M-MDSC Populationen vor und nach durchflusszytometrischer Aufreinigung (FACS) von CD11b⁺ Zellen, die zuvor mittels MACS angereichert wurden. **B.** Aus den hochangereicherten Zellsuspensionen wurde die RNA isoliert und die Genexpression bestimmter Suppressionsmarker auf mRNA-Ebene nach Präamplifikation der cDNA mittels qRT-PCR bestimmt (weitere analysierte Gene finden sich in suppl. Abb. 1 im Anhang). Dargestellt sind Mittelwerte + SEM.

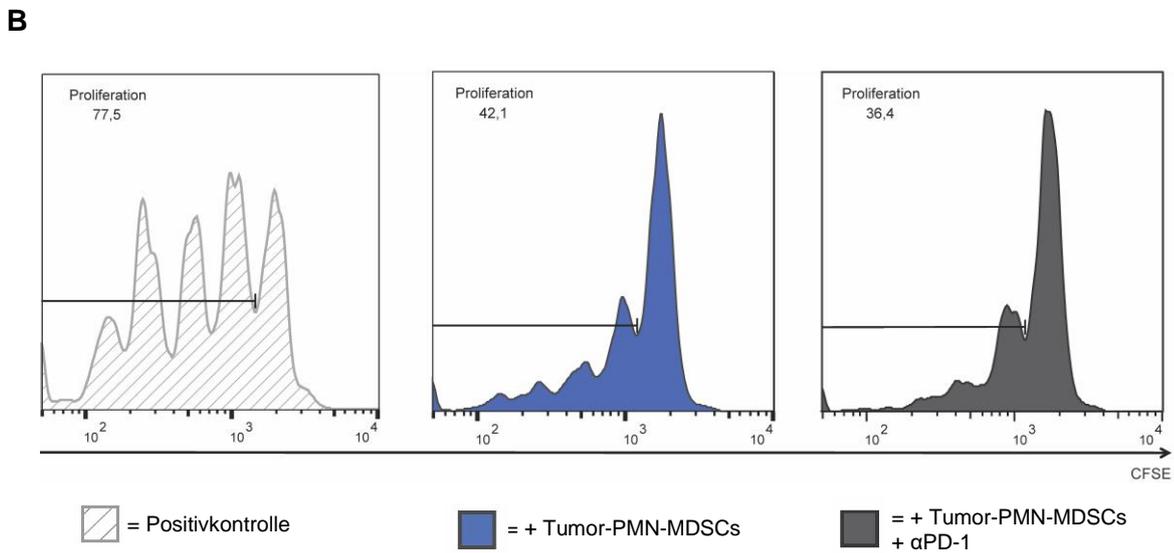
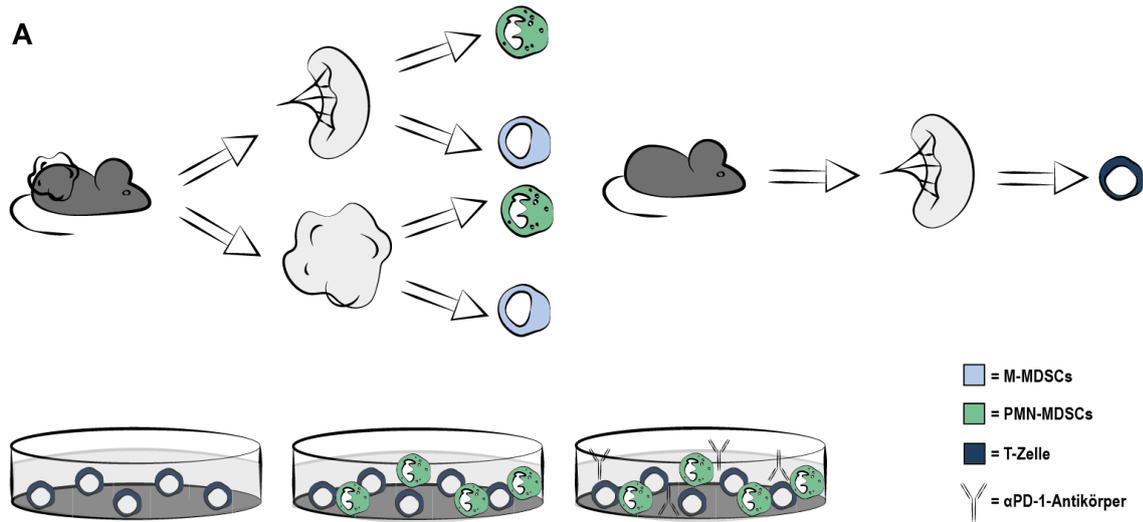
3.5 Effekte der α PD-1-basierten Therapie auf die T-Zell-Suppression durch MDSCs**3.5.1 Einfluss einer Inkubation von MDSCs mit α PD-1-Antikörpern auf deren T-Zell-Suppressivität in MDSC/T-Zell-Kokulturen**

Abschliessend sollte der Einfluss einer α PD-1-Blockade auf die suppressive Funktion von MDSCs *in vitro* analysiert werden. Die Beurteilung der Suppressivität der MDSCs erfolgte anhand eines T-Zell-Suppressionsassays (Abb. 3.5.A).

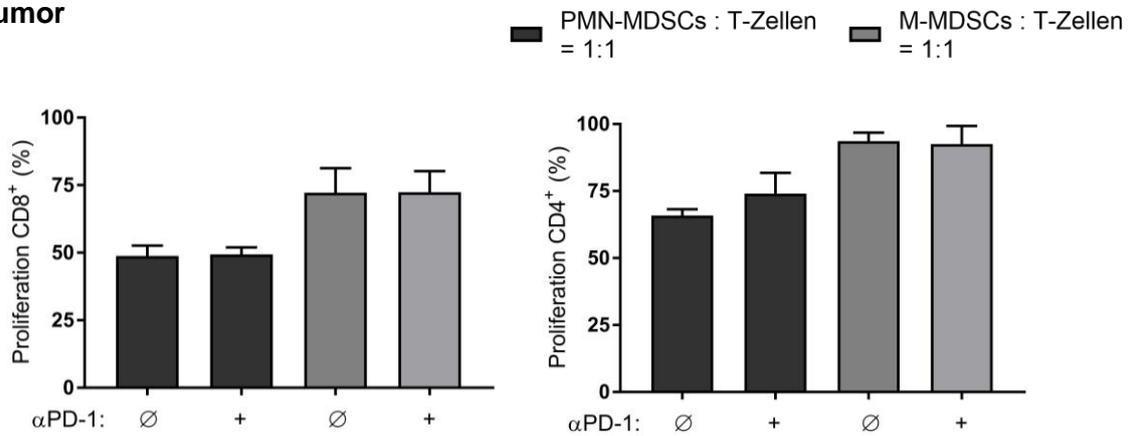
Beispielhaft wird die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen als Histogramm nach Aktivierung mit anti-CD3/CD28 Beads in Ab- bzw. Anwesenheit von Tumor-PMN-MDSCs gezeigt, die entweder nicht oder mit α PD-1-Antikörpern behandelt wurden (Abb. 3.5.B).

Wie erwartet hatte die Co-Kultur mit MDSCs einen hemmenden Effekt auf die T-Zellproliferation. Die Behandlung der MDSCs mit dem α PD-1-Antikörper hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die T-Zell-Proliferationsrate, weder unter Zugabe von Tumor-PMN-MDSCs, Tumor-M-MDSCs, Milz-PMN-MDSCs oder Milz-M-MDSCs (Abb. 3.5.C).

Zusammenfassend scheint der durch PD-1-Blockade beobachtete Therapieeffekt in den murinen PDAC Modellen kein MDSC-vermittelter Effekt zu sein, da a) die suppressiven Markermoleküle von MDSCs durch die Therapie nicht beeinflusst werden und b) eine direkte PD-1 Blockade im T-Zellsuppressionsassay keinen günstigen Einfluss auf die T-Zellaktivierung zeigt.



Tumor



Milz

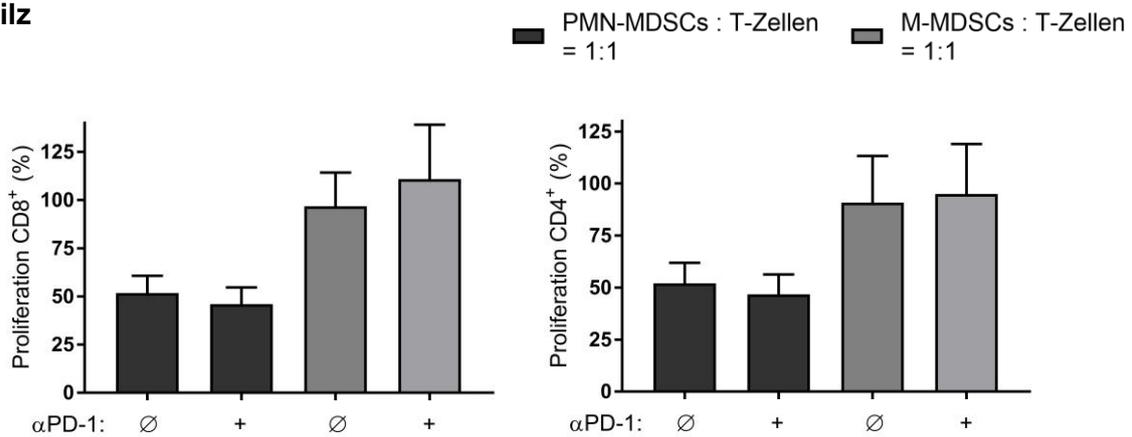


Abb. 3.5. α PD-1-Therapie hat keinen Einfluss auf die Hemmung der T-Zell-Proliferation durch MDSCs *ex vivo* im subkutanen PDAC-Mausmodell

A. Versuchsaufbau: T-Zellen wurden aus Milzen unbehandelter C57BL/6-Mäuse isoliert, mit CFSE angefärbt und anschliessend mit MDSCs aus Panc02-tumortragenden Mäusen für 3 Tage im Verhältnis 1 : 1 co-kultiviert. Die MDSCs wurden in der Therapiegruppe vor der Co-Kultur für 1 h mit 1 μ g/ml α PD-1-Antikörper inkubiert. **B.** Dargestellt ist ein Histogramm der CFSE-Verdünnung bei der Proliferation von CD8⁺ T-Zellen eines repräsentativen Experimentes aus drei unabhängigen Versuchen. **C.** Quantifizierung der T-Zellproliferation mit bzw. ohne Zugabe von α PD-1-Antikörpern. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM aus drei unabhängigen Versuchen.

4. Diskussion

4.1 Einfluss einer α PD-1-basierten Therapie auf das Überleben und die Immunantwort im murinen Pankreaskarzinommodell

4.1.1 Überleben im orthotopen Panc02- und T110299-Tumormodell

In dieser Arbeit konnte ein verlängertes Überleben durch eine α PD-1-basierte Immuntherapie im orthotopen Panc02-Tumormodell gezeigt werden. Ebenso war das Überleben in der Therapiegruppe im orthotopen T110299-Pankreaskarzinommodell signifikant verlängert, wenn auch deutlich weniger ausgeprägt als im Panc02-Modell. Die Datenlage zu einem Therapieansprechen auf eine Blockade der PD-1/PD-L1-Achse im murinen orthotopen Panc02-Pankreaskarzinommodell ist uneinheitlich. Während einzelne Studien ein verringertes Tumorstadium durch Therapie mit α PD-1-Antikörpern demonstrieren, konnte in anderen Arbeiten kein Überlebensvorteil durch eine PD-L1-Blockade festgestellt werden [70] [71] [72]. Gründe hierfür könnten in der Dosierung, Auswahl des blockierenden Antikörpers und im Therapieregime liegen. Auch tumorzellintrinsic Effekte durch die *in vitro* Kulturbedingungen sind möglich. Interessanterweise konnte im KPC-Modell kein Überlebensvorteil durch eine alleinige α PD-1-Therapie nachgewiesen werden [73] [74]. Da die T110299-Zelllinie ursprünglich aus einem KPC-Tumor generiert wurde, könnten genetische Unterschiede in der molekularen Karzinogenese für das schlechtere Therapieansprechen im Vergleich zu Panc02 verantwortlich sein. Letztere Zelllinie wurde durch chemische Karzinogenese generiert [32]. Hinzu kommt, dass Transplantationsmodelle, wie beispielsweise die in dieser Arbeit untersuchten Modelle Panc02 und T110299, zu einer lokalen Inflammation am Injektionsort führen, was sich auf die Immunogenität des Tumors auswirken könnte. Dies ist bei der Evaluation von Immuntherapien in diesen Modellen zu beachten. Das humane PDAC ist gemäß der aktuellen Studienlage weitgehend resistent gegenüber einer Monotherapie mit Checkpointinhibitoren [75] [76] und ähnelt somit dem spontanen KPC-Modell.

