

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE
Leitung: Prof. Dr. Markus Feuerer
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EINFLUSS DES TNF/TNF-REZEPTOR-SYSTEMS AUF
MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nils Benjamin Müller

2017

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE
Leitung: Prof. Dr. Markus Feuerer
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EINFLUSS DES TNF/TNF-REZEPTOR-SYSTEMS AUF
MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nils Benjamin Müller

2017

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Daniela Männel

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung:

20.07.2017

Inhaltsverzeichnis

1	EINFÜHRUNG	4
1.1	MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS (MDSC)	4
1.1.1	<i>Herkunft und Vorkommen</i>	4
1.1.2	<i>Wirkungsmechanismen</i>	4
1.1.2.1	Arginin-Depletion und Stickstoffmonoxid	5
1.1.2.2	Reaktive Sauerstoffspezies	5
1.1.2.3	Peroxyinitrit	5
1.1.2.4	Induktion und Aktivierung regulatorischer T-Zellen	5
1.1.2.5	Antigenspezifität der T-Zellsuppression	6
1.1.3	<i>Veränderungen unter pathologischen Bedingungen</i>	7
1.1.4	<i>Therapeutische Ansätze</i>	8
1.2	DER TUMORNEKROSE-FAKTOR (TNF) UND SEINE REZEPTOREN	9
1.2.1	<i>Der Tumornekrose-Faktor</i>	9
1.2.2	<i>Rezeptoren des Tumornekrose-Faktors</i>	9
1.2.2.1	TNFR1	10
1.2.2.2	TNFR2	10
1.2.2.3	Wechselwirkungen zwischen TNFR1 und TNFR2	11
1.2.3	<i>Biologische Funktion des TNF</i>	11
1.2.4	<i>TNF bei Tumorerkrankungen</i>	12
1.2.5	<i>TNF bei Autoimmunerkrankungen</i>	13
1.3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	14
2	MATERIALIEN	15
2.1	VERWENDETE GERÄTE	15
2.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	16
2.3	REAGENZIEN	17
2.4	PUFFER UND MEDIEN	17
2.5	ANTIKÖRPER	18
2.6	MÄUSE	19
2.7	SOFTWARE	19
2.8	TNC-SC-TNF80	20
3	METHODEN	21
3.1	ZELLKULTURBEDINGUNGEN	21
3.2	ISOLATION UND AUFREINIGUNG DER MILZZELLEN	21
3.3	GEWINNEN DER ZELLEN DES KNOCHENMARKS	21

3.4	GEWINNEN DER ZELLEN DES LYMPHKNOTENS FÜR FACS-FÄRBUNG.....	22
3.5	BLUTENTNAHME FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE	22
3.5.1	<i>Retrobulbäre Blutentnahme</i>	22
3.5.2	<i>Intrakardiale Blutentnahme</i>	23
3.6	BESTIMMUNG DER ZELLZAHLEN	23
3.7	CFSE-FÄRBUNG.....	24
3.8	MACS-AUFREINIGUNG DER LY6C ⁺ ZELLEN AUS DEM KNOCHENMARK	24
3.9	GEWINNUNG VON CD11b ⁺ LY6C ⁺ UND CD11b ⁺ LY6G ⁺ ZELLEN AUS DER MILZ MITTELS MACS.....	25
3.10	KULTIVIEREN VON KNOCHENMARKZELLEN.....	27
3.11	T-ZELL-SUPPRESSIONSASSAY MIT KNOCHENMARKZELLEN	27
3.12	PROLIFERATIONSASSAY	28
3.13	ERNTEN DER ZELLEN FÜR DIE ANALYSE IM FACS.....	28
3.14	ANALYSE IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	29
3.14.1	<i>Färbung von Oberflächenmarkern zur Isolierung mit Durchflusszytometrie</i>	29
3.14.2	<i>Färbung von Oberflächenmarkern für durchflusszytometrische Analyse</i>	29
3.14.3	<i>Färbung von Oberflächenmarkern bei in EDTA abgenommenen Blutproben für die durchflusszytometrische Analyse</i>	30
3.14.4	<i>Färbung von FoxP3 für die durchflusszytometrische Analyse</i>	31
3.14.5	<i>Photometrische NO-Bestimmung im Überstand</i>	31
3.15	IN VIVO VERSUCHE.....	32
3.15.1	<i>Subkutane Injektionen</i>	32
3.15.2	<i>Intraperitoneale Injektionen</i>	32
3.15.3	<i>Subkutanes Setzen von Tumoren</i>	32
4	ERGEBNISSE.....	33
4.1	ÜBERSTAND UND GEREINIGTES TNCsCTNF80 SIND BIOLOGISCH AKTIV	33
4.2	T-ZELL-SUPPRESSIVITÄT VON MDSC EX VIVO IST DURCH sCTNF80 NICHT BEEINFLUSST	34
4.3	FEHLEN DES TNFR2 BEEINFLUSST ZELLDIFFERENZIERUNG IN KNOCHENMARKKULTUR.....	35
4.4	sCTNF80 FÜHRT ZU VERRINGERTER RECOVERY NACH KNOCHENMARKKULTUR.....	38
4.5	MDSC-MARKER BEI KULTIVIERUNG MIT sCTNF80 LEICHT ERHÖHT.....	38
4.6	KNOCHENMARK-ZELLEN WEISEN NACH SECHSTÄGIGER INKUBATION MIT sCTNF80 GERINGERE SUPPRESSIVE AKTIVITÄT AUF.....	44
4.7	sCTNF80 FÜHRT IN VIVO ZUR EXPANSION DER CD11b ⁺ ZELLEN IM KNOCHENMARK.....	47
4.8	sCTNF80 FÜHRT ZU LEICHTER EXPANSION DER PMN-MDSC IN DER MILZ.....	53
4.9	REGULATORISCHE T-ZELLEN WERDEN DURCH sCTNF80-GABE IN VIVO NICHT BEEINFLUSST.....	55
4.10	sCTNF80-GABE BEEINFLUSST DEN GEWICHTSVERLAUF GESUNDER WT-MÄUSE NUR GERINGFÜGIG	56
4.11	DEUTLICH STÄRKERE EFFEKTE VON sCTNF80 BEI TUMORKRANKEN MÄUSEN.....	56
4.12	MDSC IM KNOCHENMARK EXPANDIEREN DEUTLICH INFOLGE VON sCTNF80-GABE BEI TUMORERKRANKUNG	58
4.13	ÄHNLICHE EFFEKTE DURCH sCTNF80 IN DER MILZ BEI TUMORERKRANKTEN MÄUSEN.....	59

4.14	REGULATORISCHE T-ZELL-POPULATION BLEIBT AUCH BEI TUMORKRANKEN MÄUSEN DURCH sCTNF80 UNBEEINFLUSST	63
4.15	sCTNF80-GABE BEEINFLUSST AUCH BEI TUMORKRANKEN MÄUSEN DEN GEWICHTSVERLAUF NUR GERINGFÜGIG.....	64
5	DISKUSSION.....	66
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	70
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	71
8	LITERATUR.....	73
9	DANKSAGUNG.....	95

1 Einführung

1.1 Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC)

1.1.1 Herkunft und Vorkommen

Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) sind eine heterogene Gruppe unreifer myeloider Zellen (immature myeloid cells, IMC) [1]. Ihnen gemeinsam ist neben ihrem Ursprung aus dem Knochenmark und ihrem unreifen Status die Fähigkeit, die Immunantwort effektiv zu supprimieren, wobei die Subpopulationen unterschiedliche Mechanismen nutzen [1].

Phänotypisch sind die MDSCs der Maus als CD11b⁺ GR1⁺ (granulocyte differentiation antigen) Zellen beschrieben [2]. Diese machen unter physiologischen Bedingungen 20-30% der Zellen im Knochenmark und 2-4% der Milzzellen aus. Im Lymphknoten kommen sie bei naiven Tieren nicht vor [1]. Die CD11b⁺ GR1⁺ Zellen sind frühe monozytäre, granulozytäre und dendritische Vorläuferzellen, wobei nur die monozytären und dendritischen Vorläuferzellen *in vitro* erfolgreich ausdifferenziert werden können [3]. GR1 bezeichnet ein Epitop auf zwei verschiedenen Oberflächenproteinen (Ly6C und Ly6G), die unabhängig voneinander exprimiert und durch unterschiedliche Gene codiert werden. Der monozytären Zelllinie entstammende MDSCs werden als CD11b⁺ Ly6G⁻ und Ly6C^{high} beschrieben (MO-MDSC), während MDSCs der granulozytären Linie als CD11b⁺ Ly6G⁺ und Ly6C^{low} charakterisiert sind (PMN-MDSC). Mit spezifischen Antikörpern für Ly6G und Ly6C können diese Subpopulationen phänotypisch differenziert werden [3, 4]. PMN-MDSC machen meistens 20-30% der CD11b⁺ GR1⁺ Zellen aus, und auch die MO-MDSC umfassen 20-30% dieser Zellen. Unter physiologischen Bedingungen differenzieren die IMC zügig zu reifen dendritischen, granulozytären oder monozytären Zellen aus [1].

1.1.2 Wirkungsmechanismen

Die suppressive Aktivität von MDSCs ist vielseitig. So können sie unter anderem IL-10 und TGF- β produzieren und das angeborene Immunsystem durch Beeinflussung der Zytokinproduktion von Makrophagen modulieren [5]. Ihre wohl zentralste und am umfassendsten erforschte Funktion besteht jedoch in ihrer Rolle als potente Suppressoren der T-Zell-Antwort und damit der Modulation des adaptiven Immunsystems. Für die meisten dieser Mechanismen bedarf es direkter Zellkontakte [1].

1.1.2.1 Arginin-Depletion und Stickstoffmonoxid

Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Depletion von Arginin aus der Mikroumgebung der MDSC, dessen Verfügbarkeit für die Proliferation und Funktion der T-Zellen wesentlich zu sein scheint [6–10]. So führen verminderte Konzentrationen an Arginin zu einer verringerten Expression der CD3 α -Kette in T-Lymphozyten [9], verhindern die verstärkte Expression von Cyclin D3 und Cyclin-abhängigen Kinase 4 und behindern dadurch die Proliferation der T-Zellen [11, 7].

Die Depletion von Arginin erfolgt über zwei Mechanismen. Arginase 1, ein Enzym, das beiden Subpopulationen von MDSC gleichermaßen zu eigen ist, katalysiert die Reaktion von L-Arginin zu Ornithin und Harnstoff. Die induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (iNOS), die überwiegend in MO-MDSC eine Rolle spielt [3, 12], depletiert ebenfalls Arginin und produziert zugleich NO [8, 10]. NO kann verschiedene Aminosäuren nitrosylieren, hemmt JAK3 und STAT5 [13] sowie die Expression von MHC II [14] und führt zur Induktion der Apoptose in T-Lymphozyten [15].

1.1.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Ein weiterer potenter Mechanismus der Immunsuppression insbesondere der PMN-MDSC [3, 12] ist die NADPH-abhängige Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die suppressive Potenz von MDSC aus Patienten und Mäusen konnte durch Hemmung der ROS-Produktion *in vitro* vollständig aufgehoben werden [2, 16, 17].

1.1.2.3 Peroxynitrit

Peroxynitrit ist das Produkt einer Reaktion von NO mit einem Superoxidanion. Bei einer Vielzahl an Tumorerkrankungen sind erhöhte Konzentrationen im Tumorgebiet mit einem schlechteren Krankheitsverlauf assoziiert [18–24]. Auch das Auftreten nicht aktivierbarer T-Zellen wird mit hohen Konzentrationen an Peroxynitrit in Verbindung gebracht [25]. Nitrat bindet an verschiedenste Aminosäuren und bei direktem Zell-Zell-Kontakt an Aminosäuren des CD8-Rezeptors. Diese Zellen können danach nicht mehr durch ihr Antigen aktiviert werden. Antigenunabhängige Stimuli führten weiterhin zu einer Aktivierung der T-Zellen [26, 27].

1.1.2.4 Induktion und Aktivierung regulatorischer T-Zellen

Es wurde vielfach beschrieben, dass MDSC im Tumormodell die *de novo*-Entwicklung von FoxP3-positiven regulatorischen T-Zellen fördern oder sie sogar induzieren kann [28, 29]. Außerdem können vorhandene regulatorische T-Zellen aktiviert werden [30, 31]. Für das Auftreten dieser Effekte waren Tumor-spezifische T-Zellen, IFN γ und IL-10 notwendig [29].

Auch wenn dieser Mechanismus im Rahmen der synergistischen Funktion von MDSC und regulatorischen T-Zellen durchaus naheliegend erscheint, ist der Mechanismus hier noch nicht eindeutig geklärt. So waren in einem Tumormodell CD152 (cytotoxic lymphocyte antigen 4, CTLA4)-positive MDSC notwendig [28], während in einem anderen Tumormodell der Mechanismus Arginase 1-vermittelt war und die Antigenpräsentation durch MDSC erforderte [32]. Weitere Publikationen listen die Notwendigkeit der Expression von CD40 auf MDSC [30] oder der Co-Expression von CD80 und CD86 durch MDSC auf [33], während andere Untersuchungen keine Auswirkungen der MDSC zumindest auf die *de novo*-Generierung regulatorischer T-Zellen feststellen konnten [12].

1.1.2.5 Antigenpezifität der T-Zellsuppression

In vitro-Daten deuten bislang insbesondere auf eine antigenunspezifische T-Zell-Suppression hin. Die in der Mikroumgebung der MDSC vorhandene Arginase, ROS und NO hemmen die T-Zellproliferation unabhängig von deren Antigenpezifität [34, 35]. Wie zentral dieser Effekt *in vivo* eine Rolle spielt, ist jedoch strittig. T-Zellen aus peripheren lymphatischen Organen von Mäusen mit Tumorerkrankung sind auf Stimuli durch den eigenen Tumor nicht reaktiv, andere Stimuli wie IL-2-, CD3- und CD28-Antikörper führen jedoch zu einer adäquaten Aktivierung. Selbige Beobachtungen konnten bei T-Zellen aus dem peripheren Blut von Tumorkranken gemacht werden [26, 36–39].

Stattdessen gibt es zahlreiche Hinweise auf eine ausgeprägte antigen spezifische Suppression der T-Zellen. So wurde festgestellt, dass MDSC lösliche Antigene aufnehmen und diese auf MHC-I und MHC-II T-Zellen präsentieren können [12, 26]. MHC-II wird jedoch nur von einem kleinen Anteil tumorassoziierter MDSC exprimiert, so dass hier die Datenlage noch dünn ist [1]. Die Dauer eines engen Zellkontaktes zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen ist deutlich länger als antigenunspezifische Zellinteraktionen [34, 40, 41]. Damit ROS und Peroxynitrit an der T-Zelloberfläche und damit auch am T-Zell-Rezeptor ihre Wirkung entfalten können, bedarf es einer solchen, längeren Interaktion. *In vitro* konnte festgestellt werden, dass bei Gabe von spezifischem MHC-I Antikörper die Suppression der CD8⁺ T-Zellen aufgehoben werden konnte [42]. Es sieht daher danach aus, dass der antigen spezifischen T-Zell-Suppression *in vivo* eine hohe Bedeutung zukommt. Die antigenunspezifische Suppression erscheint in erster Linie im Tumorgebiet von Bedeutung zu sein. Hierauf wird später näher eingegangen.

1.1.3 Veränderungen unter pathologischen Bedingungen

Unter physiologischen Bedingungen differenzieren IMC zügig aus und gelangen als reife Granulozyten, dendritische Zellen oder Monozyten in die Peripherie. Wird das Immunsystem mit einer ernsthafteren Erkrankung konfrontiert, kommt es zu einem partiellen Block der IMC-Ausdifferenzierung und dadurch zur Expansion der sonst kleinen MDSC-Population [1]. Die MDSC werden an den Ort der Erkrankung rekrutiert und sind auch im peripheren Blut und sekundären lymphatischen Organen anzutreffen [1]. Vor Ort können sie durch eine Vielzahl an Botenstoffen aktiviert werden. Hierzu zählt neben den Interleukinen-I , -4, -10 und -13 beispielsweise auch TNF und Toll-like Rezeptoren [43–49]. Ausführlich beschrieben ist dieser Vorgang bei Tumorerkrankungen. In an Tumoren erkrankten Mäusen machen MDSC teilweise bis zu 40% der Milzzellen aus, normal sind 2-4% [1], und auch im Patientenblut konnte bei Tumorerkrankungen ein Anstieg von MDSC um das bis zu zehnfache festgestellt werden [6, 36, 50, 51]. Die Menge an MDSC korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung und kann als negativer prognostischer Marker für den Verlauf der Erkrankung dienen [52–54]. Der Anstieg der PMN-MDSC-Population ist dabei stärker als der der MO-MDSC [3]. Auch im Tumorgebiet finden sich hohe Konzentrationen an MDSC [1, 55]. Bei an Tumoren erkrankten Mäusen beobachtet man nach MDSC-Depletion ein verzögertes Tumorwachstum [56] und eine partielle Wiederherstellung der antitumoralen Immunantwort [56, 57]. Auch bei der Angiogenese, dem invasiven Wachstum und der Metastasierung des Tumors scheinen MDSC eine wesentliche Rolle zu spielen [1, 55, 58, 43, 44, 59–70].

Während MDSC bei Tumorerkrankungen allgemein eher zu einem schlechteren Verlauf führen, lässt sich bislang keine eindeutige Tendenz ihrer Auswirkungen auf Autoimmunerkrankungen erkennen [71]. So sind MDSC zumindest bei Frauen mit systemischem Lupus erythematoses mit einem schlechteren Krankheitsverlauf assoziiert [72–74], während bei Autoimmunhepatitis ein protektiver Effekt durch MDSC beobachtet wird [75–79]. Auf andere einzelne Krankheiten bezogen ist die Studienlage nach wie vor widersprüchlich [55, 71]. So existiert bei rheumatoider Arthritis sowohl eine Publikation, die MDSC eine eventuell IL-17 vermittelte krankheitsfördernde Wirkung zuschreiben [80], als auch welche, in denen durch MDSC gesundheitsfördernde Effekte beobachtet wurden [81–83]. Selbiges gilt für experimentelle autoimmune Encephalomyelitis [84–86] und inflammatory bowel disease [87–92].

Bei Infektionen mit *Trypanosoma cruzi* [93, 94], *Listeria monocytogenes*, *Leishmania major* [95], verschiedenen Helminthen [96–98] oder *Candida albicans* [99] kommt es ebenfalls zur

systemischen Expansion der MDSC-Populationen. Auch traumatischer Stress kann einen MDSC-Anstieg bewirken [100].

Es existieren verschiedene Botenstoffe, die die MDSC-Expansion bedingen können (COX2, Prostaglandine [101–103], SCF [101], IL-6 [59], GM-CSF [103], VEGF [104] oder Interleukin-6 [43, 44, 105–107]). Bei Tumorerkrankungen werden diese auch vom Tumor selbst gebildet [43, 108, 44, 109–111, 55]. Die Signalwege führen meistens via Aktivierung der Janus-Kinase zur Induktion von STAT3, worüber die MDSC-Expansion vermittelt zu sein scheint [1, 112–115]. MDSC benötigen unabhängig von dem Signal zur Expansion einen separaten Stimulus zur Aktivierung [1], der durch T-Zellen, Stromazellen des Tumors, Bakterien oder Viren erfolgen kann [116]. Meistens handelt es sich hierbei um Liganden für Toll-like Rezeptoren, so dass die Aktivierung der MDSC über Prinzipien des angeborenen Immunsystems erreicht werden kann [1, 116]. Die Aktivierung scheint in erster Linie STAT1 assoziiert zu sein [1, 27]. Infolge der Aktivierung kommt es zur Hochregulation von Arginase 1, iNOS, sowie der Synthese von ROS und Peroxynitrit [1, 12, 27, 58]. Dieses zweigliedrige System der Expansion und Aktivierung erlaubt eine fein abgestimmte Modulation der Immunantwort.

1.1.4 Therapeutische Ansätze

Durch das große Spektrum an Erkrankungen, die mit Induktion oder Hemmung von MDSC assoziiert sind, sind sie vielversprechende Ziele therapeutischer Ansätze. Insbesondere bei Tumorerkrankungen, bei denen ausbleibende Impferfolge und die Rezidivproblematik eng mit dem supprimierten Immunsystem verknüpft sind, erhofft man sich Fortschritte.

Einer der aussichtsreichsten Ansätze ist die Förderung der Ausdifferenzierung unreifer myeloider Zellen. Dies gelingt beispielsweise durch Vitamin A Metaboliten [42, 117–119]. Hierdurch konnten bereits am Patienten und im Tumormausmodell verzögertes Tumorstadium mit einer Verbesserung der T-Zell-vermittelten Tumoralabwehr erreicht werden [36, 120, 121]. All-trans Retinsäure (ein Metabolit des Vitamin A) wirkte dabei unterschiedlich auf MO- und PMN-MDSC. Während erstere ausdifferenzierten, wurde bei letzteren vorwiegend die Apoptose induziert [1, 122].

Andere Ansätze versuchen, die MDSC-Funktion negativ zu beeinflussen, indem Arginase 1-, iNOS-Expression oder die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies gehemmt wird. Erste Erfolge konnten hier mit COX-2 Inhibitoren [123, 124], Phosphodiesterase-5 Inhibitoren [125] und Nitrospirin erreicht werden [126]. Erfolgversprechende Effekte zeigte auch eine Interleukin-6-Blockade bei Mäusen mit Prostata-Karzinom [127, 128].

1.2 Der Tumornekrose-Faktor (TNF) und seine Rezeptoren

TNF ist Teil der größten bekannten Zytokinfamilie [129]. Die sogenannte TNF-Superfamilie wird über ihre Transmembranrezeptoren charakterisiert, die 1-6 cysteinreiche Abschnitte auf ihrer extrazellulären Seite als Gemeinsamkeit aufweisen. Diese cysteinreichen Regionen sind für die Bindung der Liganden entscheidend [130]. Die Rezeptoren der TNF-Superfamilie vermitteln ihre Wirkung mittels weiterer Adapterproteine über intrazelluläre Signalkaskaden, wobei zwei unterschiedliche Rezeptortypen unterschieden werden können. Es existieren einerseits die sogenannten Todesrezeptoren (death receptors), die über ihre Todesdomäne (death domain) zum Zelltod führen können. Dabei spielen Adaptorproteine wie TRADD (TNFR-receptor associated protein with death domain) und FADD (Fas associated protein with death domain) eine entscheidende Rolle [131–133]. Als zweite Rezeptorgruppe gibt es jene, die über keine Todesdomäne verfügen. Stattdessen weisen diese eine TIM-domain (TRAF interaction motif) auf, die beispielsweise über TRAF-Proteine (TNF-receptor adaptor factor) ihre Wirkung entfalten können [131].

Die durch die TNF-Superfamilie vermittelten biologischen Effekte sind extrem vielseitig und können sowohl zum Überleben und zur Aktivierung der Zelle, als auch zum Zelltod führen. Ebenso können sie sowohl positive wie auch negative Auswirkungen bei Entzündungsreaktionen, Autoimmunerkrankungen, Erregerabwehr oder Krebserkrankungen haben.

1.2.1 Der Tumornekrose-Faktor

TNF wird als 26kDa großes Typ II Transmembranprotein synthetisiert (mTNF) [134, 135]. Es kann entweder membrangebunden an seine zwei Rezeptoren binden oder durch die Metalloprotease TACE (TNF converting enzyme) von der Membran abgespalten werden, so dass es als lösliches TNF (sTNF) vorliegt [136–142]. Sowohl lösliches als auch membrangebundenes TNF kann als Monomer, Dimer oder Trimer vorliegen, wobei es lediglich im trimerisierten Zustand seine Wirkung entfaltet [136].

1.2.2 Rezeptoren des Tumornekrose-Faktors

Membrangebundenes TNF vermittelt seine Wirkung über zwei unterschiedliche Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, während lösliches TNF lediglich TNFR1 mit hinreichender Stärke aktivieren kann [143, 144]. TNFR1 wird auf nahezu allen Körperzellen exprimiert und gehört zu der Familie der Todesrezeptoren [144], während man TNFR2 nur auf bestimmten

Zellpopulationen findet. Im Gegensatz zu TNFR1 weist es auch keine Todesdomäne auf, sondern führt im Regelfall zum Zellerhalt [143]. Die TNFR2-exprimierenden Zellen sind unter anderem Oligodendrozyten [145], Astrozyten [146], T-Zellen [147], Myozyten [148], Thymozyten [149], Endothelzellen, MDSC [150], sowie fetale mesenchymale Stammzellen [151, 152].

1.2.2.1 TNFR1

TNFR1 (p55/p60) besitzt vier cysteinreiche Domänen. Diese cysteinreichen Domänen spielen eine entscheidende Rolle bei der Bindung des Liganden [153]. Weiterhin vermittelt die N-terminale cysteinreiche Region die Trimerisierung des Rezeptors, ohne die eine Ligandenbindung nicht möglich wäre [154]. Nach Ligandenbindung werden zwei Signalkomplexe gebildet, die jedoch räumlich und zeitlich voneinander getrennt sind. Der eine Signalweg wird aktiviert, solange TNFR1 noch in der äußeren Zellmembran verankert ist (Komplex I), während der andere beginnt, nachdem der Rezeptor in die Zelle aufgenommen worden ist (Komplex II) [155].

Komplex I, in dessen Signalkaskade TRADD, TRAF2, RIP1 und andere die Apoptose verhindernden Adaptorproteine involviert sind [156–158], führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 [155, 157–159], was im Regelfall zur Synthese von cFLIP führt und den Zellfortbestand unterstützt [160].

TNFR1 kann nach Aktivierung in die Zelle aufgenommen werden. Im Rahmen dessen findet eine Konformationsänderung statt, die zur Bindung anderer Adaptorproteine führt [161]. Es bildet sich der zweite Komplex, bei dem ebenfalls TRADD und RIP1 eine Rolle spielen, jedoch auch FADD und Procaspase-8 involviert sind. Der Komplex II wird auch als death inducing signaling complex (DISC) bezeichnet [155] und kann Caspase 8 aktivieren, was die Apoptose einleitet. Der Aktivierungsschritt der Caspase 8 wird verhindert, sofern in der Zelle NF- κ B aktiviert ist. Die NF- κ B-Aktivierung führt zur Synthese von cFLIP, einem Protein, das an DISC bindet und darüber die Aktivierung der Caspase 8 und damit die Apoptose verhindern kann [162].

1.2.2.2 TNFR2

TNFR2 (p75/p80) ist ebenfalls ein Transmembranrezeptor mit vier bindungsrelevanten cysteinreichen Domänen [143]. Wenn mTNF an den Rezeptor bindet, kommt es zur Trimerisierung des Rezeptors und darüber zur Interaktion mit diversen Proteinen wie TRAF2 [163, 164], einem Schlüsselprotein in der Signalkette [165]. TRAF2 führt zur Depletion von

Inhibitor of NF- κ B (I κ B) und somit zur Aktivierung von NF- κ B [166, 167]. Welche Effekte durch NF- κ B ausgelöst werden, hängt vom Zelltyp ab, im Regelfall wird jedoch unter anderem durch die Expression von cFLIP das Überleben der Zelle gefördert [162]. Nach der Aktivierung von TNFR2 wird TRAF2 prozessiert und letztendlich durch das Proteasom degradiert [154, 168–172]. Durch diese TRAF2-Depletion reguliert sich der Rezeptor in Maßen selbstständig und verhindert so eine zu intensive Aktivierung [143, 173].

1.2.2.3 Wechselwirkungen zwischen TNFR1 und TNFR2

Bei Aktivierung des TNFR1 fördert Komplex I das Überleben der Zelle [174, 175], während Komplex II die Apoptose induziert [155, 162]. Dieses Gleichgewicht kann durch Stimulation von TNFR2 beeinflusst werden. TNFR2 führt zum Abbau von TRAF2 [154, 168–172], das auch ein entscheidendes Adaptorprotein im Komplex I der Survival-Signalkaskade des TNFR1 ist [174, 175]. Durch TRAF2-Depletion wird dieser Weg gehemmt und der pro-apoptotische Komplex II überwiegt [173]. Andererseits wird durch die TNFR2-vermittelte Depletion von Inhibitor of NF- κ B (I κ B) [166, 167] NF- κ B vermehrt aktiviert und folglich mehr cFLIP gebildet, was vor Apoptose schützt [162].

Je nach Situation und vorhergehender Aktivierung der Zelle kann TNF also zur Aktivierung der Zelle oder zu ihrem Tod führen. Welche Gene infolge einer Aktivierung exprimiert werden, hängt wiederum vom Zelltyp und weiteren Einflüssen ab. TNF kann also eine Vielzahl an teils gegensätzlichen Effekten haben, was die Vielseitigkeit und Komplexität des TNF-TNFR-Systems deutlich macht.

1.2.3 Biologische Funktion des TNF

TNF ist ein Zytokin, das in erster Linie bei der Abwehr bakterieller Infektionen eine zentrale Rolle spielt. Es wird von Makrophagen aber auch von T- und B-Zellen gebildet und rekrutiert weitere Monozyten und neutrophile Granulozyten zum Entzündungsherd. Ein Mechanismus, über den dies erreicht wird, ist die Wirkung von TNF auf Endothelzellen. Die Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, VCAM-1 oder ICAM-1 wird hochreguliert und darüber die transendotheliale Diapedese der Leukozyten gefördert. Außerdem regt es B-Zellen und T-Zellen zur Proliferation an. Auch induziert es die Synthese von IL-1 und IL-6. Letzteres veranlasst die Leber zur Bildung von Akutphase-Proteinen, so dass es bei höheren TNF-Dosen zu einer generalisierten Reaktion mit Fieber kommen kann [152, 176–178].

Allerdings ist TNF auch mit vielen nichtinfektiösen Erkrankungen assoziiert, darunter die chronisch lymphatische Leukämie (ein B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom) [179], das Ovarialkarzinom [180], das Neuroblastom [181] oder auch Typ II Diabetes mellitus [182].

1.2.4 TNF bei Tumorerkrankungen

Ein starkes Indiz für die Relevanz des TNF bei Tumorerkrankungen ist die Tatsache, dass bei Tumorerkrankungen hohe Level an TNF im Tumorgebiet festgestellt werden, die teils vom Tumor selbst produziert werden [183–187]. Im Allgemeinen wird TNF eine tumorfördernde Wirkung zugeschrieben, da bei TNF-Rezeptor defizienten Mäusen (TNFR^{-/-}) gesetzte Tumoren häufig wieder verschwinden [188, 189], während TNF-Applikation bei Wildtyp-Mäusen (WT) zu verstärkter Metastasierung führt [190]. Die möglichen Ursachen für diese Effekte sind Gegenstand aktueller Forschung und dieser Arbeit.

Eine Überlegung ist, dass TNF über die Aktivierung von NF- κ B seine Wirkung direkt an den Tumorzellen entfaltet. Es ist bekannt, dass die NF- κ B-Aktivierung ein wesentlicher Faktor für Tumorwachstum sein kann. Ob erhöhte TNF- und NF- κ B-Level tatsächlich direkt zusammenhängen, bleibt bislang jedoch unklar [185, 186]. Weiterhin zeigte sich, dass TNF, wie oben beschrieben, die Reaktion der Immunabwehr gegen den Tumor hemmt, indem es sowohl MDSC und regulatorische T-Zellen induziert und aktiviert [150, 188], als auch direkt Metastasierung fördert [191]. Andere Studien konzentrieren sich auch auf die TNF-vermittelte Induktion von FAT10, einem Protein, das mit chromosomaler Instabilität in der Mitose assoziiert ist und zu Unregelmäßigkeiten des Zellzyklus führen kann [192].

