

# INAUGURAL – DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen-Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Christiane Meyer  
aus Wiesmoor

# INAUGURAL – DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen-Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologin Christiane Meyer  
aus Wiesmoor

Tag der mündlichen Prüfung: .....

***Der Einfluss myeloider Suppressorzellen auf die  
Expression der  $\zeta$ -Kette im T-Zellrezeptor sowie auf die  
Tumorentwicklung in einem transgenen  
Melanom-Mausmodell***

***Gutachter: Prof. Dr. Viktor Umansky  
Priv.-Doz. Dr. Anne Regnier-Vigouroux***

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.07.2005 - 31.03.2009 im Rahmen der DKFZ-MOST Cooperation in Cancer Research in der Klinischen Kooperationseinheit Dermato-Onkologie des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg und des Universitätsklinikums Mannheim in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Viktor Umansky angefertigt.

In Auszügen wurde die Arbeit auf folgenden Konferenzen vorgestellt:

**Christiane Meyer**, Michal Baniyash, Dirk Schadendorf und Viktor Umansky

*"Accumulation of myeloid derived suppressor cells and downregulation of TCR  $\zeta$  chain in a mouse model of spontaneous melanoma"*, **Posterpräsentation, 14<sup>th</sup> AEK Cancer Congress**, Frankfurt/ Main, 28.02.-01.03.2007

**Christiane Meyer**, Michal Baniyash, Dirk Schadendorf und Viktor Umansky

*"Immunosuppressive cells and factors in a mouse model of spontaneous melanoma"*, **Vortrag, 30<sup>th</sup> DKFZ-MOST Cooperation in Cancer Research Meeting**, Heidelberg, 20.03.-21.03.2007

**Christiane Meyer**, Michal Baniyash, Dirk Schadendorf und Viktor Umansky

*"Myeloid derived suppressor cells and inhibition of T cell  $\zeta$  chain expression in a mouse model of spontaneous melanoma"*, **Vortrag, EORTC Melanoma Group Meeting**, Mannheim, 19.10.-20.10.2007

**Christiane Meyer**, Michal Baniyash, Dirk Schadendorf und Viktor Umansky

*"Myeloid derived suppressor cells mediate immunosuppression in transgenic mouse melanoma model"*, **Vortrag, 31<sup>st</sup> DKFZ-MOST Cooperation in Cancer Research Meeting**, Shefayim, Israel, 16.03.-19.03.2008

**Christiane Meyer**, Michal Baniyash, Dirk Schadendorf und Viktor Umansky

*"Myeloid derived suppressor cells inhibit T cell  $\zeta$  chain expression in a mouse model of spontaneous melanoma"*, **Posterpräsentation, Joined ESCII-PIVAC-Meeting**, Athen, Griechenland, 09.10.-11.10.2008

**Christiane Meyer**, Michal Baniyash, Dirk Schadendorf und Viktor Umansky  
*"Sildenafil prolongs survival and reduces immune suppression in melanoma bearing mice"*, **Vortrag und Posterpräsentation**, **36. ADF-Tagung**, Heidelberg, 05.03.-  
07.03.2009

## I. Zusammenfassung

---

Das maligne Melanom ist durch ausgeprägtes Metastasierungspotenzial gekennzeichnet, außerdem besteht Resistenz gegenüber Standardbehandlungen wie Chemotherapie oder Bestrahlung. Da dieser Tumor sehr immunogen ist, sind immuntherapeutische Behandlungen eine vielversprechende Option. Tumorinduzierte Immunsuppression setzt Vakzinierungsansätzen oder adoptivem T-Zelltransfer jedoch Grenzen. Während der Tumorprogression werden Myeloide Suppressorzellen (MDSC) in sekundäre lymphatische Organe sowie ins Tumorstroma rekrutiert und induzieren T-Zell-Anergie. T-Zellen werden von MDSC durch Stickstoffmonoxidproduktion beeinflusst und verringern die Expression der  $\zeta$ -Kette im T-Zellrezeptor (TCR). Für eine erfolgreiche Tumor-Immuntherapie müssen Strategien entwickelt werden, die die immunsuppressorische Wirkung der MDSC abschwächen oder neutralisieren. In der vorliegenden Arbeit wurden MDSC am *ret* transgenen Spontan-Melanommausmodell charakterisiert. Das humane maligne Melanom wird besonders gut imitiert, da aufgrund des spontanen Tumorwachstums eine natürliche Tumor-Stroma-Interaktion stattfindet. Wir detektierten signifikant erhöhte Mengen MDSC in sekundären lymphatischen Organen tumortragender Mäuse im Vergleich zu BL/6-Wildtyp-Mäusen. Im Tumorstroma besonders schnell wachsender Tumoren ist der Anteil MDSC signifikant erhöht, so dass MDSC als Marker für die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors gelten. T-Zellen sekundärer lymphatischer Organe in tumortragenden Mäusen zeigen signifikant erniedrigte TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression. Tumorinfiltrierende T-Zellen verringern ihre TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression signifikant in Anhängigkeit der Tumorgröße. Koinkubationsversuche ergaben, dass MDSC aus tumortragenden Mäusen stärker suppressiv sind als MDSC aus BL/6-Wildtyp-Mäusen. Im Primärtumorgewebe sowie im Metastasengewebe der Lymphknoten besonders schnell wachsender Tumoren liegen IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF und MCP-1 erhöht vor. Dies impliziert eine Rolle bei Rekrutierung myeloider Suppressorzellen. Durch Behandlung tumortragender Mäuse mit Phosphodiesterase-5-Inhibitor Sildenafil (Viagra<sup>®</sup>) zur Verringerung des von MDSC sezernierten NO waren wir in der Lage, die Überlebensrate signifikant zu verlängern. In tumorinfiltrierenden Lymphozyten des Primärtumors wie auch der

Lymphknotenmetastasen war die Expression der TCR- $\zeta$ -Kette stark erhöht und damit die T-Zellkonstitution verbessert. Metastasengewebe im Lymphknoten zeigte signifikant erhöhte T-Zell- und signifikant erniedrigte MDSC-Infiltration. Die entwickelte Strategie eröffnet neue Möglichkeiten für die Behandlung des malignen Melanoms in der Klinik.

---

## II. Abstract

---

Malignant melanoma, known to have a strong metastatic potential, is resistant against currently applied treatments like chemotherapy or radiation. Since melanoma is highly immunogenic, immunotherapy could be a promising approach. However, tumor induced immunosuppression limits the therapeutic efficiency of vaccination or adoptive T cell transfer. During melanoma progression myeloid derived suppressor cells (MDSC) recruited in secondary lymphatic organs and in the in the tumor stroma induce T cell anergy. MDSC influence T cells by nitric oxide (NO) production, downregulating T cell receptor (TCR)- $\zeta$ -chain expression. Strategies to neutralize the immunosuppressive capacity of MDSC are required in order to ensure successful immunotherapy.

We studied MDSC in the *ret* transgenic melanoma mouse model. Spontaneous tumor growth in this model enables natural tumor-stroma interactions similar to human malignant melanoma. Our analysis revealed significant accumulation of MDSC in secondary lymphatic organs of tumor bearing transgenic mice in comparison to non transgenic littermates. In addition, faster growing tumors are infiltrated by significantly more MDSC, indicating that tumor infiltrating MDSC may serve as marker for the speed of tumor growth. T cells in secondary lymphatic organs significantly downregulated TCR- $\zeta$ -chain. In tumor infiltrating T cells the level of TCR- $\zeta$ -chain downregulation was correlated with the increase in tumor weight. Coincubation experiments revealed that MDSC from tumor bearing mice are not only enriched but also stronger suppressive as compared to BL/6. IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF and MCP-1 were found to be enriched in fast progressing primary tumors as well as lymph node metastasis. This indicates a role of these cytokines in MDSC recruitment. Tumor bearing mice were treated orally with Phosphodiesterase-5-Inhibitor Sildenafil (Viagra<sup>®</sup>) in order to reduce NO secretion by MDSC. The survival rate of treated mice was significantly enhanced. Furthermore, we detected higher TCR- $\zeta$ -chain expression in tumor infiltrating lymphocytes (TIL) of primary tumor and metastatic lymph node tissue indicating increased T cell function. In addition, T cell infiltration in metastatic lymph nodes was significantly enhanced, whereas MDSC

number was significantly decreased. The identified mechanism of the TCR- $\zeta$ -chain restoration in T cells of an immunosuppressed host provides new possibilities to improve melanoma immunotherapy.

### III. Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung.....	III
II. Abstract.....	V
III. Inhaltsverzeichnis.....	VI
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.1.2 Angeborene Immunität .....	2
1.1.3 Adaptive Immunität.....	4
1.1.3.1 Zelluläre Immunität .....	4
1.1.3.2 Humorale Immunität .....	6
1.2 Immunogenität maligner Erkrankungen.....	7
1.2.1 Tumorantigene .....	8
1.2.2 Tumorimmuntherapie.....	9
1.2.2.1 aktive Immuntherapie .....	9
1.2.2.2 passive Immuntherapie.....	11
1.2.2.3 adoptive Immuntherapie .....	11
1.3 Tumor-induzierte Immunsuppression .....	12
1.3.1 "Immune escape"-Strategien maligner Tumoren .....	13
1.3.2 Suppressive Immunzellen.....	15
1.3.2.1 Regulatorische T- Zellen.....	15
1.3.2.2 Tolerogene Dendritische Zellen.....	17
1.3.2.3 Myeloide Suppressorzellen.....	18
1.4 Das maligne Melanom .....	26
1.4.1 Standardtherapie des malignen Melanoms .....	27
1.4.2 Immuntherapie des malignen Melanoms .....	28
1.5 Das <i>ret</i> transgene Melanom-Mausmodell .....	30
1.6 Fragestellung.....	31
1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	32

---

<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>33</b>
2.1 Material.....	33
2.1.1 Laborgeräte .....	33
2.1.2 Chemikalien.....	34
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	35
2.1.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	36
2.1.5 Streptavidin für die Durchflusszytometrie .....	37
2.1.6 Isotypkontrollen für die Durchflusszytometrie .....	37
2.1.7 Primer.....	37
2.1.8 Kits.....	38
2.1.9 Mäuse.....	38
2.1.10 Software .....	38
2.1.11 Lösungen.....	38
2.1.11.1 Puffer für Typisierung mittels PCR.....	38
2.1.11.2 Puffer zur Durchflusszytometrie.....	39
2.1.11.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur.....	39
2.2 Methoden.....	40
2.2.1 Monitoring und Typisierung <i>ret</i> transgener Mäuse .....	40
2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA.....	40
2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	40
2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese.....	41
2.2.2 Präparation lymphatischer Organe und Tumorgewebes.....	41
2.2.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen.....	41
2.2.4 Durchflusszytometrie .....	42
2.2.4.1 Extrazelluläre FACS-Färbung.....	43
2.2.4.2 Biotin-Streptavidinmarkierung.....	43
2.2.4.3 Intrazelluläre FACS- Färbung.....	43
2.2.4.4 Zellsortierung mittels Durchflusszytometer .....	44
2.2.5 MDSC-Milz-Kokultur mit anschließender TCR- $\zeta$ -Ketten-Messung .....	45
2.2.6 Bio-Plex-Assay .....	46
2.2.7 Behandlung <i>ret</i> transgener Mäuse mit Sildenafil (Viagra <sup>®</sup> ).....	46