Das menschliche Pankreaskarzinom zeichnet sich durch eine geringe Mutationslast und Antigenität sowie ein desmoplastisches Stroma mit Infiltration von immunsuppressiven Immunzellen aus [77]. Es unterscheidet sich damit deutlich von der hypermutierten murinen Panc02-Zelllinie, welche einen geringeren Stromaanteil aufweist [11]. Wesentlich besser bildet das ursprünglich aus KPC-Mäusen generierte T110299-Modell mit Mutationen in verbreiteten Tumorsuppressorgenen und Onkogenen das humane PDAC ab. Allerdings entspricht das Tumormilieu in Implantationsmodellen nicht den komplexen Bedingungen,

die sich in Pankreaskarzinompatienten finden [73]. Erschwerend kommt im humanen PDAC eine größere Heterogenität durch verschiedene Mutationen hinzu, welche in dieser Komplexität in einzelnen KPC-Zelllinien nicht suffizient abgebildet werden können [22]. Ein unterschiedlicher Therapieeffekt einer PD-1-Blockade im Vergleich der verschiedenen Tumormodelle untereinander und mit dem humanen PDAC ist vor den genannten Hintergründen nachvollziehbar.

Jedoch ist auch innerhalb eines Modells, wie dem orthotopen Panc02-Tumormodell, das Ansprechen auf eine α PD-1-basierte Therapie im Vergleich verschiedener Publikationen nicht einheitlich. Neben unterschiedlichen Therapieregimes ist auch ein Einfluss des Mikrobioms auf das Tumormilieu zu bedenken. Sowohl für das orthotope Modell einer KPC-basierten Zelllinie als auch für das Pan02-Tumormodell konnte ein Zusammenhang zwischen Tumormilieu und Mikrobiom aufgezeigt werden. Ebenso ließen sich Veränderungen in Zahl und Funktionalität von Immunzellen zugunsten eines proinflammatorischen Phänotyps nachweisen. Interessanterweise verbesserte eine Ablation des Mikrobioms der Versuchstiere durch Antibiotikatherapie das Therapieansprechen auf eine präemptive α PD-1-Therapie [78]. Der Zusammenhang von Mikrobiom und Immuntherapie ist aktuell Gegenstand der Forschung und stellt neue Kombinationstherapien in Aussicht.

4.1.2 Immunvermittelte Tumorkontrolle im orthotopen Panc02-Tumormodell

In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass ein Teil der geheilten Versuchstiere aus der α PD-1-Therapiegruppe nach Tumorreexposition (sog. *rechallenge*) kein erneutes Tumorstadium zeigen. Dies deutet darauf hin, dass ein immunologisches Gedächtnis durch eine α PD-1-basierte Checkpointblockade im orthotopen Panc02-Tumormodell induziert wird.

Die Ausbildung eines Immunologischen Gedächtnisses erfolgt überwiegend durch Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Verschiedene Populationen von T-Gedächtniszellen sind an der Erkennung und Elimination von Tumorzellen, auch nach einer initial erfolgreichen Therapie und Tumorstadium, beteiligt [79]. Eine Checkpointblockade kann sowohl direkt durch verminderte T-Zell-Anergie, als auch indirekt Einfluss auf die Entstehung und Funktionalität von T-Gedächtniszellen nehmen. So induziert ein selektiver *Knockout* von PD-1 auf myeloiden Zellen im murinen Melanommodell T-Gedächtniszellen mit einer gesteigerten Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN γ oder IL-17 [79] [80].

Der Einsatz eines α PD-1-Antikörpers verlängerte auch das Überleben der Versuchsmäuse im orthotopen T110299-Tumormodell signifikant. Ein Langzeitüberleben von

Versuchstieren in den verschiedenen Therapiegruppen ist eine Voraussetzung für die Durchführung von Tumorreexpositionen. Da allerdings keine Remission mit Langzeitüberlebenden induziert werden konnte, lässt sich anhand der in dieser Arbeit gezeigten Daten keine Aussage zur immunvermittelten Tumorkontrolle im T110299-Tumormodell treffen.

Eine immunvermittelte Tumorkontrolle durch den Einsatz von Checkpointinhibitoren konnte auch für andere Tumorentitäten gezeigt werden. So wurde die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses nach Therapie mit α PD-L1-Antikörpern beispielsweise für das Blasenkarzinom beschrieben [81]. In vielen experimentellen Arbeiten zur Tumorthherapie zeigte eine alleinige α PD-1-basierte Therapie jedoch keinen Überlebensvorteil gegenüber den Kontrollgruppen, sodass die Daten zu Reexpositionen oft nur von Versuchsmäusen, die eine Kombination verschiedener Therapeutika erhielten, stammen [82] [83].

Eine direkte Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit gezeigten Daten mit der Literatur ist aufgrund der Heterogenität der Datenlage nicht gegeben.

4.2 Expression von Checkpointmolekülen auf Tumorzellen, T-Zellen und MDSCs in murinen PDAC-Modellen

4.2.1 Steigerung der basalen PD-L1-Expression auf Tumorzellen durch IFN γ

Während sich *in vitro* auf den Zelllinien Panc02 und T110299 basal keine Expression von PD-L1 auf der Zelloberfläche nachweisen ließ, war diese nach Stimulation mit IFN γ signifikant erhöht.

Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit ließ sich durch Stimulation mit IFN γ eine verstärkte PD-L1-Expression auch auf Tumorzellen aus dem murinen KPC-Modell *in vitro* induzieren [76]. Im Tumormilieu wird IFN γ überwiegend von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen sezerniert und spielt sowohl für Immunevasion als auch antitumorale Immunität eine entscheidende Rolle [84]. IFN γ lässt sich in murinem orthotopen Panc02-H7-Tumorgewebe in höherer Konzentration nachweisen als in gesundem Pankreasgewebe [84]. Die Zelllinie Panc02-H7 wurde aus Lebermetastasen Panc02-tumortragender Tiere generiert und zeichnet sich durch aggressives Wachstum und ausgeprägte Metastasierung aus [84]. Einzelne Studien liefern Hinweise auf eine basale PD-L1-Expression von Panc02-Tumorzellen *in vivo*, ohne diese jedoch genauer zu quantifizieren [70] [73] [74] [77]. Diesbezüglich könnte Immunzell-sezerniertes IFN γ in der

TME eine wichtige Rolle spielen, um ein immunsuppressives Milieu aufrechtzuerhalten. Allerdings legen Versuche anderer Arbeitsgruppen mit *Knockout*-Mäusen nahe, dass IFN γ im KPC-Modell *in vivo* keine große Rolle für die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen spielt [73]. Allerdings können neben Typ II-Interferonen wie IFN γ auch Typ I-Interferone wie IFN α oder IFN β die Expression von PD-L1 induzieren [85].

Für das KPC-Modell ist eine moderate PD-L1-Expression auf über 40 % der Tumorzellen beschrieben [73]. Die Expression von PD-L1 auf Tumorzellen ist nicht zwingend prädiktiv für ein Therapieansprechen bei Blockade des PD-1/PD-L1 Signalweges, jedoch scheint eine starke PD-L1-Expression im humanen Pankreaskarzinom prognostisch ungünstig zu sein und mit einem geringeren Überleben einherzugehen [86]. Interessanterweise kann ein anhaltendes Typ I-Interferon-*Signaling* zu einer Therapieresistenz gegenüber einer PD-1-Blockade führen und korreliert mit der Akkumulation von myeloiden Zellen sowie Tregs im Tumormilieu [85]. Es wurde berichtet, dass Tumore mit starker PD-L1-Expression mit einem immunsuppressiveren Milieu durch eine höhere Anzahl an MDSCs, Tregs und TAMs einhergehen [17]. Ob das Ausmaß der Expression von PD-L1 auf Tumorzellen im Panc02- bzw. T110299-Tumormodell sich von der Expression im KPC-Modell sowie im humanen PDAC unterscheidet und inwieweit diese Expression prädiktive und prognostische Vorhersagen zulässt, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.2.2 Hochregulation von PD-1 bzw. PD-L1 auf T-Zellen und MDSCs im Tumormilieu

Eine verstärkte Expression von PD-1 auf T-Zellen im Tumor im Vergleich zu T-Zellen aus der Milz tumortragender Tiere ist in der Literatur beschrieben [87] [73]. Diese Daten konnten in dieser Arbeit für T-Zellen aus Tumor, Milz und Blut im T110299-Tumormodell bestätigt werden.

Analog zur Expression von PD-1 auf T-Zellen ist sowohl im KPC-Modell als auch in Mausmodellen für Melanom, Kolonkarzinom, Lungen- und Brustkrebs eine Hochregulation von PD-L1 auf MDSCs im Tumor im Vergleich zur Milz beschrieben [88]. Eine verstärkte PD-L1-Expression auf Tumor-MDSCs konnte auch für das orthotope Panc02-H7-Modell gezeigt werden [84]. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zur gesteigerten Expression von PD-L1 auf MDSCs aus den subkutanen Panc02- und T110299-Tumoren im Vergleich zu MDSCs aus der Milz tumortragender Versuchstiere bestätigen den Stand der aktuellen Studienlage.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Expression von Checkpointmolekülen und einer stärkeren suppressiven Funktion von MDSCs im Tumormilieu ist zu diskutieren. Einzelne Studien legen nahe, dass nur MDSCs mit hoher

PD-L1-Expression die T-Zell-Proliferation effektiv supprimieren können [17]. Diese Ergebnisse erscheinen schlüssig vor dem Hintergrund der hier gezeigten Daten, die ebenfalls eine Hochregulation von PD-L1 auf MDSCs aus dem Tumor im Vergleich zu aus der Milz isolierten MDSCs zeigen, vor allem in Zusammenschau mit bekannten Daten zur gesteigerten Suppressivität von Tumor-MDSCs [40]. Allerdings könnte es sich bei der PD-L1 Expression lediglich um einen indirekten Marker für besonders suppressive MDSC-Populationen handeln. Im T-Zell-Suppressionsassay führte in den Versuchen dieser Arbeit eine PD-1-Blockade zu keiner Aufhebung der suppressiven Eigenschaften der MDSCs.

In der Literatur wurde neben der Expression von PD-L1 auch die von PD-1 auf MDSCs im murinen Melanommodell sowie im Blut an Non-Hodgkin-Lymphomen erkrankter Patienten beschrieben [80]. Ferner wurde gezeigt, dass die PD-1-Expression in tumortragenden Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen hochreguliert wurde. Auch im Brustkrebsmodell wurde über eine Expression von PD-1 auf MDSCs berichtet [89]. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass die PD-1-Antikörperklone 29F.1A12 und RMP1-14 durch unspezifische Bindung an tote Zellen zu falsch-positiven Ergebnissen in der Durchflusszytometrie führen können [90]. Durch strenge *Gating*-Strategien, welche tote Zellen aus der Analyse ausschließen, konnte gezeigt werden, dass MDSCs im murinen Pankreaskarzinommodell kein PD-1 auf der Zelloberfläche exprimieren. [91].

Zusammenfassend stellen die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche zur Expression von PD-1 und PD-L1 auf Tumorzellen, T-Zellen und MDSCs eine notwendige Grundlage und einen Ausgangspunkt zur Diskussion der Checkpointblockade im murinen Pankreaskarzinommodell dar. Ob und in welchem Ausmaß die Expression dieser Moleküle eine Vorhersage über das Therapieansprechen einer anti-PD-1-basierten Immuntherapie zulässt, bietet Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen.

4.3 Einfluss einer α PD-1-basierten Therapie auf Anzahl, Phänotyp und Funktionalität von MDSCs

4.3.1 Reduktion von PMN-MDSCs im Tumor nach α PD-1-basierter Therapie

Das Verhältnis der MDSC-Subtypen zueinander, aber auch in Relation zu anderen Immunzellen, kann für das Ausmaß der Suppressivität im Tumormilieu relevant sein. So gelten M-MDSCs in der Literatur als suppressiver als PMN-MDSCs, da letztere überwiegend Mechanismen nutzen, die auf direktem, antigen-spezifischem Zellkontakt zu T-Zellen basieren und somit eine geringere Reichweite haben. Auch ist die Halbwertszeit

der von PMN-MDSCs produzierten ROS relativ kurz und deren Aktivität zeitlich begrenzt [46]. Allerdings konnte in einer Publikation unserer Arbeitsgruppe für das orthotope T110299-Tumormodell gezeigt werden, dass aus dem Tumor isolierte PMN-MDSCs die T-Zell-Proliferation stärker supprimieren als M-MDSCs [40]. Es ist davon auszugehen, dass je nach Tumorentität verschiedene Mechanismen der MDSC-vermittelten Immunsuppression vorherrschen und sich der Stellenwert der MDSC-Subpopulationen unterscheidet [46]. Zudem können Strategien zur Aufreinigung sowie der exakten Definition der MDSC-Subtypen Ergebnisse aus funktionellen Assays erheblich beeinflussen. Diesbezüglich ist leider in vielen Studien kein einheitliches Vorgehen gegeben, was die Vergleichbarkeit dieser Arbeiten erschwert. Eine Standardisierung der Definition, Isolationsprotokolle, Kulturbedingungen und funktionellen Assays wäre daher im Forschungsfeld der MDSC-Biologie wünschenswert [42].