Grundlage dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass der günstigere Krankheitsverlauf von mit Tumoren injizierten TNFR^{-/-} Mäusen mit deutlich kleineren MDSC-Populationen assoziiert ist und durch Gabe von TNFR^{+/+} MDSC das Tumorwachstum wiederhergestellt werden kann. Dieser Effekt scheint TNFR2-vermittelt zu sein. TNFR2^{-/-} Mäuse zeigen ebenso wie TNFR^{-/-} einen günstigeren Krankheitsverlauf, während der von TNFR1^{-/-} Mäusen denen entsprechender Wildtypen ähnelt. Dieser Effekt geht anscheinend auf eine verminderte Apoptose TNFR2^{+/+} MDSC zurück [188].

Inzwischen gibt es bereits klinische Studien in Phase I und II, in denen durch TNF-Blockade tumorhemmende Effekte beobachtet wurden [193].

1.2.5 TNF bei Autoimmunerkrankungen

Unter physiologischen Bedingungen durchlaufen T-Zellen im Thymus eine strenge Selektion, die verhindert, dass T-Zellen heranreifen können, die durch ein körpereigenes Antigen aktiviert werden. Bei Autoimmunerkrankungen geschieht ebendies. Es gelangen T-Zellen in die Peripherie, die, nachdem sie auf ein körpereigenes Antigen gestoßen sind, zu autoreaktiven T-Zellen ausdifferenzieren [152, 194]. Welche Rolle TNF in diesem Prozess spielt, ist Gegenstand aktueller Forschung.

So gibt es einige Tiermodelle, die niedrige TNF-Level aufweisen und spontan Autoimmunerkrankungen entwickeln [195]. Dies deutet auf einen protektiven Effekt des TNF hin.

Interessant ist, dass ex vivo entnommene autoreaktive CD8⁺ T-Zellen von an Typ I Diabetes erkrankten Patienten *in vitro* durch TNF spezifisch getötet werden konnten, während andere CD8⁺ T-Zellen persistierten [196]. TNFR2-Agonisten konnten diese Wirkung ebenfalls hervorrufen, während durch TNFR1-Agonisten kein gezielter Effekt erreicht wurde [196]. Das Absterben autoreaktiver CD8⁺ Zellen ist anscheinend darauf zurückzuführen, dass diese bei Typ I Diabetes eine Dysregulation des NF B-Signalweges aufweisen und daher anders auf eine TNFR2-Aktivierung reagieren. Ähnliche Effekte konnten auch bei Patienten mit Sklerodermie beobachtet werden [197].

Die Möglichkeit des gezielten Abtötens autoreaktiver T-Zellen stellt einen äußerst vielversprechenden Ansatz zur gezielten Therapie dieser komplexen Erkrankungen dar. Der Einsatz von TNF-Agonisten am lebenden Organismus haben sich jedoch als äußerst problematisch herausgestellt, da es zu systemisch-toxischen Nebenwirkungen kommen kann [198–201]. Mäuse mit Tumorerkrankungen sind zudem hypersensibilisiert für TNF und reagieren bereits bei geringen Dosierungen äußerst intensiv. Der Großteil der systemisch-toxischen Nebenwirkungen scheint jedoch TNFR1-vermittelt zu sein [201].

Umgekehrt finden sich auch zahlreiche Autoimmunerkrankungen, bei denen TNF eine negative Wirkung zugesprochen wird. Als Beispiel sei hier die Rheumatoide Arthritis aufgeführt, bei der es TNF-vermittelt zu einer kontinuierlichen, dysregulierten Produktion diverser proinflammatorischer Zytokine kommt, die mittels TNF-Blockade unterdrückt werden kann, was zu einer Besserung der Symptome führt [202–207]. Die TNF-Blockade hat sich auch bei anderen Autoimmunerkrankungen als positiv herausgestellt. Gegenwärtig sind in Deutschland TNF-Inhibitoren für Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, Spondylitis

ankylosans und Psoriasis-Arthritis zugelassen und werden bei weiteren Erkrankungen, wie Morbus Behçet Off-label eingesetzt [191].

Allgemein fällt auf, dass Störungen im TNF- und NF B-Signalweg mit einer Vielzahl an Autoimmunerkrankungen assoziiert sind (z.B. Morbus Crohn, Sjögren-Syndrom, Multiple Sklerose, Systemischer Lupus erythematodes, Ankylosierende Spondylitis oder Typ I Diabetes [208–226]). Diese genauer zu charakterisieren und daraus mögliche Therapieansätze abzuleiten, ist Gegenstand aktueller Forschung.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Bei vielen Erkrankungen kommt es zu chronischen, dysregulierten Entzündungsprozessen, bei denen die Regulationsmechanismen des Organismus nicht mehr ausreichend greifen. Teil dieser komplexen Pathomechanismen sind MDSC und TNF.

TNF ist als proinflammatorisches Zytokin bereits seit langem bekannt [227]. Seine Rolle konnte jedoch aufgrund seiner außerordentlich vielseitigen und komplexen Wirkungsweisen bislang nur unzureichend erklärt werden [191]. Auch überrascht, wie weiter oben dargelegt wurde, dass es immer wieder zu scheinbar widersprüchlichen Effekten kommt. Diese widersprüchlichen Effekte könnten durch die zwei in Teilen antagonistisch wirkenden Rezeptoren des TNF erklärt werden [191, 228]. Eine unspezifische Verstärkung der TNF-Wirkung ist mit ausgeprägten systemisch-toxischen Effekten verbunden [198–201]. Diese sind zu großen Teilen TNFR1-vermittelt [201]. Über den TNFR2 erfüllt TNF jedoch auch wichtige lokale homöostatische Funktionen [191, 228–231]. Eine selektive TNFR2-Aktivierung ist somit ein erfolgsversprechender Therapieansatz. Einen solchen selektiven Agonisten, das TNC-sc-mTNF80, hat die Arbeitsgruppe um Professor Wajant in Würzburg entwickelt und uns zur Verfügung gestellt.

MDSC sind mit vielen Krankheiten assoziiert und als solche Objekt intensiver Forschungsarbeit geworden. Ihre zentrale pathologische Funktion bei Tumorerkrankungen ist zunehmend besser verstanden [55] und auch ihre Rolle bei Autoimmunerkrankungen wird intensiv erforscht [71]. Ihre Interaktion mit dem TNF/TNF-Rezeptor-System ist bislang jedoch nur unzureichend untersucht worden. Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen einer selektiven Aktivierung des TNFR2 auf MDSC *in vitro* und *in vivo* genauer zu untersuchen und so potenzielle Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten zu finden.

2 Materialien

2.1 Verwendete Geräte

CO2-Inkubatoren	Integra Biosciences
Durchflusszytometer BD Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer BD LSRII	BD Biosciences, Heidelberg
Inverses Mikroskop Leitz DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar
Inverses Mikroskop Olympus ck2	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop Axiostar Plus	Carl Zeiss, Jena
MACS Multistand Miltenyi Biotec,	Bergisch Gladbach
Microplatereader Emax (Elisa)	Molecular Devices, USA
Multikanalpipette (100µl und 300µl)	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brandt, Wertheim
Pipettensätze	
– (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Thermo Scientific, Langenselbold
– Reference (10µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
– Research (10µl, 20µl, 100µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
– Lite XLS (2µl, 20l, 200l, 1000µl)	Rainin, USA
– (20µl, 200µl, 1000µl)	Gilson, Frankreich
– Discovery (1000µl)	ABIMED, Langenfeld
– Labmate (10µl, 200µl)	ABIMED, Langenfeld
Pipettierhilfe Accu-Jet Pro	Brandt, Wertheim
Vortex MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad TW20	Julabo, Seelbach

Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.2 Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Cups	Eppendorf, Hamburg & Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 15ml, 50ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 15ml, 50ml	Greiner Bio-One, USA
Kanülen (20 G, 22G, 27G)	BD Biosciences, Heidelberg
MACS Separation Columns 25 LS/MS/LD	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
PCR-Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (6cm, 12cm)	BD Biosciences, Heidelberg
Petrischalen (12cm)	Corning, USA
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 300µl, 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (20µl, 200µl, 300µl, 1000µl)	Rainin, USA
Sarstedt-Cups (1,5ml, 2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten (steril) (5, 10 & 25ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen (steril) (1ml, 5ml, 10ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter (0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Zellkultur Multiwellplatten (6, 96)	Becton Dickinson Labware, USA
Zellsieb Cell Strainer 40 µm (Nylon)	BD Bioscience, Heidelberg

2.3 Reagenzien

Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe
Diethylether	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DPBS	Pan Biotec, Bergisch-Gladbach
Fötale Kälberserum	PAN Biotec GmbH, Aidnach
Formaldehyd	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Grieß'sche Reagenz A und B	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ionomycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
MACS Anti-PE-MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotec GmbH, Aidenach
RPMI 1640 PAA	PAN Biotec GmbH, Aidenach
TNCscTNF80	Arbeitsgruppe Harald Wajandt, Universität Würzburg, Klon 6/479

2.4 Puffer und Medien

ACK-Puffer	8,29g NH ₄ Cl, 1g KHCO ₃ , 37.2mg Na ₂ EDTA, 800ml H ₂ O, pH7,2-7,4, steril filtriert oder autoklaviert, bei 4°C
gelagert	
Block Puffer für R&D Elisa	1% BSA in PBS
FACS-Puffer	1% FCS in DPBS; 4°C
MACS-Puffer	0,5% BSA, 2 mM EDTA in PBS; 4°C
PBS	10x 1,37 M NaCl; 26,7 mM KCL; 15 mM KH ₂ PO ₄ ; 65mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; pH 7,4; autoklaviert

Tris-Puffer

20 mM Trizma base, 150 mM NaCl;
pH 7,2-7,4; steril filtriert

Zellkulturmedium (steril)

RPMI mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin,
0,1 mg/ml Streptomycin, 100 µM
β-Mercaptoethanol

2.5 Antikörper

Antigen	Konjugat	Verwendung	Verdünnung	Klon	Hersteller	Konzentration
B220	PE	MACS	1:400			0,2mg/ml
B220	PerCP	FACS	1:1000-3200	RA3-6B2	eBioscience	0,2mg/ml
CD3	-	T-Zell-proliferation	0,5µg/ml			2,7mg/ml
CD3	-	T-Zell-proliferation	0,5µg/ml			2,9mg/ml
CD28	-	T-Zell-proliferation	0,25µg/ml	37.51	eBioscience	1mg/ml
CD11b	APC	FACS	1:1000/1:2000		eBioscience	0,2mg/ml
CD11b	PE	FACS, MACS	1:1000, 1:400	M1/70	eBioscience	0,2mg/ml
CD11c	PE	FACS, MACS	1:100, 1:400	HL3	BD Biosciences	0,2mg/ml
CD11c	Biotin	FACS	1:200	N418	eBioscience	0,5mg/ml
CD4	APC	FACS	1:1000	RM4-5	BD Biosciences	0,2mg/ml
CD4	Biotin	FACS	1:400	RM4-5	eBioscience	0,5mg/ml
CD4	FITC	FACS	1:1000	RM4-5	BD Biosciences	0,5mg/ml
CD4	PE	MACS	1:400	RM4-5	eBioscience	0,2mg/ml
CD4a	PerCP	FACS	1:1000	RM4-5	BD Biosciences	0,2mg/ml
CD8a	PE	MACS	1:400	53-6.7	BD Biosciences	0,2mg/ml

CD8a	PerCP	FACS	1:1000	53-6.7	eBioscience	0,2mg/ml
CD8a	AF647	FACS	1:1000	53-6.7	BD Biosciences	0,2mg/ml
CD8a	AF700	FACS	1:200	53-6.7	eBioscience	0,2mg/ml
CD16/ CD32	-	Fc-Block	1:40			1,8µg/ml
CD25	APC	FACS	1:200	PC61.5	eBioscience	0,2mg/ml
FoxP3	FITC	FACS	1:120	FJK-16s	eBioscience	0,2mg/ml
Ly6C	FITC	FACS	1:500	AL-21	BD Biosciences	0,2mg/ml
Ly6G	V450	FACS	1:400	1A8	BD Biosciences	0,2mg/ml
Ly6G	PE	FACS, MACS	1:800, 1:400		BD Biosciences	0,2mg/ml
NK1.1	PE	MACS	1:400	PK136	BD Biosciences	0,2mg/ml
TNC-scTNF80	-	TNFR2-Stimulation	Versuchsabhängig	6/479	Universität Würzburg, Arbeitsgruppe Harald Wajandt	

2.6 Mäuse

C57/Bl6N Wildtyp (Janvier, Le Genest, Frankreich)

C57/Bl6 (Zucht: Universität Regensburg)

C57/Bl6 TNFR2^{-/-} (Zucht: Universität Regensburg; Erickson, de Sauvage *et al.*, 1994)

2.7 Software

CellQuest Pro (BD Biosciences)

verwendet für die Auswertung der FACS-Daten

Graph Pad Prism (Version 4.02, 6.04, 7.01)

verwendet für die statistischen Berechnungen und graphischen Darstellungen

Microsoft Excel 2003, 2007 und 2016	verwendet für die Dokumentation, Erstellung von Tabellen und Sortierung der Daten
Microsoft Word 2003, 2007 und 2016	verwendet für die schriftliche Dokumentation und das Verfassen der Promotionsarbeit
Citavi 4 und 5	verwendet für die Verwaltung der Literaturverweise

2.8 TNC-sc-TNF80

Von der Forschungsgruppe um Prof. Harald Wajant von der Universität Würzburg erhielten wir im Rahmen einer Kooperation einen spezifischen Agonisten für den TNF-Rezeptor 2. Als Grundbaustein des Agonisten diente ein Trimer aus drei Proteinketten bestehend aus jeweils drei fusionierten Maus-TNF (aa 91-235)-Domänen und einer Tenascin (TNC)-Trimerisierungsdomäne, wobei die einzelnen Domänen durch Linkerpeptide verbunden sind. Um eine selektive Aktivierung des TNFR2 zu erreichen, wurden Mutationen eingebracht, die bei TNFR2-spezifischen Varianten humanen TNFs beschrieben wurden [232, 233]. Durch Anhängen einer Flag-Domäne wurde die Reinigung mittels Affinitätschromatographie ermöglicht.

Die erhaltene „nonamerische“ Variante des murinen TNF (TNC-sc-mTNF80, genau genommen ein Trimer, das neun TNF enthält) imitiert die Wirkung von membrangebundenen TNFs.

3 Methoden

3.1 Zellkulturbedingungen

Sofern die Zellen nicht direkt analysiert wurden, wurden die Experimente unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank (laminar flowcabinetHERAsafe), sterilen Pipetten, Reagenzien und einmal-Materialien durchgeführt. Die Zellen wurden wie unten beschrieben bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die verwendeten Medien wurden bereits aufgeführt.

3.2 Isolation und Aufreinigung der Milzzellen

Die Mäuse wurden mit einer Diethylether-Inhalationsnarkose sediert, mittels zervikaler Dislokation getötet und anschließend mit Nadeln fixiert. Das Fell wurde mit 70% Ethanol angefeuchtet. Ein kleiner Schnitt wurde linkslateral unter dem Rippenbogen gemacht und das Peritoneum eröffnet. Die Milz wurde vorsichtig herausgezogen, von dem umliegenden Gewebe abgetrennt und in eine Schale mit PBS/1%FCS gegeben. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank ausgeführt.

Die Milz wurde mit dem Spritzenstempel einer sterilen 2ml-Spritze gründlich zerdrückt und die entstandene Zellsuspension in ein 15ml Tube überführt. Die Zellsuspension wurde für ungefähr 1 Minute stehen gelassen, während sich der enthaltene Debris am Grund absetzte. Der Überstand wurde in ein neues 15ml-Tube überführt und bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet.

Im Anschluss wurden die Zellen in 5ml ACK-Buffer resuspendiert, um die Erythrozyten zu lysieren und direkt erneut bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und es wurden 2 Waschschrte mit je 5ml PBS/1%FCS vorgenommen.

3.3 Gewinnen der Zellen des Knochenmarks

Die Mäuse wurden mit einer Diethylether-Inhalationsnarkose sediert und mittels zervikaler Dislokation getötet. Die Maus wurde fixiert, das Fell mit 70% Ethanol angefeuchtet und die Knochen (im Regelfall Femores und manchmal Tibiae, in sehr seltenen Fällen auch Humerus) entnommen und in kaltes PBS gegeben. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle weiteren Schritte unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank ausgeführt.

Die Knochen wurden zur Oberflächendesinfektion für 1-2 Minuten in 70% Ethanol gegeben, bevor sie erneut in sterilem kaltem PBS gelagert wurden. Die Epiphysen wurden mit einer Schere abgetrennt und die Diaphyse mit einer 5ml-Spritze mit 27G-Kanüle gründlich in ein 50ml-Tube ausgespült. Nach Resuspension wurde die Zellsuspension bei 300g und 4°C für 8-10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Falls die Zellen später mittels MACS aufgereinigt werden sollten, wurden Erythrozyten lysiert, indem das Pellet in 5ml ACK-Buffer resuspendiert, bei 300g und 4°C für 8 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Danach wurden die Zellen in PBS/1%FCS aufgenommen und durch einen 40µm Nylonfilter in ein neues Tube überführt. Der Filter wurde anschließend mit derselben Menge PBS/1%FCS nachgespült und die Zellsuspension erneut bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet im für den Versuch zu benutzenden Medium resuspendiert. Zum Zählen wurde ein Aliquot mit Türckscher Lösung verdünnt und, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, die Zellzahl bestimmt.

3.4 Gewinnen der Zellen des Lymphknotens für FACS-Färbung

Die inguinalen Lymphknoten wurden beidseitig entnommen, in ca. 5ml PBS/1%FCS in eine 6-Well-Platte gegeben und mit dem oberen Ende des Spritzenstempels einer sterilen 2ml-Spritze zerdrückt. Die Lösung wurde nach mehrfachem Resuspendieren in 15ml Tubes überführt und bei 300g und 4°C für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet in 3ml PBS/1%FCS gelöst. Die Zelllösung wurde dann über einen 40µm Nylonfilter in FACS-Tubes zur FACS-Färbung überführt.

3.5 Blutentnahme für die durchflusszytometrische Analyse

3.5.1 Retrobulbäre Blutentnahme

Für die retrobulbäre Blutentnahme wurden die Mäuse zunächst mit einer Diethylether-Inhalationsnarkose sediert, bis sie keine Reaktion mehr auf Berührungsreize zeigten. Die Maus wurde im Nackengriff fixiert. Mit einer Glaskanüle wurde unter leichtem Drehen am medialen Orbitalrand in den Raum hinter dem Auge eingedrungen, bis die Kanüle sich mit Blut des retrobulbären Sinus füllte. Das Blut wurde in 10ml PBS überführt und gut durchmischt. Die Maus wurde anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet.

Die Proben wurden bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Das Pellet wurde in 10ml PBS resuspendiert und erneut bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Erythrozyten mit 10ml kalter ACK-Lösung lysiert. Die Tubes wurden bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Es folgten ein Waschschrift mit 5ml PBS/1%FCS und erneute Zentrifugation (300g, 4°C, 5 Minuten). Der Überstand wurde abgeschüttet, die Zellen in 3ml PBS/1%FCS aufgenommen und in FACS-Tubes zur Färbung und anschließenden durchflusszytometrischen Analyse überführt.

3.5.2 Intrakardiale Blutentnahme

Für die intrakardiale Blutentnahme wurden 50µl 50mM EDTA in PBS in die 1ml Spritze aufgesogen. Nachdem die Maus mit einer Diethylether-Inhalationsnarkose sediert und mittels zervikaler Dislokation getötet war, erfolgte die zügige Öffnung des Brustkorbs und die direkte Punktion des Herzens. Es wurden 150-300µl Blut entnommen, direkt in einen Eppendorf-Cup überführt und gut durchmischt. Die Proben wurden anschließend für die durchflusszytometrische Analyse nach einem abweichenden Protokoll gefärbt, wie unten aufgeführt.

Die intrakardiale Blutentnahme wurde auch durchgeführt, wenn die retrobulbäre Blutentnahme nicht erfolgreich verlief. In diesem Fall wurde ohne EDTA gearbeitet und das Blut, wie bei der retrobulbären Blutentnahme, anschließend in 10ml PBS gegeben und die Erythrozyten lysiert.

3.6 Bestimmung der Zellzahlen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Ausgangslösung mit Trypanblau oder bei Knochenmarkzellen mit Türkscher Lösung verdünnt und die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurden im Regelfall alle 4 Großquadrate gezählt, mindestens jedoch 150 Zellen.

Die Zellzahl wurde mittels folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{gezählte Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

3.7 CFSE-Färbung

Zur Bestimmung der Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden diese mit Carboxyfluoreszin-Succinimidylester (CFSE) gefärbt. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde die Suspension bei 300g und 4°C für 5 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Zeitgleich wurde eine Lösung von 1ml 2 µM CFSE PBS/1%FCS je 10⁷ Zellen hergestellt. Das Pellet wurde in der CFSE-Lösung resuspendiert und für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad gelagert. Anschließend wurde das vierfache Volumen PBS/5%FCS zum Herauswaschen von verbliebenem CFSE zugegeben, die Suspension bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS/5%FCS. Für die Weiterverwendung in der Zellkultur wurde das Pellet anschließend in Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

3.8 MACS-Aufreinigung der Ly6C⁺ Zellen aus dem Knochenmark

Mit der magnetischen Zelltrennung (magnetic cell separation, MACS) wurden Knochenmarkzellen weiter aufgereinigt, um sie *ex vivo* in einen T-Zellsuppressionsassay zu geben. Das Pellet wurde hierzu in MACS-Buffer aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und bei 300g und 4°C für 5-10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100µl MACS-Buffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Für die Fc-Blockade wurde Fc R-Antikörper [2,84mg/ml] 1:400 verdünnt zugegeben und für 10 Minuten bei 4-8°C im Kühlschrank inkubiert. Währenddessen wurde ein Mastermix mit B220-PE, CD4-PE, CD8-PE, NK1.1-PE, CD11c-PE und Ly6G-PE-Antikörper hergestellt und der Zellsuspension zugegeben. Die finale Antikörperkonzentration betrug jeweils 1:400. Nach 10 Minuten Inkubation bei 4°C wurden 1-2ml MACS-Buffer pro 10⁷ Zellen zugegeben und die Lösung bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 80µl MACS-Buffer pro 10⁷ Zellen aufgenommen. Anschließend wurde nach gutem Resuspendieren 20µl anti-PE-Beads pro 10⁷ Zellen zugegeben, die Lösung gut durchmischt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Es erfolgte erneut ein Waschschrte mit 1-2ml MACS-Buffer pro 10⁷ Zellen und 300g und 4°C für 5 Minuten. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 500µl MACS-Buffer resuspendiert.

Die LD-Säule wurde am Magneten mit 2ml MACS-Buffer equilibriert und im Anschluss das Auffangtube gewechselt. Nun wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und mit zweimal

1ml MACS-Buffer nachgespült. Das Auffangtube wurde gewechselt und das Eluat ausgeschwemmt, indem 5ml MACS-Buffer durch die Säule mit dem dafür vorgesehenen Stempel zügig durchgepresst wurden. Vom Eluat und vom Durchfluss wurden geringe Volumina zur Analyse im FACS abgenommen.

Der Durchfluss wurde resuspendiert und bei 300g und 4°C für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen zunächst in einem geringen Volumen Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt und Medium bis zum Erhalt einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml zugegeben.

3.9 Gewinnung von CD11b⁺ Ly6C⁺ und CD11b⁺ Ly6G⁺ Zellen aus der Milz mittels MACS

Die Milzzellen wurden wie beschrieben gewonnen, die Erythrozyten mit ACK-Lösung lysiert und verworfen und die verbliebenen Milzzellen in 5ml MACS-Buffer aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt und $1,8 \times 10^8$ Zellen für die weitere Verarbeitung in ein neues Tube überführt (es wurden mehrere Milzen zu gleichen Anteilen gepoolt). Die Zellen wurden bei 300g und 4°C für 10 Minuten pelletiert, der Überstand abgeschüttet und in 100µl pro 10^7 Zellen resuspendiert. Dann wurden B220-PE, CD4-PE, CD8-PE, NK1.1-PE und CD11c-PE Antikörper der Zellsuspension zugegeben. Die finale Antikörperkonzentration betrug jeweils 1:400. Die Lösung wurde gründlich durchmischt und 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 2ml MACS-Buffer pro 10^7 Zellen bei 300g und 4°C für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet zunächst in 80µl MACS-Buffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. Im Anschluss wurden 20µl PE-Beads pro 10^7 Zellen zugegeben und gut durchmischt (PE-Beads wurden zuvor gut resuspendiert). Die Suspension wurde für 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert, erneut mit 2ml MACS-Buffer pro 10^7 Zellen gewaschen und der Überstand abgeschüttet. Das Pellet wurde in 500µl MACS-Buffer resuspendiert.

Die LD-Säule wurde am Magneten mit 2ml MACS-Buffer equilibriert. Das Auffangtube wurde gewechselt, die Zelllösung auf die Säule gegeben und nach dem Durchlaufen derselben zweimal mit 1ml MACS-Buffer nachgespült.

Die Zellen wurden zunächst gezählt und anschließend bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 20µl MACS-Buffer pro 10^7 Zellen gelöst, 5µl Ly6G-Biotin-Antikörper pro 10^7 Zellen zugegeben und gut durchmischt. Die

Suspension wurde für 10 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Danach wurden ohne Waschschrift 15µl MACS-Buffer pro 10⁷ Zellen zugegeben und mit 10µl Biotin-Micobeads pro 10⁷ Zellen durchmischt. Die Lösung wurde erneut für 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Es folgt ein Waschschrift mit 1ml MACS-Buffer pro 10⁷ Zellen und einer Zentrifugation bei 300g und 4°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500µl MACS-Buffer resuspendiert.

Die MS-Säule wurde am Magneten mit 500µl MACS-Buffer equilibriert. Nach dem Wechseln des Auffangtubes wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und mit dreimal 500µl MACS-Buffer nachgespült. Die Zellen des hier erhaltenen Durchflusses wurden für die Isolierung CD11b⁺ Ly6C⁺ Zellen weiter verwendet. Das Auffangtube wurde gewechselt und das Eluat aus der MS-Säule gewonnen, indem 1ml MACS-Buffer mit dem vorgesehenen Stempel mit Druck durch die Säule in ein separates Tube gepresst wurden. Das Eluat entspricht den PMN-MDSC (definiert als CD11b⁺Ly6C^{int} Ly6G⁺). Die Zellzahl der PMN-MDSC wurde bestimmt sowie ein geringes Volumen für die Analyse in FACS-Tubes zur Färbung überführt. Die restlichen Zellen wurden zentrifugiert und in Zellkulturmedium aufgenommen, um diese in einem Suppressionsassay einsetzen zu können.

Der Durchfluss wurde bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in 500µl MACS-Buffer resuspendiert. Es folgte ein weiterer Depletionsschritt, wofür eine LD-Säule am Magneten mit 2ml MACS-Buffer equilibriert wurde. Nach Wechseln des Auffangtubes wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und dreimal mit 1ml MACS-Buffer nachgespült. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Lösung bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in 80µl MACS-Buffer pro 10⁷ Zellen aufgenommen und mit vorher gut durchmischten 20µl CD11b Microbeads versetzt. Die Lösung wurde gut resuspendiert und für 15 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 2ml MACS-Buffer pro 10⁷ Zellen und einer Zentrifugation bei 300g und 4°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500µl MACS-Buffer resuspendiert.

Eine MS-Säule wurde mit 500µl MACS-Buffer am Magneten equilibriert. Das Auffangtube wurde gewechselt, die Zelllösung auf die Säule gegeben und nach Durchlaufen dreimal mit 500µl MACS-Buffer nachgespült. Hiernach wurde das Auffangtube erneut gewechselt und das Eluat aus der Säule geschwemmt, indem 1ml MACS-Buffer mit hohem Druck durch die Säule durchgepresst wurde. Die im Durchfluss enthaltenen Zellen entsprechen den als CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C^{high} definierten MO-MDSC.

Die erhaltenen MO-MDSC wurden gezählt, ein kleines Volumen zur FACS-Färbung und – Analyse in FACS-Tubes überführt und die verbleibenden Zellen zentrifugiert und in einem Suppressionsassay eingesetzt.

3.10 Kultivieren von Knochenmarkzellen

Zur Generierung der MDSC nutzten wir ein von der Forschungsgruppe um Manfred Lutz etabliertes Modell zur *in vitro*-Generierung von MDSC [234, 235]. Knochenmarkzellen wurden wie oben beschrieben gewonnen. Abhängig von der gewünschten Zellkonzentration wurde GM-CSF-Medium zugegeben und die Zellen in entweder 10cm-Petrischalen (2×10^6 Zellen pro Dish) oder 6-Well-Platten (5×10^5 pro Well) ausgesät. In manchen Experimenten wurden weitere Reagenzien wie Kontrollüberstand, TNCscTNF80 oder hTNF zugegeben. Die Zellen wurden für vier, sechs oder sieben Tage inkubiert und anschließend analysiert und weiterverwendet.

3.11 T-Zell-Suppressionsassay mit Knochenmarkzellen

In T-Zell-Suppressionsassays wurde die suppressive Aktivität von Zellen aus dem Knochenmark oder der Milz getestet. Diese unterdrückten die Proliferation von hinzugegeben CFSE-gefärbten und stimulierten Milzzellen.

Knochenmarkzellen konnten auf verschiedenen Wegen gewonnen werden:

- *ex vivo* und wie oben beschrieben mittels MACS aufgereinigt
- nach mehrtägiger Kultur (vier, sechs oder sieben Tage)
- nach mehrtägiger Kultur mit anschließender Sortierung in der Durchflusszytometrie

Suppressorische Milzzellen wurden *ex vivo* wie oben beschrieben mittels MACS gewonnen und direkt in den Suppressionsassay gegeben.

Wenn die suppressorischen Zellen *ex vivo* verwendet wurden, inkubierten diese zunächst über Nacht bei 37°C und 5% CO₂, bevor am darauffolgenden Tag die CFSE-gefärbten Milzzellen hinzugegeben wurden, da bei unverzüglicher Weiterverarbeitung *ex vivo* noch keine suppressive Funktion beobachtet werden konnte [234, 235].

CFSE-gefärbte Milzzellen wurden als Effektorzellen eingesetzt. Als Negativ-Kontrollen und zur CFSE-Kompensation bei der FACS-Analyse wurden unstimulierte Effektorzellen verwendet. Die restlichen Effektorzellen wurden mit 0,25µg/ml CD3-Antikörper und 0,125µg/ml CD28-Antikörper stimuliert. Die stimulierten Effektorzellen wurden als

Positivkontrolle und für die Analyse der Suppressionsfähigkeit der hinzu pipettierten suppressorischen Zellen aus Knochenmark oder Milz verwendet.

Insgesamt wurden stets 2×10^5 Effektorzellen/Well einer 96-Well-Rundbodenplatte in Kombination mit unterschiedlichen Mengen an suppressorischen Zellen genutzt. Als Verhältnis der suppressorischen Zellen zu den Effektorzellen verwendeten wir meistens die Verdünnungsstufen 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 oder 1:32. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 200 μ l. Die Zellen befanden sich in Zellkulturmedium.

An Tag 3 wurden sämtliche Zellen geerntet und zur Analyse in FACS-Tubes überführt.