---

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
3.1 Typisierung und Monitoring <i>ret</i> transgener Mäuse .....	47
3.2 MDSC-Quantifizierung in lymphatischen Organen <i>ret</i> transgener Mäuse .....	48
3.3 MDSC-Subpopulationen in <i>ret</i> transgene Mäusen .....	50
3.4 IL-4R $\alpha$ -Expression bei MDSC aus <i>ret</i> transgenen Mäusen .....	52
3.5 Analyse von F4/80 als Marker myeloider Suppressorzellen bei <i>ret</i> .....	53
transgenen Mäusen .....	53
3.6 MDSC im Tumorstroma <i>ret</i> transgener Mäuse .....	55
3.7 Analyse der TCR- $\zeta$ -Kette in T-Lymphozyten bei <i>ret</i> transgenen Mäusen .....	56
3.8 TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in tumorinfiltrierenden Lymphozyten .....	59
3.9 Analyse der MDSC-vermittelten Immunsuppression in vitro .....	61
3.10 Analyse des Zytokinprofils <i>ret</i> transgener Mäuse .....	62
3.10.1 Zytokinprofil im Primärtumorgewebe .....	62
3.10.2 Zytokinprofil in metastasenbefallenen Lymphknoten .....	65
3.11 Auswirkungen von Sildenafilbehandlung auf Melanomentwicklung und .....	67
MDSC-vermittelte Immunsuppression .....	67
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>71</b>
4.1 Akkumulation myeloider Suppressorzellen in lymphatischen Organen .....	71
4.2 Phänotypische Charakterisierung von MDSC in lymphatischen Organen .....	73
4.2.1 F4/80-Expression auf MDSC .....	74
4.2.2 IL-4R $\alpha$ -Expression auf MDSC .....	74
4.3 Tumorinfiltrierende MDSC .....	75
4.4 Verminderte Expression der TCR- $\alpha$ -Kette in lymphatischen Organen .....	76
4.5 Verminderte TCR- $\alpha$ -Ketten-Expression in Tumor-infiltrierenden .....	77
Lymphozyten .....	77
4.6 Effekt von MDSC auf TCR- $\alpha$ -Ketten-Expression .....	78
4.7 Analyse des Zytokinprofils im Primärtumor sowie in Lymphknoten- .....	79
metastasen <i>ret</i> transgener Mäuse .....	79
4.8 Wirkung von Sildenafilbehandlung auf Melanomprogression und .....	81
immunsuppressorische Effekte der MDSC .....	81

<b>5. Literatur .....</b>	<b>84</b>
IV. Abkürzungen.....	111
V. Danksagung.....	114

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes Geflecht verschiedener lymphatischer Organe und Immunzellen. In seinem Zusammenspiel schützt ein intaktes Immunsystem den Organismus vor Befall mit Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten. Während einer akuten Infektion vermag das Immunsystem die schädlichen Auswirkungen von Pathogenen zu reduzieren und die Keime zu eliminieren. Nach einer überwundenen Infektion besteht außerdem Schutz vor einer Reinfektion mit dem gleichen Erreger.

Das Immunsystem besteht aus den lymphatischen Organen und dem Lymphgefäßsystem. Alle Immunzellen und alle Blutbestandteile haben ihren Ursprung in pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Zu den primären lymphatischen Organen, den Orten der Lymphozytenreifung, werden Knochenmark und Thymus gezählt. Als sekundäre lymphatische Organe bezeichnet man Milz, Lymphknoten und auch den Appendix vermiformis.

Das Lymphgefäßsystem durchzieht den ganzen Organismus netzwerkartig. Es besteht aus größeren Lymphgefäßen und vielen kleinen Lymphkapillaren, die blind im Gewebe enden. Lymphkapillaren nehmen intrazellulär Gewebsflüssigkeit auf und leiten diese in größere Lymphgefäße weiter. Der Lymphfluss wird durch unkoordinierte Kontraktion gewährleistet. In der oberen Hohlvene mündet das Lymphgefäßgeflecht in den Blutkreislauf. An bestimmten Stellen im Organismus sind Lymphgefäße zu Lymphknoten erweitert. Hier werden adaptive Immunantworten initiiert, wenn zirkulierende Lymphozyten auf antigenpräsentierende Zellen oder freie Antigene treffen. Die Milz erfüllt eine wichtige Funktion im Abbau von Blutzellen. Makrophagen beseitigen gealterte Zellen, die sich in den Milzsträngen der roten Pulpa ansammeln. Die weiße Pulpa der Milz besteht aus den periarteriellen lymphatischen Scheiden sowie den Lymphfollikeln, in denen B- und T-Zellen expandiert werden (*Janeway 2002; NIH-Science-Education 2003*).

### 1.1.2 Angeborene Immunität

Die Zellen des angeborenen Immunsystems vermitteln eine erste Barriere für eindringende Pathogene. Es erfolgt eine schnelle, jedoch unspezifische Immunreaktion und es besteht kein Schutz vor erneuter Reinfektion.

Makrophagen entwickeln sich aus Monozyten, die im Blutstrom zirkulieren. Aufgrund ihrer "Toll-like-Rezeptoren" (TLR) erkennen sie Pathogene und sind in der Lage, in Infektionsherde einzuwandern. Dort erfolgt die Ausreifung zu Makrophagen, die Zytokine sezernieren und weitere Immunzellen chemotaktisch anlocken. Pathogene oder infizierte Zielzellen werden von Makrophagen phagozytisch aufgenommen und über respiratorische Entladung abgetötet. Im Immunproteasom erfolgt Prozessierung der Antigenproteine, deren Peptide über "Major histocompatibility complex"-Klasse I (MHC-I) und -II- Moleküle präsentiert werden. In ihrer Rolle als antigenpräsentierende Zellen befinden sich Makrophagen an der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunreaktion (*Janeway 2002; NIH-Science-Education 2003*).

Dendritische Zellen entwickeln sich aus Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen bzw. aus Monozyten. Sie sind neben den Lymphknoten vor allem in der Mukosa angereichert und phagozytieren Antigene, die über Atemluft oder Nahrung aufgenommen werden. Über von dendritischen Zellen sezernierte Chemokine werden weitere Immunzellen chemotaktisch rekrutiert und der Entzündungsprozess verstärkt. Reife dendritische Zellen sind nicht mehr phagozytisch aktiv und präsentieren Antigene über MHC-I und -II. Dendritische Zellen exprimieren kostimulatorische Moleküle und senden das zur T-Zellaktivierung zusätzlich wichtige zweite Signal. Sie gelten als die effektivsten antigenpräsentierenden Zellen zur Induktion der adaptiven Immunantwort (*Banchereau und Steinman 1998; Janeway 2002*).

Granulozyten gliedern sich in Eosinophile, Basophile und Neutrophile. Sie sind phagozytisch aktiv, sehr kurzlebig und wandern nur bei akuter Entzündung chemotaktisch in die Gewebe ein. Sie enthalten große zytoplasmatische Granula, aus denen zur Immunabwehr per Exozytose Toxine freigesetzt werden. Eosinophile Granulozyten sind an der Parasitenabwehr beteiligt und sezernieren saure Hydrolasen. Basophile Granulozyten enthalten Histamin und Heparin in den Granula und werden ebenfalls der Parasitenabwehr zugeschrieben. Charakteristikum

neutrophiler Granulozyten ist der segmentierte Kern. Sie besitzen spezifische Granula, die saure Hydrolasen beinhalten. Zusätzlich exozytieren sie, neben weiteren Effektormolekülen, Defensive zur Erregerabwehr.

Mastzellen sind im Bindegewebe und der Schleimhaut angesiedelt. Sie enthalten Granula aus denen bei Antigenkontakt Heparin und Histamin freigesetzt wird. Mastzellen können spezifisch gegen Antigene gerichtete Immunglobulin E (IgE)-Moleküle binden und setzen bei erneuter Antigen-Antikörperbindung ihre Granulainhalte frei.

Die Komplementkaskade ist ein System von Plasmaproteinen, das als Kaskade von Reaktionen auf der Oberfläche von Krankheitserregern abläuft. Es werden in jedem Schritt aktive Komponenten mit verschiedenen Effektorfunktionen erzeugt. Neben Pathogenen können auch mit Antikörpern opsonierte Antigene die Komplementkaskade auslösen.

$\gamma\delta$ -T-Zellen sind nicht-MHC-restringierte Lymphozyten, die weder CD4 noch CD8 exprimieren. Ihr Rezeptor wird durch somatische Rekombination generiert, hat jedoch keine Antigenpezifität. Sie können Hitzeschockproteine, stressinduzierte Moleküle oder auch veränderte Glykosylierungsmuster auf Zielzellen erkennen und diese über Freisetzung zytotoxischer Granulainhalte abtöten. Durch Produktion inflammatorischer Zytokine haben sie hohes immunmodulatorisches Potenzial und spielen eine Rolle in Induktion und Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses (*Janeway 2002; NIH-Science-Education 2003*).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) entwickeln sich aus lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Sie identifizieren Zielzellen aufgrund fehlender MHC-I-Moleküle und setzen zytotoxische Mediatoren frei, die in Zielzellen Apoptose auslösen. Zellen mit erhöhter Expression stressinduzierter Moleküle wie "MHC-class-I-chain related" (MIC)-Proteine, werden ebenfalls von NK-Zellen abgetötet. NK-Zellen müssen nicht aktiviert werden, jedoch kann ihre Effizienz durch Interleukin (IL-) 12 und Interferon (IFN) gesteigert werden (*Kiessling et al. 1976; Janeway 2002; NIH-Science-Education 2003*).

### 1.1.3 Adaptive Immunität

Im Gegensatz zur angeborenen Immunität setzt die adaptive Immunantwort zeitverzögert ein. T- und B-Lymphozyten besitzen Rezeptoren mit Spezifität für jeweils ein bestimmtes Antigen. Da sie durch klonale Expansion vervielfältigt werden, erfolgt die adaptive Immunantwort zeitverzögert nach Antigenkontakt.

Charakteristisch für die adaptive Immunität ist zudem die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses. Ein Teil der Lymphozyten bleibt nach Eliminierung des Antigens als Gedächtniszellen erhalten und bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen wird eine rasche Immunreaktion gewährleistet (*Janeway 2002; NIH-Science-Education 2003*).