Der Anteil an PMN-MDSCs an allen CD11b⁺-Zellen war in den Ergebnissen dieser Arbeit nach α PD-1-Therapie signifikant reduziert. Ob eine Reduktion von PMN-MDSCs für den Therapieeffekt durch α PD-1-basierter Therapie im Panc02-Tumormodell von Relevanz ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Für viele Tumormodelle konnte gezeigt werden, dass die Progredienz der Erkrankung und Größenzunahme der Tumore mit einer überproportionalen Akkumulation von PMN-MDSCs einhergeht [92]. Dies zeigten auch Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in murinen PDAC-Modellen, wie dem T110299-Tumormodell [40]. Eine wirksame α PD-1-basierte Therapie mit Größenregredienz der Tumore könnte somit einer Reduktion des Anteils an PMN-MDSCs erklären. Intratumorale Hypoxie wird als Stimulus für die Rekrutierung von MDSCs ins Tumorgewebe diskutiert [93]. Da die Reduktion der Oxygenierung ein relevanter Bestandteil des immunsuppressiven Milieus des PDAC ist, könnte eine Abnahme der Tumorgöße mit konsekutiv geringerer Hypoxie auch eine Abnahme des Anteils von MDSCs an allen CD45⁺ Immunzellen zur Folge haben [94].

Die in dieser Arbeit gezeigte Reduktion von PMN-MDSCs im Tumormilieu könnte auch indirekt über eine verringerte Interaktion von PD-1 mit PD-L1 auf MDSCs vermittelt sein [80] [89].

Die Blockade von PD-1 kann zudem zu Veränderungen der Expression und Sekretion von Interleukinen wie IL-2 oder CXC- und CC-Chemokinen durch Immunzellen führen [95] [96]. Dieses veränderte Zytokinspektrum könnte auch die Migration und Viabilität von MDSCs beeinflussen und somit zu einem geringeren Anteil von PMN- und/oder M-MDSCs führen.

In der Literatur wurde beschrieben, dass die Blockade oder ein *Knockdown* von PD-1 eine geringere Kumulation von MDSCs im Tumormilieu zur Folge hat. Interessanterweise konnte der Einfluss von T-Zellen auf diese Beobachtung ausgeschlossen werden. Die geringere Kumulation wird unter anderem durch eine verringerte pathologische Myelopoese begründet [80]. Dieser Aspekt wird durch die Phänotypisierung und Evaluation der Suppressivität von MDSCs nicht berücksichtigt.

4.3.2 Expression phänotypischer und funktioneller Marker von MDSCs

Die Hypothese dieser Arbeit war, dass sich eine PD-1-Blockade und der damit zusammenhängende Therapieeffekt auf die Funktionalität von MDSC auswirken könnte, insbesondere da MDSC die für die Interaktion von PD-1 mit PD-L1 erforderlichen Moleküle exprimieren. Multiple Mechanismen wurden beschrieben, die zu einer MDSC-vermittelten Inhibierung der antitumoralen Immunantwort führen. Allerdings ergeben die Untersuchungen kein einheitliches Bild und sind oft widersprüchlich. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurde anhand der Literatur eine Liste an Genen erstellt, die diesbezüglich eine Rolle spielen könnten. Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Antigene erfolgte hinsichtlich ihrer Relevanz für Apoptose, Chemotaxis, Inflammation und Immunregulation im Tumormilieu. Die Proteinexpression dieser Antigene, die durchflusszytometrisch auf PMN-MDSCs und M-MDSCs aus Tumor und Milz nach α PD-1-basierter Therapie untersucht wurde, unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Auch in einem erweiterten Panel, welches auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR nach zuvoriger Präamplifikation analysiert wurde, ließ sich in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied in der Expression der ausgewählten Marker zwischen Therapie- und Kontrollgruppe nachweisen.

In der Literatur ist diese Fragestellung im murinen Pankreaskarzinommodell bisher nicht untersucht worden. Lediglich zu anderen Tumorentitäten oder anderen myeloiden Zellpopulationen lassen sich Veröffentlichungen finden. Die Blockade von PD-L1 veränderte das mRNA-Expressionsprofil und die Expression von Oberflächenmolekülen durch *BM-derived macrophages* zugunsten eines proinflammatorischen Phänotyps. So konnte eine Hochregulation co-stimulatorischer Moleküle wie CD86 und MHC-II sowie eine gesteigerte Zytokinproduktion gezeigt werden. Die Genexpression von *Nos2*, einer NO-Synthase, die reaktive Sauerstoffspezies freisetzt und für die MDSC-vermittelte T-Zell-Suppression eine Rolle spielt, war nach α PD-L1-Therapie hochreguliert [97]. Ein ähnlicher Effekt mit verstärkter Expression von MHC-II und iNOS und reduzierter Expression von ARG1 ist für TAMs im murinen Kolon- und Mammakarzinommodell beschrieben worden [98]. Für MDSCs hingegen ließ sich in einer anderen Publikation kein

signifikanter Unterschied in der Antigenexpression zwischen α PD-L1-Therapie- und Kontrollgruppe in murinen Lungen-, Haut-, Darm- und Brustkrebsmodellen feststellen [88].

4.3.3 T-Zell-Suppression durch MDSCs nach α PD-1-basierter Therapie *in vitro*

Übereinstimmend mit der aktuellen Literatur und bisherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, supprimierten MDSCs, die aus dem Tumor isoliert wurden, die T-Zell-Proliferation effektiv [40]. Der Einsatz eines gegen PD-1 gerichteten Antikörpers *in vitro* hatte keinen Einfluss auf die Suppressivität der MDSCs. Basierend auf den hier gezeigten Daten scheint die T-Zell-Suppression durch MDSCs aus subkutanen Panc02-Tumoren zumindest *in vitro* nicht durch die PD-1/PD-L1-Achse vermittelt zu sein. Aussagen über die *in vivo*-Suppressivität können leider aufgrund des Fehlens geeigneter *in vivo* MDSC-Suppressions-Assays nicht getroffen werden. Zumindest die fehlende Beeinflussung typischer molekularer suppressiver Mechanismen durch die Therapie, wie sie im Abschnitt 4.3 ausführlich dargelegt wurde, spricht gegen eine direkte Beeinflussung der MDSC-Suppressivität im murinen PDAC-Tumormodell.

Vor diesem Hintergrund ergibt sich die Frage, ob eine α PD-1-basierte Therapie *in vivo* und eine Analyse der Suppressivität von MDSCs aus behandelten Versuchstieren *ex vivo* ein anderes Ergebnis zur Folge hätte. Antikörper haben ungeachtet ihrer Zielstruktur eine immunogene Wirkung und können das Immunsystem *in vivo* durch Bindung an Fc-Rezeptoren, Komplementaktivierung oder Opsonierung beeinflussen [99]. Ebenso herrschen im Tumormilieu, im Vergleich zu den homogenen und artifiziellen Konditionen in der Zellkultur, besondere Bedingungen bezüglich Stromadichte, Vaskularisierung und Perfusion, sodass ein Antikörper nach systemischer Applikation in verschiedenen Kompartimenten unterschiedliche Wirkungen entfalten kann [100] [101]. So konnte für verschiedene Tumormodelle gezeigt werden, dass ein hypoxisches Milieu in Kombination mit einer PD-L1-Blockade die MDSC-vermittelte T-Zell-Suppression verringerte [88]. Eine Blockade der PD-1/PD-L1-Achse auch auf anderen Immunzellen sowie Tumorzellen kann das Tumormilieu und somit Entstehung und Funktionalität von MDSCs beeinflussen, sodass Unterschiede in der Wirksamkeit einer α PD-1-basierten Therapie *in vivo* denkbar sind. Dies wäre in weiterführenden Versuchen zu untersuchen, was allerdings aufgrund des Mangels an geeigneten Tiermodellen mit selektiver Inhibierung der PD-1/PD-L1-Achse in den verschiedenen MDSC-Populationen, z.B. in konditionellen *Knockout* Mäusen, derzeit nicht möglich ist. Erschwerend kommt hinzu, dass sich in diesen Modellen keine geeigneten Marker finden lassen, um selektiv MDSCs und nicht andere myeloide Zellpopulationen zu manipulieren, da ein einheitlicher zellliniendefinierender Marker für MDSCs derzeit fehlt.

In der Literatur werden die hier gezeigten Daten für andere Tumorentitäten, wie beispielsweise dem malignen Melanom, Kolon- oder Mammakarzinom, bestätigt. Neben den auch in dieser Arbeit durchgeführten T-Zell-Suppressionsassays wurde in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen auch die Produktion von IFN γ durch T-Zellen zur Beurteilung der Suppressivität von MDSCs herangezogen. Die alleinige Blockade von PD-L1 konnte die MDSC-vermittelte Suppression der T-Zell-Proliferation *ex vivo/in vitro* nicht aufheben und hatte keinen Effekt auf die Produktion von IFN γ durch T-Zellen [88] [92]. Lediglich unter hypoxischen Bedingungen konnte die T-Zell-Proliferation unter Zugabe eines PD-L1-Antikörpers wiederhergestellt werden [88].

Es ist ferner zu diskutieren, ob T-Zell-Suppressionsassays Auswirkungen einer α PD-1-basierten Therapie auf die MDSC-vermittelte Immunsuppression korrekt abbilden können. In der Literatur ist beschrieben, dass sowohl ein *Knockout* von PD-1 auf myeloiden Zellen als auch die Therapie mit PD-1-Antikörpern zu einer veränderten Myelopoese zugunsten differenzierter Monozyten und dendritischer Zellen mit konsekutiv verringerter Anzahl an MDSCs führen. Ein reduziertes Tumorstadium im murinen Melanommodell durch α PD-1-Therapie konnte auch in genetisch modifizierten Mäusen ohne reife T- und B-Lymphozyten (sog. RAG2-*Knockout*-Mäusen) gezeigt werden, sodass von einem T-Zell-unabhängigen Therapieeffekt auszugehen ist [80]. Unter Einbeziehung dieser Ergebnisse scheinen weitere Assays zur Evaluation der Suppressivität von MDSCs sinnvoll, die auch andere Immunzellen und das Tumormilieu miteinbeziehen, anstatt isoliert die Interaktion von MDSCs und T-Zellen zu untersuchen.

4.4 Unterschiedliche Wirksamkeit einer α PD-1-basierten Therapie in murinen Tumormodellen

4.4.1 Heterogenität der Studienlage bezüglich Versuchsaufbau und Antikörperwahl

Die Studienlage zu Effekten einer Checkpointblockade auf MDSCs ist heterogen und kontrovers. Verschiedene zugrundegelegte Definitionen von MDSCs, deren Ursprungsgewebe und unterschiedliche Isolationsprotokolle erschweren die Vergleichbarkeit der Publikationen untereinander und mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen. Zudem wurden für die α PD-1-basierten Therapieregimes unterschiedliche Applikationsformen, Antikörperklone und -konzentrationen gewählt.

In einigen Publikationen wurde lediglich die Suppressivität von aus der Milz tumortragender Tiere isolierten MDSCs untersucht und keine Aussage zu den als suppressiver geltenden Tumor-MDSCs getroffen [92] [88]. Ebenso variierte die Art der Aufbereitung der Zellen für

funktionelle *ex vivo/in vitro*-Versuche. Durch eine durchflusszytometrische oder magnetische Zellsortierung kann die Viabilität und Funktionalität von MDSCs in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst werden. Zudem wurden MDSCs anhand verschiedener Oberflächenmarker selektiert [80] [40] [92] [88]. Ob beispielsweise eine reine Positivselektion von Gr1⁺ Zellen aus dem Tumor ausreicht, um die Population als MDSCs zu beschreiben, ist fraglich [88]. Eine Unterscheidung zwischen PMN-MDSCs und M-MDSCs, wie sie von Bronte et al. empfohlen wird, ist oftmals nicht erfolgt, sodass Effekte der Therapie auf die einzelnen Subpopulationen gegebenenfalls übersehen werden könnten [42] [88] [80].