3.12 Proliferationsassay

Milzzellen wurden nach obigem Protokoll mit CFSE gefärbt und 2×10^5 Zellen 200 μ l Zellkulturmedium pro Well ausgesät. Die Stimulierung erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen (Negativkontrolle, 0,004 μ g/ml, 0,02 μ g/ml, 0,1 μ g/ml und 0,5 μ g/ml) CD3-Antikörper. Unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Reagenzien wurden zugegeben (zum Beispiel gereinigtes TNCscTNF80, Überstand-TNCscTNF80, hTNF, Kontrollüberstand), um deren Effekte auf das Proliferationsverhalten zu untersuchen.

Nach drei Tagen wurden die Zellen geerntet und in FACS-Tubes zur Analyse überführt.

3.13 Ernten der Zellen für die Analyse im FACS

Zunächst wurden die Platten makroskopisch und teilweise auch mikroskopisch inspiziert. Anschließend wurden die Zellen durch Resuspension in Lösung gebracht und in FACS-Tubes überführt, in denen bereits 1ml PBS/1%FCS vorgelegt war.

Sofern Überstände zur Analyse gewonnen werden sollte, wurden vor dem Resuspendieren vorsichtig 150 μ l pro Well abgenommen und bei -20°C zur späteren Analyse im ELISA weggefroren. Die Wells wurden mit 150 μ l PBS/1%FCS aufgefüllt und die Zellen nach dem im obigen Absatz beschriebenen Schema geerntet und in FACS-Tubes überführt.

3.14 Analyse in der Durchflusszytometrie

3.14.1 Färbung von Oberflächenmarkern zur Isolierung mit Durchflusszytometrie

Nachdem die Zellen geerntet waren, wurde die Suspension bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet, das Pellet in PBS/1%FCS resuspendiert und anschließend erneut bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in PBS/1%FCS gelöst und in sterile FACS-Tubes überführt. Die Zellsuspension wurde bei 300g und 4°C für 5 Minuten erneut pelletiert und der Überstand abgeschüttet. Je Tube wurden ca. 1µg Fc -Rezeptor-Antikörper zugegeben, gut resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde Ly6C-FITC [1:250] und Ly6G-PE [1:400] Antikörper zugegeben und erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit 1ml PBS/1%FCS mit anschließender Zentrifugation bei 300g und 4°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen in 500µl PBS/1%FCS resuspendiert. Die Zelllösung wurde nach dem oben beschriebenen Schema gezählt und über einen 40µm Nylonfilter in neue sterile FACS-Tubes überführt. Im Anschluss wurden die Zellen am Durchflusszytometer nach Ly6C^{int}Ly6G⁺ und Ly6C^{high}Ly6G⁻ sortiert und die erhaltenen Proben bei 300g und 4°C für 5 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen. Nachdem die Zellzahl bestimmt war, konnten die Zellen weiter verarbeitet werden.

3.14.2 Färbung von Oberflächenmarkern für durchflusszytometrische Analyse

Nachdem die Zellen wie oben beschrieben geerntet und in FACS-Tubes überführt wurden, folgte ein Pelletieren bei 300g und 4°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgeschüttet. Es folgte ein Waschschrift mit 1ml PBS/1%FCS und erneutem Zentrifugieren. Nachdem die Überstände abgeschüttet und verbleibende Flüssigkeitsreste am Tuberland abgetupft waren, wurde 1µg Fc R-Antikörper pro Tube zugegeben. Der Antikörper wurde entweder direkt zugegeben oder in einer Lösung mit einer Konzentration von 1µg/5µl als Tropfen an den oberen Tuberland pipettiert und anschließend bei 300g und 4°C für 1 Minute zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Proben gut geschüttelt, damit etwaige Pellets gut resuspendiert waren. Die Proben wurden für mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Während der

Inkubation wurde ein Mastermix aus den Oberflächenfarbstoffen zusammengemischt. Bei der Berechnung der notwendigen Konzentration der Farbstoffe gingen wir von einem Gesamtvolumen im Tube von 50µl aus. Nach erfolgter Inkubation erfolgte die Zugabe des Mastermixes. Dieser wurde entweder direkt hinzugegeben und gut resuspendiert oder als 5µl-Tropfen an den Tube-Rand gesetzt, das Tube dann für 1 Minute bei 300g und 4°C zentrifugiert und gut geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Es folgte ein Waschschrift mit 1ml PBS/1%FCS. Die Zellen wurden bei 300g und 4°C für 5 Minuten pelletiert, der Überstand abgeschüttet und die Tubes wie oben beschrieben abgetupft.

Sofern ein Biotin-konjugierter Antikörper verwendet wurde, folgte nun die Zugabe des Streptavidin-konjugierten Farbstoffes und erneut eine Inkubation von 5-10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur. Hiernach erfolgte erneut ein Waschschrift mit 1ml PBS/1%FCS. Nachdem die Überstände abgeschüttet und die Tubes abgetupft waren, wurden die Proben mit einer 2% Formaldehyd enthaltenen PBS/1%FCS-Lösung fixiert und für mindestens 20 Minuten inkubiert bevor, sofern notwendig, weiteres Volumen zugegeben wurde.

Sofern nur wenige Proben vorlagen und die Analyse am FACS direkt erfolgen konnte, wurde auf die Fixierung verzichtet.

3.14.3 Färbung von Oberflächenmarkern bei in EDTA abgenommenen Blutproben für die durchflusszytometrische Analyse

Das Blut wurde aus den Eppendorf-Cups auf FACS-Tubes aufgeteilt. Da die Blutproben deutlich mehr Zellen enthielten als die Proben aus Knochenmark, Milz oder Lymphknoten, verwendeten wir sämtliche Antikörper in doppelter Menge. Der Mastermix wurde direkt in die Probe gegeben, gut resuspendiert und für 20-30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Sofern ein Biotin-konjugierter Antikörper verwendet wurde, erfolgte nun die Zugabe des Streptavidin-konjugierten Fluorochroms, wobei erneut die doppelte Menge verwendet wurde. Die Proben wurden für 10-15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde FACS-Lysis-Buffer mit vollentsalztem Wasser 1:10 verdünnt und 2ml je Probe zugegeben, gut durchmischt und inkubiert. Die Proben wurden bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert der Überstand abgeschüttet und verbliebene Flüssigkeitsreste am Tuberand auf Papier abgetupft.

Die Proben wurden mit je 200µl PBS/1%FCS/2% Formaldehyd fixiert und im Kühlschrank bis zur Analyse im Durchflusszytometer gelagert.

Sofern noch eine intrazelluläre Färbung erfolgen sollte, wurde diese wie unten beschrieben durchgeführt. Der letzte Fixationsschritt blieb in diesem Fall aus.

3.14.4 Färbung von FoxP3 für die durchflusszytometrische Analyse

Nachdem die Zellen geerntet und die Oberflächenfärbungen wie zuvor beschrieben durchgeführt wurden, wurden die Zellen nach dem letzten Waschschrift in 500µl FoxP3-Fixierpuffer resuspendiert und für ca. eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1ml FoxP3-Waschpuffer zugegeben und die Proben bei 300g und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und erneut mit einem Milliliter FoxP3-Waschpuffer gewaschen. Nachdem der Überstand abgeschüttelt wurde und die Tubes abgetupft wurden, erfolgte eine Fc-Blockade mit 1µg Fc R-Rezeptor-Antikörper pro Tube. Der Antikörper wurde entweder direkt oder in FoxP3-Waschpuffer als 5µl Tropfen oben an den Tuberland pipettiert und eine Minute bei 300g und 4°C runter zentrifugiert. Die Tubes wurden dann gründlich geschüttelt, um die Zellen in Suspension zu bringen. Während der fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde eine Lösung mit 0,5µl FoxP3-Antikörper pro 5µl in FoxP3-Waschpuffer hergestellt, die im Anschluss als 5µl Tropfen an den oberen Tuberland pipettiert und eine Minute bei 300g und 4°C zentrifugiert wurde. Die Tubes wurden ausgiebig geschüttelt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Es folgte ein Waschschrift mit 1ml FoxP3 Waschpuffer je Probe mit Zentrifugation bei 300g und 4°C für 5 Minuten. Die Überstände wurden abgeschüttelt und verbleibende Tropfen am Tuberland auf Papier abgetupft. Das Zellpellet wurde in 200µl PBS/1%FCS mit 2% Formaldehyd resuspendiert.

3.14.5 Photometrische NO-Bestimmung im Überstand

Überstände wurden abgenommen und zur späteren Analyse weggefroren. Zur Analyse wurden die Überstände bei Raumtemperatur aufgetaut und 50µl auf eine Platte zur Analyse übertragen. Mittels einer 10mM NO-Lösung wurde eine Standardkurve in Duplikaten angelegt. Die höchste NO-Konzentration der Standardkurve betrug 100µM. Zur Verdünnung und als Negativkontrolle wurde Zellkulturmedium genutzt. Nun wurden 50µl Griess'sches Reagenz A und B zu gleichen

Anteilen gemischt und in sämtliche Wells hinzugegeben. Die Extinktion wurde bei 540nm gemessen.

3.15 *In vivo* Versuche

3.15.1 Subkutane Injektionen

Für subkutane Injektionen wurden die Mäuse mit dem Nacken-Schwanz-Griff fixiert und in leichte Kopftieflage gebracht. Die Mäuse wurden abdominal rasiert und anschließend mit der Spitzenöffnung nach oben zeigend in flachem Einstichwinkel vorsichtig injiziert. Das Zurückziehen der Nadel erfolgte erst nach 3-5 Sekunden, um ein Rücklaufen eines Teils der Flüssigkeit zu vermeiden.

3.15.2 Intraperitoneale Injektionen

Für intraperitoneale Injektionen wurden die Mäuse mit dem Nacken-Schwanz-Griff fixiert und in leichte Kopftieflage gebracht. Anschließend wurde in relativ steilem Winkel die abdominale Haut durchstoßen und die Injektion mit mittlerer Geschwindigkeit durchgeführt. Die Nadel wurde zügig zurückgezogen und das Tier in seinen Käfig zurückgesetzt.

3.15.3 Subkutaner Setzen von Tumoren

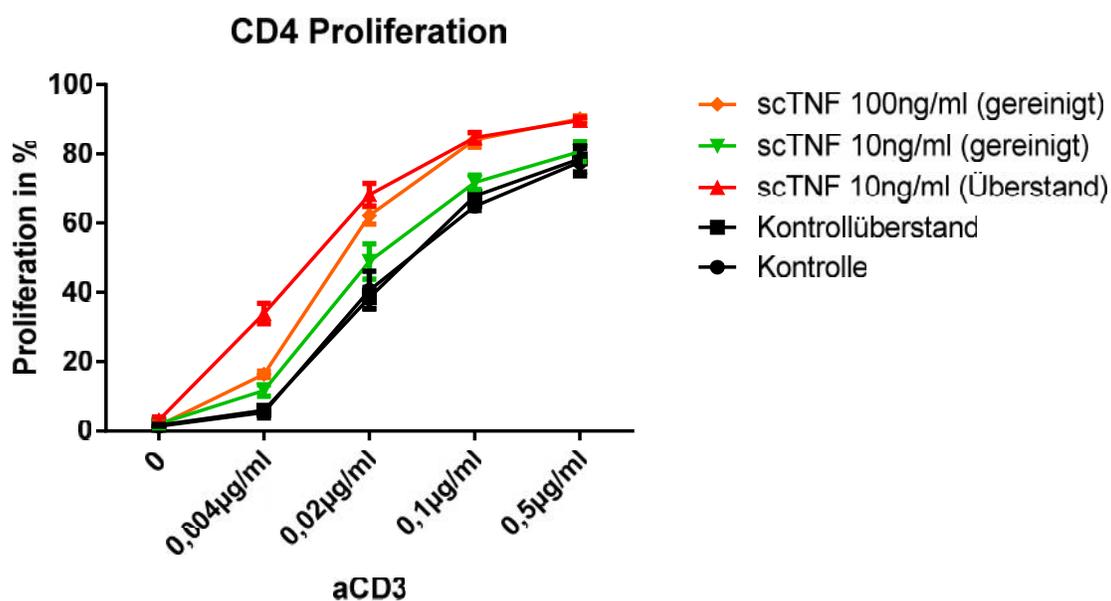
Für Tumorexperimente wurden Zellen der BFS-1 Zelllinie verwendet. Die Tumorzellen wurden aufgetaut, in Kultur mit RPMI, 10% FCS, 1% PBS-Medium gehalten und am Tag der Injektion einmal in PBS gewaschen, gezählt und in einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml in eine 1ml Spritze überführt. Jedes Tier erhielt eine linksabdominale Injektion von 50 μ l (2×10^5 Zellen) nach dem obigen Schema.

4 Ergebnisse

4.1 Überstand und gereinigtes TNCscTNF80 sind biologisch aktiv

In vitro Studien am Institut haben bereits mehrfach dokumentiert, dass es durch spezifische TNFR2-Aktivierung durch TNCscTNF80 (im folgenden scTNF80 genannt) zu einer verstärkten T-Zell-Proliferation kommt. Um den gereinigten und aus dem Überstand gewonnenen Stock auf seine biologische Aktivität zu prüfen, wurde ein Proliferationsassay über drei Tage durchgeführt. Die Zellen wurden aus der Milz gewonnen, CFSE-gelabelt und mit den entsprechenden Reagenzien inkubiert. Die durchflusszytometrische Färbung und Analyse erfolgte nach drei Tagen.

Wie erwartet war die Proliferation sowohl von CD4⁺, als auch von CD8⁺ Zellen in Gegenwart von scTNF80 deutlich verstärkt. Überstand-scTNF80 und gereinigter Stock zeigten denselben Effekt. Das gereinigte scTNF80 wies jedoch eine geringere biologische Aktivität auf - eine Beobachtung, die auch in weiteren Versuchsordnungen gemacht wurde. (Abb. 1)



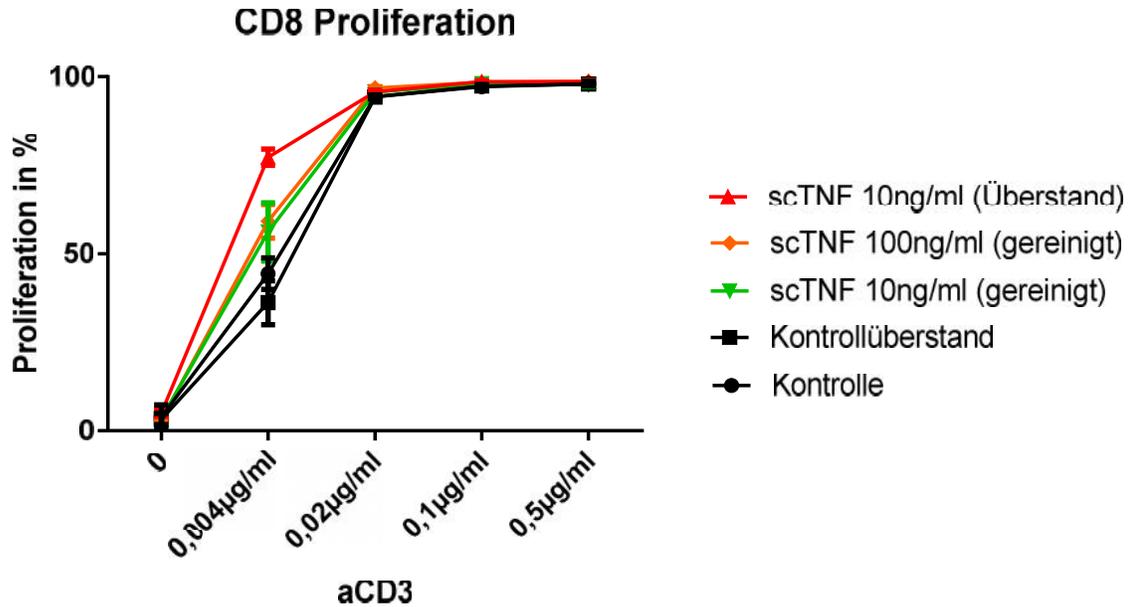


Abbildung 1 | 2×10^5 CFSE gelabelte Milzzellen je Well wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen anti-CD3-Antikörper stimuliert. Nach drei Tagen im Inkubator wurden die Proben gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Ein Punkt entspricht dem Mittelwert dreier technischer Replikate, Standardabweichungen sind angegeben. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

4.2 T-Zell-Suppressivität von MDSC *ex vivo* ist durch scTNF80 nicht beeinflusst

In einem ersten Experiment wurde die Auswirkungen von TNFR2-Aktivierung auf die Funktion der MDSC im T-Zell-Suppressionsassay untersucht. Hierzu wurden Knochenmarkzellen aus der Maus gewonnen und mittels magnetischer Depletion MO-MDSC isoliert. Diese wurden mit oder ohne scTNF80 im T-Zellsuppressionsassay eingesetzt. Die Responder-Milzzellen wurden aus TNFR2^{-/-} Mäusen gewonnen, CFSE-gelabelt und mit CD3- und CD28-Antikörper zur Proliferation angeregt. Nach drei Tagen erfolgte die durchflusszytometrische Färbung und Analyse.

Es zeigte sich, dass unabhängig von der Gegenwart und Menge an scTNF80 MO-MDSC die T-Zell-Proliferation in vergleichbarem Ausmaß hemmten und die TNFR2-Aktivierung keine eindeutigen Auswirkungen hatte (Abb. 2).

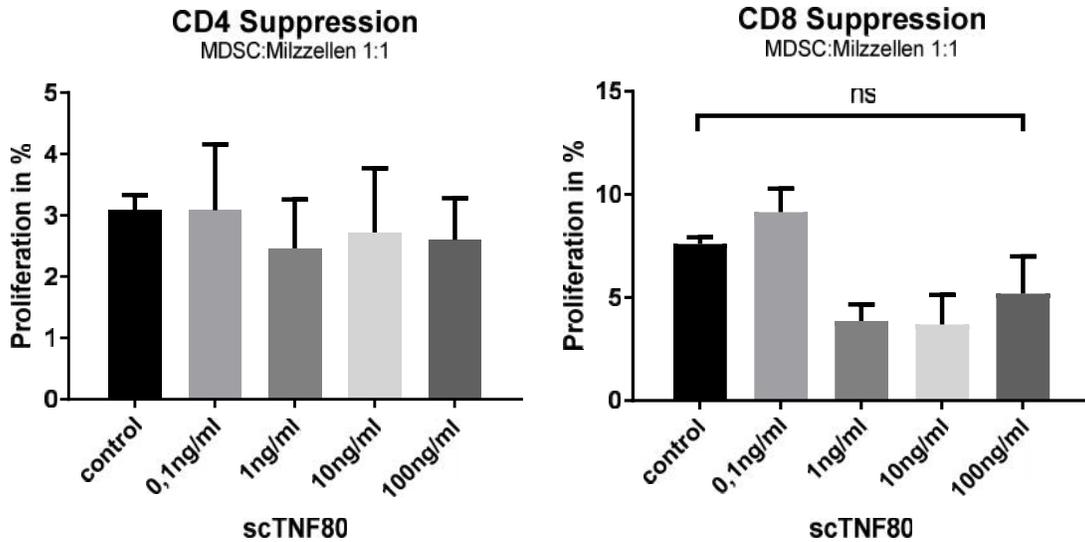


Abbildung 2 | MO-MDSC wurden aus dem Knochenmark von WT-Mäusen isoliert. Nach einer Nacht im Inkubator wurden 2×10^5 CFSE-gefärbte Milzzellen hinzugegeben und die Kultur mit CD3/ CD28 für drei Tage stimuliert. Ein Balken stellt den Mittelwert zweier technischer Replikate dar. Es wurde ein repräsentatives Experiment von insgesamt zwei Experimenten ausgewählt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

4.3 Fehlen des TNFR2 beeinflusst Zelldifferenzierung in Knochenmarkkultur

Wir verglichen die Entwicklung von TNFR2-kompetenten (TNFR2^{+/+}) MDSC und TNFR2^{-/-} MDSC in Knochenmarkkultur. Um dies zu untersuchen, wurden Knochenmarkzellen aus WT-Mäusen in GM-CSF-haltigem Medium in Gegenwart von scTNF80 inkubiert. Dieses Protokoll wurde ursprünglich zur Generierung von dendritischen Zellen aus Vorläuferzellen genutzt [236]. Im Rahmen der Reifung treten jedoch als Zwischenschritt MDSC auf [234, 235], die von uns an Tag 4 genauer auf Expression der Oberflächenmarker CD11b, Ly6C und Ly6G im Durchflusszytometer analysiert wurden.

Nach viertägiger Inkubation konnte eine leicht erhöhte Zellzahl bei TNFR2^{-/-} Knochenmarkkulturen festgestellt werden, wobei dieser Effekt statistisch nicht signifikant ausfiel (Abb. 3). Aus Vorarbeiten am Institut ist dieser Effekt des Fehlens des TNFR2 bereits bekannt und in anderen Experimenten auch schon statistisch signifikant ausgefallen.

Es zeigte sich, dass TNFR2^{-/-} Knochenmarkkulturen geringere Anteile an CD11b⁺ Zellen aufwiesen als entsprechende WT-Kontrollen. Dabei sank der Anteil der MO-MDSC genauso wie der der PMN-MDSC. Die monozytären MDSC waren jedoch deutlicher betroffen (Abb. 3).

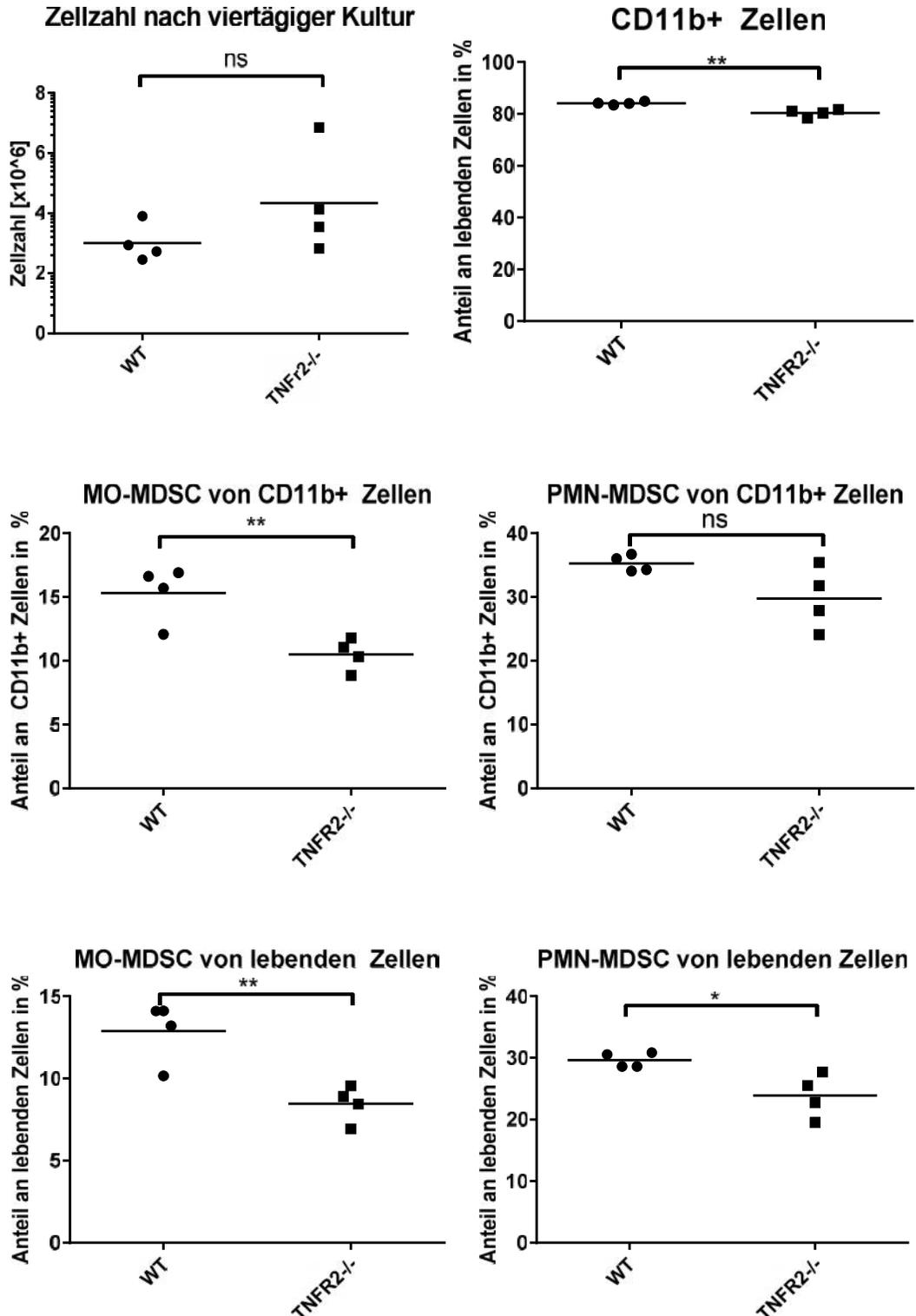


Abbildung 3| Knochenmark aus WT und TNFR2^{-/-} Mäusen wurde über vier Tage in GM-CSF-haltigem Medium inkubiert. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. MO-MDSC sind als CD11b⁺ Ly6G⁻ und Ly6C^{high} definiert, PMN-MDSC als CD11b⁺ Ly6G⁺ und Ly6C^{intermediate}. Ein Punkt repräsentiert die Daten eines einzelnen Tieres, die Balken bilden die Mittelwerte ab. Die p-Werte wurden mittels ungepaartem t-Test bestimmt. Daten aus einem Experiment.

Im Folgeschritt wurden die in viertägiger Kultur gereiften Knochenmarkszellen in einem T-Zell-Suppressionsassay auf ihre Funktion hin untersucht. Hierfür wurden identische Gesamtzellzahlen verwendet und keine Rücksicht auf Schwankungen von Subpopulationen genommen. Die Knochenmarkszellen wurden zusammen mit CFSE-gelabelten und stimulierten Milzzellen über drei Tage inkubiert und danach die Proliferation analysiert.

Es zeigte sich, dass T-Zellen schlechter proliferierten, wenn diese den Zellen aus WT-Knochenmarkkultur ausgesetzt wurden. Zellen aus TNFR2^{-/-} Knochenmarkkultur supprimierten zwar ebenso in einer dosisabhängigen Wirkung, die Suppression war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 4).

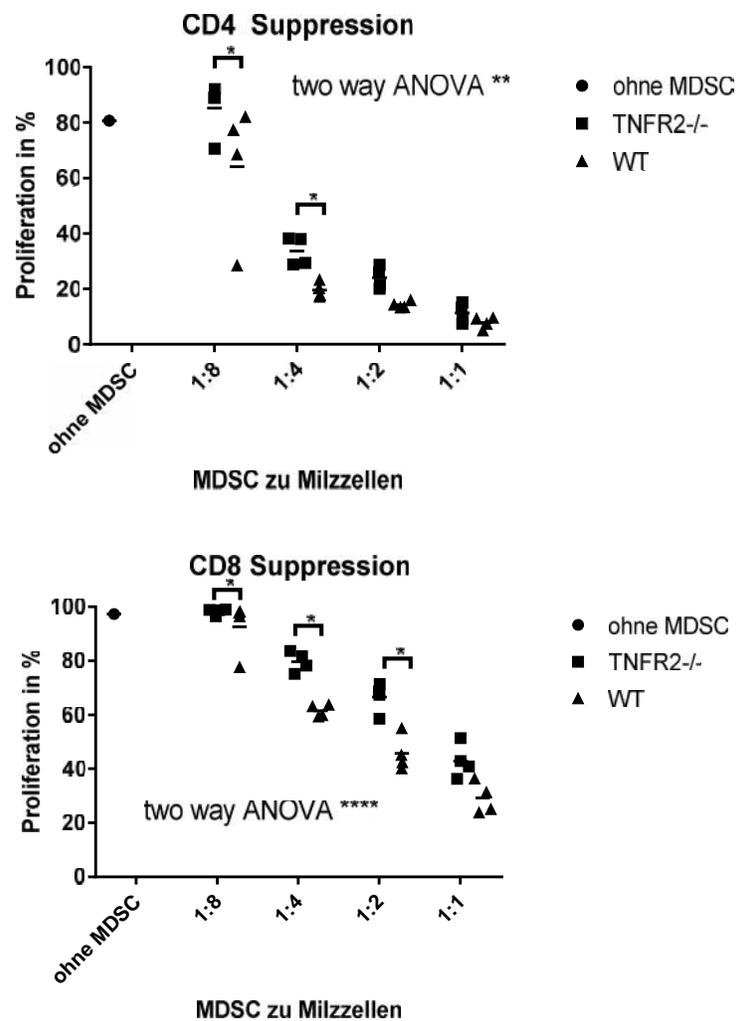


Abbildung 4 | Über vier Tage in Gegenwart von GM-CSF-haltigem Medium generierte Knochenmarkszellen wurden mit 2×10^5 CFSE-gelabelten und CD3/ CD28-stimulierten Milzzellen in entsprechender Anzahl (genormt auf Gesamtzellzahl) inkubiert. Nach drei Tagen wurde die Proliferation im Durchflusszytometer analysiert. Jeder Punkt stellt zwei technische Replikate eines einzelnen Tieres dar, die Balken bilden die Mittelwerte ab. Zur Analyse wurde ein Two-Way-Anova durchgeführt, als Post-Hoc-Test wurde der Holm-Šidák-Test verwendet. Daten aus einem Experiment.

4.4 scTNF80 führt zu verringerter Recovery nach

Knochenmarkkultur

Nachdem die Auswirkungen eines Fehlens des TNFR2 charakterisiert waren, widmeten wir uns der Untersuchung der Einflüsse einer TNFR2-spezifischen Aktivierung. Knochenmarkszellen aus WT-Mäusen wurden hierzu in GM-CSF-haltigem Medium in Gegenwart von scTNF80 inkubiert. Wir führten an Tag 4, 6 und 7 genauere Analysen durch. Als Kontrollen dienten Kontrollüberstand oder reines GM-CSF Medium ohne Zusatz weiterer Reagenzien. Beide Kontrollen verhielten sich identisch.

Die absoluten Zellzahlen wurden nach vier, sechs und in Ausnahmefällen nach sieben Tagen analysiert. Sowohl an Tag vier, wie auch an Tag sechs bzw. sieben war die Zellzahl in Kulturen mit scTNF80 deutlich verringert (Abb. 5).

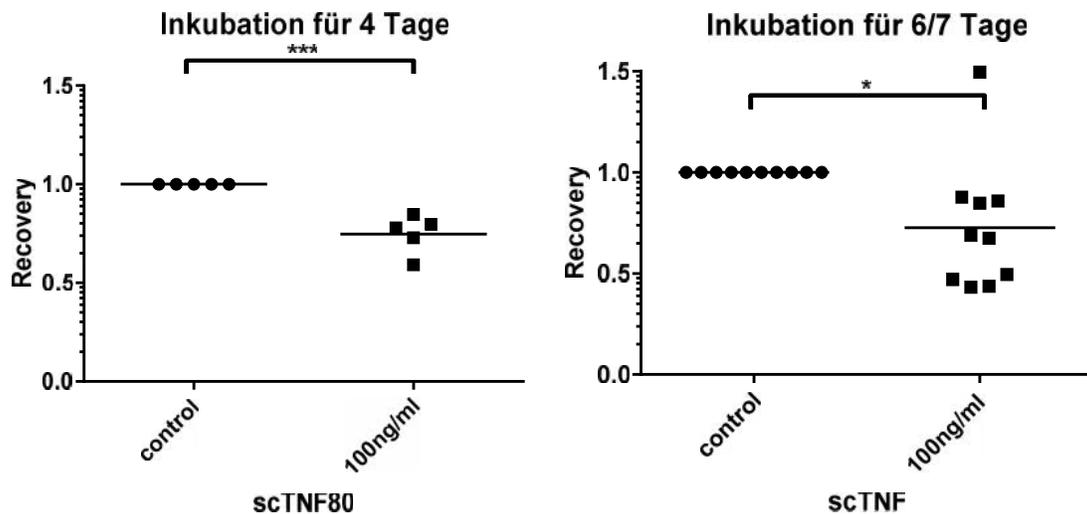


Abbildung 5 | Knochenmarkszellen wurden mit und ohne scTNF80 in GM-CSF-haltigem Medium über vier bzw. sechs oder sieben Tage inkubiert. Die Probe wurde mit Trypanblau verdünnt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Jeder Punkt stellt die Daten eines Tieres dar, die Balken bilden die Mittelwerte ab. Die Zellzahlen der Kontrollgruppe wurden dabei auf 1 normiert und die Werte der entsprechenden mit scTNF80-behandelten Gruppe im Verhältnis dazu angegeben. Die p-Werte wurden mittels gepaartem t-Test bestimmt. Gepoolte Daten aus mehreren Experimenten.