#### 1.1.3.1 Zelluläre Immunität

Die Zelluläre Immunreaktion basiert auf T-Lymphozyten. Diese entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, reifen jedoch im Thymus zu naiven T-Zellen heran. T-Zellen exprimieren Rezeptoren, die spezifisch für ein Antigenepitop sind. Durch somatische Rekombination in den T-Zellrezeptorgenen während der T-Zellreifung wird in jeder T-Zelle ein charakteristischer Rezeptor ausgebildet. Es entsteht eine große Anzahl naiver T-Zellen, die ein breites Spektrum an Rezeptoren und eine Vielzahl verschiedener MHC-Antigenspezifitäten aufweisen. Durch positive Selektion im Thymus werden zunächst T-Zellen selektiert, die in der Lage sind körpereigene MHC-Moleküle zu binden. Kontakt mit Autoantigenen auf MHC-Molekülen im Thymusstroma eliminiert anschließend T-Zellen, deren Rezeptor gegen körpereigene Peptide gerichtet ist. Dieser Vorgang ist als negative Selektion beschrieben. Gegen nicht körpereigene MHC-Moleküle oder gegen körpereigene Peptide gerichtete Lymphozyten sterben durch Apoptose. Naive, reife T-Zellen, die in die Peripherie entlassen werden, erkennen spezifisch körperfremde Peptidsequenzen, die von körpereigenen MHC-Molekülen präsentiert werden. Um ein Aktivierungssignal an T-Zellen zu senden, bedarf es neben der TCR-Peptid-MHC-Bindung zusätzlich der Bindung kostimulatorischer Moleküle. CD28 auf T-Zellen bindet CD80 bzw. CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen und löst T-Zellaktivierung aus (*Lenschow et al. 1996; Henry et al. 1999; Gonzalo et al. 2001*). Gleiches gilt für die Bindung von CD154 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD40 auf antigenpräsentierenden Zellen (*Janeway und Bottomly 1994; van Essen et al. 1995*).

Bei autoreaktiven T-Zellen, die vereinzelt in der Peripherie vorkommen, findet keine Kostimulation statt diese und T-Lymphozyten gehen in einen anergischen Zustand über. T-Lymphozyten unterscheiden sich durch Expression ihrer Korezeptoren. Während alle T-Zellen CD3-positiv sind, exprimiert eine Untergruppe CD4, eine zweite CD8 (*Janeway et al. 1988; Parnes 1989*). Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Peptidantigene, die an MHC-I-Molekülen präsentiert werden (*Norment et al. 1988*). MHC-I wird auf nahezu allen somatischen Zellen exprimiert und präsentiert intrazelluläre Antigene. Nach Bindung des Peptid-MHC-Komplexes werden von den CD8<sup>+</sup> T-Zellen zytotoxische Mediatoren, z.B. und Perforin und Granzym B freigesetzt. Perforin permeabilisiert die Zielzelle, so dass Granzym B eindringt und die Zelle lysiert wird (*Squier und Cohen 1994*).

CD4<sup>+</sup> Lymphozyten werden auch als T-Helferzellen (Th-Zellen) bezeichnet. Sie binden Peptidantigene, die über MHC-II auf antigenpräsentierenden Zellen gebunden sind (*Villadangos 2001*). Antigenpräsentierende Zellen phagozytieren und präsentieren extrazelluläre Antigene und präsentieren diese über MHC-II, zusätzlich zur MHC-I-Präsentation intrazellulärer Antigene (*Schlienger et al. 2000; Thery und Amigorena 2001*).

T-Helferzellen werden entsprechend ihrer Zytokinsekretion untergliedert in Th1- und Th2-Zellen. Th1-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\beta$  und IL-2. Dieses Zytokinprofil dient hauptsächlich der Makrophagenaktivierung. Th2-Zellen sekretieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. Sie stimulieren humorale Immunantworten (*Mosmann und Sad 1996*). Welche Entwicklung eine aktivierte T-Helferzelle einschlägt ist anhängig vom Zytokinmilieu der jeweiligen Immunreaktion (*Mosmann und Coffman 1989*).

Th17-Zellen sind eine weitere Untergruppe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Diese Zellen sekretieren IL-17, IL-17-F und IL-22 (*Bronte 2008; Korn et al. 2009*). Es erfolgt eine massive Entzündungsreaktion, die mit der Abwehr extrazellulärer Pathogene in Zusammenhang gebracht wird (*Chung et al. 2003; Kelly et al. 2005*). Außerdem ist eine Beteiligung an Autoimmunkrankheiten beschrieben (*Reiner 2007*). IL-23 spielt eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Th17-Antwort (*Bronte 2008*). An der Entwicklung von Th17-Zellen ist "Transforming growth factor" (TGF)- $\beta$  beteiligt, in Kombination mit IL-6 oder IL-21. Zusätzlich wird IL-21 als Wachstumsfaktor benötigt, sowie die Transkriptionsfaktoren "Signal transducer and activator of transcription"

(Stat)-3, " Retinoid-related orphan receptor" (ROR)- $\gamma$ t und ROR $\alpha$  (Korn et al. 2009).

Nach klonaler Expansion von T-Lymphozyten während einer Immunreaktion wird über CD152-Bindung an CD80 bzw. CD86 ein inhibierendes Signal gesendet. Die Aktivierungsschwelle für T-Zellen wird heraufgehoben und die Menge des sekretierten IL-2 verringert (Wolchok und Saenger 2008). Ein Teil der antigenspezifischen T-Lymphozyten stirbt nicht durch Apoptose, sondern differenziert zu Gedächtniszellen. Diese Zellen verbleiben in der Mukosa und garantieren bei einer Reinfektion mit dem gleichen Erreger eine schnellere zelluläre Immunantwort. Im Humansystem exprimieren T-Gedächtniszellen charakteristisch CD45RO (Butcher et al. 1999). Gedächtniszellen sind sehr langlebig und reagieren schon auf kleine Antigenmengen mit Proliferation. Aktivierung und Sekretion eines breiten Zytokinspektrums erfolgt schon bei geringer Kostimulation (Zinkernagel et al. 1996; Goldrath und Bevan 1999; Lanzavecchia und Sallusto 2000). Die meisten Gedächtniszellen befinden sich in einem ruhenden Stadium und durchlaufen nur wenige Zellteilungen (Goldrath und Bevan 1999; Westermann et al. 2001). IL-7 und IL-15 wurden als essentielle Zytokine zur Aufrechterhaltung der Gedächtnis-T-Zellen beschrieben (Zhang et al. 1998; Geginat et al. 2003).

Es können zwei Untergruppen von Gedächtniszellen unterschieden werden. "Central Memory Cells" sind in aufgrund ihrer "Homing"-Rezeptoren CCR7 und L-Selektin in lymphatischen Organen lokalisiert und besitzen ein hohes proliferatives Potenzial (Forster et al. 1999). "Effector Memory Cells" zeigen keine Expression dieser "Homing-Rezeptoren" und zirkulieren durch nicht-lymphatisches Gewebe. Sie sind vor allem für Zytokinproduktion nach Antigenstimulus verantwortlich. Durch Verlust ihrer "Homing-Rezeptoren" differenzieren "Central Memory Cells" zu "Effector Memory Cells" (Sallusto et al. 1999).

### 1.1.3.2 Humorale Immunität

Die B-Zellvermittelte humorale Immunantwort stellt eine Barriere für extrazelluläre Pathogene dar. Es werden Antikörper sekretiert, die in Blut und Extrazellularräumen zirkulieren oder in Lymphknoten angereichert sind.

B-Zellen reifen im Knochenmark zu naiven B-Zellen heran, die einen spezifischen B-Zellrezeptor auf der Zelloberfläche tragen. Dieser entsteht durch somatische Rekombination während der B-Zellreifung. B-Zellen, deren Rezeptor Selbstantigene

erkennt, werden eliminiert. B-Zellrezeptoren erkennen Antigene in naiver, löslicher Form. Am B-Zellrezeptor gebundene Antigene werden intrazellulär über das Immunproteasom abgebaut und an MHC-II präsentiert, so dass B-Zellen T-Lymphozyten aktivieren können. Nach Kontakt mit einem Th2-Lymphozyt der das gleiche Antigen erkennt reift die B-Zelle durch das Zytokinprofil der T-Helferzelle zur Plasmazelle heran. Lediglich einige thymusunabhängige Antigene vermögen B-Zellen direkt ohne T-Zellhilfe zu stimulieren. Plasmazellen sekretieren Antikörper, die die gleiche Spezifität aufweisen wie ihr B-Zellrezeptor. Antikörper können in fünf Immunglobulinklassen unterteilt werden (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM). Für jedes Antigen werden spezifische Antikörper produziert. Sie sind in der Lage Pathogene oder Toxine durch Bindung zu Neutralisieren, so dass Anheften an die Zelloberfläche und Eindringen in die Zelle verhindert werden. Extrazellulär vermehrte Erreger werden von Antikörpern opsoniert und zur Eliminierung durch Phagozyten oder das Komplementsystem gekennzeichnet.

## **1.2 Immunogenität maligner Erkrankungen**

Einige solide Tumoren, darunter auch das maligne Melanom, weisen im Vergleich höhere spontane Remissionsraten auf (*Jantzer und Schendel 1998; Emanuel et al. 2008*). Dies gilt sowohl für den Primärtumor als auch für Fernmetastasen. Am malignen Melanom wurden in 0,22-0,27% aller Fälle Spontanremissionen dokumentiert (*King et al. 2001; Emanuel et al. 2008; Kalialis et al. 2008*). Dieses, wenn auch sehr seltene, Phänomen gibt Hinweise auf die potenzielle Immunogenität des malignen Melanoms.

Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des Immunsystems zur Abwehr maligner Neoplasien ist ein erhöhtes Krebsrisiko bei Patienten mit medikamentöser oder infektiöser Immunsuppression (*de Visser et al. 2006; Zitvogel et al. 2006*). Am Beispiel des Melanoms konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Infiltration des Tumorgewebes mit zytotoxischen T-Zellen mit einer besseren Prognose korreliert (*Ladanyi et al. 2007*).

### 1.2.1 Tumorantigene

Die Veränderung gesunden Gewebes hin zu entarteten Tumorzellen geht mit einer Modifikation in der Proteinexpression einher. Tumorzellen lassen sich mittels im malignen Gewebe exprimierter Antigene von gesunden Zellen unterscheiden. Da die meisten Tumorantigene während der Ontogenese nicht präsent sind, entwickeln T-Zellen keine Resistenz.

1991 wurde mit "Melanoma associated antigen" (MAGE)-1 das erste Tumorantigen beim malignen Melanom charakterisiert (*van der Bruggen et al. 1991*). Seither wurden, auch bei anderen Tumorarten, zahlreiche weitere Tumorantigene beschrieben (*Jager et al. 1998; Van Den Eynde et al. 1999*). Tumorantigene beim malignen Melanom lassen sich aufgrund ihres Expressionsmusters in Kategorien einteilen (*Schultz und Schuler 2008*). Differenzierungsantigene wie Tyrosinase (*Brichard et al. 1993*), "Tyrosine related protein" (Trp)-1 und -2 (*Winder et al. 1994*), Melan-A (*Coulie et al. 1994*) und glycoprotein (gp)-100 (*Bakker et al. 1994*) sind spezifisch für das Gewebe, aus dem sich die Neoplasie entwickelt hat. Die Expression im Tumorgewebe ist hoch und i. d. R. sehr homogen.