Die Applikation der gegen PD-1 oder PD-L1 gerichteten Antikörper erfolgte in unterschiedlicher Anzahl und Frequenz intravenös, intraperitoneal oder in der Zellkultur. Die Dosierungen variierten zwischen 100 µg und 250 µg für die intraperitoneale Injektion sowie zwischen 1 µg/ml und 5 µg/ml *in vitro* [88] [80] [102] [98] [70]. Entsprechend könnte der Effekt einer αPD-1-basierten Therapie durch die Wahl eines bestimmten Antikörperklons sowie dessen Dosierung und Wirkdauer beeinflusst werden.

Ebenso ist relevant, ob eine repetitive Blockade *in vivo* unter Berücksichtigung von Zelldifferenzierung und -migration, Tumormilieu und Zell-Zell-Interaktion stattfindet oder eine isolierte Einmalgabe unter artifiziellen Bedingungen in der Zellkultur erfolgt. So ist beschrieben worden, dass die Zugabe eines PD-L1-Antikörpers das Expressionsprofil myeloider Zellen wie Makrophagen *in vitro* zugunsten eines proinflammatorischen Phänotyps verändert, dieser Effekt konnte *in vivo/ex vivo* jedoch nur für bestimmte Tumormodelle, die auf eine αPD-1-Therapie ansprechen, verifiziert werden [97] [98]. Dies veranschaulicht den Stellenwert des Tumormilieus und der Immunzellinfiltration für die Effekte einer Checkpointblockade.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass sich eine αPD-1-basierte Therapie funktionell von einer gegen PD-L1 gerichteten Therapie unterscheidet und die Auswahl der Zielstruktur einen entscheidenden Einfluss auf den Therapieeffekt haben kann [103]. Gemäß der Datenlage weist PD-L1, zusätzlich zu den durch die Bindung an PD-1 vermittelten Effekten, selbst Eigenschaften als Signalmolekül auf und kann Viabilität und Funktionalität der PD-L1-exprimierenden Zelle beeinflussen. Ein sogenanntes *reverse signaling* durch PD-L1 ist sowohl für Tumorzellen als auch für Immunzellen beschrieben und die zugrundeliegenden Mechanismen der Signalübertragung sind aktuell Gegenstand der Forschung [104] [105].

Ein weiterer Aspekt, der für die Wahl des Antikörpers eine Rolle spielen kann, ist die Bindung von PD-1 und PD-L1 an andere an der Immunregulation beteiligte Oberflächenmoleküle. Die PD-L1-vermittelte Blockade von CD80, das als co-stimulatorisches Molekül von T-Zellen exprimiert wird, inhibiert die T-Zell-Proliferation auch unabhängig von PD-1 in PD-1-*Knockout*-Modellen [106].

Eine Rationale für den Einsatz von α PD-1-Antikörpern hingegen ist die Interaktion von PD-1 mit dem Liganden PD-L2, der im Tumormilieu beispielsweise von antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen und Makrophagen oder Endothel- und Epithelzellen exprimiert wird [107]. Die Rolle von PD-L2 auf MDSCs ist bisher spärlich untersucht und die Expression von PD-L2 auf MDSCs vor allem deskriptiv dargestellt [88] [62]. Die Studienlage zum Einsatz von PD-L2-Antikörpern in der Therapie des Pankreaskarzinoms ist unzureichend, ein geringeres Tumorstadium durch die Therapie mit gegen PD-L2 gerichteten Antikörpern wurde jedoch für das orthotope Panc02-Tumormodell beschrieben [70].

4.4.2 Das Tumormilieu als Variable des Therapieerfolgs einer α PD-1-basierten Therapie

In Zusammenschau der hier dargestellten Ergebnisse, nach denen eine Therapie mit α PD-1-Antikörpern in den hier untersuchten Tumormodellen das Überleben der Versuchstiere verlängerte, ist zu vermuten, dass dieser Effekt durch die von uns genutzten Methoden nicht auf eine Veränderung von Phänotyp und Funktionalität von MDSCs zurückzuführen ist. Vielmehr könnte das Tumormilieu die Diskrepanz im Erfolg einer α PD-1-basierten Therapie zwischen den hier untersuchten Panc02- und T110299-Tumormodellen und anderen murinen Tumormodellen sowie dem humanen PDAC erklären.

Es muss berücksichtigt werden, dass das Tumormilieu maßgeblich auch durch Einwanderung (= Quantität) aber vor allem auch Funktionalität und Aktivierung (= Qualität) anderer Immunzellen wie beispielsweise T-Effektorzellen, Tregs oder TAMs beeinflusst wird [86]. Die Wirksamkeit einer α PD-1/PD-L1-Therapie soll maßgeblich von der bereits vor der Blockade vorhandenen T-Zell-Infiltration, der anti-Tumor-T-Zell-Aktivität sowie dem Verhältnis von T-Effektorzellen zu Tregs, TAMs und MDSCs abhängen [73] [30] [17]. Desweiteren kann eine dichte extrazelluläre Matrix (=Desmoplasie) die Wirksamkeit einer Checkpointblockade beeinträchtigen [108].

Eine Charakterisierung einzelner Aspekte der Tumorbiologie unterschiedlicher muriner Pankreaskarzinommodelle erfolgte in der Dissertation von Dr. T. Adunka aus der Abteilung

für Klinische Pharmakologie, LMU München [109]. Die oben aufgeführten Bestandteile und Akteure des Tumormilieus, die den Effekt einer Checkpointblockade beeinflussen können, spielen auch im Vergleich der syngenen Tumormodelle Panc02 und T110299 mit dem KPC-Modell eine Rolle. So findet sich in orthotopen Panc02- und T10299-Tumoren ein weniger dichtes Stroma als im KPC-Modell. Als weiterer Unterschied ist zu nennen, dass Panc02- und T110299-Tumore stärker von T-Zellen und Lymphozyten infiltriert werden, während die Lymphozyteninfiltration in KPC-Tumoren eher spärlich ausfällt [109]. Unter Einbeziehung der aufgeführten Charakteristika ist es nachvollziehbar, dass sich der in den hier untersuchten Tumormodellen gezeigte Überlebensvorteil durch eine α PD-1-basierte Therapie im KPC-Modell, aber auch im humanen PDAC, nicht reproduzieren lässt. Umso wichtiger ist es jedoch, Komponenten, die eine Therapieresistenz vermitteln, zu identifizieren und therapeutisch zu beeinflussen. Diesbezüglich können die hier dargestellten Tumormodelle mit mehr oder weniger gutem Ansprechen auf eine PD-1-Blockade einen wesentlichen Beitrag leisten.

4.5 Ausblick

4.5.1 Weiterführende Versuche

Da MDSCs auf ihrer Oberfläche PD-L1 exprimieren, wären Versuche mit einem gegen PD-L1 gerichteten Antikörper von Interesse, um auch die Interaktion mit anderen Oberflächenmolekülen, wie beispielsweise B7-1 (CD80), das co-stimulatorisch an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist, zu blockieren. Ebenso wäre eine *in vivo*-Blockade der PD-1/PD-L1 Achse mit subsequenten *ex vivo*-Funktionsanalysen der MDSCs sinnvoll, um den Einfluss des Antikörpers im Kontext des TME beurteilen zu können und nicht frei von sämtlichen Akteuren *in vitro* nachzustellen. Hierfür müssten methodische Probleme bei der Isolation von MDSCs aus den Tumoren der Versuchstiere optimiert werden, um Einflussfaktoren wie geringe Ausbeute, Viabilität und Verunreinigungen zu minimieren. Denkbar wären auch Versuche mit MDSCs aus PD-1/PD-L1-*Knockout*-Mäusen.

4.5.2 Klinischer Ausblick

Die klassische operative Therapie des Pankreaskarzinoms verringert zwar die Tumorlast, stellt jedoch durch das chirurgische und anästhesiologische Trauma sowie endokrine und metabolische Veränderungen einen starken immunsuppressiven Stressor dar [110]. Die Immuntherapie hingegen bietet, angesichts der Fortschritte bei der Therapie anderer solider Malignome, einen vielversprechenden Ansatz in der Behandlung des PDAC. Um das Ansprechen des Pankreaskarzinoms auf eine Checkpointblockade zu verbessern, ergibt sich aus pathophysiologischen Überlegungen eine Kombination verschiedener Therapeutika, die das hochgradig immunsuppressive Tumormilieu beeinflussen und die patienteneigene Immunantwort stärken. Beispielhaft könnten sich eine gesteigerte T-Zell-Aktivierung und Antigenpräsentation, eine Modulation des desmoplastischen Stromas oder eine gezielte Blockade von immunsuppressiven Signalwegen günstig auf das Therapieansprechen auswirken.

Aktuell befassen sich mehrere klinische Studien mit möglichen Kombinationspartnern von α PD-1/PD-L1-Antikörpern, um synergistische Effekte zu erproben [68].

- Andere Checkpointinhibitoren: z.B. CTLA-4
- Vakzine: z.B. GVAX
- Klassische Chemotherapeutika: z.B. Gemcitabin, nab-Paclitaxel
- Radiotherapie
- *Targeted therapy*: z.B. Tyrosinkinaseinhibitoren wie Acalabrutinib

Die Diagnose Pankreaskarzinom ist nach wie vor mit einer infausten Prognose verbunden [2]. Das Heranziehen prognostischer Biomarker und eine stärkere Gewichtung interindividueller Unterschiede werden in Zukunft personalisierte Therapieansätze ermöglichen [21]. Die Abkehr vom reinen Tumorzentrismus hin zum besseren Verständnis des *Tumorimmunemicroenvironment* (TIME) erweitert das Verständnis der komplexen Tumorimmunologie und eröffnet neue Behandlungsmöglichkeiten. Checkpointinhibition könnte schließlich, in Kombination mit anderen Therapeutika, Ausgangspunkt sein für die dringend benötigten Fortschritte in der Therapie des Pankreaskarzinoms.

5. Zusammenfassung

Um eine Verbesserung der Therapieoptionen des Pankreaskarzinoms zu erreichen, ist ein Verständniszugewinn der immunologischen Mechanismen und eine Analyse der beteiligten Akteure der Immunsuppression im Tumormilieu von entscheidender Bedeutung. Die Rolle von MDSCs als Vermittler einer tumorinduzierten Immunsuppression ist zunehmend besser untersucht. Dies macht MDSCs zu vielversprechenden Zielzellen von Immuntherapeutika. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer auf Checkpointblockade basierenden Immuntherapie und konkret der Einsatz von α PD-1-Antikörpern auf Anzahl, Phänotyp und Funktion von MDSCs in zwei murinen Pankreaskarzinommodellen untersucht.

Die Expression der Checkpointmoleküle PD-1 und PD-L1 auf Tumor- und Immunzellen in den murinen Pankreaskarzinommodellen Panc02 und T110299 konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. PD- L1 wird von Tumorzellen sowie von MDSCs exprimiert. Diese Expression ist durch die Zugabe von IFN γ *in vitro* induzierbar, zudem zeigen aus dem Tumor isolierte MDSCs eine verstärkte Expression von PD- L1. Letztlich ist die Expression von PD-1 auf T-Zellen aus dem Tumor im Vergleich zu T-Zellen aus Milz und Blut erhöht. Diese Ergebnisse rechtfertigen eine detaillierte Untersuchung der Rolle der PD-1/PD-L1-Achse in murinen PDAC-Modellen.

Eine α PD-1-basierte Therapie verlängert das Überleben von Versuchsmäusen im orthotopen Panc02- und T110299-Tumormodell signifikant, wobei dieser Effekt im chemisch-induzierten und daher stärker immunogenen Panc02-Tumormodell ausgeprägter war. In diesem Tumormodell fand sich eine immunvermittelte Tumorkontrolle und ein immunologisches Gedächtnis, welches die Tiere nach Eradikation des Primärtumors vor einer Tumorreexposition schützte. Die Analyse der MDSC-Populationen ergab eine Reduktion von PMN-MDSCs durch die α PD-1-basierte Therapie. Eine extensive Analyse der immunsuppressiven Moleküle in PMN-MDSCs und M-MDSCs aus Milzen und Tumorgewebe mittels FACS und qRT-PCR zeigte jedoch keinen Unterschied in der Expressionsstärke dieser Marker. Mit *ex vivo* T-Zell-Suppressionsassays fand sich ferner durch PD-1-Blockade keine funktionelle Beeinflussung der MDSC-vermittelten Suppression. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine direkte Beeinflussung der MDSCs durch die gewählte Immuncheckpointblockade.