4.5 MDSC-Marker bei Kultivierung mit scTNF80 leicht erhöht

Um genauer zu verstehen, wie sich eine TNFR2-Aktivierung auf Knochenmarkszellen in Kultur auswirkt, wurden das Knochenmark von vier einzelnen Tieren mit und ohne scTNF80 inkubiert und in regelmäßigem Abstand auf MDSC im FACS untersucht. Die Ausbeute verhielt sich auch

hier wie erwartet: ab Tag vier war die Ausbeute bei Kultivierung mit scTNF80 deutlich verringert (Abb. 6).

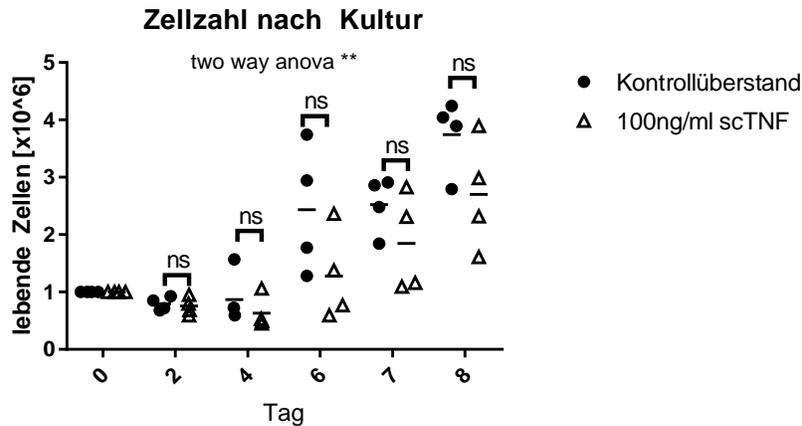


Abbildung 6 | Knochenmarkszellen wurden mit und ohne scTNF80 in GM-CSF-haltigem Medium über zwei, vier, sechs, sieben und acht Tage inkubiert. Die Proben wurden mit Trypanblau verdünnt und die Zellzahl bestimmt. Jeder Punkt stellt die Mittelwerte technischer Duplikate der Kulturen eines einzelnen Tieres dar, die Balken bilden die Mittelwerte ab. Zur Analyse wurde ein Two-Way-Anova durchgeführt, als Post-Hoc-Test wurde der Holm-Šidák-Test verwendet. Daten aus einem Experiment.

Die entnommenen Proben wurden für die Durchflusszytometrie gefärbt und nach folgendem Schema gated (Abb. 7).

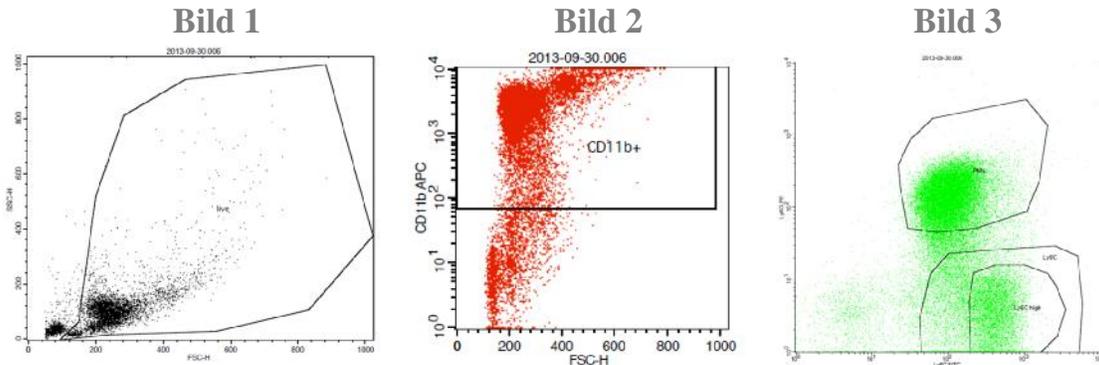


Abbildung 7 | Knochenmarkszellen wurden mit und ohne scTNF80 in GM-CSF-haltigem Medium über zwei, vier, sechs, sieben und acht Tage inkubiert und die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt. Dargestellt ist das Gatingschema: Bild 1: Gaten auf lebende Zellen; Bild 2: Gaten der lebenden Zellen auf CD11b⁺ Zellen; Bild 3: Gaten der CD11b⁺ und lebenden Zellen auf CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{intermediate} PMN-MDSC und CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C^{high} MO-MDSC

Bei der Analyse der Oberflächenmarker fiel auf, dass sich die beiden Gruppen in Bezug auf CD11b⁺ Zellen nicht unterschieden. Ab Tag vier waren nahezu alle Zellen CD11b⁺ (Abb. 8).

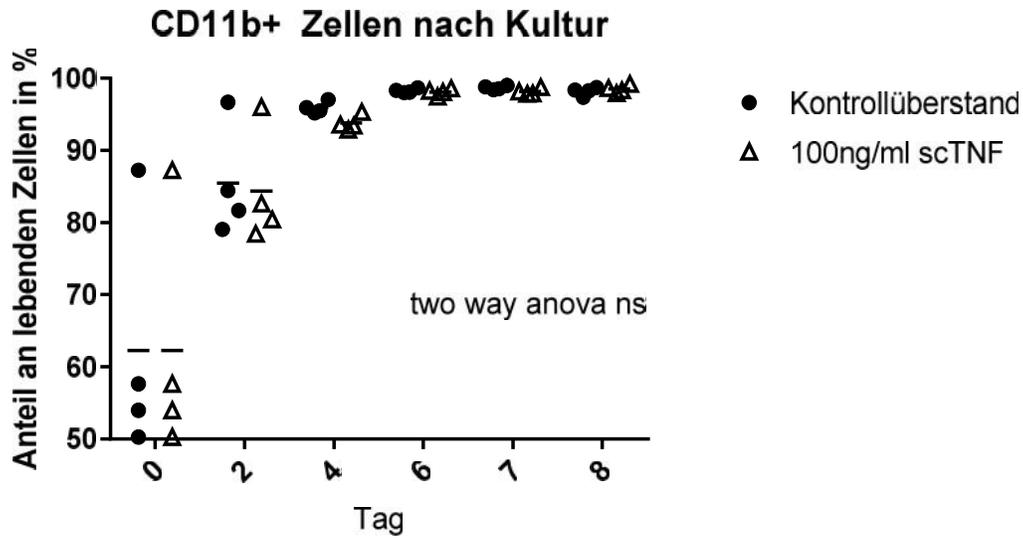
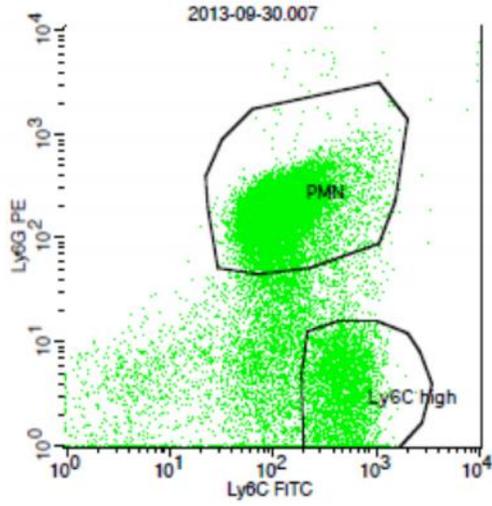


Abbildung 8 | Knochenmarkszellen wurde mit und ohne scTNF80 in GM-CSF-haltigem Medium über zwei, vier, sechs, sieben und acht Tage inkubiert und die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt. Jeder Punkt stellt die Mittelwerte technischer Duplikate der Kulturen eines einzelnen Tieres dar, die Balken bilden den Mittelwert der vier Einzeltiere ab. Zur Analyse wurde ein Two-Way-Anova durchgeführt. Daten aus einem Experiment.

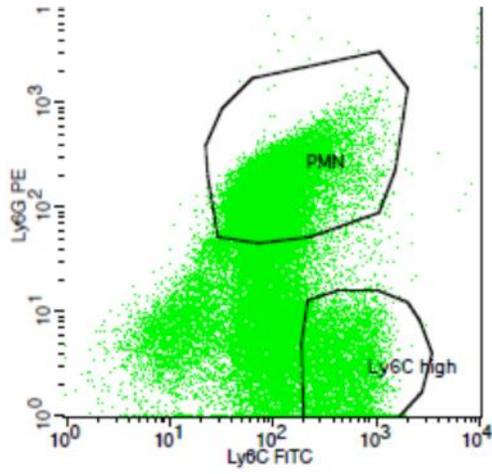
Eine genauere Analyse der CD11b⁺ Zellen ergab, dass die Anteile von MO- und PMN-MDSC über den untersuchten Zeitraum zügig sanken und bereits an Tag 4 als eigene Population kaum noch auszumachen waren. Das Gating gestaltete sich daher schwierig (Abb. 9).

Tier 2, Tag 0

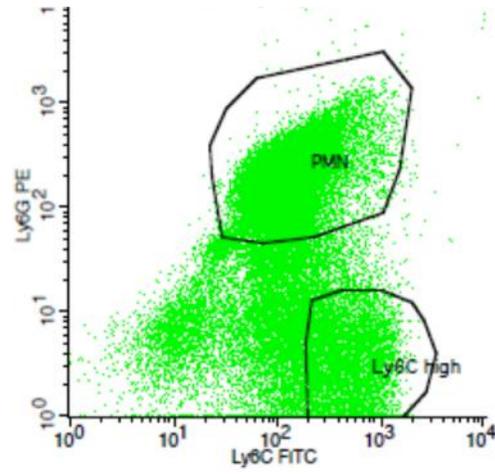


Tier 2, Tag 2

Kontrolle

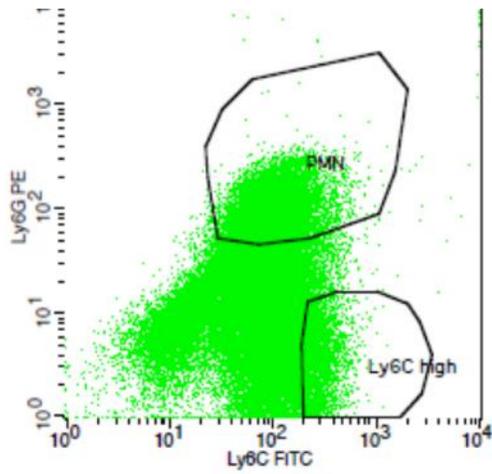


mit scTNF80

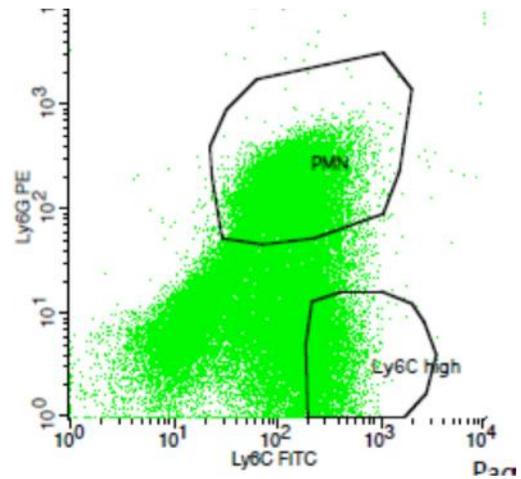


Tier 2, Tag 4

Kontrolle

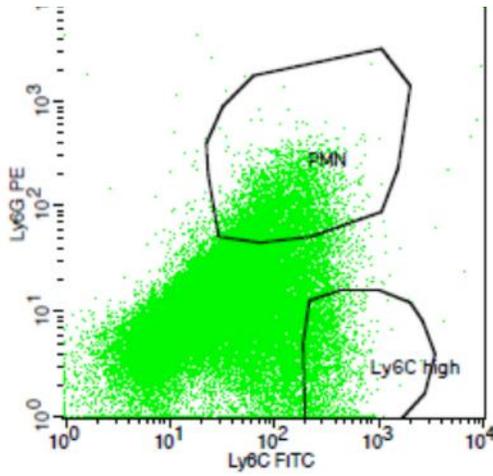


mit scTNF80

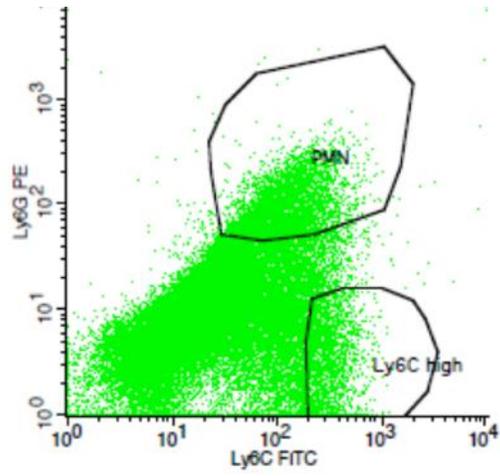


Tier 2, Tag 6

Kontrolle

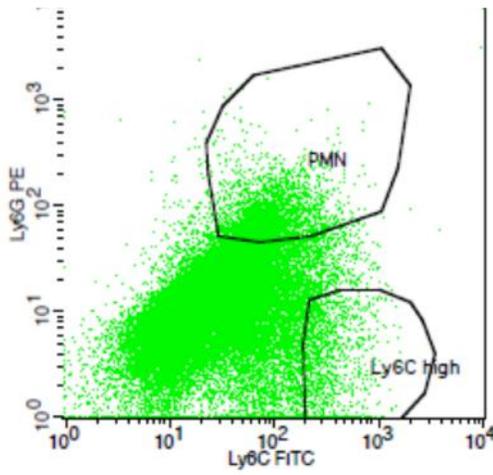


mit scTNF80

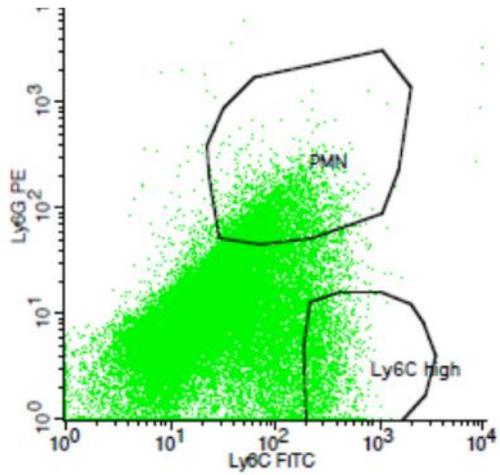


Tier 2, Tag 7

Kontrolle

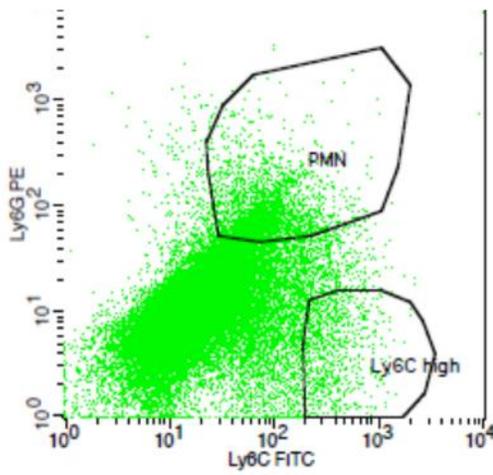


mit scTNF80



Tier 2, Tag 8

Kontrolle



mit scTNF80

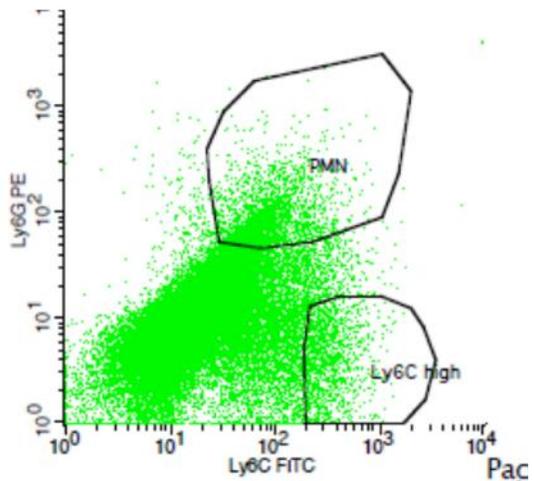


Abbildung 9 | Knochenmarkszellen wurden mit und ohne scTNF80 in GM-CSF-haltigem Medium über zwei, vier, sechs, sieben und acht Tage inkubiert und die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt. Dargestellt sind Dotplots der lebenden CD11b positive Zellen aus den entsprechenden Proben. Auswahl eines repräsentativen Tieres (Tier 2).

Es zeigte sich ein leicht vergrößerter Anteil an MO- und PMN-MDSC in den mit scTNF80 inkubierten Proben (Abb. 10).

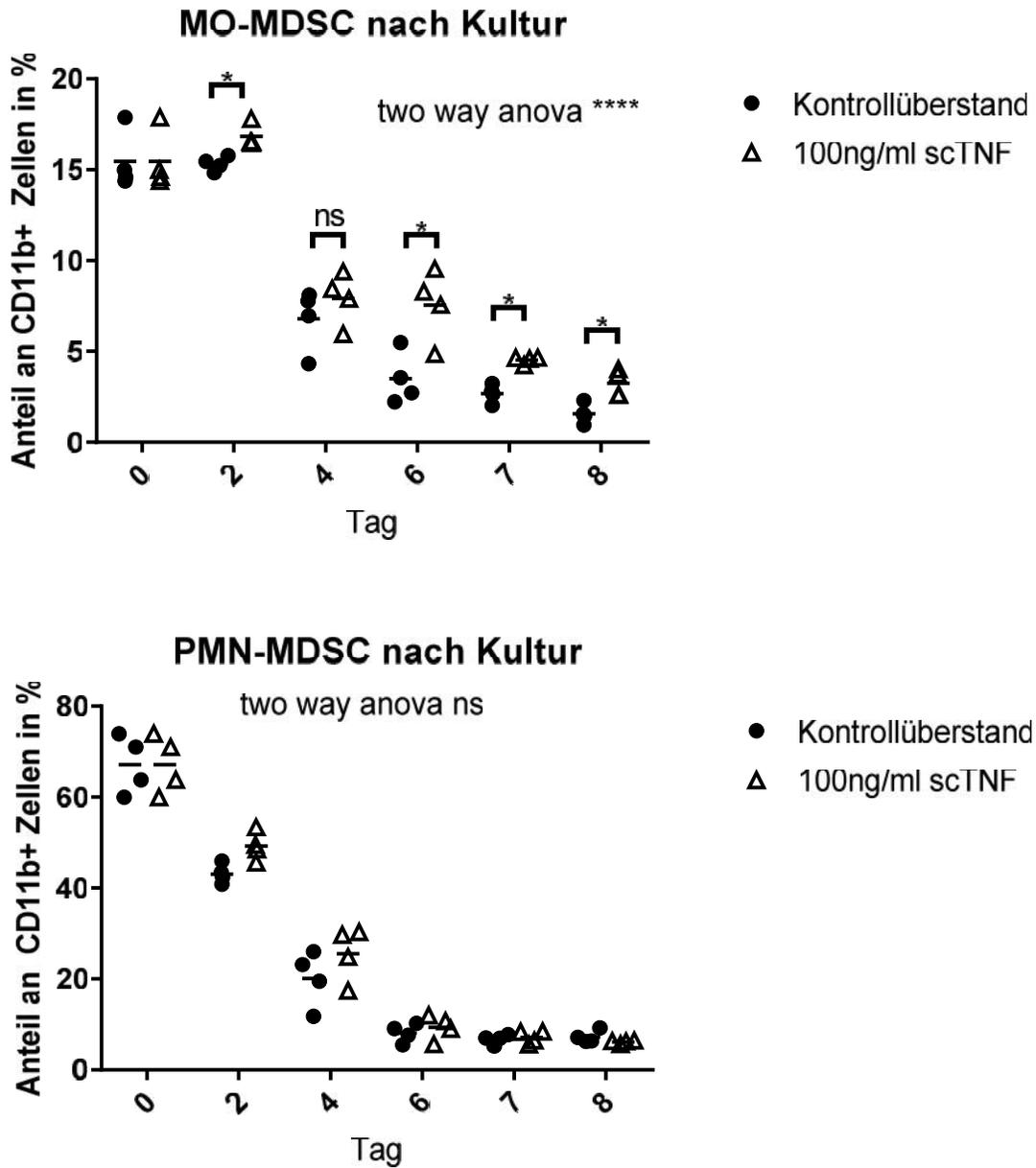


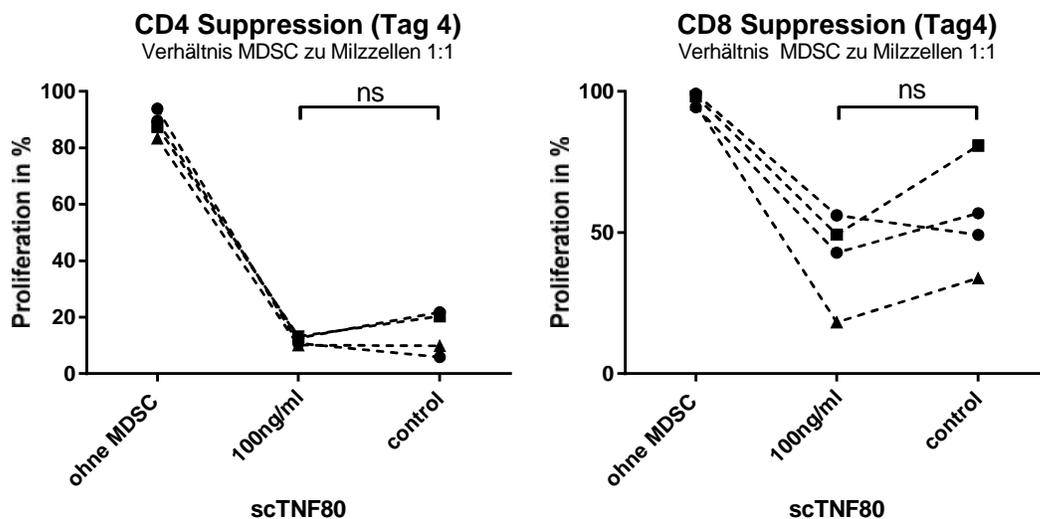
Abbildung 10 | Knochenmarkszellen wurden mit und ohne scTNF80 in GM-CSF-haltigem Medium über zwei, vier, sechs, sieben und acht Tage inkubiert und die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt. Jeder Punkt stellt die Mittelwerte technischer Duplikate der Kulturen eines einzelnen Tieres dar, die Balken bilden den Mittelwert der vier Einzeltiere ab. Zur Analyse wurde ein Two-Way-Anova durchgeführt. Daten aus einem Experiment.

4.6 Knochenmark-Zellen weisen nach sechstägiger Inkubation mit scTNF80 geringere suppressive Aktivität auf

Im Folgenden untersuchten wir die unter scTNF80 generierten Knochenmarkszellen auf ihre suppressorische Aktivität in einem T-Zell-Suppressionsassay.

Hierzu wurden die Knochenmarkszellen nach vier- oder sechs- bzw. siebentägiger Kultur geerntet, gewaschen, um das scTNF80 zu entfernen, und ohne weitere Isolierung mit CFSE-gelabelten und stimulierten Milzzellen für drei Tage inkubiert. Zusätzlich wurde teilweise der Überstand abgenommen und die NO-Konzentration bestimmt. Höhere NO-Konzentrationen sind ein Indikator für gesteigerte MDSC-Aktivität [237].

Da der Effekt einer TNFR2-Aktivierung in Kultur Schwankungen unterworfen war, wurde dieser Versuch mehrfach wiederholt. Trotz Schwankungen in der Stärke des Effekts durch scTNF80 konnte deutlich gezeigt werden, dass TNFR2-Aktivierung zu einer verminderten suppressiven Aktivität der MDSC führte. Dieser Effekt trat jedoch erst bei MDSC auf, die an Tag 6 geerntet wurden, und war abhängig von der scTNF80-Dosis der MDSC-Kultur (Abb. 11,12). Nach viertägiger MDSC-Kultur konnten keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 11). Die verringerte Proliferation der CD8⁺-T-Zellen an Tag 4 ist nicht signifikant ($p=0,18$) und fand sich ausschließlich in der 1:1 Verdünnungsstufe. In anderen Verdünnungsansätzen konnte dieser Trend nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



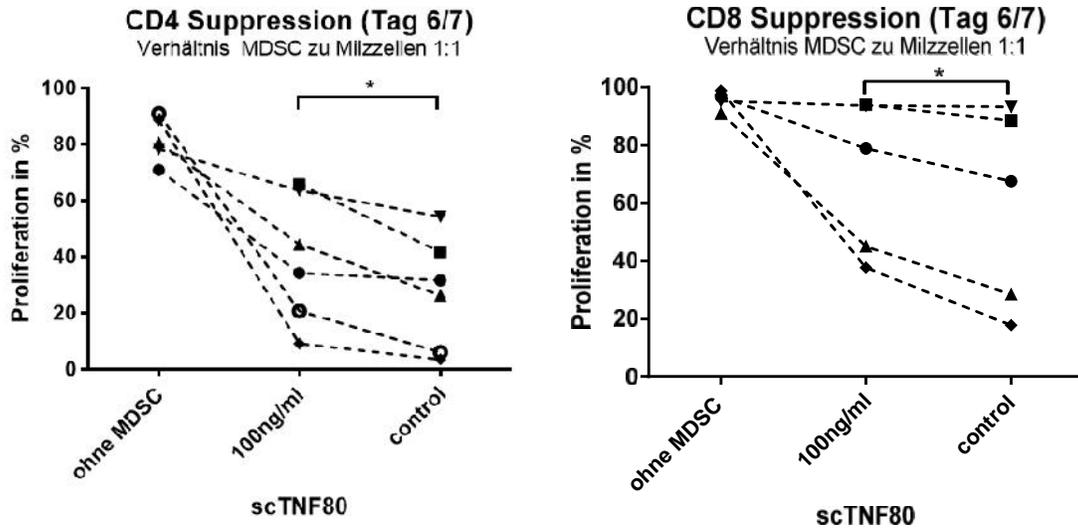
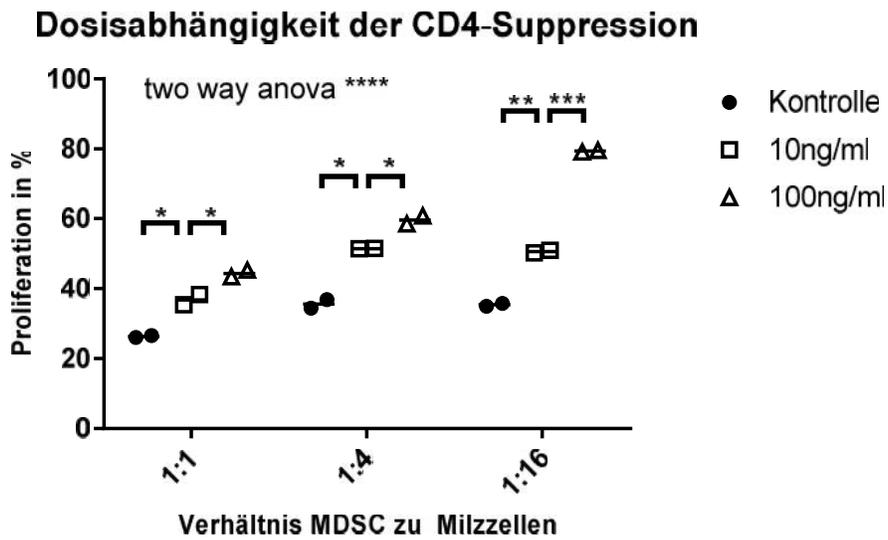


Abbildung 11 | Knochenmarkszellen wurden nach vier- bzw. sechs- oder siebentägiger Kultur mit und ohne scTNF80 geerntet und mit 2×10^5 CFSE-gelabelten Milzzellen inkubiert und die Kultur mit CD3/ CD28 stimuliert. Nach drei Tagen wurden die Proben gefärbt und im FACS analysiert. Jeder Punkt repräsentiert die Daten eines Experiments und ist Mittelwert mindestens zweier technische Replikate. Die Punkte eines Experiments sind über Linien verbunden. Zur Analyse wurde ein gepaarter t-Test ($p < 0,5$) durchgeführt.



Dosisabhängigkeit der CD8-Suppression

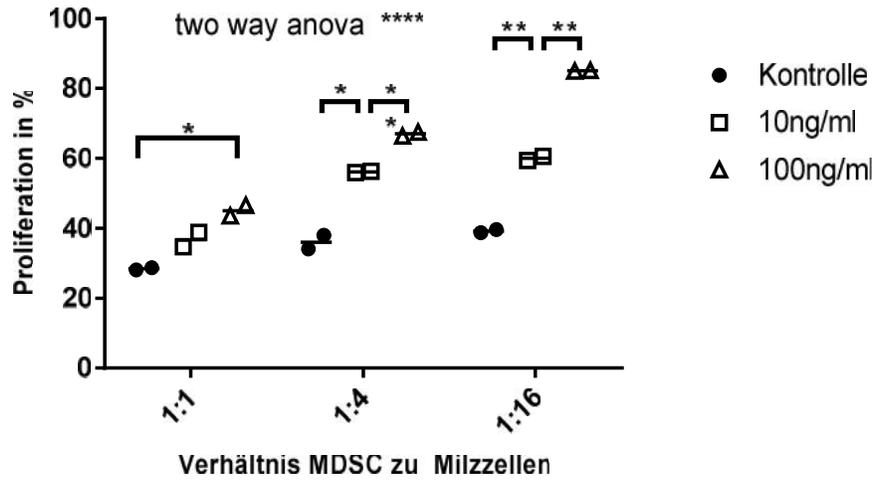


Abbildung 12 | Knochenmarkszellen wurden nach sechstägiger Kultur mit unterschiedlichen Konzentrationen scTNF80 geerntet und mit 2×10^5 CFSE-gelabelten Milzzellen inkubiert und die Kultur mit CD3/ CD28 stimuliert. Nach drei Tagen wurden die Proben gefärbt und im FACS analysiert. Jeder Punkt entspricht einem technischen Replikat. Daten aus einem exemplarischen Experiment. Zur Analyse wurde ein Two-Way-Anova durchgeführt, als Post-Hoc-Test wurde der Holm-Šidák-Test verwendet. Daten aus einem Experiment.

Die Analyse der NO-Überstände zeigte, dass MDSC, die in Kultur über sechs Tage scTNF80 ausgesetzt waren, auch geringere Mengen an NO produzierten als entsprechende Kontrollen (Abb. 13). Ein Ergebnis, das mit einer verminderten Suppression vereinbar ist (Abb. 12).