Durch veränderte Transkription eines Gens können im Tumor Antigene im Vergleich zu Normalgewebe überexprimiert werden. Oft hat diese verstärkte Gentranskription funktionelle Relevanz für die Tumorprogression. Survivin (*Ambrosini et al. 1997*), "Melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan" (MCSP) (*Geiser et al. 1999*) und Telomerase (*Nair et al. 2000*) gehören zu dieser Gruppe der überexprimierten Tumorantigene. Neben Tumorzellen werden Cancer-Testis-Antigene wie MAGE (*Chomez et al. 2001*) ausschließlich im immunprivilegierten Gewebe der Keimbahn exprimiert.

Mutierte Antigene können charakteristisch für den Tumor eines individuellen Patienten sein oder aber in Tumoren vieler verschiedener Patienten gleichermaßen nachgewiesen werden. Ist ein gewisses Protein in vielen verschiedenen Tumoren homogen verändert, spielt es meist eine Rolle in der malignen Transformation der Tumorzellen wie z. B. "V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1" (BRAF) (*Davies et al. 2002*). Bei virusinduzierten Tumoren des Menschen werden auf Tumorzellen Antigene exprimiert, die vom viralen Genom kodiert sind (*Tabuchi et al. 1978; Gissmann et al. 1984*).

Da das Immunsystem von Krebspatienten prinzipiell Tumorantigene als fremd

erkennt, werden sie auf vielfache Weise in der Tumorimmuntherapie eingesetzt.

### **1.2.2 Tumorimmuntherapie**

Tumorzellen präsentieren veränderte Antigene über MHC-I-Moleküle. Sie werden von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten erkannt und lysiert, wobei über Bindung kostimulatorischer Moleküle zusätzliche Aktivierungssignale erzeugt werden (*Schoenberger et al. 1998*).

CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfüllen in der Tumorimmuntherapie eine wichtige Rolle in der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (*Hung et al. 1998*) sowie antigenpräsentierender Zellen. Durch Ausschüttung von IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wird die MHC-I-Expression verstärkt und zytotoxische T-Zellen können vermehrt angreifen. Auch spezifisch gegen Tumorantigene oder gegen Rezeptoren auf malignen Zellen gerichtete Antikörper haben Relevanz in der Immuntherapie. Zusätzlich zum adaptiven Immunsystem werden tumorantigenunabhängige Immuntherapiestrategien eingesetzt. Dies kann über Mechanismen der angeborenen Immunität geschehen, wenn MHC-I defiziente Tumorzellen von NK-Zellen lysiert werden (*Robertson und Ritz 1990; Whiteside und Herberman 1995*).

#### **1.2.2.1 aktive Immuntherapie**

Einer der ersten Immuntherapieansätze dieser Art war die Verwendung inaktivierter Tumorzellen als Vakzine. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass das maximale Repertoire an Tumorantigenen eingesetzt wird und viele verschiedene tumorreaktive T-Zellen generiert werden. Jedoch ist die Verfügbarkeit von Tumorzellen für die Vakzinierung vor allem bei Viszeraltumoren nicht immer gegeben. Hier sind neue Ansätze in der Kultivierung autologer und allogener Tumorzellen von Bedeutung (*Mocellin et al. 2004*). Tumorzellen können zur Vakzinierung *ex vivo* mit Zytokingenen transfiziert und dann im autologen System als Vakzine appliziert werden (*Simons et al. 1999*). Ebenso werden durch Fusion mit dendritischen Zellen Vakzine erzeugt, die immunmodulatorisch wirksame Zytokine sezernieren (*Maher und Davies 2004*).

Seit Identifikation einiger Tumorantigene konnten rekombinante Proteine direkt zur Vakzinierung eingesetzt werden. Da diese Proteine nach Applikation von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und intrazellulär prozessiert werden,

muss keine bestimmte Peptidsequenz bekannt sein um Präsentation über MHC-I oder –II zu erreichen (*Mocellin et al. 2004*). Vakzine aus bekannten immunogenen Peptidsequenzen sind nur für einen Teil der Patienten verfügbar, da nicht nur das entsprechende Tumorantigen exprimiert sein muss, sondern zusätzlich das entsprechende zur Bindung benötigte "human leukocyte antigen" (HLA)-Molekül (*Van Der Bruggen et al. 2002*).

Ein Vorteil bei Verwendung von tumorzellbasierten Vakzinen und Proteinvakzinen liegt darin, dass neben zytotoxischen T-Zellen auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen stimuliert werden. Dendritische Zellen gelten als die effektivsten antigenpräsentierenden Zellen zur Induktion einer T-Zellimmunantwort. Sie exprimieren große Mengen MHC-I und –II und liefern die erforderlichen kostimulierenden Signale um eine zelluläre Immunreaktion einzuleiten (*Figdor et al. 2004*). Das stimulatorische Potential dendritischer Zellen (DC) wird in der Immuntherapie genutzt, indem dendritische Zellen an Tumorantigene gekoppelt werden (*Vieweg und Jackson 2005*). Um dendritische Zellen mit immunogenen Peptiden zu beladen, muss die Peptidsequenz bekannt sein. Zusätzlich muss zur Induktion einer T-Zellantwort im Patienten der MHC-Typ übereinstimmen. Dies kann umgangen werden, indem dendritische Zellen mit Tumorzelllysaten beladen oder mit "messenger-ribonucleic acid" (mRNA) aus Tumorzellen transfiziert werden (*Ashley et al. 1997; Jäger 2002; Nair et al. 2002*). In klinischen Studien haben sich DC-Vakzine als sicher erwiesen, Nebenwirkungen sind als marginal einzustufen (*Mackensen et al. 2000; Jonuleit et al. 2001*).

Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Vakzine werden in eukaryotischen Expressionsplasmiden oder nicht replikationsfähigen viralen Vektoren per "gene gun" appliziert oder aber intramuskulär, intradermal oder intratumoral injiziert. Das Therapiekonzept stützt sich in diesem Fall auf Expression des codierten Proteins und Einleitung einer Immunantwort *in vivo* (*Kumar und Sercarz 1996; Rosenberg et al. 1998; Rice et al. 2008*). Ein Vorteil von DNA-Vakzinen sind die zusätzlich enthaltenen CpG-Sequenzen, die als Adjuvanz dendritische Zellen aktivieren (*Krieg 2002*).

RNA-Vakzine werden ebenfalls seit langem in klinischen Studien getestet. Zusätzlich zur Induktion einer adaptiven Immunantwort werden sie von antigenpräsentierenden Zellen über Toll-like-Rezeptoren erkannt (*Boczkowski et al. 1996; Weide et al. 2008*).

### 1.2.2.2 passive Immuntherapie

Aus klinischen Studien ist bekannt, dass tumorzellbasierte Vakzine, die durch genetische Veränderung "Granulocyte macrophage colony stimulating factor" (GM-CSF) oder IL-12 produzieren oder denen exogen GM-CSF zugesetzt wurde, zu einer verstärkten Infiltration des Tumors mit T-Lymphozyten und dendritischen Zellen führen (*Forni et al. 1995*). Interferone haben in der Immuntherapie zunächst zytotoxische und proliferationshemmende Wirkung. Hinzu kommt Induktion terminaler Differenzierung von Krebszellen sowie einige indirekte Effekte, die auf Produktion anderer Zytokine in der Interferon-Kaskade beruhen, vor allem IL-2 und "Tumor Necrosis Factor" (TNF). IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  haben sich besonders bei Behandlung hämatologischer Tumoren als vorteilhaft erwiesen (*Bubenik 1996*). Unter lokaler TNF $\alpha$ -Behandlung konnten in der Klinik ebenfalls gute Ergebnisse erzielt werden, besonders in Kombination mit IFN- $\gamma$  und Zytostatika (*Hieber und Heim 1994*).

Bei Verabreichung monoklonaler Antikörper zur passiven Immuntherapie gibt es verschiedene Herangehensweisen. Über Antikörper, die gegen Tumorantigene oder spezifisch auf malignen Zellen exprimierte Rezeptoren gerichtet sind, werden Tumorzellen antikörpervermittelter Lyse zugeführt (*Glennie et al. 2007; Azim und Azim 2008*). Monoklonale Antikörper werden außerdem eingesetzt, um spezifisch Rezeptoren, die an Krebsentstehung und Ausbreitung beteiligt sind, zu blockieren (*Norden et al. 2008; Patel 2008*).

Bispezifische Antikörper sind in der Lage, Immunzellen an maligne Zellen zu binden, um die Einleitung einer Immunantwort zu erleichtern (*Stanglmaier et al. 2008*). Antikörper können außerdem an Therapeutika gekoppelt sein, um diese dann zielgerichtet an maligne Zellen zu transportieren (*Goldenberg und Sharkey 2007*).

### 1.2.2.3 adoptive Immuntherapie

Zur adoptiven Immuntherapie werden Effektorzellen aus peripherem Blut, Lymphknoten oder Tumorgewebe des Patienten isoliert und *in vitro* aufbereitet. Die stimulierten und expandierten Zellen werden anschließend in den Patienten rücktransferiert.

Erste adoptive Immuntherapieansätze erfolgten unter Verwendung von Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK). Diese gehen aus NK-Zellen hervor und unterliegen

somit keiner MHC-Restriktion. Sie werden durch *in vitro*-Stimulation von Lymphozyten des peripheren Blutes mit IL-2 gewonnen (*Grimm et al. 1983; Yannelli und Wroblewski 2004*).

Die adoptive Immuntherapie unter Verwendung von T-Zellen erfolgt als individualisierte Behandlung im autologen System. Die Effizienz von Vakzinierungen lässt sich durch eine solche Behandlung deutlich erhöhen (*June 2007*). Zytotoxische T-Zellen, die nach Vakzinierung aus Lymphknoten oder peripherem Blut des Patienten gewonnen werden, können *in vitro* mit IL-2 stimuliert und in der Zellkultur expandiert werden. Anschließend erfolgt Rückinfusion in den chemotherapeutisch behandelten Patienten (*Yee et al. 2000; Yee et al. 2002*).

Auch aus dem Tumor direkt werden zytotoxische T-Zellen für eine adoptive Immuntherapie gewonnen und nach Chemotherapie in den Patienten rücktransferiert (*Kono et al. 2002*).

### **1.3 Tumor-induzierte Immunsuppression**

Obwohl auf allen humanen und experimentellen Tumoren Tumorantigene detektiert wurden, die im Prinzip eine Immunantwort auslösen können (*Schreiber und Rowley 2008*), kommen die oben skizzierten Immuntherapiestrategien häufig nicht völlig zum Tragen. Tumoren fördern aktiv Toleranzinduktion im Immunsystem und zahlreiche immunsupprimierende Mechanismen von Tumorzellen stehen der Immunerkennung maligner Neoplasien entgegen (*Rabinovich et al. 2007*).