6. Literaturverzeichnis

1. Leitlinienprogramm-Onkologie: Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF (ed). S3-Leitlinie zum exokrinen Pankreaskarzinom, Vol 51; 2013.
2. Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. RKI-Bib1 (Robert Koch-Institut); 2016.
3. Ferlay J, Partensky C, Bray F. More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta oncologica* (Stockholm, Sweden) 2016;55:1158–1160.
4. Sahara K, Trenkwitz D, Akan B, Kühner I, Göttinger P, Gnant M. Moderne Tumorthherapie des Pankreaskarzinoms. *Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 2008; 6:17–24.
5. Stathis A, Moore MJ. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2010; 7:163.
6. Gooden HM, White KJ. Pancreatic cancer and supportive care--pancreatic exocrine insufficiency negatively impacts on quality of life. *Supportive care in cancer: official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* 2013; 21:1835–1841.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018; 68:7–30.
8. Biankin AV, Maitra A. Subtyping Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* 2015; 28:411–413.
9. Yamamoto T, Yagi S, Kinoshita H, Sakamoto Y, Okada K, Uryuhara K, et al. Long-term survival after resection of pancreatic cancer: a single-center retrospective analysis. *World journal of gastroenterology* 2015; 21:262–268.
10. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* 2011; 364:1817–1825.
11. Guo S, Contratto M, Miller G, Leichman L, Wu J. Immunotherapy in pancreatic cancer: Unleash its potential through novel combinations. *WJCO* 2017; 8:230.
12. Hoff DD von, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England journal of medicine* 2013; 369:1691–1703.
13. Jia L, Jiang S-M, Shang Y-Y, Huang Y-X, Li Y-J, Xie D-R, et al. Investigation of the incidence of pancreatic cancer-related depression and its relationship with the quality of life of patients. *Digestion* 2010; 82:4–9.
14. McCarthy EF. The Toxins of William B. Coley and the Treatment of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *The Iowa Orthopaedic Journal* 2006; 26:154–158.
15. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. *Cancer immunotherapy. Science* (New York, N.Y.) 2013;342:1432–1433.
16. Deutscher Ärzteverlag GmbH, Ärzteblatt RD. Nobelpreis für Medizin: Lahme Abwehr scharf machen; 2018.
<https://www.aerzteblatt.de/treffer?mode=s&wo=17&typ=16&aid=201330&s=2018&s=nobelpreis> (accessed 25. Januar 2019).
17. Feng M, Xiong G, Cao Z, Yang G, Zheng S, Song X, et al. PD-1/PD-L1 and immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Letters* 2017; 407:57–65.

18. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017; 168:707–723.
19. Kobold S, Duedel P, Schnurr M, Subklewe M, Rothenfusser S, Endres S. Immunotherapy in tumors. *Deutsches Arzteblatt international* 2015; 112:809–815.
20. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front. Pharmacol.* 2017; 8:765.
21. Morrison AH, Byrne KT, Vonderheide RH. Immunotherapy and Prevention of Pancreatic Cancer. *Trends in Cancer* 2018; 4:418–428.
22. Banerjee K, Kumar S, Ross KA, Gautam S, Poelaert B, Nasser MW, et al. Emerging trends in the immunotherapy of pancreatic cancer. *Cancer Letters* 2018; 417:35–46.
23. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* 2002; 3:991.
24. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science (New York, N.Y.)* 2009;324:1457–1461.
25. Watt J, Kocher HM. The desmoplastic stroma of pancreatic cancer is a barrier to immune cell infiltration. *Oncoimmunology* 2013; 2: e26788.
26. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology* 2014; 27:16–25.
27. Xu J, Wang L, Cheng Y, Zhang G, Hu S, Zhou B, et al. Immunotherapy for pancreatic cancer: A long and hopeful journey. *Cancer Letters* 2018; 425:143–151.
28. Baxter D. Active and passive immunization for cancer. *Human vaccines & immunotherapeutics* 2014; 10:2123–2129.
29. Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *The American journal of pathology* 2007; 170:793–804.
30. Lee JW, Komar CA, Bengsch F, Graham K, Beatty GL. Genetically Engineered Mouse Models of Pancreatic Cancer: The KPC Model (LSL-Kras(G12D/+); LSL-Trp53(R172H/+); Pdx-1-Cre), Its Variants, and Their Application in Immunology Drug Discovery. *Current protocols in pharmacology* 2016; 73:14.39.1-14.39.20.
31. Ding Y, Cravero JD, Adrian K, Grippo P. Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice. *Pancreas* 2010; 39:283–292.
32. Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, Peckham JC, Wilkoff LJ, Griswold DP, et al. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer research* 1984; 44:717–726.
33. Waddell N, Pajic M, Patch A-M, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015; 518:495–501.
34. Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science (New York, N.Y.)* 2015; 349:1483.

35. Christopher Greenman, Philip Stephens, Raffaella Smith, Gillian L. Dalglish, Christopher Hunter, Graham Bignell, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007; 446:153–158.
36. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, et al. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005; 7:469–483.
37. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, et al. Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *The American journal of surgical pathology* 2001; 25:579–586.
38. Beatty GL, Winograd R, Evans RA, Long KB, Luque SL, Lee JW, et al. Exclusion of T Cells From Pancreatic Carcinomas in Mice Is Regulated by Ly6C(low) F4/80(+) Extratumoral Macrophages. *Gastroenterology* 2015; 149:201–210.
39. Torres MP, Rachagani S, Soucek JJ, Mallya K, Johansson SL, Batra SK. Novel pancreatic cancer cell lines derived from genetically engineered mouse models of spontaneous pancreatic adenocarcinoma: applications in diagnosis and therapy. *PloS one* 2013; 8: e80580.
40. Metzger P, Kirchleitner SV, Kluge M, Koenig LM, Hörth C, Rambuscheck CA, et al. Immunostimulatory RNA leads to functional reprogramming of myeloid-derived suppressor cells in pancreatic cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2019; 7:288.
41. Gabilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer immunology research* 2017; 5:3–8.
42. Bronte V, Brandau S, Chen S-H, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Comms* 2016; 7:12150.
43. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells. In: *Immunotherapy of Cancer. Advances in Cancer Research.* Elsevier; 2015:95–139.
44. Marvel D, Gabilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *Journal of Clinical Investigation* 2015; 125:3356–3364.
45. Youn J-I, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK, Gabilovich DI. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of leukocyte biology* 2012; 91:167–181.
46. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in Immunology* 2016; 37:208–220.
47. Groth C, Hu X, Weber R, Fleming V, Altevogt P, Utikal J, et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *British journal of cancer* 2019; 120:16–25.
48. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2001; 11:173–186.
49. Raber P, Ochoa AC, Rodríguez PC. Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives. *Immunological investigations* 2012; 41:614–634.

50. Haas N de, Koning C de, Spilgies L, Vries IJM de, Hato SV. Improving cancer immunotherapy by targeting the STATE of MDSCs. *Oncoimmunology* 2016;5.
51. Dardalhon V, Anderson AC, Karman J, Apetoh L, Chandwaskar R, Lee DH, et al. Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2010;185:1383–1392.
52. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nature Immunology* 2005; 6:1245–1252.
53. Tsukamoto H, Fujieda K, Senju S, Ikeda T, Oshiumi H, Nishimura Y. Immune-suppressive effects of interleukin-6 on T-cell-mediated anti-tumor immunity. *Cancer science* 2018; 109:523–530.
54. Tsukamoto H, Nishikata R, Senju S, Nishimura Y. Myeloid-derived suppressor cells attenuate TH1 development through IL-6 production to promote tumor progression. *Cancer immunology research* 2013; 1:64–76.
55. Sinha P, Chornoguz O, Clements VK, Artemenko KA, Zubarev RA, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells express the death receptor Fas and apoptose in response to T cell-expressed FasL. *Blood* 2011; 117:5381–5390.
56. Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 2001;166:5398–5406.
57. Sanctis F de, Solito S, Ugel S, Molon B, Bronte V, Marigo I. MDSCs in cancer: Conceiving new prognostic and therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2016; 1865:35–48.
58. Daley D, Zambirinis CP, Seifert L, Akkad N, Mohan N, Werba G, et al. $\gamma\delta$ T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining $\alpha\beta$ T Cell Activation. *Cell* 2016; 166:1485-1499.e15.
59. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology* 2008; 26:677–704.
60. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal* 1992; 11:3887–3895.
61. Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci* 2017; 24:480.
62. Ballbach M, Dannert A, Singh A, Siegmund DM, Handgretinger R, Piali L, et al. Expression of checkpoint molecules on myeloid-derived suppressor cells. *Immunology Letters* 2017;1 92:1–6.
63. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer discovery* 2018; 8:1069–1086.
64. Aguiar PN, Santoro IL, Tadokoro H, Lima Lopes G de, Filardi BA, Oliveira P, et al. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker in advanced non-small-cell lung cancer: a network meta-analysis. *Immunotherapy* 2016; 8:479–488.
65. Foley K, Kim V, Jaffee E, Zheng L. Current progress in immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Letters* 2016; 381:244–251.
66. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, et al. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clinical cancer*

- research: an official journal of the American Association for Cancer Research 2007; 13:2151–2157.
67. Geng L, Huang D, Liu J, Qian Y, Deng J, Li D, et al. B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2008; 134:1021–1027.
 68. Henriksen A, Dyhl-Polk A, Chen I, Nielsen D. Checkpoint inhibitors in pancreatic cancer. *Cancer treatment reviews* 2019; 78:17–30.
 69. Macherla S, Laks S, Naqash AR, Bulumulle A, Zervos E, Muzaffar M. Emerging Role of Immune Checkpoint Blockade in Pancreatic Cancer. *International journal of molecular sciences* 2018;19.
 70. Miura S, Okudaria K, Hokari R, Tzuzuki, Okada, Yoshikatzu, Komoto S, Watanabe C, et al. Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model. *Int J Oncol* 2009;35.
 71. Sumithra Urs. Pan02 – Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Model Characterized for Immuno-oncology Applications; 2019. <https://de.covance.com/industry-solutions/oncology/preclinical/tumor-spotlights/pan02-pancreatic-ductal-adenocarcinoma-model-characterized-for-immuno-oncology-applications.html> (accessed 08. April 2020).
 72. Luheshi NM, Coates-Ulrichsen J, Harper J, Mullins S, Sulikowski MG, Martin P, et al. Transformation of the tumour microenvironment by a CD40 agonist antibody correlates with improved responses to PD-L1 blockade in a mouse orthotopic pancreatic tumour model. *Oncotarget* 2016; 7:18508–18520.
 73. Winograd R, Byrne KT, Evans RA, Odorizzi PM, Meyer ARL, Bajor DL, et al. Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma. *Cancer immunology research* 2015; 3:399–411.
 74. Ma Y, Li J, Wang H, Chiu Y, Kingsley CV, Fry D, et al. Combination of PD1 Inhibitor and OX40 Agonist Induces Tumor Rejection and Immune Memory in Mouse Models of Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 2020 Jul;159(1):306-319.e12.
 75. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu W-J, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England journal of medicine* 2012; 366:2455–2465.
 76. Royal RE, Levy C, Turner K, Mathur A, Hughes M, Kammula US, et al. Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 2010;33:828–833.
 77. Scarlett C, Weidenhofer J, Colvin E, Bond D. Animal models of pancreatic cancer and their application in clinical research. *GICTT* 2016; Volume 6:31–39.
 78. Pushalkar S, Hundeyin M, Daley D, Zambirinis CP, Kurz E, Mishra A, et al. The Pancreatic Cancer Microbiome Promotes Oncogenesis by Induction of Innate and Adaptive Immune Suppression. *Cancer discovery* 2018; 8:403–416.
 79. Liu Q, Sun Z, Chen L. Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. *Protein & cell* 2020 Aug;11(8):549-564.
 80. Strauss L, Mahmoud MAA, Weaver JD, Tijaro-Ovalle NM, Christofides A, Wang Q, et al. Targeted deletion of PD-1 in myeloid cells induces antitumor immunity. *Science immunology* 2020;5.