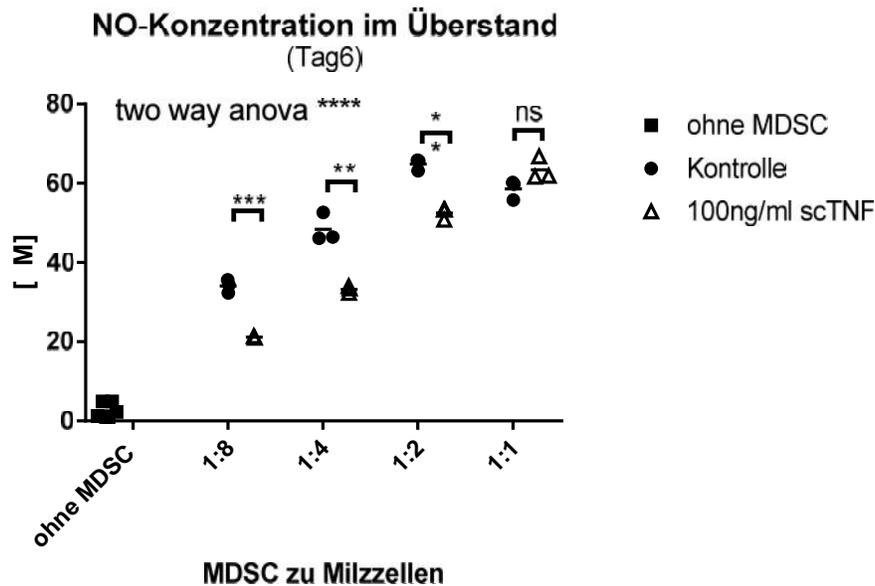


Abbildung 13 | Knochenmarkszellen wurden nach vier- bzw. sechstägiger Kultur mit und ohne scTNF80 geerntet und mit 2×10^5 CFSE-gelabelten Milzzellen inkubiert und die Kultur mit CD3/ CD28 stimuliert. Nach drei Tagen wurden die Überstände genommen und NO-Konzentrationen bestimmt. Einzelne Punkte repräsentieren technische Replikate, die Balken bilden die Mittelwerte ab. Zur Analyse wurde ein Two-Way-Anova durchgeführt, als Post-Hoc-Test wurde der Holm-Šidák-Test verwendet. Daten aus einem Experiment.

4.7 scTNF80 führt *in vivo* zur Expansion der CD11b⁺ Zellen im Knochenmark

Wie in der Einführung beschrieben, existieren umfassende Daten zu MDSC in TNF^{-/-}, TNFR^{-/-}, TNFR1^{-/-} und TNFR2^{-/-} Mäusen und auch dazu, wie sich TNF-Gabe auf MDSC auswirkt. Unbekannt ist jedoch nach wie vor, wie sich eine spezifische Aktivierung des TNFR2 *in vivo* auswirkt.

Um dies zu untersuchen, wurde gesunden WT Mäusen gereinigtes scTNF80 intraperitoneal verabreicht. Die Applikation erfolgte nach folgendem Schema.

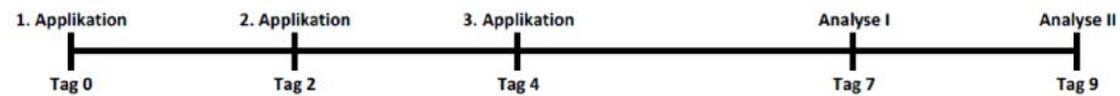


Abbildung 14 | Applikationsschema bei naiven WT-Mäusen

In einem Experiment wurde der Analysezeitpunkt I (Tag 7) verwendet, in drei weiteren der Analysezeitpunkt II (Tag 9). Die Tiere wurden getötet und es wurde das Blut, die inguinalen Lymphknoten, die Milz und das Knochenmark durchflusszytometrisch analysiert. Zusätzlich wurden MO-MDSC aus dem Knochenmark mittels magnetischer Depletion isoliert und funktionell im T-Zell-Suppressionsassay untersucht.

Unabhängig vom Analysezeitpunkt ließ sich ein Anstieg der CD11b⁺ Population im Knochenmark beobachten, der jedoch statistisch nicht relevant ausfiel (Abb. 15).

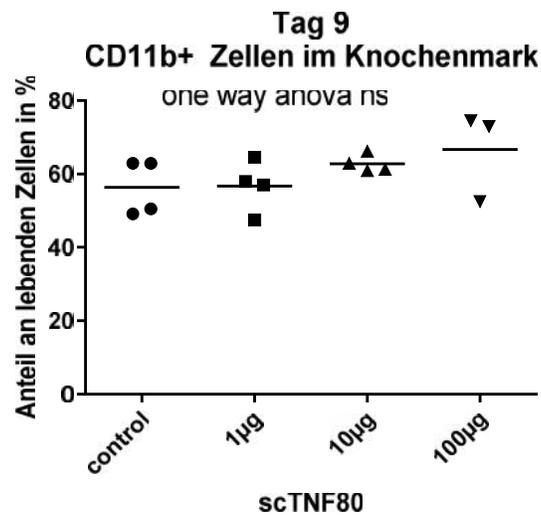
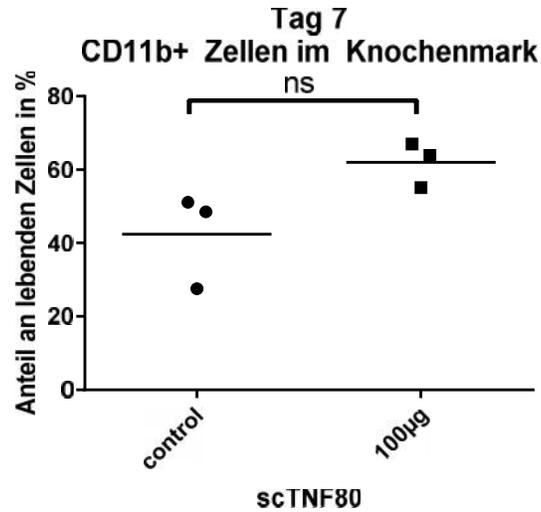


Abbildung 15 | Zellen wurden aus dem Knochenmark gewonnen und gefärbt. Jeder Punkt repräsentiert die Daten eines einzelnen Tieres, die Balken stellen die Mittelwerte dar. Zur Analyse wurde ein ungepaarter t-Test (Analysezeitpunkt I, Tag 7) bzw. ein One-Way-Anova (Analysezeitpunkt II, Tag 9) durchgeführt. An Analysezeitpunkt II wurden Daten zweier identischer Experimente in einer Grafik dargestellt.

Eine genauere Analyse der CD11b⁺ Zellen ergab unterschiedliche Ergebnisse je nach Analysezeitpunkt bei den MO-MDSC. Deren Anteil an den CD11b⁺ Zellen war an Tag 7 unverändert. In Bezug auf alle lebenden Zellen stieg er jedoch infolge der Expansion CD11b⁺ Zellen deutlich. An dem späteren Zeitpunkt, Tag 9, blieb der Anteil der MO-MDSC an den Gesamtzellen unverändert. Der Anteil der MO-MDSC an CD11b⁺ Zellen verkleinerte sich dementsprechend (Abb. 16).

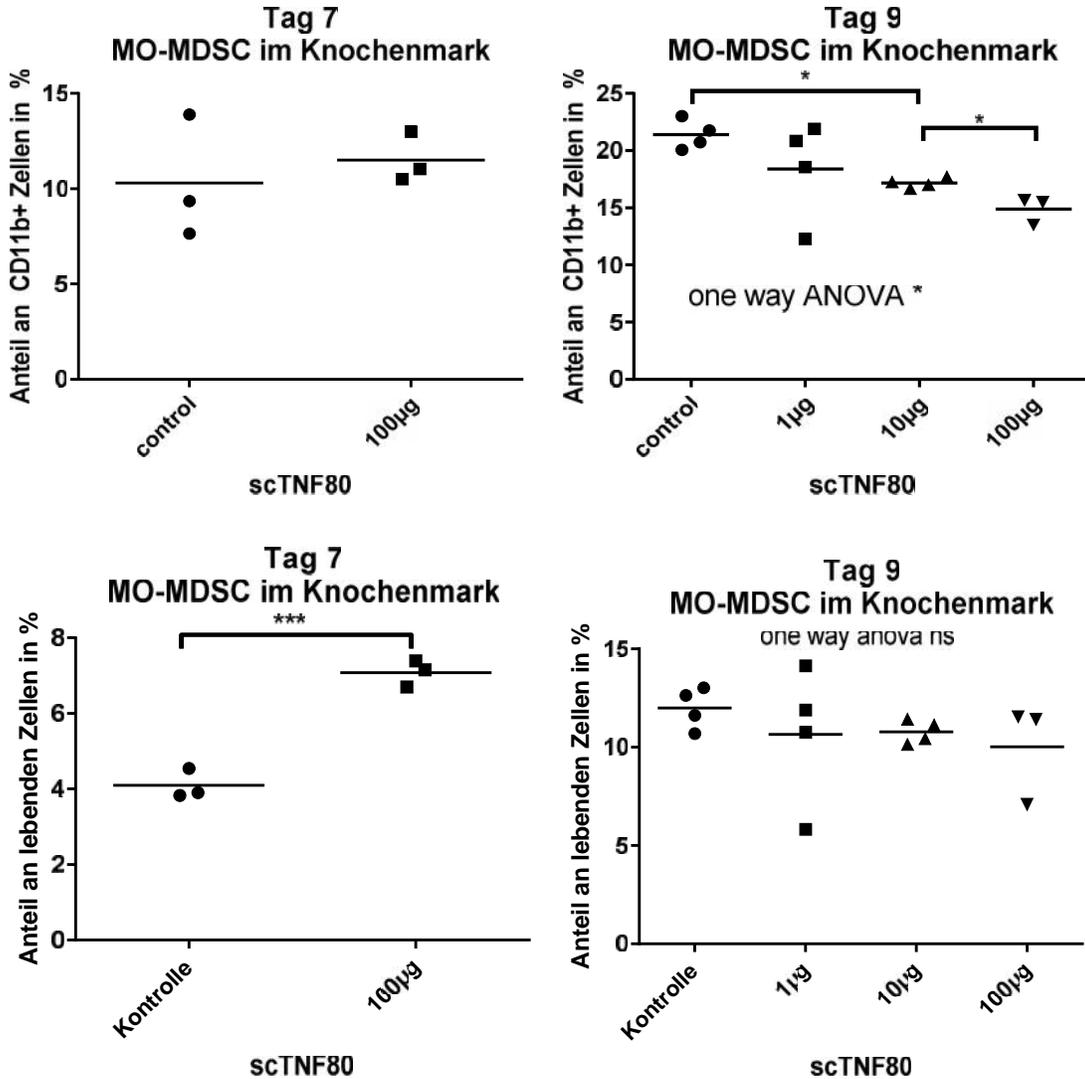


Abbildung 16 | Zellen wurden aus dem Knochenmark gewonnen und gefärbt. Jeder Punkt repräsentiert die Daten eines einzelnen Tieres, die Balken stellen die Mittelwerte dar. Zur Analyse wurde ein ungepaarter t-Test (Tag 7) bzw. ein One-Way-Anova (Tag 9) durchgeführt. MO-MDSC sind als CD11b⁺ Ly6G⁻ und Ly6C^{high} definiert.

Wir analysierten im Folgenden, wie suppressiv die MO-MDSC aus dem Knochenmark dieser Tiere waren. Die MO-MDSC wurden über eine magnetische Depletion isoliert und für drei Tage mit stimulierten Milzzellen von unbehandelten WT-Mäusen inkubiert.

Die funktionelle Analyse der MO-MDSC aus dem Knochenmark zeigte, dass passend zu unseren *in vitro*-Daten die suppressive Aktivität der MDSC, die scTNF80 ausgesetzt waren, verringert war. Dies galt jedoch nur für den früheren Analysezeitpunkt an Tag 7 (Abb. 17).

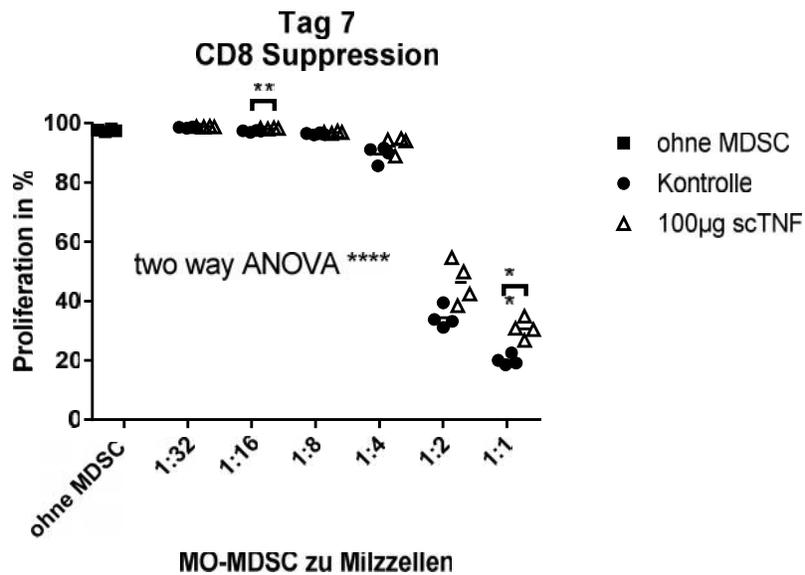
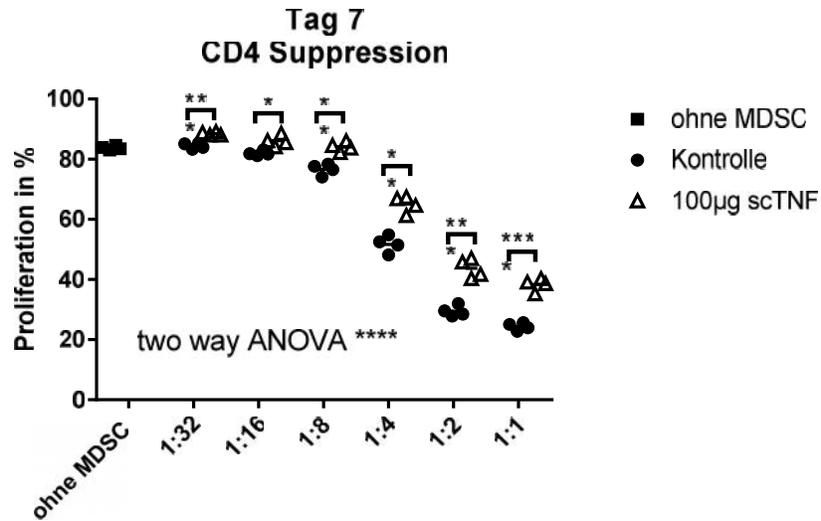


Abbildung 17 | Knochenmarkszellen der Einzeltiere einer Gruppe wurde zu gleichen Anteilen gepoolt. MO-MDSC wurden aus dem Knochenmark isoliert. Nach einer Nacht im Inkubator wurden 2×10^5 CFSE-gelabelte Milzzellen hinzugegeben und die Kultur mit CD/ CD28 für drei Tage stimuliert. Jeder Punkt repräsentiert ein technisches Replikat, die Balken stellen die Mittelwerte dar. Zur Analyse wurde ein Two-Way-Anova durchgeführt, als Post-Hoc-Test wurde der Holm-Šidák-Test verwendet.

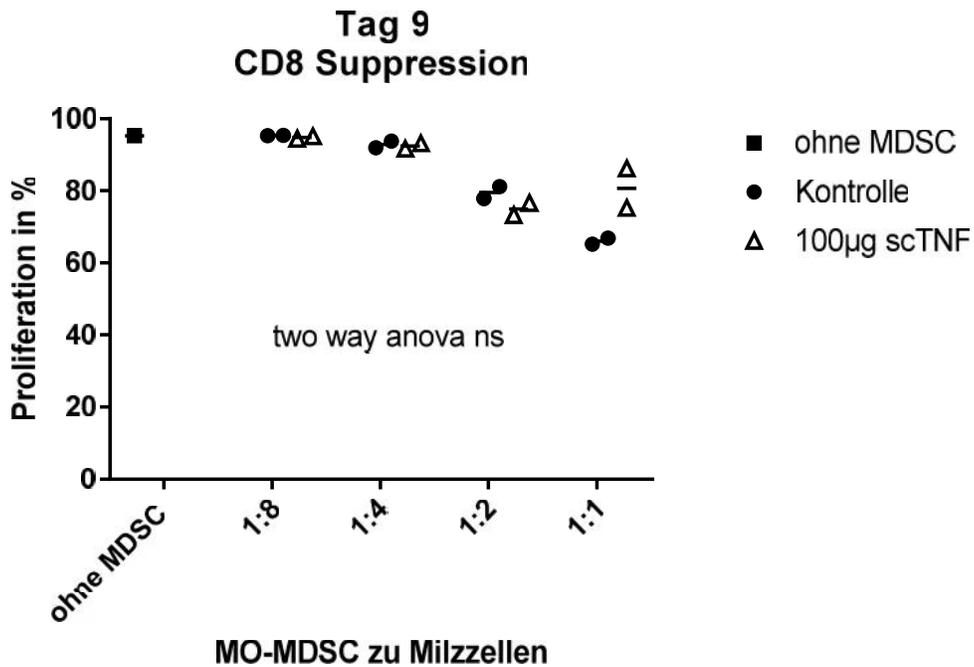
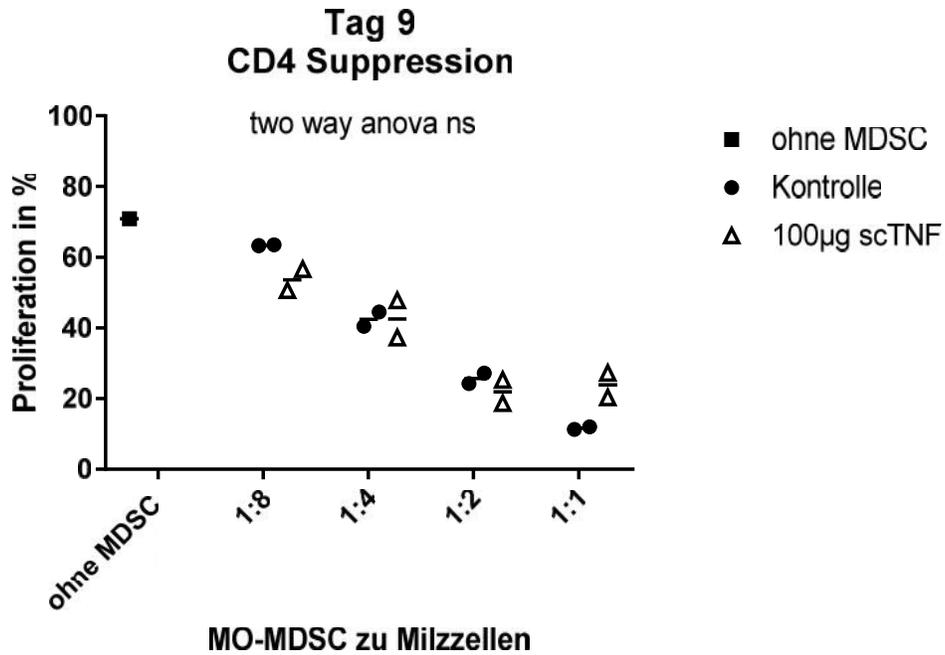


Abbildung 18 | Aus dem Knochenmark wurden MO-MDSC isoliert. Nach einer Nacht im Inkubator wurden 2×10^5 CFSE-gefärbte und CFSE-gelabelte Milzzellen hinzugegeben und die Kultur mit CD3/ CD28 stimuliert. Jeder Punkt stellt die Daten eines Tieres dar, die Linien die Mittelwerte. Zur Analyse wurde ein Two-Way-Anova durchgeführt.

Am Analysezeitpunkt II sahen wir in drei unabhängigen Experimenten Schwankungen in beide Richtungen. Ein Zusammenhang mit der eingesetzten scTNF80-Dosis bestand nicht. Nach

gegenwärtiger Datenlage kann daher nicht mit Sicherheit von einer veränderten Suppressivität der MO-MDSC aus dem Knochenmark (Abb. 18) ausgegangen werden.

Die deutlichsten Veränderungen konnten jedoch bei den PMN-MDSC beobachtet werden. Deren Population wuchs durch scTNF80-Gabe sowohl in Bezug auf CD11b⁺ Zellen als auch im Verhältnis zur Gesamtheit der im Knochenmark lebenden Zellen deutlich. Dies galt für beide Analysezeitpunkte. Der Effekt war dosisabhängig (Abb. 19).

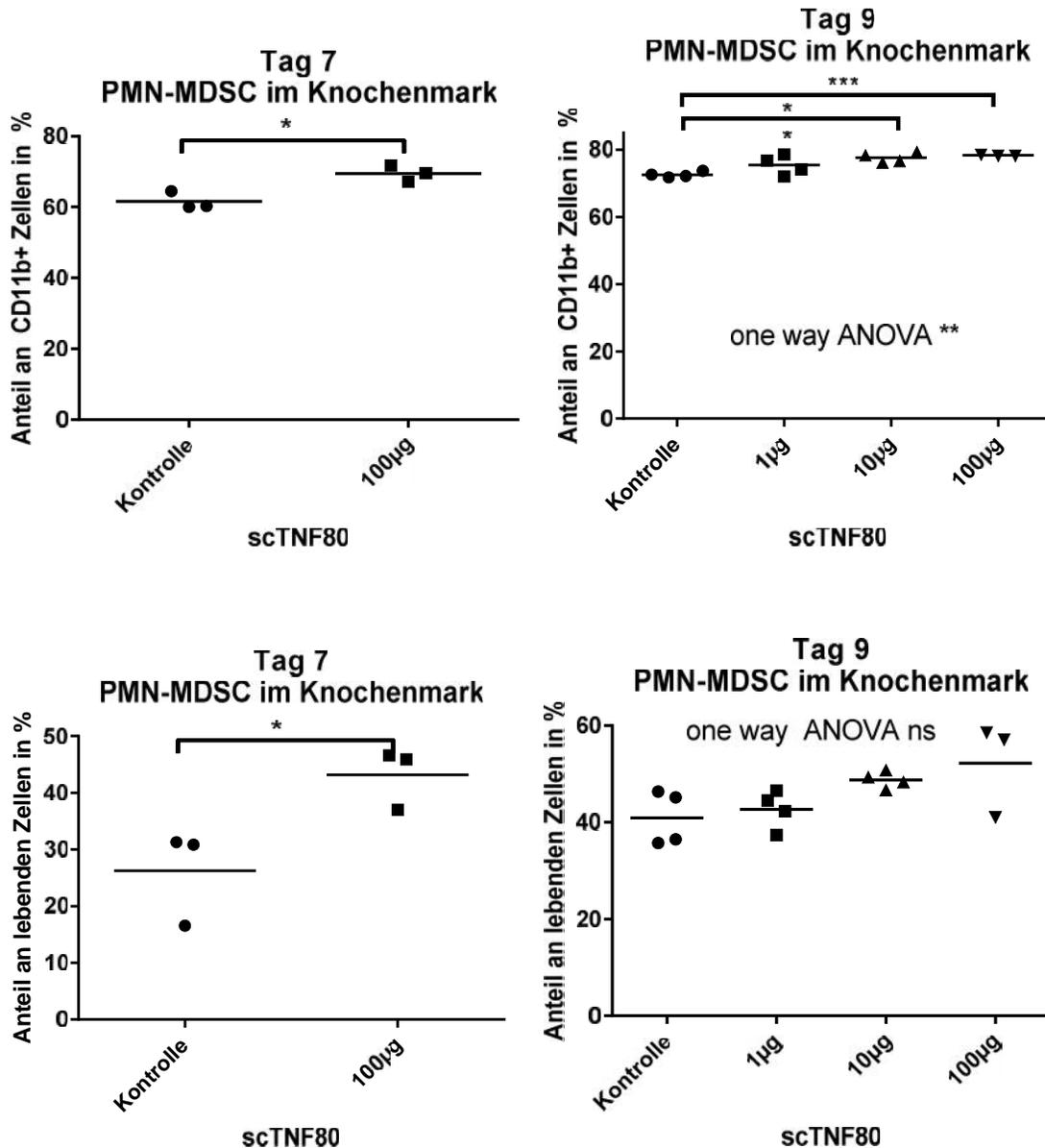


Abbildung 19 | Zellen wurden aus dem Knochenmark gewonnen und gefärbt. Jeder Punkt repräsentiert die Daten eines einzelnen Tieres, die Balken stellen die Mittelwerte dar. Zur Analyse wurde ein ungepaarter t-Test (Analysezeitpunkt I) bzw. ein One-Way-Anova (Analysezeitpunkt II) durchgeführt. PMN-MDSC sind als CD11b⁺ Ly6G⁺ und Ly6C^{intermediate} definiert.

4.8 scTNF80 führt zu leichter Expansion der PMN-MDSC in der Milz

Nachdem gezeigt wurde, dass scTNF80 im Rahmen des Heranreifens im Knochenmark eine Rolle spielt, stellte sich die Frage, inwiefern das Populationsgleichgewicht auch in der Peripherie beeinflusst wird. Hierfür untersuchten wir inguinale Lymphknoten und die Milz. Während im Lymphknoten konstant keine Veränderung gesehen werden konnte (Daten nicht gezeigt), fanden sich in der Milz leichte Effekte, die in ihrer Tendenz gut zu den Daten aus dem Knochenmark passten.

Auch hier existierten Unterschiede in Abhängigkeit vom Analysezeitpunkt. An Tag 7 erschienen die MDSC-Populationen unbeeinflusst durch scTNF80-Gabe, während zwei Tage später, an Tag 9, eine leichte Expansion der PMN-MDSC zu beobachten war. Populationsgrößen von MO-MDSC und CD11b⁺ Zellen insgesamt waren Schwankungen unterworfen, zeigten jedoch keine eindeutige Tendenz (Abb. 20).

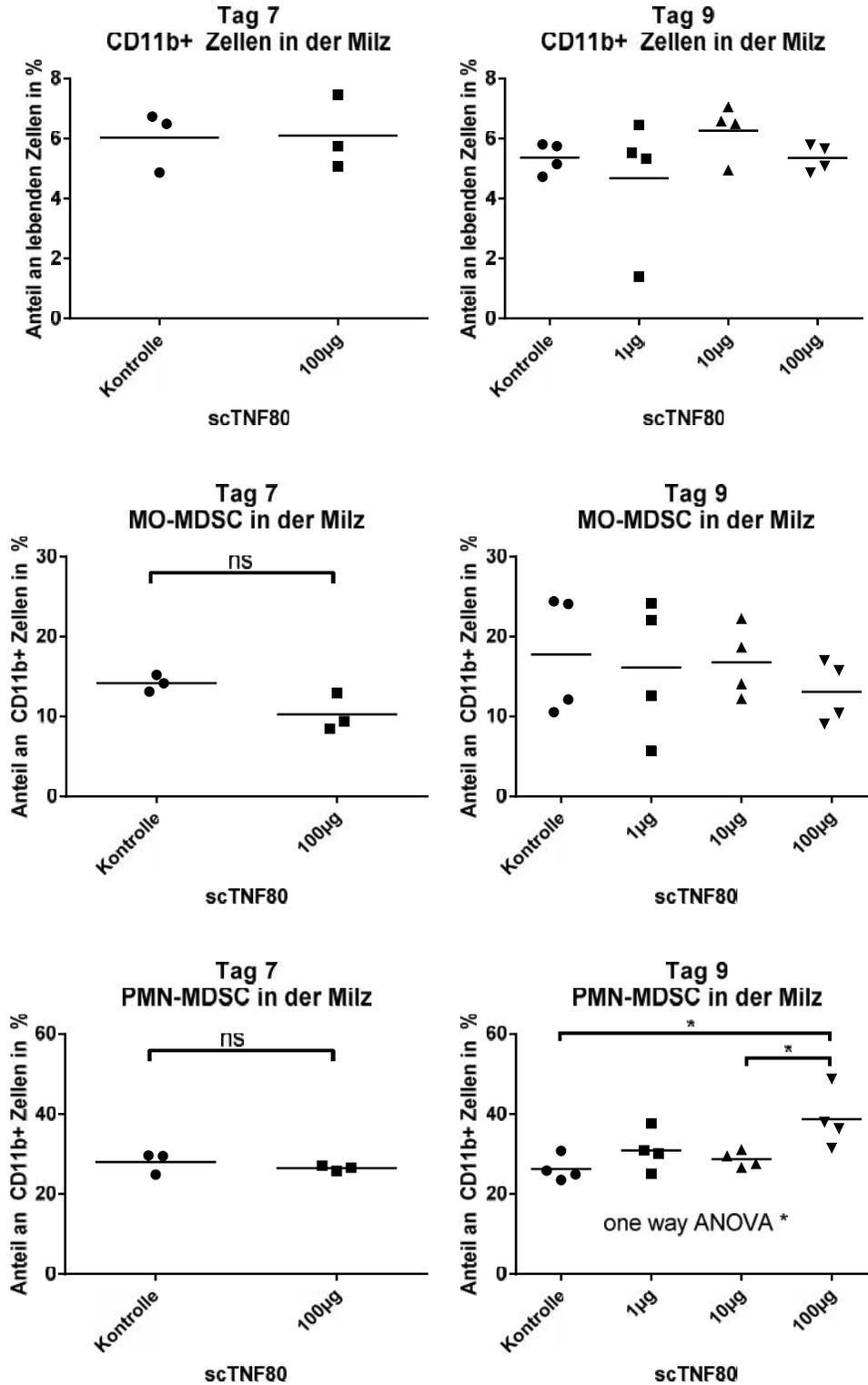


Abbildung 20 | Zellen wurden aus der Milz gewonnen, die Erythrozyten lysiert und die Zellen gefärbt. Jeder Punkt repräsentiert die Daten eines einzelnen Tieres, die Balken stellen die Mittelwerte dar. Zur Analyse wurde ein unpaired t-test (Tag 7) bzw. ein One-Way-Anova (Tag 9) durchgeführt, als Post-Hoc-Test wurde der Holm-Šidák-Test verwendet. An Tag 9 wurden Daten zweier identischer Experimente in einer Grafik dargestellt. MO-MDSC sind als CD11b⁺ Ly6G⁻ und Ly6C^{high} definiert, PMN-MDSC als CD11b⁺ Ly6G⁺ und Ly6C^{intermediate}.

4.9 Regulatorische T-Zellen werden durch scTNF80-Gabe *in vivo* nicht beeinflusst

Aufgrund der Erkenntnis, dass TNFR2 auch wichtig für Differenzierung und Funktion von regulatorischen T-Zellen ist [238] und MDSC regulatorische T-Zellen induzieren können [1, 28, 29], interessierte, wie sich deren Population infolge der scTNF80-Gabe verhält. Wir färbten daher Milz, Lymphknoten und Blut auf CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen. Veränderungen durch scTNF80 konnten wir in keinem der Organe feststellen. Dies galt sowohl für den Anteil an CD4⁺ Zellen, wie auch in Bezug auf alle Zellen im entsprechenden Organ (Abb. 21).