Bei nicht-viralen Tumoren erfolgt Aktivierung antigenpräsentierender Zellen des adaptiven Immunsystems über zusätzliche "danger"-Signale wie stressinduzierte Proteine. Diese aktivieren dendritische Zellen, die dann in der Lage sind, Tumorpartikel aufzunehmen und T-Zellen zu aktivieren. Wächst der Tumor jedoch ohne Stresssignale zu erzeugen, so wird er vom Immunsystem zunächst toleriert (*Melief 2005*). Im Gegensatz dazu werden Tumoren, die eine effektive Immunantwort generieren, in einer ersten Phase vom Immunsystem erkannt und über zytotoxische T-Zellen eliminiert ("Eliminationsphase") (*Koebel et al. 2007*). Zellulärer Ursprung und Lokalisation des Tumors, Art der Transformation, sezernierte Zytokine, Tumorstromazellen und Immunogenität des Tumors bestimmen die Effektivität der Immunreaktion (*Dunn et al. 2004*). Die eingeleitete Immunantwort übt

---

Selektionsdruck auf die Tumorzellen aus, und maligne Zellen mit verstärkter Resistenz gegen die Immunabwehr formieren sich. Die Abwehrreaktion gegen den Tumor steht mit den neu nachwachsenden Zellen im Gleichgewicht ("Equilibrium"). Können resistente Tumorzellen der Immunabwehr entkommen und expandieren, so erfolgt ungebremsstes Tumorwachstum und der Tumor wird klinisch diagnostizierbar ("Escape"-Phase) (Dunn et al. 2002; Dunn et al. 2004; Dunn et al. 2004).

### 1.3.1 "Immune escape"-Strategien maligner Tumoren

Immunsuppressive Mechanismen, die es Tumoren ermöglichen der Immunabwehr zu entkommen, können durch Selektionsdruck des Immunsystems auf den Tumor ausgelöst werden oder aber bereits bei ersten transformierten Zellen einer Neoplasie bestehen (Dunn et al. 2004).

Unzureichende Präsentation von Tumorantigenen, bei der keine effektive Stimulierung zytotoxischer T-Zellen möglich ist, ist ein Beispiel wie maligne Tumoren der Immunabwehr entgehen. Während des Tumorwachstums steigt die Häufigkeit für Mutationen oder Gendeletionen an, so dass Tumorzellen entstehen, die keine immunogenen Antigene tragen. Solche "Antigen-loss-variants" können progressiv wachsen, da sie so der Immunerkennung völlig entkommen (Marincola et al. 2000).

Veränderungen in zur Antigenpräsentation wichtigen Molekülen können ebenfalls dazu führen, dass Tumorzellen von Immunzellen nicht mehr erkannt werden (Drake et al. 2006). Mutationen im  $\beta 2$ -Mikroglobulin-Gen oder Veränderungen auf transkriptionaler Ebene bewirken völliges Fehlen oder eine geringere Anzahl intakter MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche. Durch "Transporters associated with antigen processing" (TAP)-Defizienz oder durch Fehlen bestimmter Komponenten des Immunproteasoms ist keine MHC-I-vermittelte Antigenpräsentation möglich, da intrazellulär abgebaute Antigene nicht zur Präsentation an die Zelloberfläche transportiert werden können (Maeurer et al. 1996; Rivoltini et al. 2002; Whiteside 2006).

TGF- $\beta$ , sezerniert vom Tumor oder aber von Tumorstromazellen, verhindert T-Zellaktivierung, -proliferation und -differenzierung. In Tumorpatienten sind hohe TGF- $\beta$ -Spiegel im Serum Indikator für eine schlechte klinische Prognose (Ahmadzadeh und Rosenberg 2005). In experimentellen Tumormodellen und in Melanompatienten konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  bei zytotoxischen T-Zellen spezifisch alle

Effektorfunktionen wie Perforin- und Granzymausschüttung sowie Expression von IFN- $\gamma$  und CD95-L herunterreguliert (*Ahmadzadeh und Rosenberg 2005; Thomas und Massague 2005*).

Des Weiteren hat IL-10 supprimierenden Einfluss auf Tumorimmunantworten. Dendritische Zellen werden in ihrer Aktivität gehemmt, außerdem spielt IL-10 eine Rolle bei TAP-1 und -2-Verlust (*Gerlini et al. 2004; Kurte et al. 2004*).

Negative kostimulatorische Signaltransduktionswege verändern die anti-Tumorimmunantwort an wichtigen Schlüsselmolekülen und unterbinden damit effektive T-Zellantworten. In diesem Fall ist auch bei optimaler Antigenstimulierung keine Aktivierung möglich. Ein solcher Mechanismus ist der der Bindung von CD120a ("Programed death ligand 1", PD-L1) auf Tumorzellen mit B7-H1 und B7-DC auf tumorspezifischen T-Zellen (*Freeman et al. 2000; Blank et al. 2005*). Nach Interaktion über diese Rezeptoren wird über zwei gekoppelte Signaltransduktionskaskaden in CD8<sup>+</sup> T-Zellen Apoptose eingeleitet (*Dong et al. 2002; Lavrik et al. 2005*).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in Tumorzellen Immunregulation über Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) erfolgt (*Uyttenhove et al. 2003*). Dieses Enzym ist in den Aminosäureabbau, insbesondere in den Tryptophanmetabolismus, involviert. IDO-Expression wird über das Tumorsuppressorgen *Bin1* kontrolliert, das in vielen Tumoren verstärkt exprimiert ist (*Muller et al. 2005*). IDO-Expression wurde sowohl in antigenpräsentierenden Zellen als auch in Tumorzellen nachgewiesen, so dass potentiell zwei IDO-vermittelte Suppressionswege existieren (*Frey und Monu 2008*). In Patienten korreliert IDO-Expression in Lymphknoten mit einer schlechten klinischen Prognose (*Lee et al. 2005*).

Apoptoseresistenz vermittelt malignen Zellen ebenfalls die Möglichkeit, einem Immunangriff zu entgehen. T-Zellen und NK-Zellen vermögen über CD95-Expression in ihren Zielzellen durch Bindung an CD95-Ligand den programmierten Zelltod auszulösen. Tumorzellen können durch verschiedene Mechanismen, z. B. "B cell lymphoma 2" (BCL 2)- Proteinüberexpression, FLIP-Überexpression oder Sezernieren löslicher CD95-Moleküle, die kompetitiv CD95 binden, Apoptoseeintritt verhindern oder verringern (*Igney und Krammer 2002*). Hohe Serumtitel löslicher CD95-Moleküle in Krebspatienten sind mit einer schlechten klinischen Prognose verbunden (*Cheng et al. 1994; Midis et al. 1996; Ugurel et al. 2001*). "Decoy receptor

3" (DcR3)- Amplifikation wurde in humanen Primärtumoren nachgewiesen. Hier wird ebenfalls durch kompetitive Bindung an CD95-L die Apoptoserate bei Tumorzellen verringert (*Pitti et al. 1998; Roth et al. 2001*). Neben verstärkter Expression anti-apoptotischer Faktoren reduzieren Tumorzellen zusätzlich die Menge natürlicherweise vorkommender pro-apoptotisch wirkender Faktoren. Leserastermutationen im *BAX*-Gen und entsprechend niedrigere Expressionsraten kommen häufig vor und bewirken verstärkte Apoptoseresistenz bei Tumorzellen (*Rampino et al. 1997; Igney und Krammer 2002*).

Alle hier skizzierten Mechanismen kommen bei fortgeschrittenem Tumorwachstum synergistisch vor, um die Chance einer erfolgreichen anti-Tumorimmunantwort zu minimieren (*Pardoll und Allison 2004*).

### **1.3.2 Suppressive Immunzellen**

Neben Veränderungen auf Tumorzellen selbst wird verminderte Tumor-Immunabwehr auch durch Rekrutierung immunsuppressiver Zellen bewirkt. Diese Zellen, die in tumortragenden Organismen stark angereichert vorliegen, sind modifizierte Immunzellen, die ihre ursprüngliche Funktion der Tumorabwehr nicht mehr erfüllen. Sie induzieren aufgrund vieler verschiedener Mechanismen Toleranz des Immunsystems gegenüber malignen Zellen.

#### **1.3.2.1 Regulatorische T- Zellen**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die konstitutiv CD25, CD152, den glukokortikoidinduzierten TNF-Rezeptor (GITR) sowie den "forkhead box P3"- (FoxP3) Transkriptionsfaktor exprimieren, werden als regulatorische T-Zellen (Treg) bezeichnet (*Sakaguchi et al. 1995; Shimizu et al. 2002; Hori et al. 2003*). Natürlich vorkommende Treg reifen im Thymus und stellen ca. 5-10% des peripheren T-Zellrepertoires (*Wing et al. 2002*). Die physiologische Rolle regulatorischer T-Zellen besteht in der Unterdrückung autoreaktiver T-Zellen die zu Autoimmunkrankheiten mit massiver Gewebeschädigung führen würden (*Vieweg et al. 2007*).

Neben natürlich vorkommenden Treg sind im Blut von Krebspatienten Tumor-induzierte Treg angereichert. Sie entwickeln sich unter Einfluss von IL-10 aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (*Roncarolo et al. 2006*). Dies konnte z.B. für das Nierenzellkarzinom, Melanom (*Dannull et al. 2005; Cesana et al. 2006*) und

Lungenkarzinom (*Woo et al. 2002*) nachgewiesen werden. Treg-Akkumulation ist einer der meist verbreitetsten Mechanismen tumorinduzierter Immunsuppression, ihr Einfluss variiert jedoch in verschiedenen Neoplasien (*Sutmuller et al. 2001; Quezada et al. 2008*).

Für die inhibitorische Wirkung von Treg ist entweder direkter Zell-Zellkontakt mit der Zielzelle erforderlich oder Inhibition erfolgt über freigesetzte inhibitorische Zytokine (*Scheffold et al. 2007*). Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ , Fas, Granzym-B, "lymphocyte activated gene" (LAG)- 3 sowie "cytotoxic T lymphocyte antigen 4" (CTLA-4) von regulatorischen T-Zellen exprimiert werden und Zielzellen nach direktem Kontakt in ihrer Aktivität blockiert oder abgetötet werden (*Nakamura et al. 2001; Grossman et al. 2004; Paust et al. 2004; Bodor et al. 2007*).

Treg sekretieren inhibitorische Zytokine wie TGF- $\beta$ , IL-10 und IL-35 (*Collison et al. 2007; Vignali et al. 2008*) und gewährleisten damit ebenfalls suppressorische Wirkung auf T-Zellen. Dieser Vorgang ist nicht von direktem Zell-Zellkontakt anhängig.

Treg üben des Weiteren Einfluss auf Stoffwechselwege in T-Effektor-Zellen aus und schwächen somit ihre Immunantworten. Es wird zur Zeit diskutiert, ob hohe CD25-Expression auf Treg IL-2-Moleküle abfängt, die T-Effektor-Zellen als Stimulator benötigen (*Thornton und Shevach 1998; de la Rosa et al. 2004; Fontenot et al. 2005*). Durch CD39 und CD73 generieren Treg Adenosin-Nukleoside, die Effektorfunktionen von T-Zellen blockieren (*Kobie et al. 2006; Deaglio et al. 2007*). Transfer des sekundären Botenstoffes "cyclic adenosine monophosphate" (cAMP) aus Treg über "gap junctions" in T-Effektor-Zellen ist ein weiterer Mechanismus der Effektorzellsuppression (*Bopp et al. 2007*).