81. Vandever AJ, Fallon JK, Tighe R, Sabzevari H, Schlom J, Greiner JW. Systemic Immunotherapy of Non-Muscle Invasive Mouse Bladder Cancer with Avelumab, an Anti-PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitor. *Cancer immunology research* 2016; 4:452–462.
82. Spranger S. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. *International immunology* 2016; 28:383–391.
83. Guo Z, Wang X, Cheng D, Xia Z, Luan M, Zhang S. Correction: PD-1 Blockade and OX40 Triggering Synergistically Protects against Tumor Growth in a Murine Model of Ovarian Cancer. *PloS one* 2017;12: e0186965.
84. Lu C, Redd PS, Lee JR, Savage N, Liu K. The expression profiles and regulation of PD-L1 in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* 2016;5.
85. Jacquelot N, Yamazaki T, Roberti MP, Duong CPM, Andrews MC, Verlingue L, et al. Sustained Type I interferon signaling as a mechanism of resistance to PD-1 blockade. *Cell research* 2019; 29:846–861.
86. Hu Y, Chen W, Yan Z, Ma J, Zhu F, Huo J. Prognostic value of PD-L1 expression in patients with pancreatic cancer: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine* 2019; 98: e14006.
87. Clark CE, Beatty GL, Vonderheide RH. Immunosurveillance of pancreatic adenocarcinoma: insights from genetically engineered mouse models of cancer. *Cancer Letters* 2009; 279:1–7.
88. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *The Journal of experimental medicine* 2014; 211:781–790.
89. Nam S, Lee A, Lim J, Lim J-S. Analysis of the Expression and Regulation of PD-1 Protein on the Surface of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs). *Biomolecules & therapeutics* 2019; 27:63–70.
90. Metzger P, Kirchleitner SV, Koenig LM, Hörth C, Kobold S, Endres S, et al. Dying cells expose a nuclear antigen cross-reacting with anti-PD-1 monoclonal antibodies. *Scientific reports* 2018; 8:8810.
91. Metzger P. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in murine pancreatic cancer: Role of IRF4 in development and function of MDSC in RIG-I-like helicase-based immunotherapy. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät 2019
92. Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M, Gabilovich DI. Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice. *The Journal of Immunology* 2008; 181:5791–5802.
93. Chiu DK-C, Tse AP-W, Xu IM-J, Di Cui J, Lai RK-H, Li LL, et al. Hypoxia inducible factor HIF-1 promotes myeloid-derived suppressor cells accumulation through ENTPD2/CD39L1 in hepatocellular carcinoma. *Nature communications* 2017; 8:517.
94. Erkan M, Kurtoglu M, Kleeff J. The role of hypoxia in pancreatic cancer: a potential therapeutic target? *Expert review of gastroenterology & hepatology* 2016; 10:301–316.
95. Zhou S, Zhu M, Meng F, Shao J, Xu Q, Wei J, et al. Evaluation of PD-1 blockade using a multicellular tumor spheroid model. *American Journal of Translational Research* 2019; 11:7471–7478.

96. Jiang X, Wang J, Deng X, Xiong F, Ge J, Xiang B, et al. Role of the tumor microenvironment in PD-L1/PD-1-mediated tumor immune escape. *Molecular cancer* 2019; 18:10.
97. Hartley GP, Chow L, Ammons DT, Wheat WH, Dow SW. Programmed Cell Death Ligand 1 (PD-L1) Signaling Regulates Macrophage Proliferation and Activation. *Cancer immunology research* 2018; 6:1260–1273.
98. Xiong H, Mittman S, Rodriguez R, Moskalenko M, Pacheco-Sanchez P, Yang Y, et al. Anti-PD-L1 Treatment Results in Functional Remodeling of the Macrophage Compartment. *Cancer research* 2019; 79:1493–1506.
99. Mengus C, Muraro MG, Mele V, Amicarella F, Manfredonia C, Foglietta F, et al. In Vitro Modeling of Tumor–Immune System Interaction. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2018; 4:314–323.
100. Lim J., Asward F. Ex vivo versus in vivo the challenge of generating meaningful results with traditional cell culture. *DDW Summer 2016 Issue*.
101. Arantes-Rodrigues R, Colaçon L, Pinto-Leite R, Oliviera PA. In Vitro and In Vivo Experimental Models as Tools to Investigate the Efficacy of Antineoplastic Drugs on Urinary Bladder Cancer; 2020. <http://ar.iijournals.org/content/33/4/1273.full> (accessed 07. Juni 2020).
102. Dylan Daniel. Pan02 – Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Model Characterized for Immuno-oncology Applications - Google-Suche; 2017. <https://www.google.com/search?client=firefox-b&q=Pan02+%E2%80%93+Pancreatic+Ductal+Adenocarcinoma+Model+Characterized+for+Immuno-oncology+Applications+> (accessed 25. Januar 2019).
103. Zhang N, Tu J, Wang X, Chu Q. Programmed cell death-1/programmed cell death ligand-1 checkpoint inhibitors: differences in mechanism of action. *Immunotherapy* 2019; 11:429–441.
104. Lecis D, Sangaletti S, Colombo MP, Chiodoni C. Immune Checkpoint Ligand Reverse Signaling: Looking Back to Go Forward in Cancer Therapy. *Cancers* 2019;11.
105. Gato-Cañas M, Zuazo M, Arasanz H, Ibañez-Vea M, Lorenzo L, Fernandez-Hinojal G, et al. PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Reports* 2017; 20:1818–1829.
106. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007; 27:111–122.
107. Rozali EN, Hato SV, Robinson BW, Lake RA, Lesterhuis WJ. Programmed death ligand 2 in cancer-induced immune suppression. *Clinical & developmental immunology* 2012; 2012:656340.
108. Burrack AL, Spartz EJ, Raynor JF, Wang I, Olson M, Stromnes IM. Combination PD-1 and PD-L1 Blockade Promotes Durable Neoantigen-Specific T Cell-Mediated Immunity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cell Reports* 2019; 28:2140-2155.e6.
109. Adunka T. Characterization of murine pancreatic carcinoma models regarding immunosuppressive mechanisms and therapy with bifunctional siRNA targeting galectin-1. *Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät* 2014.
110. Hogan BV, Peter MB, Shenoy HG, Horgan K, Hughes TA. Surgery induced immunosuppression. *The surgeon: journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland* 2011; 9:38–43.

7. Verzeichnis der Abkürzungen/Akronyme

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ADAM17	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17</i>
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
Arg1/2	Arginase 1/2
ARID1A	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 1A</i>
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>copy-Desoxyribonukleinsäure</i>
CFSE	5-(6-)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CMP	<i>Common myeloid progenitor</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
EU	Europäische Union
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAS(-L)	Fas-Rezeptor/Fas-Ligand
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
FOLFIRINOX	Chemotherapie-Schema: Fluoruracil, Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin
Freq	<i>Frequency/Häufigkeit</i>
G	Gauge
Gal9	Galectin 9
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GEMM	<i>Genetically engineered mouse model</i>

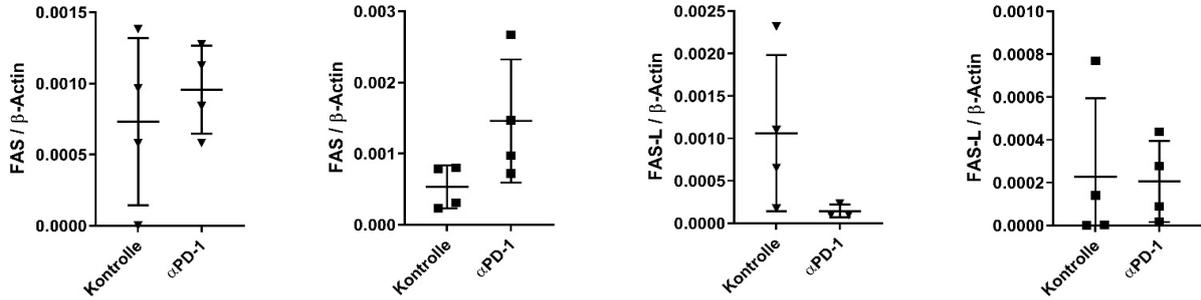
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GP	<i>Granulocyte progenitor</i>
GR	Granulozyt
GVAX	<i>GM-CSF gene-transfected tumor cell vaccine</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
i.p.	Intraperitoneal
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Ly-6C/G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus C/G</i>
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MDA-5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MDSCs	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
M-MDSCs	<i>Monocytic MDSCs</i>
MΦ	Monozyt
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
Nos	<i>Nitric oxide synthase</i>
Nox	NADPH Oxidase
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PanIN	Intraepitheliale Neoplasie des Pankreas
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PDAC	<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death 1 ligand 1</i>
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid

PMN-MDSCs	<i>Polymorphonuclear MDSCs</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion
RAG2	<i>Recombination activating gene 2</i>
RCF	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
T _H 17	Subtyp T-Helferzelle, Produktion von IL-17
Tim-3	<i>T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3</i>
TME	<i>Tumor microenvironment</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