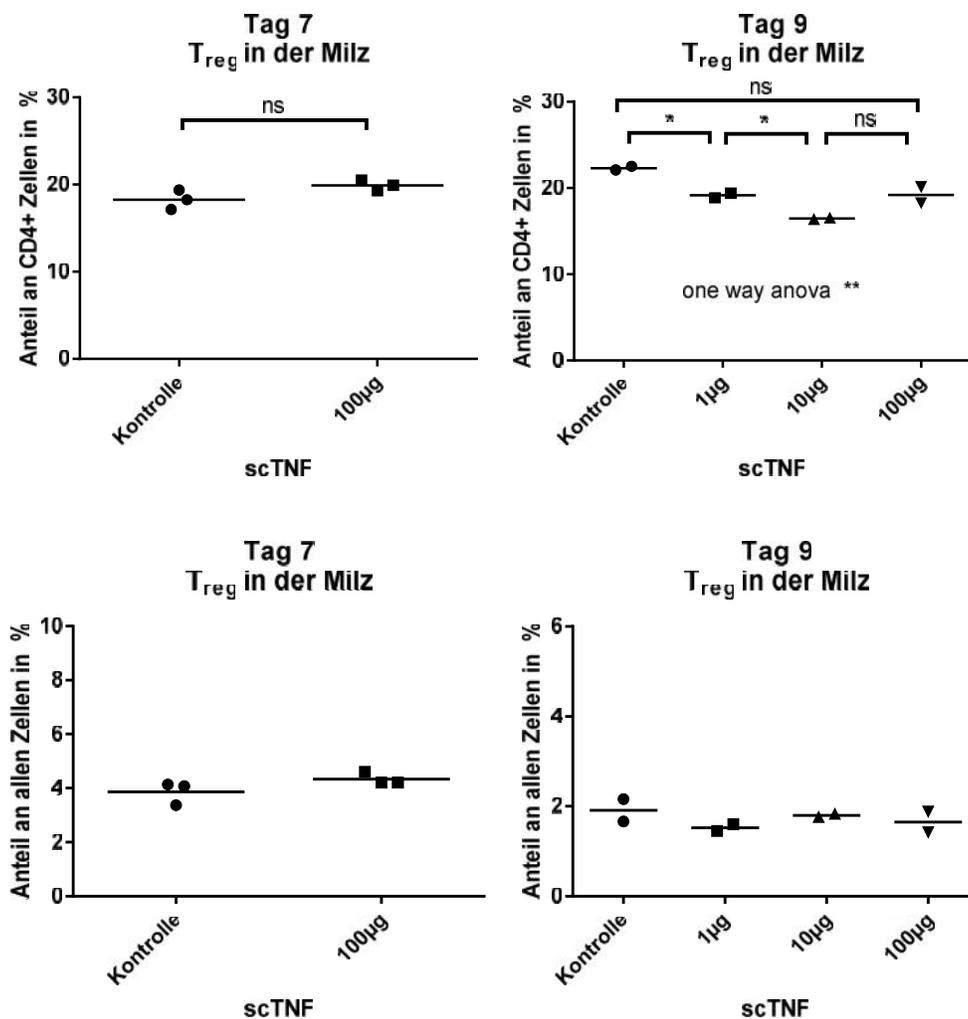


Abbildung 21 | Zellen wurden aus der Milz gewonnen, die Erythrozyten lysiert und zunächst Oberflächenmarker gefärbt. Im Anschluss erfolgte die intrazelluläre FoxP3-Färbung. Jeder Punkt repräsentiert die Daten eines einzelnen Tieres, die Balken stellen die Mittelwerte dar. Zur Analyse wurde ein unpaired t-test (Analysezeitpunkt I) bzw. ein One-Way-Anova (Analysezeitpunkt II) durchgeführt, als Post-Hoc-Test wurde der Holm-Šidák-Test verwendet. Regulatorische T-Zellen sind als CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ definiert.

4.10 scTNF80-Gabe beeinflusst den Gewichtsverlauf gesunder WT-Mäuse nur geringfügig

Nachdem die Therapie mit TNF durch teils dramatische Nebenwirkungen limitiert ist [198–200], wurde im Verlauf der *in vivo*-Experimente die Entwicklung des Körpergewichts der Mäuse näher beobachtet. Da wesentliche Anteile der Nebenwirkungen TNFR1-vermittelt zu sein scheinen [201], bestand die Hoffnung, dass sich scTNF80 als besser verträglich erweisen würde.

Im Verlauf sämtlicher *in vivo*-Experimente konnte ein Anstieg des Körpergewichts beobachtet werden, wobei dieser bei Gabe von scTNF80 leicht verlangsamt ausfiel. Verhaltensauffälligkeiten oder Haarausfall traten nicht auf.

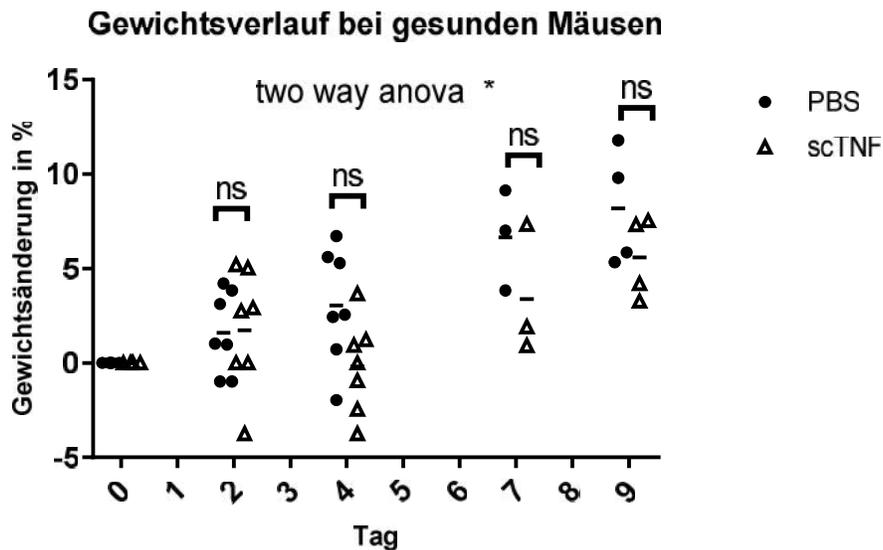


Abbildung 22 | Gewichtsverlauf von Mäusen mit dreimaliger intraperitonealer Injektion von gereinigtem scTNF80 und PBS als Kontrollgruppe. Die Injektionen erfolgten gemäß dem oben dargestellten Applikationsschema an naiven WT-Mäusen (Tag 0, 2 und 4). Gezeigt ist die Gewichtsveränderung in Prozent zum Gewicht bei Beginn der Injektionen. Jeder Punkt stellt den Wert eines einzelnen Tieres dar, die Balken den Mittelwert. Zur Analyse wurde ein Two-Way-Anova durchgeführt, als Post-Hoc-Test wurde der Holm-Šidák-Test verwendet. Gepoolte Daten aus drei Experimente.

4.11 Deutlich stärkere Effekte von scTNF80 bei tumorkranken Mäusen

Nachdem wir generelle Effekte einer TNFR2-Aktivierung auf naive Mäuse untersucht hatten, wurde als Folgeschritt scTNF80 im Krankheitsmodell untersucht, um einen möglichen therapeutischen Nutzen zu evaluieren. Aufgrund unserer *in vitro* Daten wurde von einer verminderten Suppressionsfähigkeit der MDSC ausgegangen und ein Tumormodell gewählt, in

dem wir uns einen therapeutischen Nutzen des scTNF80 erhofften. Für den Versuch wurde die BFS-1 (Fibrosarkom) Tumorlinie verwendet, von der jeder Maus an Tag 0 2×10^5 Zellen subkutan injiziert wurden. Die Therapie erfolgte mittels intraperitonealer Injektion mit $100 \mu\text{g}$ gereinigtem scTNF80 oder reinem PBS als Kontrolle nach folgendem Schema (Abb. 23).

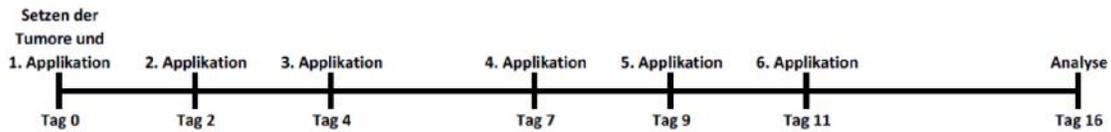


Abbildung 23 | Applikationsschema bei mit Tumoren injizierten Mäusen

Der verwendete Batch der Tumorlinie war anscheinend fehlerhaft, da binnen zwei Wochen sämtliche Tumore der Kontrollgruppe und fünf von sechs Tumoren der mit scTNF80 behandelten Gruppe wieder verschwanden (Abb. 24). Das Experiment wurde daraufhin vorzeitig beendet, um die Effekte von scTNF80 auf den Organismus analysieren zu können. Der Analysezeitpunkt wurde wie bei dem Großteil unserer vorherigen *in vivo* Experimente fünf Tage nach der letzten scTNF80-Applikation gesetzt.

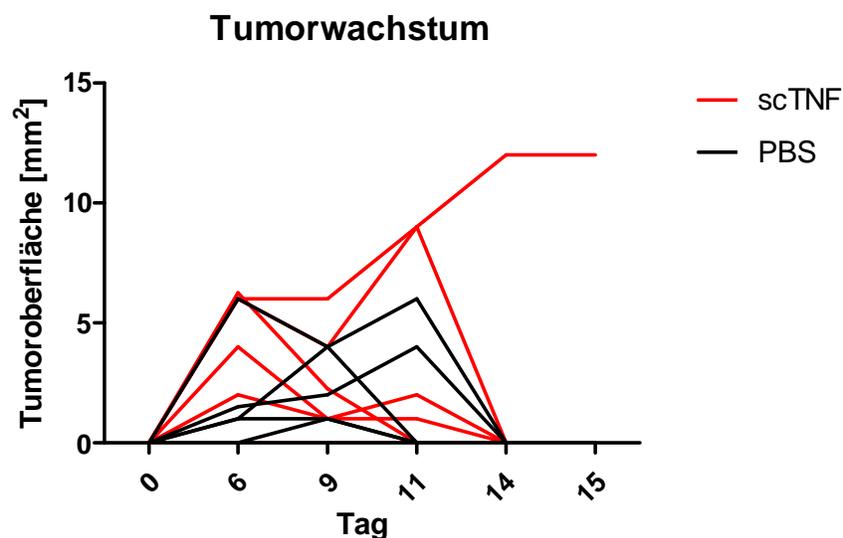
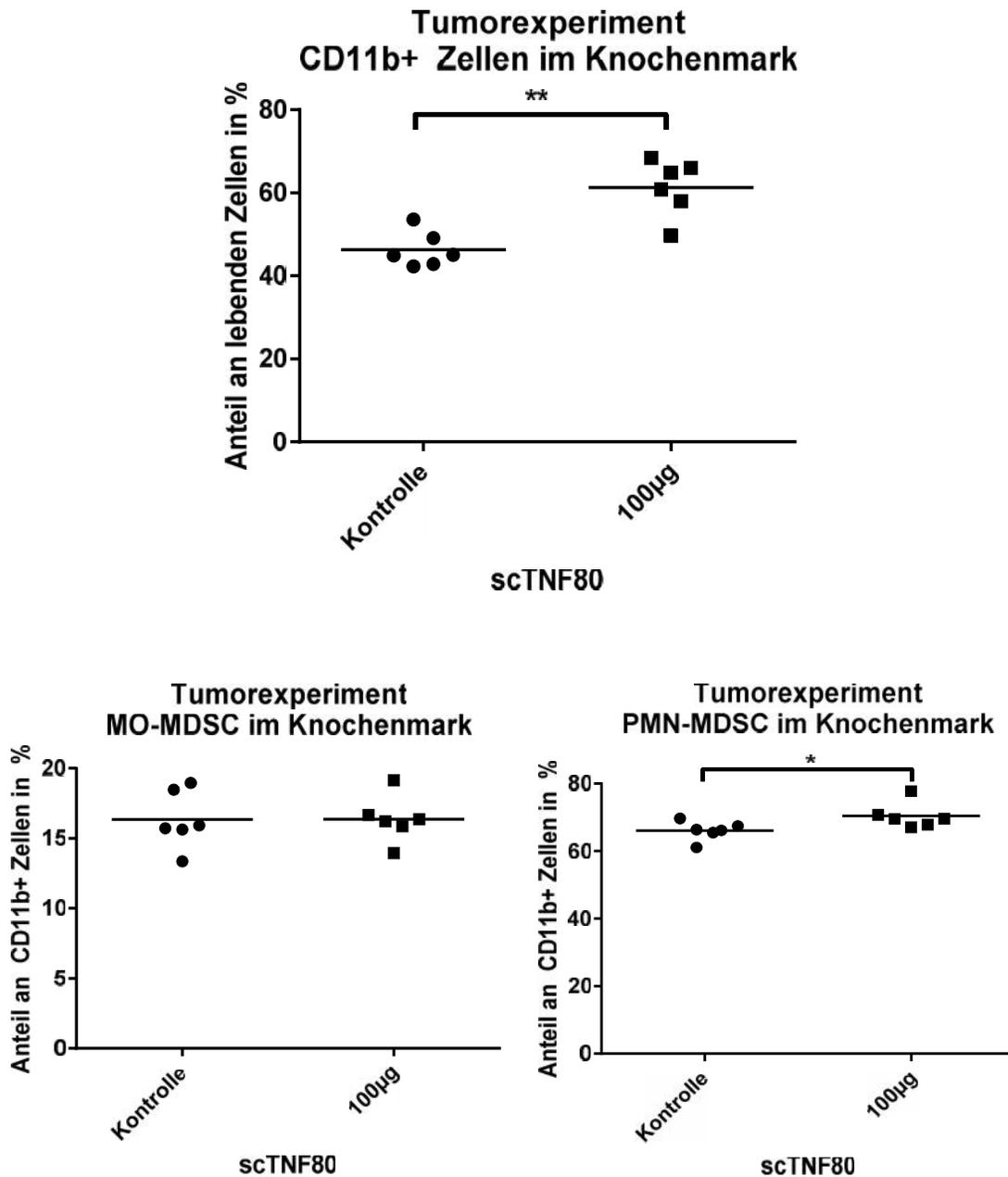


Abbildung 24 | An Tag 0 wurden 2×10^5 BFS-1 Tumorzellen in $50 \mu\text{l}$ PBS je Maus linksabdominal subkutan injiziert. Gemessen wurde Breite und Länge des Tumors mit einem Schieberegler. Jeder Punkt stellt die berechnete Tumoroberfläche aus den gemessenen Daten eines einzelnen Tieres dar. Die Punkte eines Tieres sind durch Linien verbunden. Daten aus einem Experiment.

Wir analysierten, ebenso wie bei den *in vivo* Versuchen an gesunden Mäusen, Blut, Lymphknoten, Milz und Knochenmark.

4.12 MDSC im Knochenmark expandieren deutlich infolge von scTNF80-Gabe bei Tumorerkrankung

Im Knochenmark kam es durch scTNF80-Gabe zu einem deutlichen Anstieg der CD11b⁺ Population. Dieser Anstieg geht auf die überproportionale Expansion der PMN-MDSC zurück. Die MO-MDSC expandierten, den Anstieg der CD11b⁺ Population berücksichtigend, ebenfalls, ihr Anteil an den CD11b⁺ Zellen blieb jedoch unverändert (Abb. 25).



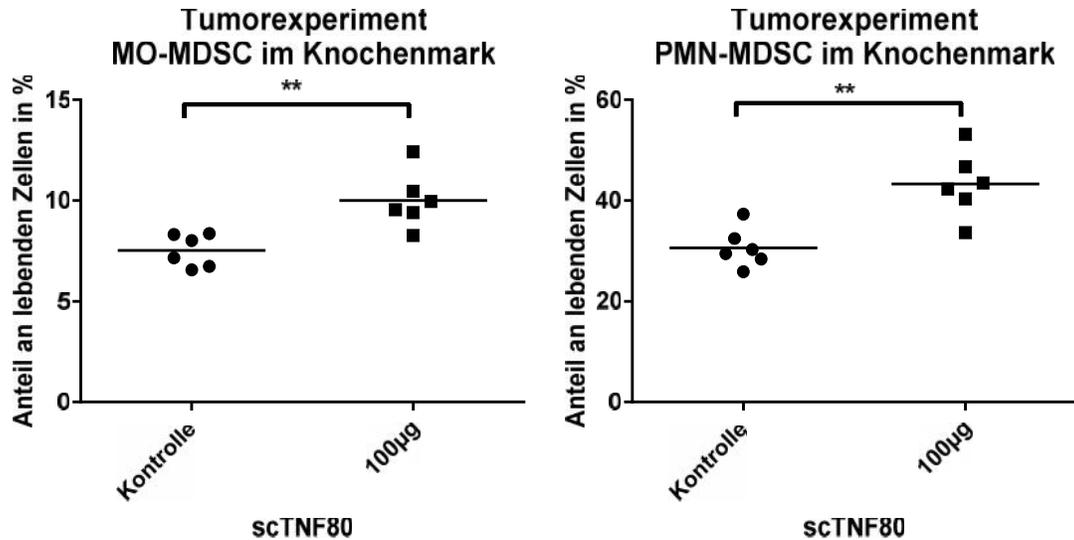


Abbildung 25 | An Tag 0 wurden 2×10^5 BFS-1 Tumorzellen in $50 \mu\text{l}$ PBS je Maus linksabdominal subkutan injiziert. Nach 16 Tagen wurden die Tiere analysiert. Zellen wurden aus dem Knochenmark gewonnen und gefärbt. Jeder Punkt repräsentiert die Daten eines einzelnen Tieres, die Balken stellen die Mittelwerte dar. Zur Analyse wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. MO-MDSC sind als $\text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^-$ und $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ definiert, PMN-MDSC als $\text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^+$ und $\text{Ly6C}^{\text{intermediate}}$. Daten aus einem Experiment.

Damit decken sich die Effekte in ihrer Richtung im Wesentlichen mit denen, die bereits an gesunden WT-Mäusen durch scTNF80 hervorgerufen werden konnten. Die Stärke des Effekts war jedoch deutlich verstärkt.

4.13 Ähnliche Effekte durch scTNF80 in der Milz bei tumorerkrankten Mäusen

Ähnliches ergab sich bei der Analyse der Milz. Hier war an gesunden Mäusen aufgefallen, dass die PMN-MDSC angestiegen waren, ansonsten konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden. Unter pathologischen Bedingungen fiel auch hier die Wirkung des scTNF80 deutlich stärker aus. Die Verschiebungen der Populationen glichen denen im Knochenmark: CD11b^+ expandierten, ebenso MO- und PMN-MDSC, wobei die PMN-MDSC deutlich stärker reagierten als die MO-MDSC. Der Anteil der MO-MDSC an den CD11b^+ Zellen blieb auch hier unbeeinflusst durch scTNF80 (Abb. 26).

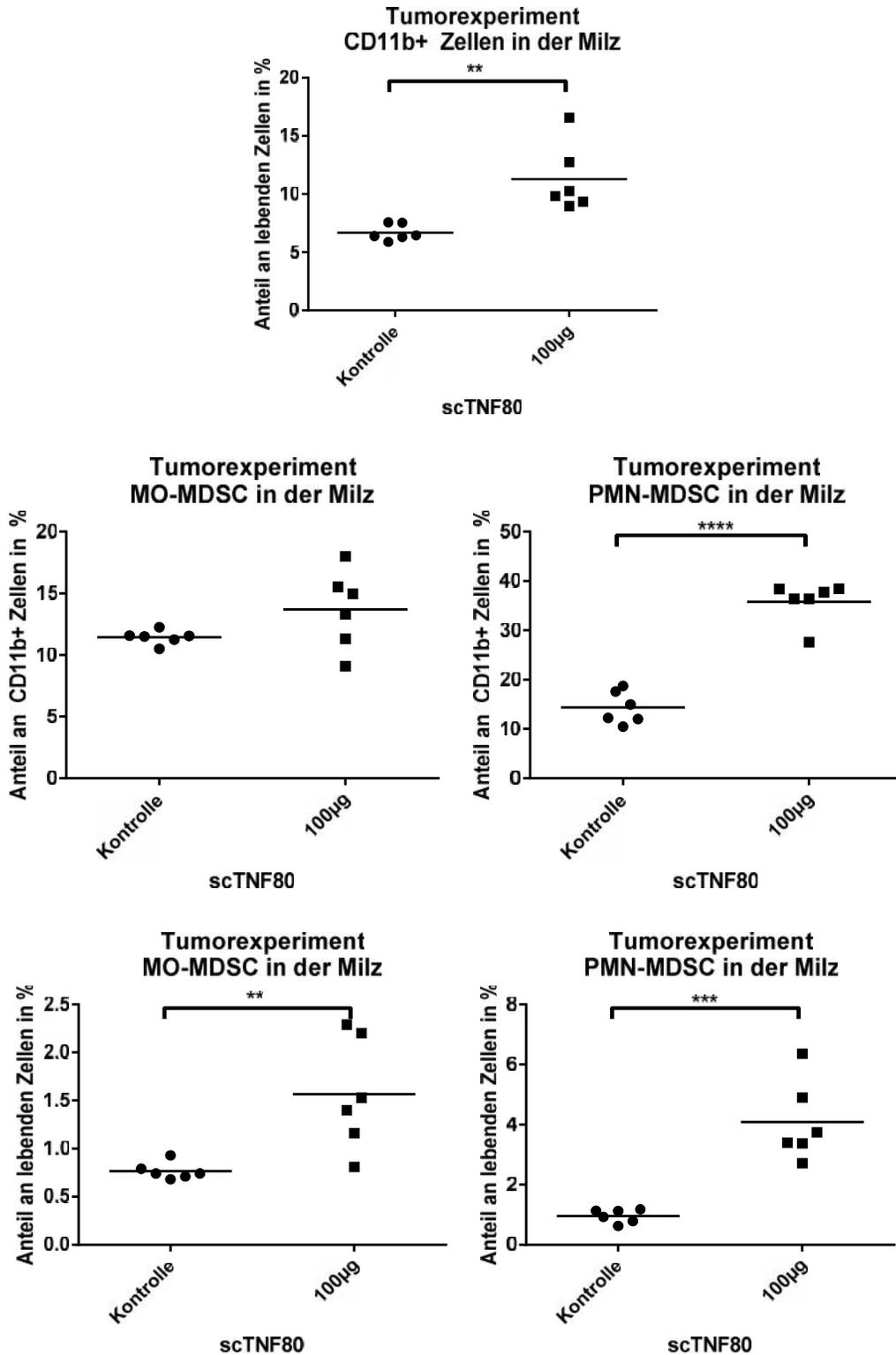
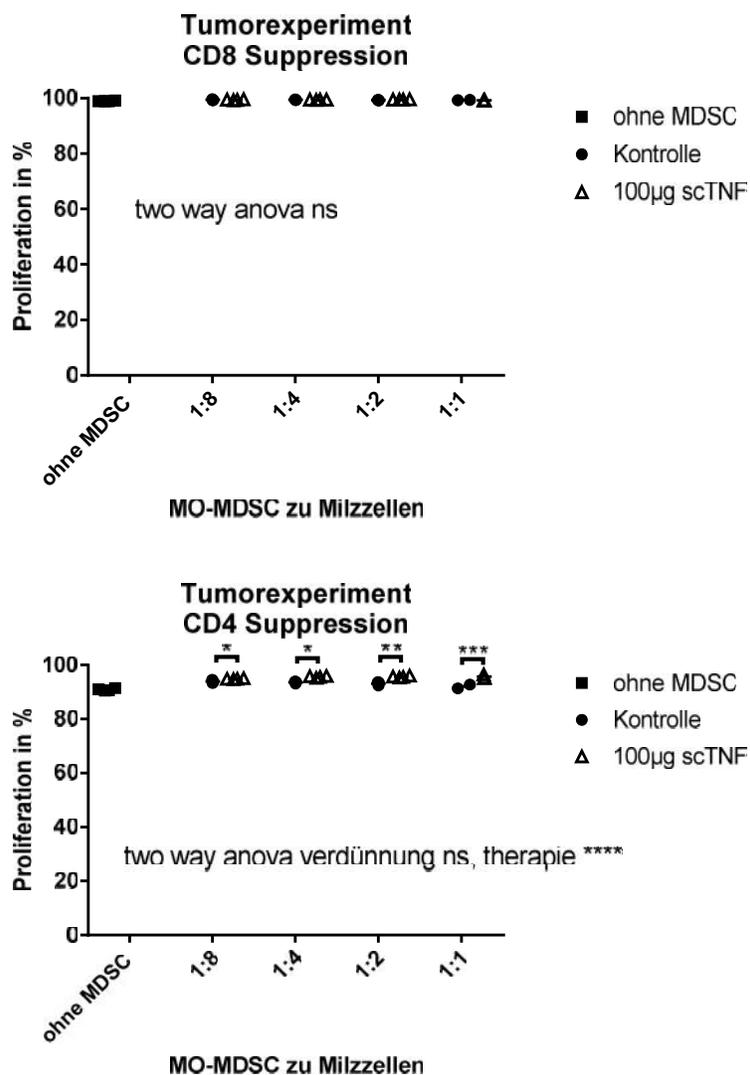


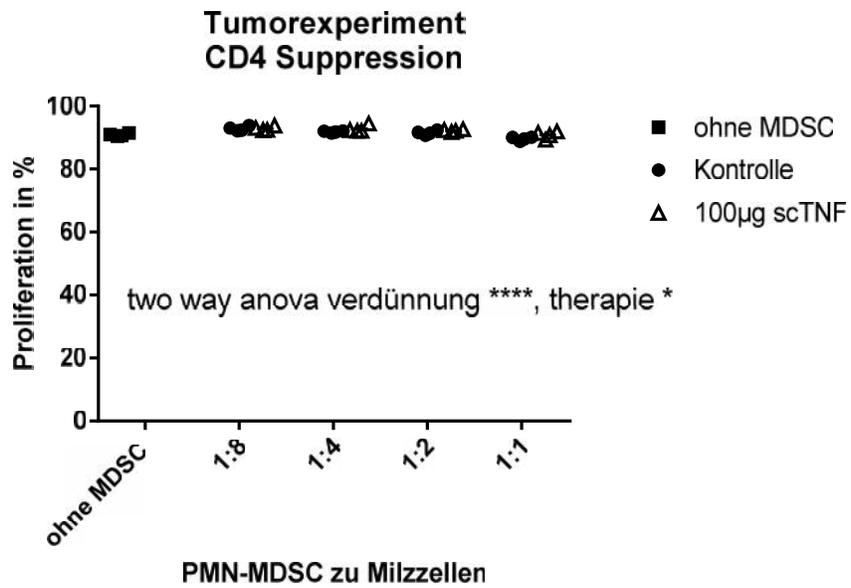
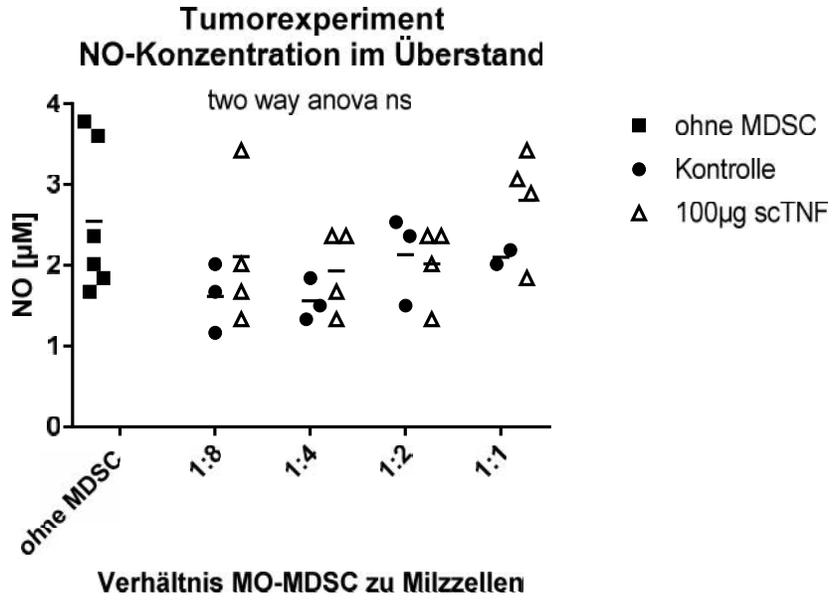
Abbildung 26 | An Tag 0 wurden 2×10^5 BFS-1 Tumorzellen in $50 \mu\text{l}$ PBS je Maus linksabdominal subkutan injiziert. Nach 15 Tagen wurden die Tiere analysiert. Zellen wurden aus der Milz gewonnen, die Erythrozyten lysiert und die Zellen gefärbt. Jeder Punkt repräsentiert die Daten eines einzelnen Tieres, die Balken stellen die Mittelwerte dar. Zur Analyse wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. MO-MDSC sind als $\text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^-$ und $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ definiert, PMN-MDSC als $\text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^+$ und Ly6C^{int} . Daten aus einem Experiment.

Da im Krankheitsmodell die Veränderung der Suppressionsfähigkeit in der Peripherie ein entscheidender Parameter ist, wurden in diesem Experiment nicht MDSC aus dem Knochenmark, sondern aus der Milz gewonnene MO- und PMN-MDSC funktionell isoliert.

Um die Zellen zu gewinnen wurden die Milzen der Mäuse einer Gruppe gepoolt und mittels magnetischer Selektion und Depletion in mehreren Schritten isoliert, so dass für den T-Zell-Suppressionsassay gereinigte MO- und PMN-MDSC vorlagen.

In dem Versuch zeigten sich sowohl bei MO-MDSC und PMN-MDSC kaum suppressive Aktivität. Auch der NO-Gehalt im Überstand wich nicht von Kontrollen ohne MDSC ab. Unterschiede zwischen den Gruppen, wonach teilweise eine verminderte Suppressionsfähigkeit der mit scTNF80-behandelten Gruppe vorliegt, sind daher nur eingeschränkt zu interpretieren (Abb. 27).





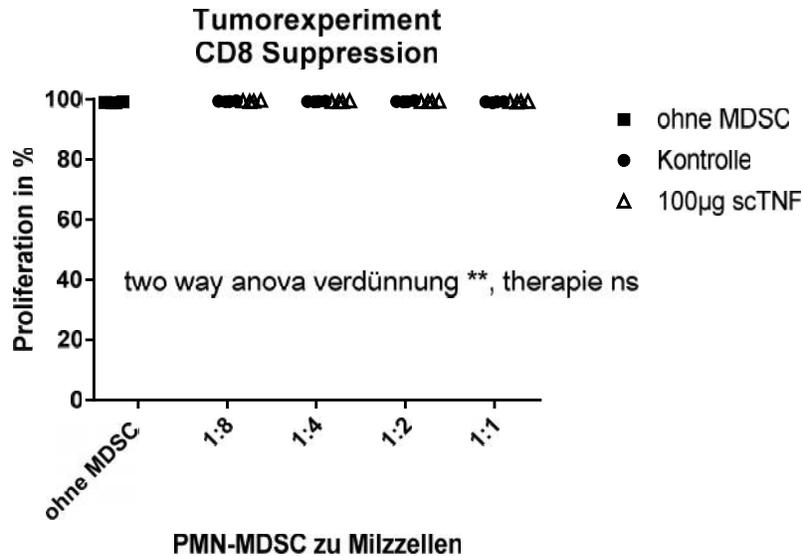


Abbildung 27 | An Tag 0 wurden 2×10^5 BFS-1 Tumorzellen in $50 \mu\text{l}$ PBS je Maus linksabdominal subkutan injiziert. Nach 15 Tagen wurden die Tiere analysiert. Zellen wurden aus der Milz gewonnen, die Erythrozyten lysiert und die Zellen der Einzeltiere einer Gruppe zu gleichen Anteilen gepoolt. PMN- und MO-MDSC wurden in mehreren Schritten über Depletions- und Selektionssäulen mittels magnetischer Beads isoliert. Nach einer Nacht wurden pro Well 2×10^5 CFSE-gelabelte Milzzellen hinzugegeben und die Kultur mit CD3/ CD28 stimuliert. Nach drei Tagen wurden Überstände zur NO-Bestimmung entnommen. Die im Well verbleibenden Zellen wurden gefärbt und die Proliferation im Durchflusszytometer analysiert. Die einzelnen Punkte repräsentieren technische Replikate, die Balken stellen die Mittelwerte dar. Zur Analyse wurde ein Two-Way-Anova durchgeführt, als Post-Hoc-Test wurde der Holm-Šidák-Test verwendet. MO-MDSC sind als $\text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^-$ und $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ definiert, PMN-MDSC als $\text{CD11b}^+ \text{Ly6G}^+$ und Ly6C^{int} . Daten aus einem Experiment.