Über Wechselwirkungen mit dendritischen Zellen sind regulatorische T-Zellen ebenfalls in der Lage, Immunantworten zu schwächen. In präklinischen Modellen konnte in einer Reihe von Studien nachgewiesen werden, dass Treg und dendritische Zellen interagieren (*Vignali et al. 2008*). In einem CTLA-4 abhängigen Prozess werden dendritische Zellen in ihrer T-Zellaktivierung geschwächt (*Read et al. 2000; Oderup et al. 2006*). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Treg in dendritischen ZellenIDO-Expression auslösen, dessen Metabolite T-Lymphozyten hemmen (*Fallarino et al. 2003; Mellor und Munn 2004*). Durch Treg-induzierten Verlust von CD80 und CD86 ist keine effektive Kostimulation von T-Zellen durch

dendritische Zellen möglich (*Cederbom et al. 2000*).

### 1.3.2.2 Tolerogene Dendritische Zellen

Nach Phagozytose und Expression von Tumorantigenen sind dendritische Zellen in der Lage  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen zu stimulieren (*Van Gool et al. 2000; Preynat-Seauve et al. 2006*). Dendritische Zellen spielen physiologisch zusätzlich eine Rolle bei Erhaltung der peripheren Toleranz (*Steinman et al. 2003*). Diese tolerogenen dendritischen Zellen präsentieren Autoantigene ohne zusätzliche Kostimulation. T-Zellen, die für die präsentierten Autoantigene spezifisch sind, werden in einen anergischen Zustand versetzt, da immunsupprimierende Zytokine ausgeschüttet werden (*Fathman und Lineberry 2007*). Bei Krebspatienten, insbesondere mit metastasierten Tumoren, ist die Anzahl dendritischer Zellen herabgesetzt (*Pinzon-Charry et al. 2007*) und deren Effektivität zur Induktion einer T-Zellantwort geringer (*Kim et al. 2006*).

Vom Tumor sezernierte immunsuppressive Zytokine wie "Vascular endothelial growth factor" (VEGF), TGF- $\beta$ , IL-6 und IL-10 stören die normale Ausreifung von Monozyten zu funktionellen dendritischen Zellen und führen zur Entstehung eines tolerogenen Phänotyps (*Gabrilovich et al. 1996; Enk et al. 1997; Steinbrink et al. 1997; Geissmann et al. 1999*). Der von Tumorzellen exprimierte Transkriptionsfaktor Stat3 löst VEGF- und IL-10-Sekretion aus. Dendritische Zellen exprimieren aufgrund der inhibitorischen Zytokine ebenfalls Stat3 und reifen nicht zu funktionellen antigenpräsentierenden Zellen heran (*Gabrilovich 2004*).

Die Expression von MHC-II sowie kostimulatorischen Molekülen ist bei tolerogenen dendritischen Zellen unterdrückt (*Geissmann et al. 1999*), dieIDO-Expression hingegen erhöht (*Lob und Konigsrainer 2008*). Bei Kontakt von T-Lymphozyten mit tolerogenen dendritischen Zellen werden immunsupprimierende Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10 ausgeschüttet, so dass  $CD8^+$  T-Zellen in einen anergischen Zustand übergehen (*Gabrilovich 2004*) und  $CD4^+$  T-Zellen zu Treg differenzieren (*Enk 2005; Mahnke et al. 2007*). Durch VEGF induzierte tolerogene dendritische Zellen tragen auch bei zur vermehrten Bildung von IL-10-produzierenden "T regulatory like cells" mit erhöhter Expression von CD152 auf  $CD4^+$  T-Lymphozyten (*Jonuleit et al. 2000*).

### 1.3.2.3 Myeloide Suppressorzellen

Während einer akuten Immunreaktion muss das Immunsystem Gewebeschäden verhindern, die durch eine andauernde Entzündungsreaktion ausgelöst werden würden. Dies geschieht durch kurzzeitige Anreicherung von Zellpopulationen, die die T-Zell-Funktion herunterregulieren und nach Eliminierung des Antigens die Immunreaktion beenden (*Serafini et al. 2006*). Myeloide Suppressorzellen ("Myeloid Derived Suppressor Cells", MDSC) sind physiologisch an diesem Rückkopplungsmechanismus beteiligt. Des Weiteren spielen sie eine Rolle zur Eindämmung autoreaktiver T-Zellen und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz (*Dolcetti et al. 2008*).

Das Vorkommen von MDSC ist oft beschrieben, jedoch wurde diese Population lange nicht einheitlich definiert und sowohl als "Myeloid suppressor cells" (*Bronte et al. 2000*) wie auch als "Immature myeloid cells" geführt (*Gabrilovich et al. 2001*). MDSC sind Zellen myeloider Abstammung. Diese sehr heterogene Population beinhaltet unreife Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten in unterschiedlichen Differenzierungsstadien (*Serafini et al. 2006; Gabrilovich et al. 2007*).

#### *Lokalisation*

Humane MDSC werden sowohl im peripheren Blut der Patienten als auch im Tumorstroma gefunden (*Pak et al. 1995; Young et al. 1997*).

In gesunden Mäusen sind MDSC besonders im Knochenmark lokalisiert, ihre Anzahl schwankt je nach genetischem Hintergrund der Mauslinie. Zu geringeren Anteilen befinden sich MDSC auch in Milz und Blut (*Serafini et al. 2004; Serafini et al. 2006; Sinha et al. 2008*). Bei Tumorwachstum infiltrieren MDSC ins Tumorstroma und liegen z. T. auch in metastasenhaltigem Lymphknotengewebe vor (*Serafini et al. 2004; Marigo et al. 2008*).

#### *Marker*

Humane MDSC sind hinsichtlich ihrer Marker bisher noch nicht ausreichend charakterisiert. In peripherem Blut von Kopf-Hals-Tumorpatienten sowie Lungen- und Brustkrebspatienten wurden  $CD34^+CD33^+CD15^-$  Zellen nachgewiesen, die T-Zellantworten unterdrücken können (*Almand et al. 2001*). Bei Patienten mit malignem

Melanom wurde im Blut eine CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Suppressorzellpopulation beschrieben (*Filipazzi et al. 2007*). In einer weiteren Studie wurden im Blut von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren sowie in Patienten mit multiplen Myelom CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> potenzielle MDSC detektiert (*Serafini et al. 2006*). Neben diesen eher monozytischen Zellen wurden auch vornehmlich granulozytäre MDSC im Humansystem beschrieben, die z.B. als CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut angereichert werden (*Schmielau und Finn 2001; Zea et al. 2005*). Innerhalb der humanen MDSC-Population konnten anhand der Expression von CD11c und HLA-DR zwei Unterpopulationen eingeteilt werden: unreife monozytische DC und frühe Differenzierungsstadien (*Almand et al. 2001*). Generell werden humane MDSC in einen neueren Ansatz in Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup> oder CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD33<sup>+</sup> eingeteilt (*Gabrilovich und Nagaraj 2009*). Die Expression von CD14 in potenziellen humanen MDSC wird jedoch zur Zeit noch kontrovers diskutiert (*Zea et al. 2005; Filipazzi et al. 2007*). In murinen Tumormodellen wurden MDSC definiert als CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>F4/80<sup>int</sup>CD11c<sup>schwach</sup> MHC-II<sup>-/schwach</sup> ER-MP58<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> (*Bronte et al. 1998; Bronte et al. 2000; Gallina et al. 2006*). Außerdem ist die Koloniebildung in Agar ein weiteres Charakteristikum dieser Zellen (*Melani et al. 2003*). In experimentellen Tumor- und Infektionsmodellen sind murine MDSC zusätzlich CD80<sup>+</sup> (*Mencacci et al. 2002; Yang et al. 2006*). CD11b<sup>+</sup> MDSC gliedern sich in Gr1<sup>+</sup> und Gr1<sup>++</sup> Zellen. Beide Populationen unterscheiden sich phänotypisch und funktionell: Gr1<sup>++</sup> Zellen sind als polymorphkernig, IL-4R $\alpha$ <sup>schwach/-</sup> und nicht T-Zell-suppressiv beschrieben, während monozytische Gr1<sup>+</sup> Zellen IL-4R $\alpha$  exprimieren und zytotoxische T-Zellen supprimieren (*Marigo et al. 2008*).

### *Funktionale Aktivität*

IFN- $\gamma$ -Sekretion von aktivierten T-Zellen führt während einer inflammatorischen Reaktion zur Rekrutierung von MDSC, die über verschiedene Mechanismen T-Zell-Überaktivierung verhindern (*Sercan et al. 2006*). Bei Antigenstimulation während einer chronischen Entzündungsreaktion wird kontinuierlich IFN- $\gamma$  ausgeschüttet und MDSC reichern sich an, da das entzündungsauslösende Antigen nicht eliminiert werden kann (*Baniyash 2004*). Dieser Prozess wird induziert durch die inflammatorischen Proteine S100A8/A9 (*Cheng et al. 2008; Sinha et al. 2008*). In Tumormausmodellen wurden erhöhte Anzahlen von MDSC in peripheren

lymphatischen Organen, im Blut und im Tumorstroma festgestellt (*Serafini et al. 2004; Serafini et al. 2006*). Die Anzahl der detektierten MDSC nahm während des Tumorwachstums abhängig von Wachstumszeitraum und Tumorgröße zu (*Melani et al. 2003; Sinha et al. 2005*). Zur Zeit wird untersucht, inwieweit verschiedene Tumoren auch MDSC-Einwanderung in Lymphknoten induzieren (*Marigo et al. 2008*).

Auch bei Superantigenstimulation (*Cauley et al. 2000*), bakteriellen Infektionen (*al-Ramadi et al. 1991; Ezernitchi et al. 2006*), Pilzinfektionen (*Angulo et al. 2002; Mencacci et al. 2002*), "Graft versus host"-Krankheit und Autoimmunerkrankungen (*Bronte et al. 2001; Kusmartsev und Gabrilovich 2002; Serafini et al. 2004*) werden in murinen Modellen, einhergehend mit persistierender Antigenstimulation, erhöhte MDSC-Mengen beschrieben. Während glukokortikoidinduzierter Immunsuppression konnte ebenfalls eine Zunahme von MDSC beobachtet werden (*Varga et al. 2008*).

Bei Krebspatienten werden MDSC im peripheren Blut angereichert, z.B. im Plattenepithelzellkarzinom, Kopf-Hals-Tumoren, Melanom, Leberzellkarzinom, Lungen- und Brustkrebs (*Almand et al. 2001; Filipazzi et al. 2007; Hoechst et al. 2008*). Tumorassoziierte MDSC und MDSC in peripheren lymphatischen Organen unterscheiden sich auf funktioneller Ebene. MDSC im Tumorstroma exprimieren konstitutiv Arginase (Arg1) und induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (iNOS) während diese in MDSC aus peripheren lymphatischen Organen erst induziert werden müssen (*Serafini et al. 2006*).