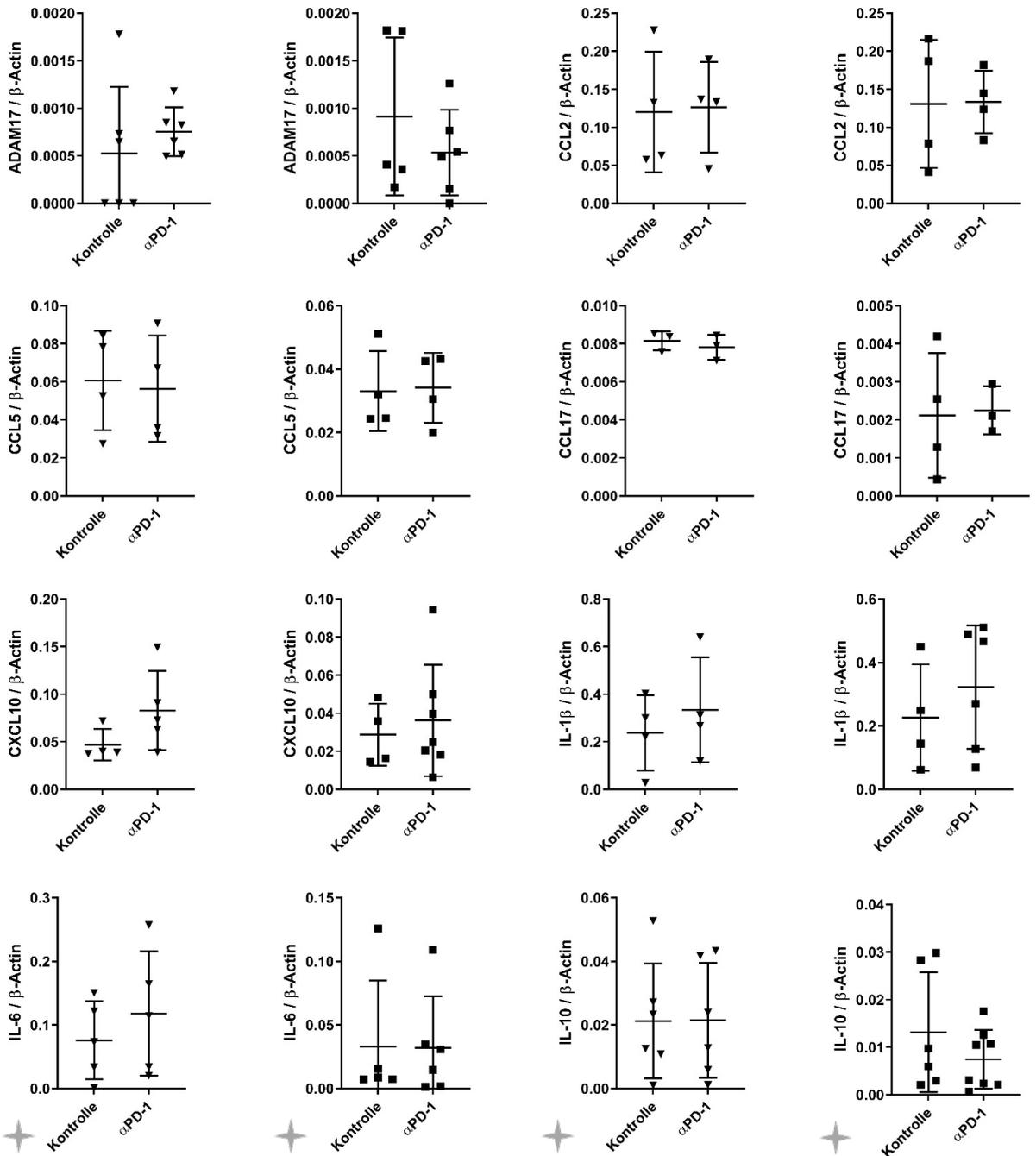
Anhang

A. Tumor Apoptose

▼ M-MDSCs ■ PMN-MDSCs



Chemotaxis/Inflammation

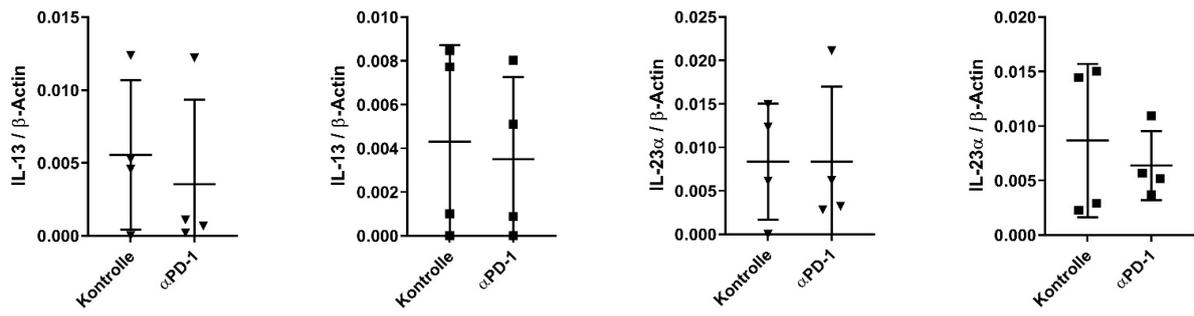


✦ im Ergebnisteil bereits aufgeführt

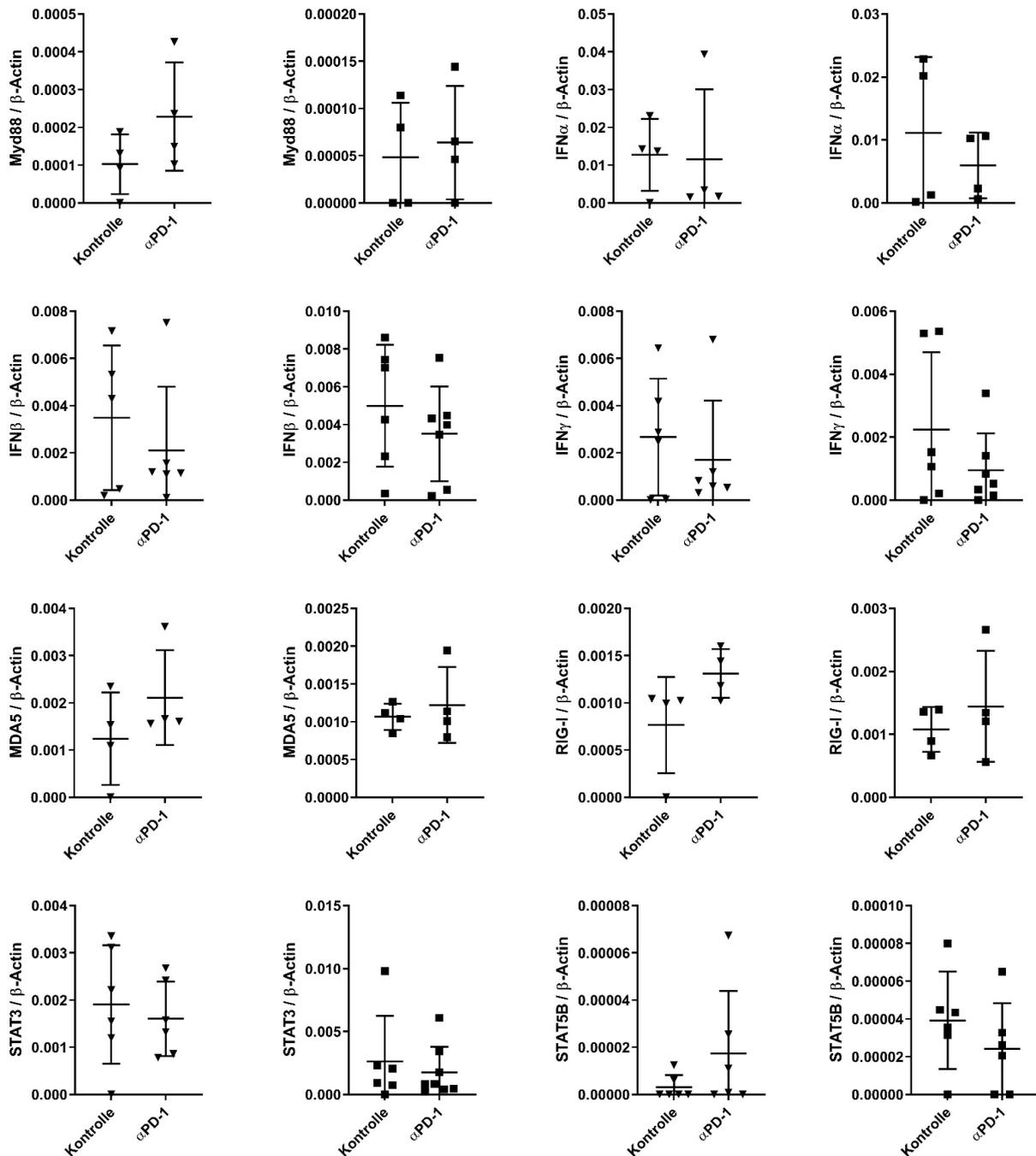
Chemotaxis/Inflammation

▼ M-MDSCs

■ PMN-MDSCs

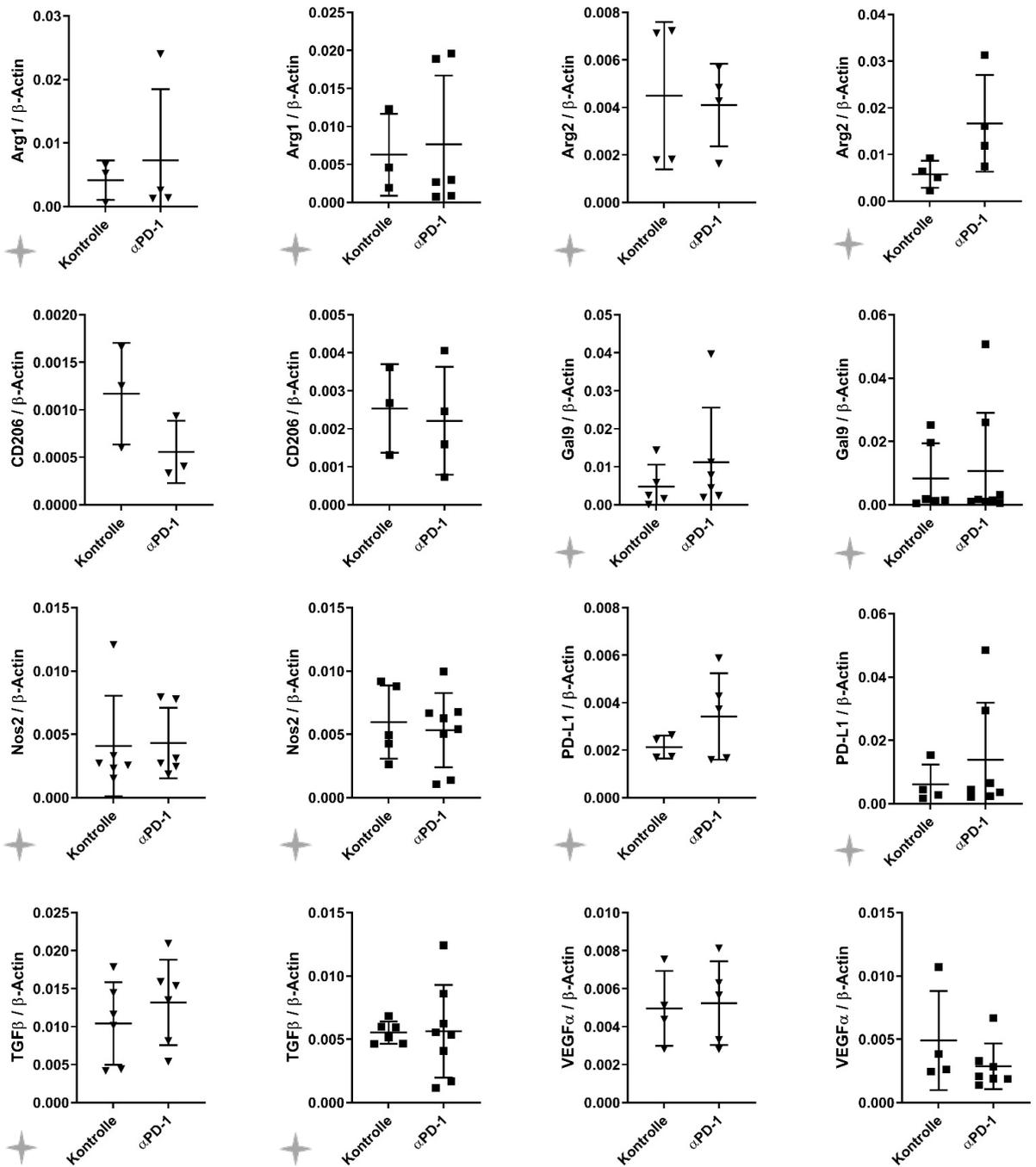


IFN-Signalweg



Immunregulation

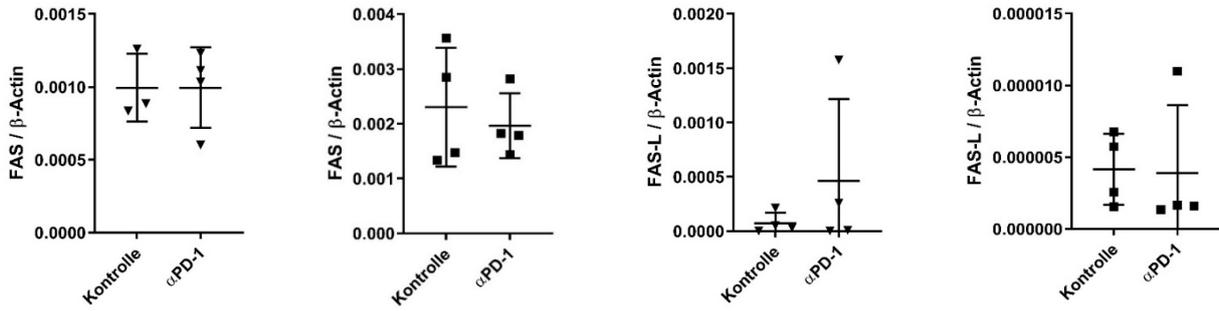
▼ M-MDSCs ■ PMN-MDSCs



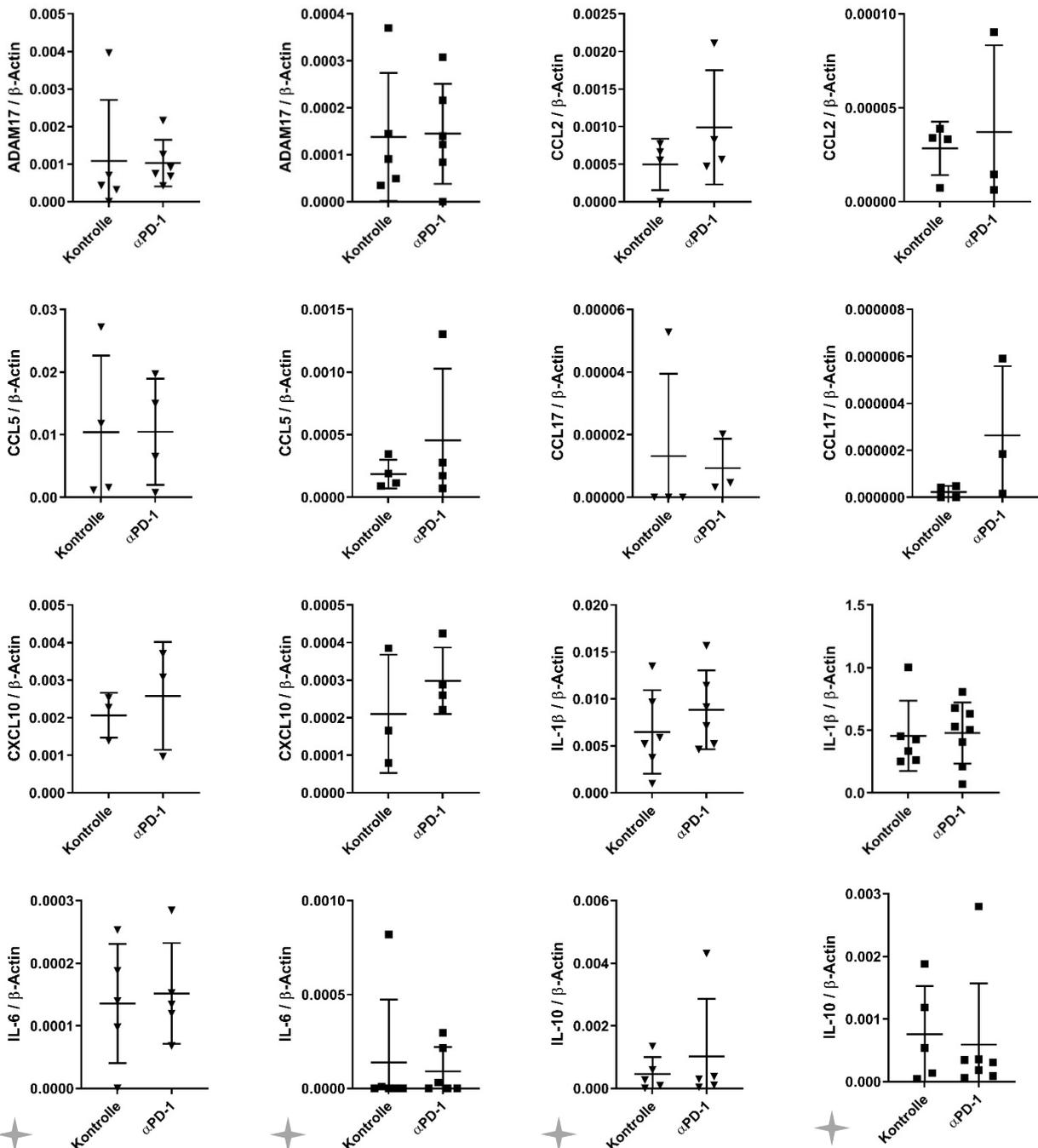
★ im Ergebnisteil bereits aufgeführt

B. Milz Apoptose

▼ M-MDSCs ■ PMN-MDSCs



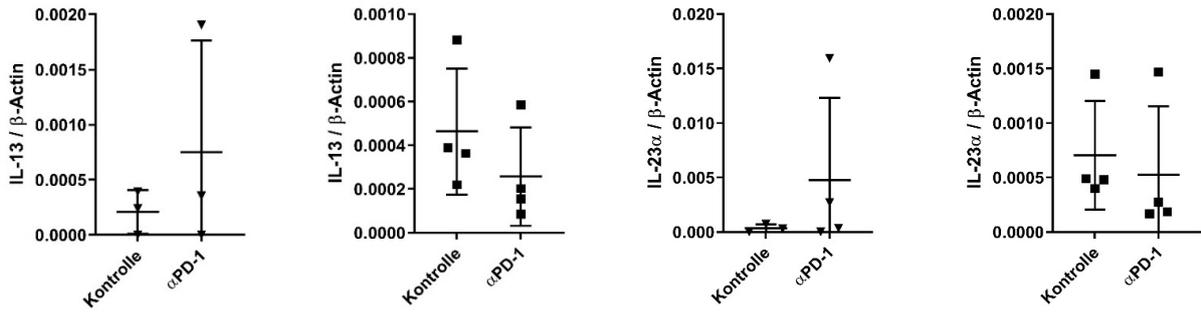
Chemotaxis/Inflammation



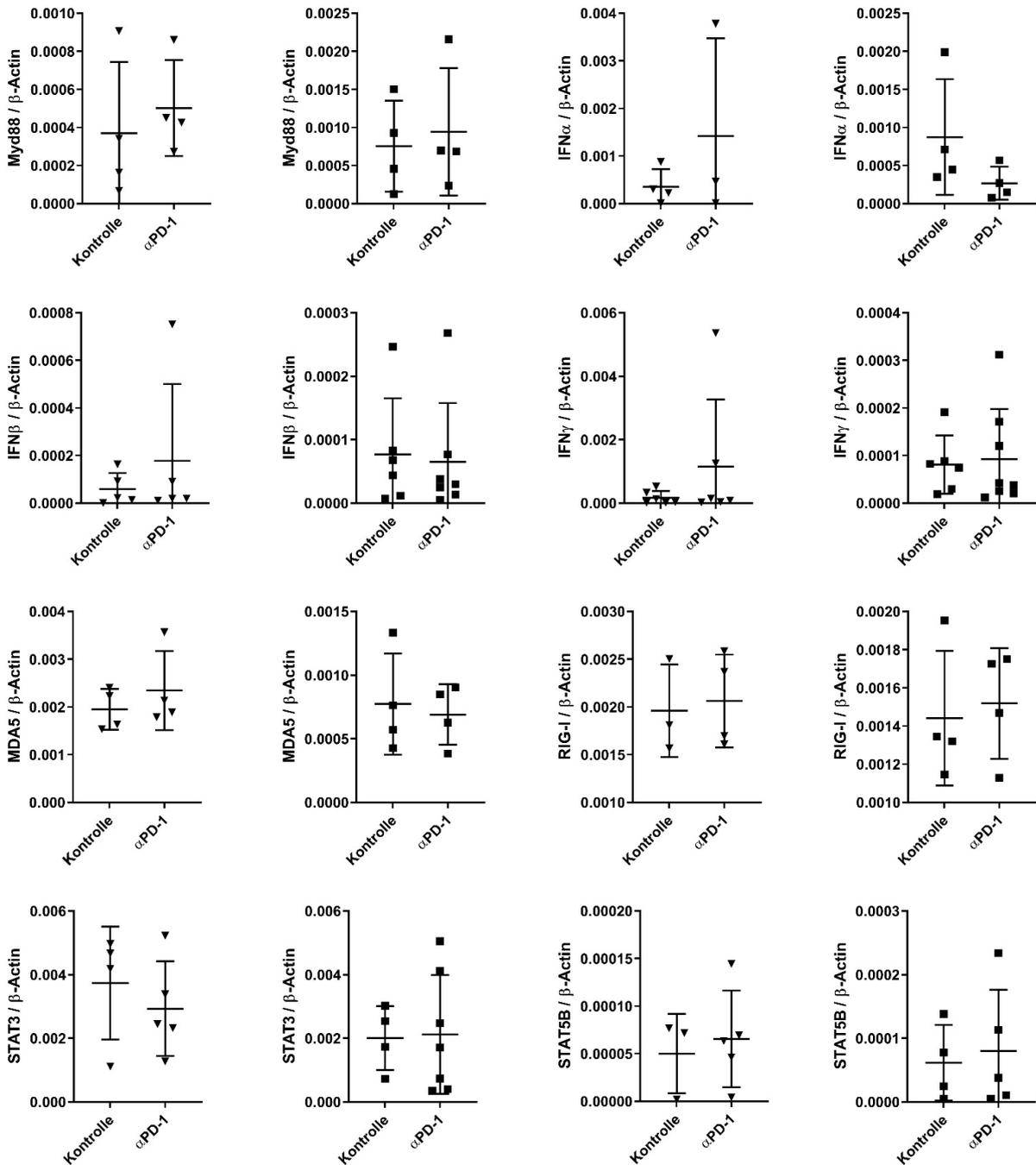
✦ im Ergebnisteil bereits aufgeführt

Chemotaxis/Inflammation

▼ M-MDSCs ■ PMN-MDSCs

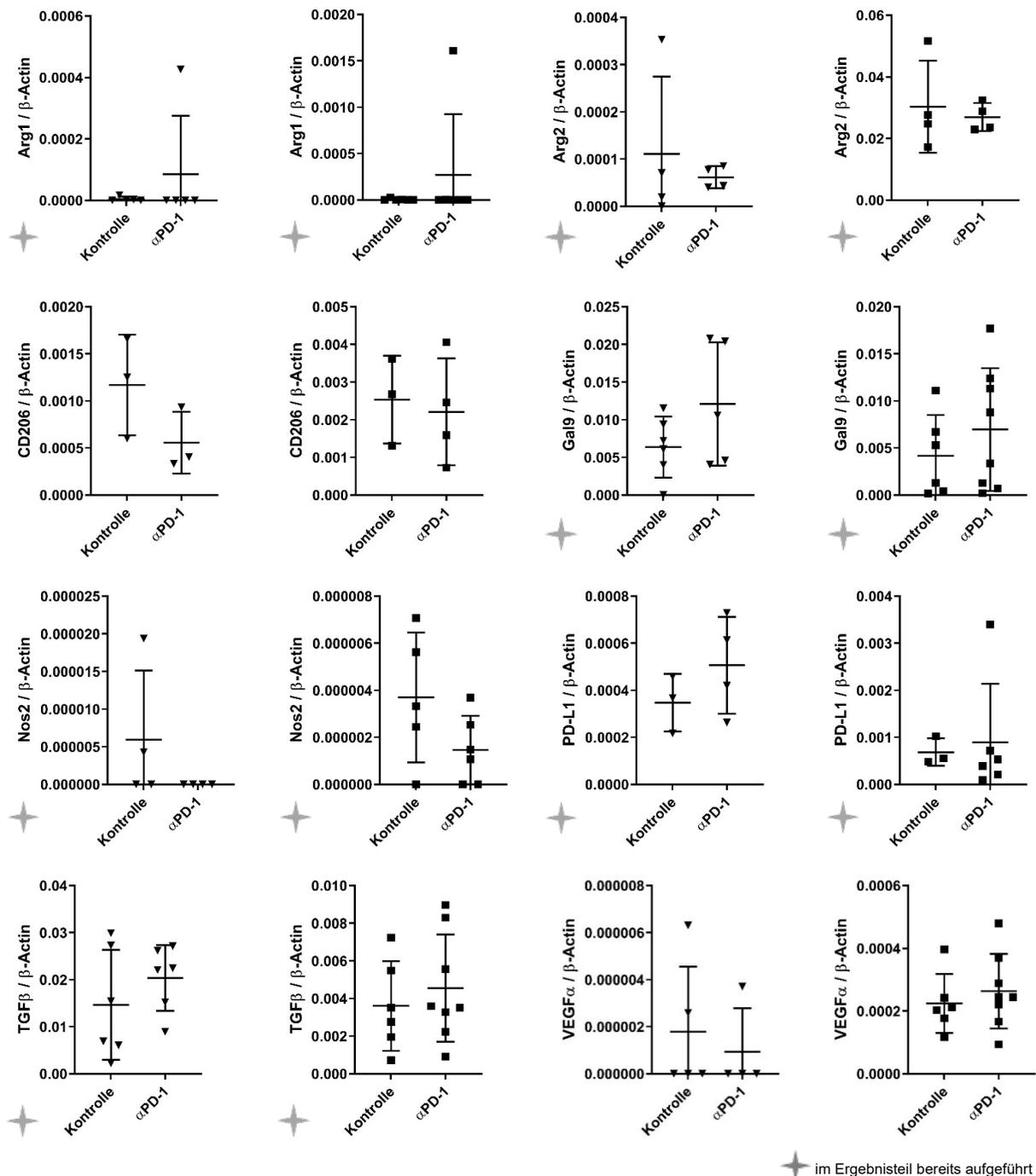


IFN-Signalweg



Immunregulation

▼ M-MDSCs ■ PMN-MDSCs



Suppl. Abb. 1: α PD-1-Therapie hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression ausgewählter Suppressionsmarker im subkutanen Panc02-Mausmodell

C57BL/6-Mäuse erhielten nach subkutaner Tumorinduktion mit Panc02-Zellen intraperitoneale Injektionen mit 2x250 μ g α PD-1-Antikörper bzw 2x250 μ g IgG2a κ -Isotypkontrolle vier Tage und einen Tag vor Organentnahme. Tumore und Milzen wurden entnommen und aufgearbeitet. Aus hochangereicherten