4.14 Regulatorische T-Zell-Population bleibt auch bei tumorkranken Mäusen durch scTNF80 unbeeinflusst

scTNF80-Gabe bei naiven Mäusen ließ die Populationsgröße regulatorischer T-Zellen unbeeinflusst.

Ebenso wie bei scTNF80-Injektion bei gesunden Mäusen, konnten auch bei Mäusen mit Tumorerkrankung keine Unterschiede in Bezug auf regulatorische T-Zellen festgestellt werden. Dies bezieht sich sowohl auf ihren Anteil an CD4^+ Zellen, wie auch auf ihren Anteil an sämtlichen Zellen (Abb. 28). Da die Effekte des scTNF80 im pathologischen Modell deutlich stärker waren, sieht es stark danach aus, dass scTNF80 Populationsgrößen regulatorischer T-Zellen *in vivo* nicht beeinflusst.

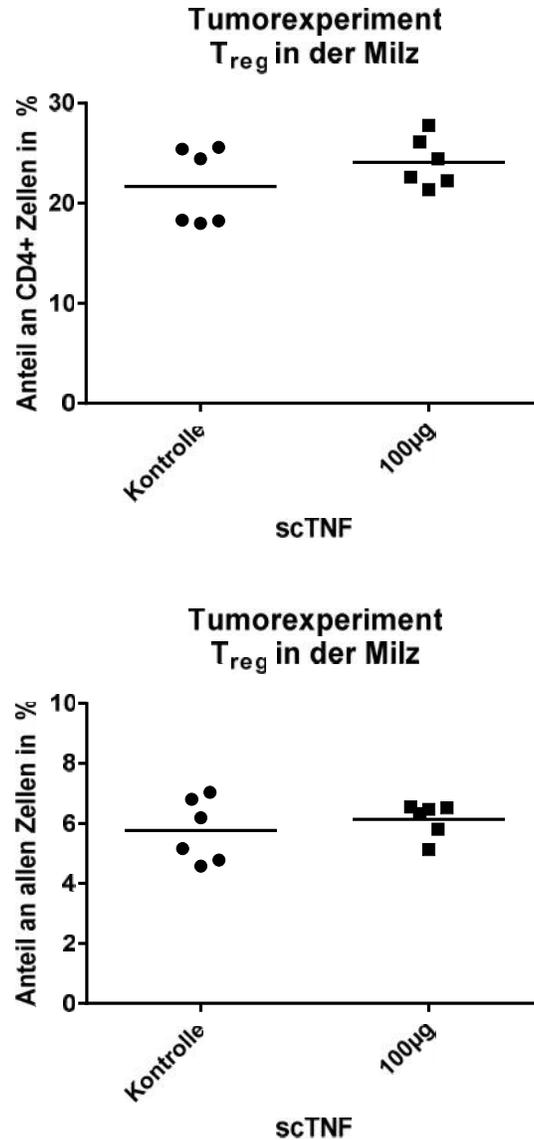


Abbildung 28 | An Tag 0 wurden 2×10^5 BFS-1 Tumorzellen in 50µl PBS je Maus linksabdominal subkutan injiziert. Nach 15 Tagen wurden die Tiere analysiert. Zellen wurden aus der Milz gewonnen, die Erythrozyten lysiert und zunächst Oberflächenmarker gefärbt. Im Anschluss erfolgte die intrazelluläre FoxP3-Färbung. Jeder Punkt repräsentiert die Daten eines einzelnen Tieres, die Balken stellen die Mittelwerte dar. Zur Analyse wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Regulatorische T-Zellen sind als CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ definiert. Daten aus einem Experiment.

4.15 scTNF80-Gabe beeinflusst auch bei tumorkranken Mäusen den Gewichtsverlauf nur geringfügig

Da sich die Nebenwirkungen von TNF-Agonisten häufig therapielimitierend auswirken [198–201] und an Tumoren erkrankte Mäuse für TNF hypersensibilisiert sind, so dass sich bereits bei geringen Dosierungen ausgeprägte toxisch-systemische Nebenwirkungen entwickeln können

[201], wurde neben offensichtlichen Auffälligkeiten auch der Gewichtsverlauf der Mäuse während des Experiments verfolgt.

Es zeigte sich sowohl bei der Therapie-, wie auch bei der Kontrollgruppe ein vergleichbarer Kurvenverlauf. Zunächst erfolgte eine stetige Gewichtszunahme bis Tag 11. Anschließend kam es zu einem leichten Rückgang. Auffällig ist das stets leicht geringere Gewicht der Therapie-Gruppe.

Andere Auffälligkeiten bezüglich des Verhaltens oder des Erscheinungsbildes (z.B. Haarausfall) traten nicht auf.

Insgesamt zeigen sich somit ähnliche Ergebnisse wie bei gesunden WT-Mäusen. Indizien für eine Hypersensibilisierung der Mäuse für scTNF80 bei Tumorerkrankungen wurden nicht gefunden.

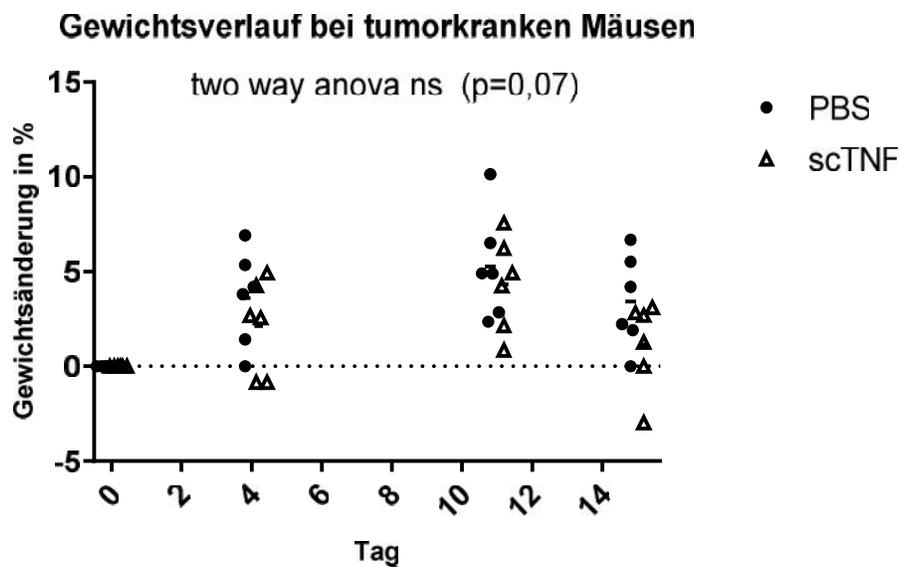


Abbildung 29 | Gewichtsverlauf von Mäusen mit subkutan gesetztem BFS-1-Tumor unter sechsmaliger intraperitonealer Injektion von gereinigtem scTNF80 und PBS als Kontrollgruppe. Die Injektionen erfolgten gemäß dem oben dargestellten Applikationsschema an WT-Mäusen (Tag 0, 2, 4, 7, 9 und 11). Gezeigt ist die Gewichtsveränderung in Prozent zum Gewicht bei Beginn der Injektionen und Setzen des Tumors. Jeder Punkt stellt den Wert eines einzelnen Tieres dar, die Balken den Mittelwert (der Balken der scTNF80-Gruppe ist zur besseren Sichtbarkeit ebenfalls in schwarz). Zur Analyse wurde ein Two-Way-Anova durchgeführt. Daten aus einem Experiment.

5 Diskussion

Tumor- oder Autoimmunerkrankungen sind hochkomplexe Krankheiten, die in der Therapie eine große Herausforderung darstellen und nicht selten einen chronischen, teils tödlichen Verlauf nehmen. Beiden gemeinsam ist eine ausgeprägte immunologische Komponente: Während es bei Tumorerkrankungen zu einer gezielten Suppression des Immunsystems kommt, liegt bei Autoimmunkrankheiten eine überschießende Reaktion der körpereigenen Abwehr vor. Das Immunsystem zielgerichtet zu beeinflussen, ohne dessen grundsätzliche Abwehrfunktion einzuschränken, gelingt bislang nur eingeschränkt.

Im Verlauf der letzten Jahre wurde festgestellt, dass beide Krankheitsformen sowohl MDSC- als auch TNFR2-assoziiert sind. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war, die Interaktion zwischen TNFR2 und MDSC genauer zu charakterisieren und so potentielle Wege für eine immunologisch-orientierte Pharmakotherapie aufzuzeigen.

In der Arbeitsgruppe war festgestellt worden, dass TNFR2^{-/-} MDSC, wenn sie *in vitro* generiert werden, schlechter differenzieren und die T-Zell-Proliferation weniger hemmen als entsprechende MDSC aus Wildtyp-Mäusen [239]. Dieses Ergebnis passt gut zu bekannten Publikationen über die Rolle des TNFR2 in MDSC *in vivo*. Dort wurde nachgewiesen, dass sowohl TNFR^{-/-} als auch TNFR2^{-/-} Mäuse, weniger MDSC haben und deren Funktion zusätzlich eingeschränkt ist. Tumore wachsen bei diesen Tieren langsamer und gehen teilweise spontan in Remission [188, 189]. Bei TNFR1^{-/-} Mäusen tritt dieser Effekt nicht auf. Damit ist unser Ergebnis ein weiteres Indiz für die Relevanz eines intakten TNFR2-Signalweges für MDSC-Expansion und -Funktion.

Da TNFR2^{-/-} MDSC funktionell gehemmt sind, wurde ursprünglich vermutet, dass eine spezifische TNFR2-Aktivierung *in vitro* zu mehr differenzierten und potenteren MDSC führen würde. Diese Erwartung konnte in dieser Arbeit an GM-CSF-haltigen Knochenmarkzell-Kulturen von Wildtyp-Mäusen nur teilweise bestätigt werden. Der Anteil an MDSC in der Kultur war bereits ab Tag 2 stark rückläufig, so dass sich das korrekte Gating schwierig gestaltete und bereits ein leichtes Überstrahlen benachbarter Populationen einen großen Effekt haben kann. Inwiefern auf dieser Grundlage die erhöhten MDSC-Anteile tatsächlich relevant sind, erscheint fraglich. Deutliche Auswirkungen scheint die zusätzliche agonistenvermittelte TNFR2-Aktivierung im Rahmen der MDSC-Differenzierung *in vitro* somit nicht hervorzurufen. Möglicherweise genügen die in den Kulturen vorliegenden Mengen an TNF für eine optimale MDSC-Differenzierung.

In der funktionellen Analyse zeigten sich die mit scTNF80 generierten MDSC entgegen unserer Annahme weniger suppressiv als entsprechende Kontrollen. Damit waren sowohl TNFR2^{-/-} MDSC wie auch MDSC, die unter Stimulierung des TNFR2 kultiviert wurden, *in vitro* weniger suppressiv als Wildtyp-MDSC. Es ist bekannt, dass MDSC unterschiedliche Stimuli für Differenzierung und Aktivierung benötigen [55]. Inwiefern unter TNFR2-Aktivierung generierte MDSC auch nach erneuter Aktivierung weniger suppressiv sind, wäre interessant festzustellen.

Weiterhin fiel auf, dass die Zellausbeute nach Kultivierung mit scTNF80 deutlich verringert war. Inwiefern dies auf geringere Proliferation oder gesteigerte Apoptose zurückzuführen ist, blieb ungeklärt. Da einer TNFR2-Aktivierung im Regelfall eine überlebensfördernde Wirkung zugeschrieben wird [162], überraschen diese Ergebnisse. TNFR2 kann jedoch auch pro-apoptotisch wirken. Dies tritt beispielsweise bei wiederholter starker Aktivierung des TNFR2 auf. Hierdurch kommt es zu einem verstärkten Abbau von TRAF2, einem Adaptorprotein des TNFR2-Signalwegs [154, 168–172]. Da TRAF2 jedoch auch Teil der Survival-Signalkaskade bei TNFR1-Aktivierung ist, die zur Aktivierung von NF- κ B führt und anti-apoptotisch wirkt, kann es infolge des Verbrauchs zu einem Überwiegen der pro-apoptotischen Signalkaskade bei TNFR1-Aktivierung kommen [173–175]. Inwiefern TRAF2-Depletion tatsächlich Ursache der verringerten Ausbeute ist, wurde nicht untersucht.

scTNF80 führt somit zu weniger Zellen nach Kultivierung von Knochenmarkzellen und die in Gegenwart von scTNF80 aus Knochenmarkkultur generierten Zellen weisen zusätzlich eine verminderte Funktion auf. CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten proliferieren durch Zugabe von scTNF80 hingegen verstärkt, so dass die *in vitro* Ergebnisse auf eine Verstärkung der Immunantwort durch selektive TNFR2-Aktivierung hindeuten.

In vivo konnten am gesunden Tier nur leichte Effekte festgestellt werden. TNFR2-Aktivierung führte hier zu einer Expansion der MDSC-Populationen. Dies könnte auf ein längeres Überleben der MDSC zurückzuführen sein, da bekannt ist, dass TNFR2^{+/+} im Gegensatz zu TNFR2^{-/-} MDSC *in vivo* vor Apoptose geschützt sind [188]. In der Peripherie expandierten die MDSC nur leicht mit einem Anstieg der PMN-MDSC in der Milz. Ein Befund, der dadurch erklärt werden könnte, dass MDSC zwar durch TNFR2-Aktivierung im Knochenmark verstärkt generiert, aufgrund fehlender entzündlicher Stimuli jedoch nicht mobilisiert und rekrutiert wurden, so dass nur geringe Veränderungen in der Peripherie auftraten. Die Beobachtung, dass PMN-MDSC sensibler als MO-MDSC reagieren und bei Ihnen deutlichere Effekte auftraten,

deckt sich gut mit der Tatsache, dass diese sich auch in den meisten pathologischen Zuständen expansionsfreudiger zeigen als monozytäre MDSC [1].

Die Frage nach einer veränderten suppressiven Aktivität durch scTNF80 der MDSC *in vivo* in gesunden WT-Mäusen konnten wir nicht endgültig klären. Die Daten deuten auf eine verminderte antigenunspezifische Suppressionsfähigkeit hin. Damit lägen tendenziell entgegengesetzte Effekte des scTNF80 vor: Es werden mehr MDSC generiert, die jedoch schlechter supprimieren. Da MDSC jedoch separate Stimuli für Generierung, Mobilisierung und Aktivierung benötigen, erscheint es gut möglich, dass sich unter scTNF80 generierte MDSC bei nachfolgender Aktivierung anders verhalten.

Im Tumormodell sollte ebendies geklärt werden. Wir untersuchten, wie sich die Wirkung des scTNF80 verändert, wenn ein aktiviertes Immunsystem vorliegt. Unglücklicherweise wuchsen die Tumore zwar zunächst, verschwanden aber nahezu allesamt wieder. Dies geschah sowohl in der behandelten Gruppe als auch bei den mit PBS behandelten Kontrollen. Wir testeten diesen Tumorzell-Batch anschließend erneut mit identischem Ergebnis. Bei anderen Batches derselben Zellreihe zeigte sich adäquates Tumorwachstum. Die Frage nach einer Veränderung im Krankheitsverlauf konnte daher nicht geklärt werden. Trotzdem waren die Ergebnisse des Experiments von großem Interesse, da sie erstmalig die Effekte des scTNF80 auf die MDSC eines aktivierten Immunsystems beschrieben.

In der genaueren Analyse der mit Tumorzellen injizierten Tiere konnte festgestellt werden, dass scTNF80 zu ähnlichen Effekten führte wie am gesunden Tier. Unsere Erwartung, dass die Effekte bei einem aktivierten Immunsystem deutlich stärker ausfallen würden, bewahrheitete sich. MO- und PMN-MDSC im Knochenmark expandierten deutlich. Neu war, dass nun mit dem immunologischen Stimulus auch in der Peripherie deutliche Wirkungen auftraten. Durch scTNF80-Behandlung stieg der Anteil sowohl der MO-MDSC als auch der PMN-MDSC deutlich an, insbesondere der Anteil der PMN-MDSC an sämtlichen Milzzellen stieg im Schnitt um das Achtfache. Die Tatsache, dass dieser Effekt nur deutlich auftrat, wenn das Immunsystem durch Tumorzellen herausgefordert wurde, deutet darauf hin, dass TNFR2-Aktivierung alleine nicht fähig ist, um MDSC aus dem Knochenmark auszuschwemmen. Durch scTNF80 steigt jedoch die Anzahl der MDSC im Knochenmark, die im Krankheitsfall durch das Immunsystem rekrutiert werden und dann in der Peripherie deutlich vermehrt aufzufinden sind.

Im Tumorversuch entschlossen wir uns, periphere MDSC auf ihre Funktion zu untersuchen, da Veränderungen dort direktere Schlussfolgerungen auf eine mögliche Beeinflussung des Krankheitsverlaufs zulassen. Hierfür wählten wir zwecks Vergleichbarkeit die antigen-unspezifische suppressive Aktivität, wie wir sie auch *in vitro* und in naiven Mäusen *in vivo* untersucht hatten.

Aus welchem Grund die MDSC aus der Milz in diesen Untersuchungen nicht suppressiv waren, lässt sich nicht mit letzter Sicherheit sagen. Da praktisch keine unspezifische Suppression vorlag und auch kein NO synthetisiert wurde, können die beobachteten minimalen Unterschiede zwischen den Gruppen nicht bewertet werden.

Inwiefern es durch scTNF80 im Tumormodell zu einer Veränderung der Antigen-spezifischen Suppression durch MDSC kommt, ist ebenfalls noch zu klären.

Allgemein zeigten sich keine Hinweise auf ausgeprägte Nebenwirkungen des scTNF80. Insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass die Therapie mit TNF-Agonisten mit starken systemisch-toxischen Nebenwirkungen einhergeht [198–200], ist dieses Ergebnis positiv. Zwar wurde bereits gezeigt, dass wesentliche Nebenwirkungen TNFR1-vermittelt auftreten [201], doch war nicht auszuschließen, dass TNFR2-Agonisten durch Wegfangen des löslichen TNFR2 zu erhöhten TNF-Spiegeln und dadurch ebenfalls zu dramatischen Nebenwirkungen führen könnten, zumal an Tumoren erkrankte Mäuse für TNF hypersensibilisiert sind [201]. Dass an gesunden Mäusen kaum Effekte außerhalb des Knochenmarks zu beobachten waren und auch mit Tumoren belastete Mäuse ebenso wie PBS-Kontrollen weiter leicht an Gewicht zulegten, deutet auf eine nebenwirkungsarme Therapie mit deutlichen Effekten auf MDSC hin. An CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen und regulatorischen T-Zellen konnten keine Effekte festgestellt werden, so dass scTNF80 relativ selektiv zu wirken scheint.

Insgesamt zeigen die *in vivo* Experimente, dass durch TNFR2-Aktivierung die MDSC-Population selektiv expandiert werden kann, diese Effekte am erkrankten Tier deutlich stärker sind und am gesunden Tier nur geringe Veränderungen bewirkt werden. Die weitergehende Erforschung des therapeutischen Nutzens einer TNFR2-Aktivierung ist daher vielversprechend und erscheint unter anderem in dem weiten Feld der chronischen entzündlichen Erkrankungen neue Möglichkeiten aufzuzeigen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Effekte des spezifischen TNFR2-Agonisten TNC-sc-mTNF80 auf MDSC *in vitro* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Funktion bereits ausgereifter MDSC durch TNFR2-Aktivierung nicht beeinflusst wurde. Die Kultivierung der MDSC in GM-CSF mit TNFR2-Agonisten führte jedoch zu einer verminderten Ausbeute nach Kultur und einer verringerten Suppressionsfähigkeit der T-Zellproliferation mit verringerter NO-Produktion. Der beobachtete Effekt war mehrfach reproduzierbar und klar dosisabhängig.

In vivo fand sich an gesunden Wildtyp-Mäusen durch TNFR2-Aktivierung lediglich eine auf das Knochenmark beschränkte Expansion der MDSC-Populationen, ohne dass es zu ausgeprägten systemischen Nebenwirkungen zu kommen schien. Andere Zellpopulationen, wie regulatorische T-Zellen, B-Zellen oder T-Zellen wurden durch die selektive TNFR2-Aktivierung nicht beeinflusst. Im Fibrosarkom-Tumormodell kam es vermutlich aufgrund eines fehlerhaften Batches sowohl in der Kontroll- als auch in der Therapiegruppe zu einer spontanen Remission der Tumore. Trotzdem fand sich durch den immunologischen Stimulus ein um ein Vielfaches stärkerer Anstieg der MDSC-Populationen nach mehrmaliger Applikation des TNFR2-Agonisten als bei gesunden Mäusen. Der Effekt beschränkte sich im Tumormodell nicht auf das Knochenmark, sondern ließ sich auch deutlich in der Milz nachweisen. Anzeichen für ausgeprägte systemische Nebenwirkungen fanden sich auch im Tumormodell nicht.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
AF647	Alexa Fluor 647
AF700	Alexa Fluor 700
AP-1	activator protein 1
APC	Allophycocyanin
BFS-1	murines Fibrosarkom
cFLIP	cellular FLICE(Caspase-8)-inhibitory protein
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
CTLA	cytotoxic lymphocyte antigen
DISC	death-inducing signaling complex
DPBS	Dulbecco's Phosphate-buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADD	FAS-associated protein with death domain
FAT	HLA-F-adjacent transcript 10
FCS	fetal calf serum
Fc R	Fc- -Rezeptor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FoxP3	Forkhead Box P3
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
ICAM	intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon-
IL	Interleukin
IMC	immature myeloid cell
iNOS	inducible Nitric oxide synthase
I B	inhibitor of NF- B
JAK	Janus-Kinase
KM	Knochenmark
MACS	magnetic activated cell sorting
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
MHC	major histocompatibility complex

MO-MDSC	monozytäre MDSC
mTNF	membrangebundener TNF
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
ns	nicht signifikant
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PMN-MDSC	polymorphonuclear (granulozytäre) MDSC
RIP	receptor interacting protein
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SCF	stem cell factor
scTNF80	spezifischer TNFR2-Agonist (in späteren Publikationen auch STAR2)
STAT	signal transducer and activator of transcription
sTNF	soluble (löslicher) TNF
TACE	TNF converting enzyme
TGF-	tumor growth factor-
TIM	TRAF (TNF-receptor adaptor factor) interaction motif
TNCscTNF80	spezifischer TNFR2-Agonist (siehe auch scTNF80)
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
TRAF	TNF-receptor adaptor factor
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
VCAM	vascular cell adhesion protein
VEGF	vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp
*	p-Wert < 0,5
**	p-Wert < 0,05
***	p-Wert < 0,005
****	p-Wert < 0,0005

8 **Literatur**

1. Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9(3): 162–174. doi: 10.1038/nri2506
2. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI (2004) Antigen-specific inhibition of CD8⁺ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J. Immunol.* 172(2): 989–999
3. Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI (2008) Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol.* 181(8): 5791–5802
4. Hestdal K, Ruscetti FW, Ihle JN et al. (1991) Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J. Immunol.* 147(1): 22–28
5. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S (2007) Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J. Immunol.* 179(2): 977–983
6. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC (2007) Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 13(2 Pt 2): 721s-726s. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2197
7. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC (2007) L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 109(4): 1568–1573. doi: 10.1182/blood-2006-06-031856
8. Rodríguez PC, Ochoa AC (2008) Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol. Rev.* 222: 180–191. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00608.x
9. Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC (2002) Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J. Biol. Chem.* 277(24): 21123–21129. doi: 10.1074/jbc.M110675200
10. Bronte V, Zanovello P (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 5(8): 641–654. doi: 10.1038/nri1668
11. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D et al. (2005) Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J. Exp. Med.* 202(7): 931–939. doi: 10.1084/jem.20050715
12. Movahedi K, Guillemins M, Van den Bossche, Jan et al. (2008) Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111(8): 4233–4244. doi: 10.1182/blood-2007-07-099226

13. Bingisser RM, Tilbrook PA, Holt PG, Kees UR (1998) Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J. Immunol.* 160(12): 5729–5734
14. Harari O, Liao JK (2004) Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Curr. Pharm. Des.* 10(8): 893–898
15. Rivoltini L, Carrabba M, Huber V et al. (2002) Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol. Rev.* 188: 97–113
16. Schmielau J, Finn OJ (2001) Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 61(12): 4756–4760
17. Szuster-Ciesielska A, Hryciuk-Umer E, Stepulak A, Kupisz K, Kandefer-Szersze M (2004) Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol* 43(3): 252–258
18. Vickers SM, MacMillan-Crow LA, Green M, Ellis C, Thompson JA (1999) Association of increased immunostaining for inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine with fibroblast growth factor transformation in pancreatic cancer. *Arch Surg* 134(3): 245–251
19. Cobbs CS, Whisenhunt TR, Wesemann DR, Harkins LE, Van Meir, Erwin G, Samanta M (2003) Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells. *Cancer Res.* 63(24): 8670–8673
20. Dairou J, Dupret J-M, Rodrigues-Lima F (2005) Impairment of the activity of the xenobiotic-metabolizing enzymes arylamine N-acetyltransferases 1 and 2 (NAT1/NAT2) by peroxynitrite in mouse skeletal muscle cells. *FEBS Lett.* 579(21): 4719–4723. doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.043
21. Bentz BG, Haines GK, Radosevich JA (2000) Increased protein nitrosylation in head and neck squamous cell carcinogenesis. *Head Neck* 22(1): 64–70
22. Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Smid CM et al. (2000) Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. *Clin. Cancer Res.* 6(12): 4768–4775
23. Kinnula VL, Torkkeli T, Kristo P et al. (2004) Ultrastructural and chromosomal studies on manganese superoxide dismutase in malignant mesothelioma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31(2): 147–153. doi: 10.1165/rcmb.2003-0409OC
24. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M et al. (2006) Nitric oxide in breast cancer: induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and

- poor prognosis. *Clin. Cancer Res.* 12(4): 1201–1207. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1269
25. Bronte V, Kasic T, Gri G et al. (2005) Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J. Exp. Med.* 201(8): 1257–1268. doi: 10.1084/jem.20042028
 26. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V et al. (2007) Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat. Med.* 13(7): 828–835. doi: 10.1038/nm1609
 27. Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI (2005) Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J. Immunol.* 175(7): 4583–4592
 28. Yang R, Cai Z, Zhang Y, Yutzy WH, Roby KF, Roden, Richard B S (2006) CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer Res.* 66(13): 6807–6815. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3755
 29. Huang B, Pan P-Y, Li Q et al. (2006) Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 66(2): 1123–1131. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1299
 30. Pan P-Y, Ma G, Weber KJ et al. (2010) Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer research* 70(1): 99–108. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1882
 31. Qu P, Yan C, Du H (2011) Matrix metalloproteinase 12 overexpression in myeloid lineage cells plays a key role in modulating myelopoiesis, immune suppression, and lung tumorigenesis. *Blood* 117(17): 4476–4489. doi: 10.1182/blood-2010-07-298380
 32. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I (2008) Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res.* 68(13): 5439–5449. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6621
 33. Dugast A-S, Haudebourg T, Coulon F et al. (2008) Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J. Immunol.* 180(12): 7898–7906
 34. Kusmartsev SA, Li Y, Chen SH (2000) Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *J. Immunol.* 165(2): 779–785

35. Watanabe S, Deguchi K, Zheng R et al. (2008) Tumor-induced CD11b+Gr-1+ myeloid cells suppress T cell sensitization in tumor-draining lymph nodes. *J. Immunol.* 181(5): 3291–3300
36. Mirza N, Fishman M, Fricke I et al. (2006) All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res.* 66(18): 9299–9307. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1690
37. Monu N, Frey AB (2007) Suppression of proximal T cell receptor signaling and lytic function in CD8+ tumor-infiltrating T cells. *Cancer Res.* 67(23): 11447–11454. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1441
38. Fricke I, Mirza N, Dupont J et al. (2007) Vascular endothelial growth factor-trap overcomes defects in dendritic cell differentiation but does not improve antigen-specific immune responses. *Clin. Cancer Res.* 13(16): 4840–4848. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0409
39. Antonia SJ, Mirza N, Fricke I et al. (2006) Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 12(3 Pt 1): 878–887. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2013
40. Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germain RN (2002) Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296(5574): 1873–1876. doi: 10.1126/science.1071065
41. Miller MJ, Safrina O, Parker I, Cahalan MD (2004) Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J. Exp. Med.* 200(7): 847–856. doi: 10.1084/jem.20041236
42. Gabrilovich DI, Velders MP, Sotomayor EM, Kast WM (2001) Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J. Immunol.* 166(9): 5398–5406
43. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature reviews. Immunology* 12(4): 253–268. doi: 10.1038/nri3175
44. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI (2016) The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in immunology* 37(3): 208–220. doi: 10.1016/j.it.2016.01.004
45. Ostrand-Rosenberg S (2010) Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 59(10): 1593–1600. doi: 10.1007/s00262-010-0855-8

46. Umansky V, Sevko A (2012) Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Seminars in cancer biology* 22(4): 319–326. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.02.003
47. Kanterman J, Sade-Feldman M, Baniyash M (2012) New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. *Seminars in cancer biology* 22(4): 307–318. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.02.008
48. Umansky V, Sevko A, Gebhardt C, Utikal J (2014) Myeloid-derived suppressor cells in malignant melanoma. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 12(11): 1021–1027. doi: 10.1111/ddg.12411
49. Sade-Feldman M, Kanterman J, Ish-Shalom E, Elnekave M, Horwitz E, Baniyash M (2013) Tumor necrosis factor-alpha blocks differentiation and enhances suppressive activity of immature myeloid cells during chronic inflammation. *Immunity* 38(3): 541–554. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.007
50. Almand B, Clark JI, Nikitina E et al. (2001) Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J. Immunol.* 166(1): 678–689
51. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ (2009) Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 58(1): 49–59. doi: 10.1007/s00262-008-0523-4
52. Gabitass RF, Annels NE, Stocken DD, Pandha HA, Middleton GW (2011) Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol. Immunother.* 60(10): 1419–1430. doi: 10.1007/s00262-011-1028-0
53. Gonda K, Shibata M, Ohtake T et al. (2012) [Myeloid-derived suppressor cells in patients with breast cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* 39(9): 1363–1368
54. Trellakis S, Bruderek K, Hütte J et al. (2013) Granulocytic myeloid-derived suppressor cells are cryosensitive and their frequency does not correlate with serum concentrations of colony-stimulating factors in head and neck cancer. *Innate Immun* 19(3): 328–336. doi: 10.1177/1753425912463618