### *Rekrutierung*

Tumorwachstum, Infektion oder andere Veränderungen im Immunsystem können ein verändertes Zytokinprofil bewirken. Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen reifen nicht komplett heran, sondern werden in einem unreifen Stadium angereichert (*Maecker et al. 2006; Serafini et al. 2006*). *In vitro* lösen tumorassoziierte Faktoren im Kulturmedium Januskinase (Jak)- 2 und Stat3-Aktivierung in Monozyten aus, verhindern ihre Ausreifung zu dendritischen Zellen und bewirken Akkumulation von MDSC (*Kusmartsev et al. 2004*). Viele verschiedene vom Tumor sekretierte Faktoren, z. T. auch in Tumor-Exosomen, bewirken synergistisch die Migration von MDSC aus dem Knochenmark in die Milz und von dort in Lymphknoten und ins Tumorstroma (*Serafini et al. 2006; Marigo et al. 2008*).

Hier sind wiederum andere Zytokine daran beteiligt, die immunsuppressive Wirkung der MDSC zu erhalten bzw. zu verstärken. Tabelle (Tab.) 1.3.2.3.1 gibt einen Überblick über Faktoren, die an der MDSC-Rekrutierung in lymphatische Organe bzw. ihrer suppressiven Wirkung auf T-Zellen beteiligt sind.

<b><i>Tumorassoziierte Faktoren</i></b>	<b><i>Referenz</i></b>
"Epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78" (ENA-78)	(Yang et al. 2008)
"Granulocyte colony stimulating factor" (G-CSF)	(Sawanobori et al. 2008)
"Granulocyte macrophage colony stimulating factor" (GM-CSF)	(Parmiani et al. 2007) (Filipazzi et al. 2007)
Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	(Baniyash 2004)
Interleukin 1 $\beta$ (IL1- $\beta$ )	(Bunt et al. 2006)
Interleukin 6 (IL-6)	(Pan et al. 2008)
Interleukin 10 (IL-10)	(Chen et al. 2001)
Interleukin 12 (IL-12)	(Li et al. 2004)
Interleukin 13 (IL-13)	(Terabe et al. 2004)
"Macrophage colony stimulating factor" (MCSF)	(Bronte et al. 1999)
"Monocyte chemotactic protein-1" (MCP-1)	(Huang et al. 2007)
Prostaglandine (PG)	(Sinha et al. 2007) (Rodriguez et al. 2005)
"Stem cell factor" (SCF)	(Pan et al. 2008)
"Stromal cell derived factor 1" (SCDF-1)	
"Vascular endothelial growth factor" (VEGF)	(Melani et al. 2003)

**Tab. 1.3.2.3.1** An Rekrutierung von MDSC beteiligte tumorassoziierte Faktoren

### *Zytokinsekretion*

Es konnte in der Vergangenheit nachgewiesen werden, dass MDSC eine Reihe wichtiger immunmodulatorischer Zytokine ausschütten, die zu ihrer eigenen Verbreitung sowie zu ihrer immunsuppressorischen Wirkung auf T-Lymphozyten beitragen. Tab. 1.3.2.3.2 stellt die bisher bekannten von myeloiden Suppressorzellen sezernierten Zytokine zusammen.

<b>MDSC-sezernierte Zytokine</b>	<b>Referenz</b>
Interferon $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	(Baniyash 2004)
Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	(Umemura et al. 2008)
Interleukin 10 (IL10)	(Chen et al. 2001)
Interleukin 13 (IL-13)	(Gallina et al. 2006)
"Transforming growth factor- $\beta$ " (TGF- $\beta$ )	(Terabe et al. 2003)
"Tumor necrosis factor- $\alpha$ " (TNF- $\alpha$ )	(Umemura et al. 2008)

**Tab. 1.3.2.3.2** MDSC-sezernierte Zytokine

### *Immunsuppression*

Die wichtigsten Effektorfunktionen in MDSC werden über Arg1 und iNOS vermittelt. In experimentellen Modellen beeinflussen Tumortyp, genetischer Hintergrund mit Präferenz auf Th1- oder Th2- Immunantworten sowie das Krankheitsstadium, ob bevorzugt Arg1 oder iNOS exprimiert wird (Marigo et al. 2008). Beide Enzyme konnten in murinen wie auch humanen MDSC nachgewiesen werden (Bronte et al. 2005) und metabolisieren die Aminosäure L-Arginin.

Arg1-Expression wird stimuliert von Th2-Zytokinen, TGF- $\beta$ , MCP-1, GM-CSF und erfordert Expression von Stat6 (Marigo et al. 2008). Arginasaktivität wurde sowohl im Serum als auch im Tumorstroma von Patienten mit verschiedenen malignen Neoplasien detektiert (Porembaska et al. 2002; Porembaska et al. 2003) und als Marker für Tumorprogression beschrieben (Polat et al. 2003). Arg1 ist zytoplasmatisch lokalisiert, verstoffwechselt L-Arginin zu Harnstoff und L-Ornithin und ist, im Gegensatz zu Arg2, nur nach Induktion aktiv.

Hohe Arg1-Aktivität in MDSC führt zu Depletion von L-Arginin und Anreicherung von Harnstoff in der Mikroumgebung. Aufgrund des Aminosäuremangels unbeladene mRNA-Moleküle lösen über einen noch nicht vollständig geklärten Signalweg unter Beteiligung von "General control non-depressible 2 kinase" (GCN2) und "Mammalian target of rapamycin" (mTOR) veränderte RNA-Translation in T-Zellen aus. Die  $\zeta$ -Kette im CD3-Molekül wird daraufhin nicht korrekt im T-Zellrezeptor integriert (Bronte und Zanovello 2005).

iNOS-Expression wird induziert über das Th1-Zytokin IFN- $\gamma$ , zusätzlich über TNF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-1, VEGF, GM-CSF und IL-6 (Bronte und Zanovello 2005; Serafini et

al. 2006) und wurde in MDSC bei Patienten als Tumorprogressionsmarker nachgewiesen (Johansson et al. 2008). iNOS setzt L-Arginin in NO und Citrullin um. NO nitrosyliert Cystein-Reste in Signalproteinen der T-Zellaktivierungskaskade, so dass Phosphorylierung von essentiellen Signaltransduktionsmolekülen verhindert wird. Außerdem aktiviert NO Guanylat-Zyklase und zyklisches-GMP (cGMP)-abhängige Proteinkinasen. Hohe cGMP-Spiegel verringern die Stabilität von IL-2-mRNA und verringern die IL-2-Ausschüttung der T-Zellen (Bronte und Zanovello 2005).

Im Gegensatz zu Makrophagen, bei denen Arg1 und iNOS sich gegenseitig hemmen, tritt in MDSC ein Synergismus beider Enzyme auf (Bronte und Zanovello 2005). Arg1 reduziert intrazellulär für iNOS verfügbares L-Arginin, so dass iNOS O<sub>2</sub>-Radikale produziert. Diese hochreaktiven Sauerstoffradikale reagieren weiter zu T-zellschädigenden Verbindungen wie "reactive nitrogen-oxide-species" (RNOS) und "reactive oxygen species" (ROS).

Kürzlich konnte ein neuer suppressorischer Mechanismus bei MDSC charakterisiert werden. In einem murinen Leberkrebsmodell erfolgte Inhibition von NK-Zellen durch membrangebundenes TGF- $\beta$  auf MDSC (Li et al. 2009).

#### *Interaktion mit Treg*

Es wurde berichtet, dass Bindung von CD80 auf MDSC und CD152 auf Treg einen suppressiven Mechanismus darstellt, mit dem IFN- $\gamma$ -Produktion bei Lymphozyten verhindert wird (Marigo et al. 2008). Zahlreiche weitere Studien belegen eine Interaktion beider suppressiver Zellpopulationen, wenn auch der Mechanismus gegenseitiger Induktion bisher nicht vollständig geklärt ist.

In einem experimentellen Modell des Lymphoms wurde nachgewiesen, dass MDSC als antigenpräsentierende Zellen fungieren und Treg-Proliferation induzieren (Serafini et al. 2008). In einem experimentellen Tumormodell konnte nachgewiesen werden, dass durch IFN- $\gamma$  aktivierte MDSC unter TGF- $\beta$  und IL-10 Treg induzieren, Effektorzellen hingegen hemmen (Huang et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse erbrachte auch eine Studie an Krebspatienten (Hoechst et al. 2008).

### *MDSC-vermittelte Verringerung der TCR- $\zeta$ -Kette*

Die TCR- $\zeta$ -Kette ist ein essentieller Teil des T-Zellrezeptors (TCR) sowie den Rezeptoren NKp46, NKp30 und CD16 in NK-Zellen (*Weissman et al. 1988; Baniyash et al. 1989; Lanier et al. 1989*). Das TCR- $\zeta$ -Molekül ist ein Homodimer, das durch Disulfidbrücken verbunden ist. Es besteht aus einer kurzen extrazellulären Domäne und einem langen Intrazellulärbereich, der die zur Signaltransduktion notwendigen "Immunoreceptor tyrosine based activation motifs" (ITAMS) enthält. Die TCR- $\zeta$ -Kette spielt eine wichtige Rolle für die Struktur des TCR und stabilisiert das Molekül an der Zelloberfläche. Nur TCR, die das  $\zeta$ -Homodimer korrekt exprimieren, gelangen an die Zelloberfläche (*Baniyash 2004*). In gesunden Organismen ist die TCR- $\zeta$ -Kette der limitierende Faktor für die korrekte Anordnung des T-Zellrezeptors an der Zelloberfläche, bestimmt also die Anzahl der TCR pro Zelle. Korrekte TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression ist essentiell für Signaltransduktion nach TCR-MHC-Peptidkomplexbildung und zur Vermittlung der Effektorfunktion in T- und NK-Zellen (*Baniyash 2004*).

Durch L-Arginin-Metabolismus in MDSC, die durch chronische Antigenstimulation akkumuliert sind, kommt es zur Produktion immunsuppressiver Metabolite, die die Expression der  $\zeta$ -Kette im TCR unterbinden. Die TCR- $\zeta$ -Kette wird dann innerhalb einer kürzlich identifizierten 35 Aminosäuren langen Region zur lysosomalen Degradation markiert und wird nicht mehr in allen CD3-Molekülen exprimiert (*Vaknin et al. 2008*).