Zellsuspensionen aus Tumor (A) und Milz (B) wurde die RNA isoliert und die Genexpression ausgewählter Suppressionsmarker auf mRNA-Ebene nach Präamplifikation der cDNA mittels qRT-PCR bestimmt und in die Kategorien Apoptose, Chemotaxis/Inflammation, IFN-Signlaweg und Immunregulation eingeteilt. Dargestellt sind Mittelwerte + SEM.

Eidesstattliche Versicherung

Ritter, Iris

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**Einfluss der PD-1/PD-L1-Achse auf Phänotyp und Funktion Myeloider
Suppressorzellen (MDSCs) im murinen Pankreaskarzinommodell**

selbständig 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.

Heidelberg, 01.03.2022

Ort, Datum

Iris Ritter

Unterschrift Doktorand

Erklärung zu Daten in zwei Dissertationen

Die Daten in folgendem Teil der vorliegenden Dissertation wurden in Kooperation mit Frau Dr. med. Sabrina V. Kirchleitner generiert.

- Überlebenskurve im T110299-Tumormodell (Abb. 3.1.C)

Es ist geplant, die Daten im Rahmen einer gemeinsamen Veröffentlichung mit geteilter Erstautorenschaft zu publizieren. Sie wurden nicht in der Dissertationsschrift von Frau Dr. med. Sabrina V. Kirchleitner aufgeführt.

Hiermit wird bestätigt, dass die obenstehenden Daten in Zusammenarbeit entstanden sind.

Dr. med. Sabrina V. Kirchleitner

Iris Ritter, Ärztin