55. Umansky V, Blattner C, Gebhardt C, Utikal J (2016) The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. *Vaccines* 4(4). doi: 10.3390/vaccines4040036
56. Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H (1995) Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J. Exp. Med.* 181(1): 435–440
57. Shojaei F, Wu X, Malik AK et al. (2007) Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat Biotechnol* 25(8): 911–920. doi: 10.1038/nbt1323
58. Kusmartsev S, Gabrilovich DI (2005) STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J. Immunol.* 174(8): 4880–4891
59. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S (2007) Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* 67(20): 10019–10026. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2354
60. Ye X-Z, Yu S-C, Bian X-W (2010) Contribution of myeloid-derived suppressor cells to tumor-induced immune suppression, angiogenesis, invasion and metastasis. *Journal of Genetics and Genomics* 37(7): 423–430. doi: 10.1016/S1673-8527(09)60061-8
61. Yang L, DeBusk LM, Fukuda K et al. (2004) Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6(4): 409–421. doi: 10.1016/j.ccr.2004.08.031
62. Du R, Lu KV, Petritsch C et al. (2008) HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer cell* 13(3): 206–220. doi: 10.1016/j.ccr.2008.01.034
63. Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H (2008) Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation* 118(10): 3367–3377. doi: 10.1172/JCI35213
64. Friedlander M, Dorrell MI, Ritter MR et al. (2007) Progenitor cells and retinal angiogenesis. *Angiogenesis* 10(2): 89–101. doi: 10.1007/s10456-007-9070-4
65. Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y (2006) Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nature cell biology* 8(12): 1369–1375. doi: 10.1038/ncb1507
66. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P et al. (2009) CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. *Cancer cell* 16(2): 91–102. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.018

67. Huysentruyt LC, Mukherjee P, Banerjee D, Shelton LM, Seyfried TN (2008) Metastatic cancer cells with macrophage properties: evidence from a new murine tumor model. *International journal of cancer* 123(1): 73–84. doi: 10.1002/ijc.23492
68. Clark CE, Hingorani SR, Mick R, Combs C, Tuveson DA, Vonderheide RH (2007) Dynamics of the Immune Reaction to Pancreatic Cancer from Inception to Invasion. *Cancer research* 67(19): 9518–9527. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0175
69. Hermani A, Servi B de, Medunjanin S, Tessier PA, Mayer D (2006) S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Experimental cell research* 312(2): 184–197. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.10.013
70. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G (2008) Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181(7): 4666–4675
71. Boros P, Ochando J, Zeher M (2016) Myeloid derived suppressor cells and autoimmunity. *Human immunology* 77(8): 631–636. doi: 10.1016/j.humimm.2016.05.024
72. Vlachou K, Mintzas K, Glymenaki M et al. (2016) Elimination of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells in Lupus-Prone Mice Linked to Reactive Oxygen Species-Dependent Extracellular Trap Formation. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 68(2): 449–461. doi: 10.1002/art.39441
73. Dong G, You M, Fan H et al. (2015) 17beta-estradiol contributes to the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in blood by promoting TNF-alpha secretion. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 47(8): 620–629. doi: 10.1093/abbs/gmv053
74. Wu H-j, Dong Z-j (2016) Phase diagram of ternary Cu-Ga-Te system and thermoelectric properties of chalcopyrite CuGaTe₂ materials. *Acta Materialia* 118: 331–341. doi: 10.1016/j.actamat.2016.07.060
75. Cripps JG, Wang J, Maria A, Blumenthal I, Gorham JD (2010) Type 1 T helper cells induce the accumulation of myeloid-derived suppressor cells in the inflamed Tgfb1 knockout mouse liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 52(4): 1350–1359. doi: 10.1002/hep.23841
76. Hammerich L, Warzecha KT, Stefkova M et al. (2015) Cyclic adenosine monophosphate-responsive element modulator alpha overexpression impairs function of hepatic myeloid-derived suppressor cells and aggravates immune-mediated hepatitis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 61(3): 990–1002. doi: 10.1002/hep.27571

77. Hegde VL, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2011) Role of myeloid-derived suppressor cells in amelioration of experimental autoimmune hepatitis following activation of TRPV1 receptors by cannabidiol. *PloS one* 6(4): e18281. doi: 10.1371/journal.pone.0018281
78. Sarra M, Cupi ML, Bernardini R et al. (2013) IL-25 prevents and cures fulminant hepatitis in mice through a myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 58(4): 1436–1450. doi: 10.1002/hep.26446
79. Zhu K, Zhang N, Guo N et al. (2014) SSC(high)CD11b(high)Ly-6C(high)Ly-6G(low) myeloid cells curtail CD4 T cell response by inducible nitric oxide synthase in murine hepatitis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 54: 89–97. doi: 10.1016/j.biocel.2014.07.005
80. Guo C, Hu F, Yi H et al. (2016) Myeloid-derived suppressor cells have a proinflammatory role in the pathogenesis of autoimmune arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 75(1): 278–285. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205508
81. Egelston C, Kurko J, Besenyei T et al. (2012) Suppression of dendritic cell maturation and T cell proliferation by synovial fluid myeloid cells from mice with autoimmune arthritis. *Arthritis and rheumatism* 64(10): 3179–3188. doi: 10.1002/art.34494
82. Fujii W, Ashihara E, Hirai H et al. (2013) Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191(3): 1073–1081. doi: 10.4049/jimmunol.1203535
83. Jiao Z, Hua S, Wang W, Wang H, Gao J, Wang X (2013) Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlated negatively with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology* 42(2): 85–90. doi: 10.3109/03009742.2012.716450
84. Zhu B, Bando Y, Xiao S et al. (2007) CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 179(8): 5228–5237
85. Dardalhon V, Anderson AC, Karman J et al. (2010) Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185(3): 1383–1392. doi: 10.4049/jimmunol.0903275
86. Ioannou M, Alissafi T, Lazaridis I et al. (2012) Crucial role of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in the regulation of central nervous system autoimmune disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188(3): 1136–1146. doi: 10.4049/jimmunol.1101816

87. Haile LA, Wasielewski R von, Gamrekashvili J et al. (2008) Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology* 135(3): 871-81, 881.e1-5. doi: 10.1053/j.gastro.2008.06.032
88. Zhang R, Ito S, Nishio N, Cheng Z, Suzuki H, Isobe K-I (2011) Dextran sulphate sodium increases splenic Gr1(+)CD11b(+) cells which accelerate recovery from colitis following intravenous transplantation. *Clinical and experimental immunology* 164(3): 417–427. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04374.x
89. Westendorf AM, Fleissner D, Deppenmeier S et al. (2006) Autoimmune-mediated intestinal inflammation-impact and regulation of antigen-specific CD8+ T cells. *Gastroenterology* 131(2): 510–524. doi: 10.1053/j.gastro.2006.05.015
90. Guan Q, Moreno S, Qing G et al. (2013) The role and potential therapeutic application of myeloid-derived suppressor cells in TNBS-induced colitis. *Journal of leukocyte biology* 94(4): 803–811. doi: 10.1189/jlb.0113050
91. Rivollier A, He J, Kole A, Valatas V, Kelsall BL (2012) Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *The Journal of experimental medicine* 209(1): 139–155. doi: 10.1084/jem.20101387
92. Dabritz J, Judd LM, Chalinor HV, Menheniott TR, Giraud AS (2016) Altered gp130 signalling ameliorates experimental colitis via myeloid cell-specific STAT3 activation and myeloid-derived suppressor cells. *Scientific reports* 6: 20584. doi: 10.1038/srep20584
93. Goñi O, Alcaide P, Fresno M (2002) Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. *Int. Immunol.* 14(10): 1125–1134
94. Giordanengo L, Guiñazú N, Stempin C, Fretes R, Cerbán F, Gea S (2002) Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur. J. Immunol.* 32(4): 1003–1011. doi: 10.1002/1521-4141(200204)32:4<1003::AID-IMMU1003>3.0.CO;2-P
95. Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ et al. (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol.* 172(7): 4410–4417
96. Terrazas LI, Walsh KL, Piskorska D, McGuire E, Harn DA (2001) The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J. Immunol.* 167(9): 5294–5303

97. Gómez-García L, López-Marín LM, Saavedra R, Reyes JL, Rodríguez-Sosa M, Terrazas LI (2005) Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite Immunol.* 27(10-11): 395–405. doi: 10.1111/j.1365-3024.2005.00790.x
98. Brys L, Beschin A, Raes G et al. (2005) Reactive oxygen species and 12/15-lipoxygenase contribute to the antiproliferative capacity of alternatively activated myeloid cells elicited during helminth infection. *J. Immunol.* 174(10): 6095–6104
99. Mencacci A, Montagnoli C, Bacci A et al. (2002) CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis. *J. Immunol.* 169(6): 3180–3190
100. Makarenkova VP, Bansal V, Matta BM, Perez LA, Ochoa JB (2006) CD11b+/Gr-1+ myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. *J. Immunol.* 176(4): 2085–2094
101. Pan P-Y, Wang GX, Yin B et al. (2008) Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* 111(1): 219–228. doi: 10.1182/blood-2007-04-086835
102. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S (2007) Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 67(9): 4507–4513. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4174
103. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I (2004) High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* 64(17): 6337–6343. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0757
104. Gabrilovich D, Ishida T, Oyama T et al. (1998) Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 92(11): 4150–4166
105. Marvel D, Gabrilovich DI (2015) Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *The Journal of clinical investigation* 125(9): 3356–3364. doi: 10.1172/JCI80005
106. Sonda N, Chioda M, Zilio S, Simonato F, Bronte V (2011) Transcription factors in myeloid-derived suppressor cell recruitment and function. *Current opinion in immunology* 23(2): 279–285. doi: 10.1016/j.coi.2010.12.006
107. Yu H, Pardoll D, Jove R (2009) STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature reviews. Cancer* 9(11): 798–809. doi: 10.1038/nrc2734

108. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S (2015) Myeloid-Derived Suppressor Cells. In: Wang X-Y, Fisher PB (Hrsg) Immunotherapy of cancer, Band 128. Academic Press, Waltham, MA, S 95–139
109. Meirow Y, Kanterman J, Baniyash M (2015) Paving the Road to Tumor Development and Spreading. Myeloid-Derived Suppressor Cells are Ruling the Fate. *Front. Immunol.* 6(26): 1650. doi: 10.3389/fimmu.2015.00523
110. Navarini-Meury AA, Conrad C (2009) Melanoma and innate immunity--aActive inflammation or just erroneous attraction? Melanoma as the source of leukocyte-attracting chemokines. *Seminars in cancer biology* 19(2): 84–91. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.10.012
111. Meyer C, Sevko A, Ramacher M et al. (2011) Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(41): 17111–17116. doi: 10.1073/pnas.1108121108
112. Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebti SM, Gabrilovich DI (2005) Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res.* 65(20): 9525–9535. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0529
113. Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S et al. (2004) Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J. Immunol.* 172(1): 464–474
114. Kortylewski M, Kujawski M, Wang T et al. (2005) Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat. Med.* 11(12): 1314–1321. doi: 10.1038/nm1325
115. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J (2007) S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.* 81(1): 28–37. doi: 10.1189/jlb.0306170
116. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS et al. (2007) MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J. Exp. Med.* 204(6): 1463–1474. doi: 10.1084/jem.20062602
117. Hengesbach LM, Hoag KA (2004) Physiological concentrations of retinoic acid favor myeloid dendritic cell development over granulocyte development in cultures of bone marrow cells from mice. *J. Nutr.* 134(10): 2653–2659

118. Kuwata T, Wang IM, Tamura T et al. (2000) Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood* 95(11): 3349–3356
119. Walkley CR, Yuan Y-D, Chandraratna, R A S, McArthur GA (2002) Retinoic acid receptor antagonism in vivo expands the numbers of precursor cells during granulopoiesis. *Leukemia* 16(9): 1763–1772. doi: 10.1038/sj.leu.2402625
120. Kusmartsev S, Cheng F, Yu B et al. (2003) All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res.* 63(15): 4441–4449
121. Lathers, Deanne M R, Clark JI, Achille NJ, Young, M Rita I (2004) Phase 1B study to improve immune responses in head and neck cancer patients using escalating doses of 25-hydroxyvitamin D3. *Cancer Immunol. Immunother.* 53(5): 422–430. doi: 10.1007/s00262-003-0459-7
122. Nefedova Y, Fishman M, Sherman S, Wang X, Beg AA, Gabrilovich DI (2007) Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 67(22): 11021–11028. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2593
123. Talmadge JE, Hood KC, Zobel LC, Shafer LR, Coles M, Toth B (2007) Chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibition reduces immature myeloid suppressor cell expansion. *Int. Immunopharmacol.* 7(2): 140–151. doi: 10.1016/j.intimp.2006.09.021
124. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB et al. (2005) Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 65(8): 3044–3048. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4505
125. Serafini P, Meckel K, Kelso M et al. (2006) Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J. Exp. Med.* 203(12): 2691–2702. doi: 10.1084/jem.20061104
126. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM (2005) Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin. Cancer Res.* 11(18): 6713–6721. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0883
127. Wu C-T, Hsieh C-C, Lin C-C, Chen W-C, Hong J-H, Chen M-F (2012) Significance of IL-6 in the transition of hormone-resistant prostate cancer and the induction of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 90(11): 1343–1355. doi: 10.1007/s00109-012-0916-x

128. Sumida K, Wakita D, Narita Y et al. (2012) Anti-IL-6 receptor mAb eliminates myeloid-derived suppressor cells and inhibits tumor growth by enhancing T-cell responses. *European journal of immunology* 42(8): 2060–2072. doi: 10.1002/eji.201142335
129. Wiens GD, Glenney GW (2011) Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies. *Dev. Comp. Immunol.* 35(12): 1324–1335. doi: 10.1016/j.dci.2011.03.031
130. Bodmer J-L, Schneider P, Tschopp J (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 27(1): 19–26
131. Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G (2003) The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14(3-4): 193–209
132. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74(5): 845–853
133. Itoh N, Nagata S (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J. Biol. Chem.* 268(15): 10932–10937
134. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53(1): 45–53
135. Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS et al. (1984) Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312(5996): 724–729
136. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ et al. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385(6618): 729–733. doi: 10.1038/385729a0
137. Feldman SR, Garton R, Averett W, Balkrishnan R, Vallee J (2003) Strategy to manage the treatment of severe psoriasis: considerations of efficacy, safety and cost. *Expert Opin Pharmacother* 4(9): 1525–1533. doi: 10.1517/14656566.4.9.1525
138. Lammich S, Kojro E, Postina R et al. (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96(7): 3922–3927
139. Moss ML, Jin SL, Milla ME et al. (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385(6618): 733–736. doi: 10.1038/385733a0

140. Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL et al. (1998) TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J. Immunol.* 160(2): 943–952
141. Reddy P, Slack JL, Davis R et al. (2000) Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 275(19): 14608–14614
142. Buckley CA, Rouhani FN, Kaler M, Adamik B, Hawari FI, Levine SJ (2005) Amino-terminal TACE prodomain attenuates TNFR2 cleavage independently of the cysteine switch. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 288(6): L1132-8. doi: 10.1152/ajplung.00429.2004
143. Cabal-Hierro L, Lazo PS (2012) Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell. Signal.* 24(6): 1297–1305. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.02.006
144. Grell M, Douni E, Wajant H et al. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83(5): 793–802
145. Dopp JM, Sarafian TA, Spinella FM, Kahn MA, Shau H, Vellis J de (2002) Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NFkappaB translocation and oxyradical neutralization in glial cells. *Neurochem. Res.* 27(11): 1535–1542
146. Li X, Yang Y, Ashwell JD (2002) TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416(6878): 345–347. doi: 10.1038/416345a
147. Ware CF, Crowe PD, Vanarsdale TL et al. (1991) Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. *J. Immunol.* 147(12): 4229–4238
148. Irwin MW, Mak S, Mann DL et al. (1999) Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 99(11): 1492–1498
149. Grell M, Becke FM, Wajant H, Männel DN, Scheurich P (1998) TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur. J. Immunol.* 28(1): 257–263
150. Hu X, Li B, Li X et al. (2014) Transmembrane TNF- promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2. *J. Immunol.* 192(3): 1320–1331. doi: 10.4049/jimmunol.1203195
151. Choi SJ, Lee K-H, Park HS, Kim S-K, Koh C-M, Park JY (2005) Differential expression, shedding, cytokine regulation and function of TNFR1 and TNFR2 in human fetal astrocytes. *Yonsei Med. J.* 46(6): 818–826

152. Faustman D, Davis M (2010) TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 9(6): 482–493. doi: 10.1038/nrd3030
153. Tuma R, Russell M, Rosendahl M, Thomas, G J Jr (1995) Solution conformation of the extracellular domain of the human tumor necrosis factor receptor probed by Raman and UV-resonance Raman spectroscopy: structural effects of an engineered PEG linker. *Biochemistry* 34(46): 15150–15156
154. Chan FK, Lenardo MJ (2000) A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 30(2): 652–660. doi: 10.1002/1521-4141(200002)30:2<652:AID-IMMU652>3.0.CO;2-L
155. Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114(2): 181–190
156. Aggarwal BB, Schwarz L, Hogan ME, Rando RF (1996) Triple helix-forming oligodeoxyribonucleotides targeted to the human tumor necrosis factor (TNF) gene inhibit TNF production and block the TNF-dependent growth of human glioblastoma tumor cells. *Cancer Res.* 56(22): 5156–5164
157. Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV (1996) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4(4): 387–396
158. Chen N-J, Chio, Iok In Christine, Lin W-J et al. (2008) Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(34): 12429–12434. doi: 10.1073/pnas.0806585105
159. Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL et al. (2008) Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF α -mediated NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(33): 11778–11783. doi: 10.1073/pnas.0711122105
160. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin, A S Jr (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281(5383): 1680–1683
161. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J et al. (2004) Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. *Immunity* 21(3): 415–428. doi: 10.1016/j.immuni.2004.08.017
162. Li L, Soetandyo N, Wang Q, Ye Y (2009) The zinc finger protein A20 targets TRAF2 to the lysosomes for degradation. *Biochim Biophys Acta* 1793(2): 346–353. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.09.013

163. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV (1995) The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83(7): 1243–1252
164. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78(4): 681–692
165. Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV (1995) TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269(5229): 1424–1427
166. Rauert H, Wicovsky A, Müller N et al. (2010) Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *J. Biol. Chem.* 285(10): 7394–7404. doi: 10.1074/jbc.M109.037341
167. Marchetti L, Klein M, Schlett K, Pfizenmaier K, Eisel, Ulrich L M (2004) Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway. *J. Biol. Chem.* 279(31): 32869–32881. doi: 10.1074/jbc.M311766200
168. Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB (2000) Translocation of TRAF proteins regulates apoptotic threshold of cells. *Biochem Biophys Res Commun* 272(3): 936–945. doi: 10.1006/bbrc.2000.2873
169. Wu C-J, Conze DB, Li X, Ying S-X, Hanover JA, Ashwell JD (2005) TNF-alpha induced c-IAP1/TRAF2 complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *EMBO J* 24(10): 1886–1898. doi: 10.1038/sj.emboj.7600649
170. Feng X, Gaeta ML, Madge LA, Yang JH, Bradley JR, Pober JS (2001) Caveolin-1 associates with TRAF2 to form a complex that is recruited to tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.* 276(11): 8341–8349. doi: 10.1074/jbc.M007116200
171. Wicovsky A, Henkler F, Salzmann S, Scheurich P, Kneitz C, Wajant H (2009) Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation. *Oncogene* 28(15): 1769–1781. doi: 10.1038/onc.2009.29
172. Aggarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti AC (2002) The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1(4): 327–341

173. Rodriguez M, Cabal-Hierro L, Carcedo MT et al. (2011) NF-kappaB signal triggering and termination by tumor necrosis factor receptor 2. *J. Biol. Chem.* 286(26): 22814–22824. doi: 10.1074/jbc.M111.225631
174. Fotin-Mleczek M, Henkler F, Samel D et al. (2002) Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J. Cell. Sci.* 115(Pt 13): 2757–2770
175. Weiss T, Grell M, Hessabi B et al. (1997) Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J Immunol* 158(5): 2398–2404
176. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hrsg) (2010) *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie ; mit 85 Tabellen ; mit herausnehmbarem Repetitorium, 31., überarb. und aktualisierte Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer-Medizin-Verl, Heidelberg*
177. Male D (2005) *Immunologie auf einen Blick, 1. Aufl. Elsevier, Urban und Fischer, München, Jena*
178. Rassow J (2008) *Biochemie. 50 Tabellen, 2., aktualisierte Aufl. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart*
179. Digel W, Stefanic M, Schöniger W et al. (1989) Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 73(5): 1242–1246
180. Wu S, Boyer CM, Whitaker RS et al. (1993) Tumor necrosis factor alpha as an autocrine and paracrine growth factor for ovarian cancer: monokine induction of tumor cell proliferation and tumor necrosis factor alpha expression. *Cancer Res.* 53(8): 1939–1944
181. Goillot E, Combaret V, Ladenstein R et al. (1992) Tumor necrosis factor as an autocrine growth factor for neuroblastoma. *Cancer Res.* 52(11): 3194–3200
182. Emanuelli B, Peraldi P, Filloux C et al. (2001) SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor-alpha in the adipose tissue of obese mice. *J. Biol. Chem.* 276(51): 47944–47949. doi: 10.1074/jbc.M104602200
183. Mantovani A (2009) Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* 457(7225): 36–37. doi: 10.1038/457036b
184. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454(7203): 436–444. doi: 10.1038/nature07205

185. Hsu TC, Nair R, Tulsian P et al. (2001) Transformation nonresponsive cells owe their resistance to lack of p65/nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res.* 61(10): 4160–4168
186. Shishodia S, Aggarwal BB (2004) Nuclear factor-kappaB: a friend or a foe in cancer? *Biochem. Pharmacol.* 68(6): 1071–1080. doi: 10.1016/j.bcp.2004.04.026
187. Balkwill F (2006) TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25(3): 409–416. doi: 10.1007/s10555-006-9005-3
188. Zhao X, Rong L, Zhao X et al. (2012) TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J. Clin. Invest.* 122(11): 4094–4104. doi: 10.1172/JCI64115
189. Wu TH, Pabin CN, Qin Z et al. (2004) Long-term suppression of tumor growth by TNF requires a Stat1- and IFN regulatory factor 1-dependent IFN-gamma pathway but not IL-12 or IL-18. *J Immunol* 172(5): 3243–3251
190. Orosz P, Echtenacher B, Falk W, Ruschoff J, Weber D, Mannel DN (1993) Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 177(5): 1391–1398
191. Kalliolias GD, Ivashkiv LB (2016) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews. Rheumatology* 12(1): 49–62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169
192. Ren J, Wang Y, Gao Y, Mehta, Shalin B K, Lee, Caroline G L (2011) FAT10 mediates the effect of TNF- in inducing chromosomal instability. *J. Cell. Sci.* 124(Pt 21): 3665–3675. doi: 10.1242/jcs.087403
193. Harrison ML, Obermueller E, Maisey NR et al. (2007) Tumor necrosis factor alpha as a new target for renal cell carcinoma: two sequential phase II trials of infliximab at standard and high dose. *J Clin Oncol* 25(29): 4542–4549. doi: 10.1200/JCO.2007.11.2136
194. Faustman DL, Davis M (2009) The primacy of CD8 T lymphocytes in type 1 diabetes and implications for therapies. *J Mol Med (Berl)* 87(12): 1173–1178. doi: 10.1007/s00109-009-0516-6
195. Lenardo MJ (1991) Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353(6347): 858–861. doi: 10.1038/353858a0
196. Ban L, Zhang J, Wang L, Kuhnreiber W, Burger D, Faustman DL (2008) Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(36): 13644–13649. doi: 10.1073/pnas.0803429105

197. Kessel A, Rosner I, Rozenbaum M et al. (2004) Increased CD8+ T cell apoptosis in scleroderma is associated with low levels of NF-kappa B. *J Clin Immunol* 24(1): 30–36. doi: 10.1023/B:JOCI.0000018060.36183.bb
198. Sidhu RS, Bollon AP (1993) Tumor necrosis factor activities and cancer therapy--a perspective. *Pharmacol Ther* 57(1): 79–128
199. Hieber U, Heim ME (1994) Tumor necrosis factor for the treatment of malignancies. *Oncology* 51(2): 142–153
200. Balkwill F (2009) Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(5): 361–371. doi: 10.1038/nrc2628
201. Bartholeyns J, Freudenberg M, Galanos C (1987) Growing tumors induce hypersensitivity to endotoxin and tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* 55(9): 2230–2233
202. Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M (1989) Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)* 2(8657): 244–247
203. Buchan G, Barrett K, Fujita T, Taniguchi T, Maini R, Feldmann M (1988) Detection of activated T cell products in the rheumatoid joint using cDNA probes to Interleukin-2 (IL-2) IL-2 receptor and IFN-gamma. *Clinical and experimental immunology* 71(2): 295–301
204. Buchan G, Barrett K, Turner M, Chantry D, Maini RN, Feldmann M (1988) Interleukin-1 and tumour necrosis factor mRNA expression in rheumatoid arthritis: prolonged production of IL-1 alpha. *Clinical and experimental immunology* 73(3): 449–455
205. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN (1996) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual review of immunology* 14: 397–440. doi: 10.1146/annurev.immunol.14.1.397
206. Haworth C, Brennan FM, Chantry D, Turner M, Maini RN, Feldmann M (1991) Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha. *European journal of immunology* 21(10): 2575–2579. doi: 10.1002/eji.1830211039
207. Williams RO, Feldmann M, Maini RN (1992) Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(20): 9784–9788

208. Kodama S, Davis M, Faustman DL (2005) The therapeutic potential of tumor necrosis factor for autoimmune disease: a mechanistically based hypothesis. *Cell Mol Life Sci* 62(16): 1850–1862. doi: 10.1007/s00018-005-5022-6
209. Abbott DW, Wilkins A, Asara JM, Cantley LC (2004) The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitinylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol* 14(24): 2217–2227. doi: 10.1016/j.cub.2004.12.032
210. Eckmann L, Karin M (2005) NOD2 and Crohn's disease: loss or gain of function? *Immunity* 22(6): 661–667. doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.004
211. Maeda S, Hsu L-C, Liu H et al. (2005) Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 307(5710): 734–738. doi: 10.1126/science.1103685
212. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W (2004) NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 5(8): 800–808. doi: 10.1038/ni1092
213. Levine A, Shamir R, Wine E et al. (2005) TNF promoter polymorphisms and modulation of growth retardation and disease severity in pediatric Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 100(7): 1598–1604. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.41737.x
214. van Heel, David A, Udalova IA, De Silva, Arjuna P et al. (2002) Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors. *Hum Mol Genet* 11(11): 1281–1289
215. Karban AS, Okazaki T, Panhuysen, Carolien I M et al. (2004) Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 13(1): 35–45. doi: 10.1093/hmg/ddh008
216. Kammer GM, Tsokos GC (2002) Abnormal T lymphocyte signal transduction in systemic lupus erythematosus. *Curr Dir Autoimmun* 5: 131–150
217. Hegazy DM, O'Reilly DA, Yang BM, Hodgkinson AD, Millward BA, Demaine AG (2001) NFkappaB polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes. *Genes Immun* 2(6): 304–308. doi: 10.1038/sj.gene.6363776
218. Deng GY, Muir A, Maclaren NK, She JX (1995) Association of LMP2 and LMP7 genes within the major histocompatibility complex with insulin-dependent diabetes mellitus: population and family studies. *Am J Hum Genet* 56(2): 528–534
219. Ding H, Cheng H, Fu Z, Yan L, Yang G (2001) Relationship of large multifunctional proteasome 7 gene polymorphism with susceptibility to type 1 diabetes mellitus and DR3 gene. *Chin Med J (Engl)* 114(12): 1263–1266

220. Fu Y, Yan G, Shi L, Faustman D (1998) Antigen processing and autoimmunity. Evaluation of mRNA abundance and function of HLA-linked genes. *Ann N Y Acad Sci* 842: 138–155
221. Hayashi T, Faustman D (2000) Essential role of human leukocyte antigen-encoded proteasome subunits in NF-kappaB activation and prevention of tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275(7): 5238–5247
222. Hayashi T, Faustman D (1999) NOD mice are defective in proteasome production and activation of NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 19(12): 8646–8659
223. Hayashi T, Faustman DL (2001) Selected contribution: Association of gender-related LMP2 inactivation with autoimmune pathogenesis. *J Appl Physiol* (1985) 91(6): 2804–2815
224. Yan G, Fu Y, Faustman DL (1997) Reduced expression of Tap1 and Lmp2 antigen-processing genes in the nonobese diabetic (NOD) mouse due to a mutation in their shared bidirectional promoter. *J Immunol* 159(6): 3068–3080
225. Milterski B, Bohringer S, Klein W et al. (2002) Inhibitors in the NFkappaB cascade comprise prime candidate genes predisposing to multiple sclerosis, especially in selected combinations. *Genes Immun* 3(4): 211–219. doi: 10.1038/sj.gene.6363846
226. Chatzikiyriakidou A, Georgiou I, Voulgari PV, Drosos AA (2009) The role of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptor polymorphisms in susceptibility to ankylosing spondylitis. *Clin Exp Rheumatol* 27(4): 645–648
227. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(9): 3666–3670
228. Probert L (2015) TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience* 302: 2–22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.06.038
229. Liu J, Marino MW, Wong G et al. (1998) TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nature medicine* 4(1): 78–83
230. Marino MW, Dunn A, Grail D et al. (1997) Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(15): 8093–8098
231. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, Kollias G (1996) Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and

- germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *The Journal of experimental medicine* 184(4): 1397–1411
232. Loetscher H, Stueber D, Banner D, Mackay F, Lesslauer W (1993) Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J. Biol. Chem.* 268(35): 26350–26357
233. Chopra M, Biehl M, Steinfatt T et al. (2016) Exogenous TNFR2 activation protects from acute GvHD via host T reg cell expansion. *The Journal of experimental medicine* 213(9): 1881–1900. doi: 10.1084/jem.20151563
234. Rossner S, Voigtlander C, Wiethe C, Hanig J, Seifarth C, Lutz MB (2005) Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *European journal of immunology* 35(12): 3533–3544. doi: 10.1002/eji.200526172
235. (2016) Corrections. *European journal of immunology* 46(11): 2679. doi: 10.1002/eji.201670117
236. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL et al. (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods* 223(1): 77–92
237. Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology* 2(10): 907–916. doi: 10.1038/ni1001-907
238. Chen X, Subleski JJ, Kopf H, Howard, O M Zack, Mannel DN, Oppenheim JJ (2008) Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol* 180(10): 6467–6471
239. Polz J, Remke A, Weber S et al. (2014) Myeloid suppressor cells require membrane TNFR2 expression for suppressive activity. *Immunity, inflammation and disease* 2(2): 121–130. doi: 10.1002/iid3.19

9 Danksagung

Meiner Doktormutter und Betreuerin Prof. Dr. Daniela Männel danke ich herzlich für die stets freundliche, kompetente und äußerst engagierte Betreuung, die sie selbst im Ruhestand mit großer Begeisterung fortführt.

Weiterhin möchte ich Dr. Sven Mostböck danken, der mich menschlich und fachlich vorbildlich in theoretische und praktische Forschungsarbeit eingeführt hat und mir selbst nach seinem Wechsel nach Wien weiterhin eifrig mit Rat und Tat zur Seite stand.

Aus dem gesamten Team der Immunologie, in das ich freundlich aufgenommen wurde und das mich stets unterstützte, möchte ich Dorothea Weber-Steffens und Anne Pietryga-Krieger besonders für ihre tatkräftige und zugleich humorvolle Mitarbeit während langer Stunden im Labor danken.

Der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg danke ich für mein Studium und das Promotionsstipendium, das mir es ermöglichte, mich vollständig auf die experimentelle Arbeit zu konzentrieren.

Darüber hinaus gilt mein Dank der Studienstiftung des deutschen Volkes für ihre tolle Unterstützung meiner gesamten Ausbildung.

Zuletzt richtet sich mein Dank an all die Menschen aus meinem persönlichen Umfeld, die stets für mich da gewesen sind und durch die Vieles erst möglich geworden ist.