Verringerte Expression der TCR- $\zeta$ -Kette durch MDSC-vermittelte Immunsuppression bewirkt bei einer Th1-Antwort Anergie der betroffenen aktivierten Lymphozyten und Immunsuppression. Im adaptiven Immunsystem sind T-Zell-Proliferation nach Antigenstimulus und IFN- $\gamma$ -Produktion herabgesetzt (*Baniyash 2004; Kusmartsev und Gabrilovich 2006*). TCR, denen die  $\zeta$ -Kette fehlt, werden lysosomal abgebaut (*Alarcon et al. 2003*), in einigen Fällen ersetzt eine Fc $\epsilon$ R $\gamma$ -Kette den fehlenden Part, kann aber die Funktionalität des TCR nicht wiederherstellen (*Mizoguchi et al. 1992*). Viele verschiedene maligne Neoplasien zeigen herunterregulierte TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in tumorinfiltrierenden T-Zellen (TIL) und in T-Zellen aus peripherem Blut (*Ferrandina et al. 2006; Gruber et al. 2008*). TCR- $\zeta$ -Expression in TIL wurde außerdem als prognostischer Faktor für die Überlebensrate von Krebs-Patienten

herangezogen (*Reichert et al. 2001; Ishigami et al. 2002*). Neben malignen Neoplasien vermitteln angereicherte MDSC TCR- $\zeta$ -Ketten-Herunterregulation in T-Zellen auch bei chronischen bakteriellen Infektionen (*Bronstein-Sitton et al. 2003; Zea et al. 2006; Delano et al. 2007*), Autoimmunerkrankungen (*Liossis et al. 1998*), Virusinfektionen (*Stefanova et al. 1996*) und "Toll-like-Rezeptor" (TLR)-vermittelten Entzündungsprozessen (*Vaknin et al. 2008*). Auch NK-Zellen sind durch TCR- $\zeta$ -Ketten-Verlust immunsupprimiert (*Frydecka et al. 1999; Geertsma et al. 1999*). Von der Immunsuppression durch MDSC sind zunächst nur aktivierte T-Zellen betroffen, in späteren Stadien kommt es jedoch zu einer generalisierten Suppression, unter der auch opportunistische Infektionen auftreten können (*Baniyash 2004; Marigo et al. 2008*). Verminderte TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression unter MDSC-Einfluss ist reversibel. Nach Eliminierung des Antigens bzw. der von MDSC sekretierten immunsuppressiven Faktoren wird der TCR vollständig an der Zelloberfläche ausgebildet (*Baniyash 2004; Ezernitchi et al. 2006*).

#### *Blockierung von MDSC*

In vielen experimentellen Modellen konnte gezeigt werden, dass Resektion des Tumors oder Depletion von Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> MDSC die T-Zellimmunantwort verbessert (*Bronte et al. 1998; Bronte et al. 1999; Danna et al. 2004*). MDSC können, bei entsprechender Veränderung des Zytokinmilieus, zu Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten ausreifen (*Pak et al. 1995; Bronte et al. 2000*). Inhibition der Stat3-Phosphorylierung ist ebenfalls möglicherweise geeignet, die Suppression aufzuheben und Differenzierung der MDSC zu induzieren (*Nefedova et al. 2004*).

Viele Strategien zur Inhibition von MDSC und auch einige pharmakologische Inhibitoren sind aufgrund ihrer Nebenwirkungen jedoch nicht applikabel (*Serafini et al. 2006*). Vielversprechende pharmakologische Ansätze in der Vergangenheit waren Induktion der MDSC-Differenzierung durch ATRA ("All trans retinoic acid") (*Kusmartsev et al. 2003*) sowie Eliminierung granulozytischer Zellen durch das Vitamin D3-Metabolit "A25-dihydroxyvitamin D3" (*Young et al. 1996*). Im Tumormodell des Lungenkrebses und Mesothelioms konnte mit Gemcitabine Neutralisierung der MDSC erreicht werden (*Suzuki et al. 2005*). Des Weiteren waren antiinflammatorische Wirkstoffe wie Aspirin vielversprechend (*De Santo et al. 2005*). Kürzlich wurde gezeigt, dass auch pharmakologische Phosphodiesterase-5 (PDE-5)-

Inhibition die NO-Sekretion bei MDSC reduzieren kann. PDE-5-Blockade reichert intrazellulär cGMP an und durch negative Rückkopplung auf mRNA-Ebene wird iNOS in MDSC gehemmt. Es kommt zu verminderter NO-Sekretion von MDSC, so dass die suppressorische Aktivität der MDSC gegenüber T-Zellen schwächer wird. Dies äußert sich in einem signifikant verbesserten anti-Tumor-Effekt (*Serafini et al. 2006*).

#### **1.4 Das maligne Melanom**

Hautkrebs ist eine der am häufigsten diagnostizierten neoplastischen Erkrankungen. Das maligne Melanom (schwarzer Hautkrebs) stellt unter ihnen eine sehr aggressive Tumorform dar und hat, verglichen mit anderen Hauttumoren, eine dreifach erhöhte Mortalitätsrate (*Ilkovitch und Lopez 2008*). Die Tumoren bilden sich ausgehend von transformierten Melanozyten meist in der Haut, seltener in Retina und Uvea des Auges, in Schleimhäuten oder Hirnhaut. Charakteristisch für das maligne Melanom ist eine ausgeprägte Metastasierungstendenz schon bei geringer Tumorgöße (*Hurst et al. 1999; Houghton und Polsky 2002; Rahimi-Movaghar und Karimi 2003*). Bei bereits ausgebildeten Fernmetastasen überleben nur 6% der Patienten länger als fünf Jahre (*Barth et al. 1995*).

Entsprechend der "Tumor, Node, Metastasis" (TNM-Einteilung) können vier Melanomstadien unterschieden werden. In Stadium I breiten sich die Tumorzellen horizontal-intraepidermal aus (Melanom *in situ*). Der Tumor ist noch dünner als 1,5 mm. Hat ein Tumor diese Größe überschritten, wird er dem Stadium II zugerechnet. In Stadium III erfolgt Metastasierung der umgebenden Haut oder Lymphknoten. Tumorzellen verbreiten sich per Blut- und Lymphgefäße weiter und metastasieren in Lunge, Leber, Haut, Knochen oder Gehirn. Nach Ausbilden dieser Fernmetastasen ist Stadium IV und damit eine systemische Erkrankung erreicht (*Balch 2002*).

Entsprechend des Krankheitsverlaufs und der Invasivität des Melanoms unterscheidet man vier Subtypen: superfiziell spreitendes, noduläres, Lentigo-maligna- und akrolentiginöses Melanom (*Reed und Martin 1997*).

### 1.4.1 Standardtherapie des malignen Melanoms

Ein malignes Melanom wird, sofern möglich, zunächst durch chirurgischen Eingriff entfernt. Meist werden die regionalen Lymphknoten gleichzeitig auf Tumorbefall überprüft (*Thorn et al. 1996*).

Das maligne Melanom ist durch eine ausgeprägte Chemotherapieresistenz gekennzeichnet, deren zugrundeliegenden molekularen Ursachen nicht vollständig aufgeklärt sind (*Rockmann und Schadendorf 2003*). Chemotherapie muss deshalb beim Melanom als rein palliativ angesehen werden. Dakarbazin und Temozolamid werden einzeln oder als Kombinationspräparat verabreicht. Die Ansprechrate auf Dakarbazinmonotherapie liegt bei bis zu 28,6% partielle Remissionen. Komplette Remissionen werden in bis zu 8% aller Fälle erzielt, jedoch nur für drei bis sechs Monate (*Serrone et al. 2000*).

Strahlentherapie hat sich bei der Behandlung des malignen Melanoms als relativ wirkungslos erwiesen, wird jedoch angewandt, um nach operativer Tumorsektion minimal zurückbleibendes Tumorgewebe zu behandeln (*Mendenhall et al. 2008*).

Als adjuvante Therapie ist bei malignen Melanom zusätzlich IFN- $\alpha$  indiziert, das Onkogenexpression negativ sowie Tumorsuppressorgenexpression positiv zu beeinflussen vermag (*Fang et al. 2008*). Immunologische Wirkung von IFN- $\alpha$  beruht auf Erhöhung der MHC-I-Expression bei Tumorzellen und Verbesserung der Immunogenität des Tumors. IFN- $\alpha$ -Therapie ist in der Lage, die Rückfallquote nach Tumorbehandlung zu senken und die Überlebensrate um 15% zu steigern (*Fang et al. 2008*).

IL-2-Gabe ist bis heute das einzige "Food and drug-administration" (FDA)-zugelassene Immuntherapeutikum bei metastasiertem malignen Melanom. Es spielt eine entscheidende Rolle bei Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen. 1985 wurde die erste klinische Studie durchgeführt (*Rosenberg et al. 1985*), der weitere folgten und auf die nur wenige Patienten komplett ansprachen (*Rosenberg et al. 1994*). Allerdings kam es in der nachfolgenden 15jährigen Beobachtungsphase bei keinem dieser Patienten zu einem Rückfall (*Fang et al. 2008*). Applikation von hochdosiertem IL-2 ist bei Patienten jedoch auch kritisch zu betrachten, da regulatorische T-Zellen angereichert werden, die negative Therapieeffekte und Suppression induzierter zytotoxischer T-Zellen bewirken können (*Ahmadzadeh und Rosenberg 2006*).

Neben den hier aufgeführten Standardtherapien werden weitere immunologische Therapieansätze in der Klinik erprobt und verbessert.

### **1.4.2 Immuntherapie des malignen Melanoms**

#### *Anti-CTLA-4-Therapie*

Ipilimumab und Tivolumab sind humanisierte anti-CTLA-4-Antikörper, die in klinischen Studien der Phase I und II erprobt wurden. Monotherapie in vorbehandelten Melanompatienten erbrachte Ansprechraten von bis zu 15% (*Korman et al. 2005; Ribas et al. 2005*), bei gleichzeitiger Gabe einer Peptidvakzine konnten in drei von 14 Patienten Tumorremissionen erzielt werden (*Phan et al. 2003*).

#### *Toll-like-Rezeptor-Agonisten*

Durch Vernetzung von TLR werden zusätzliche "danger-Signale" ausgesendet, die zu einer Immunstimulation führen, Sekretion proinflammatorischer Zytokine induzieren und dendritische Zellen aktivieren (*Krieg 2004*). In klinischen Studien wurde synthetisches "Deoxycytidyl-deoxyguanosine oligodesoxynucleotides" als TLR9-Agonist in Kombination mit einer Peptidvakzine eingesetzt und erhöhte die Anzahl zirkulierender tumorantigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen (*Speiser et al. 2005*). TLR7-Agonist Imiquimod wurde erfolgreich bei ansonsten nicht behandelbarem metastasiertem Melanom eingesetzt (*Steinmann et al. 2000; Ray et al. 2005*).

#### *Vakzinierung*

Obwohl erste Studien mit gegen mehrere Tumorantigene gerichteten polyvalenten Vakzinen vielversprechend verliefen (*Morton et al. 1992*), konnte kein signifikanter klinischer Behandlungsvorteil detektiert werden. In nachfolgenden Studien wurden einzelne tumorantigenspezifische Peptide zur Vakzinierung eingesetzt (*Rosenberg et al. 1998*). 13 von insgesamt 31 Patienten sprachen auf die Vakzinierung in Kombination mit IL-2 an und bestätigten die Wirksamkeit dieser Therapieform (*Fang et al. 2008*). Spätere Studien konzentrierten sich auf Verabreichung der Peptide kodiert in Plasmiden oder rekombinanten adenoviralen Vektoren (*Rosenberg et al. 1998; Rosenberg et al. 2003*), jedoch konnte kein signifikanter Behandlungsvorteil

erzielt werden. "Cancer-Testis"-Antigene, als potenzielle Targets für eine anti-Tumorvakzinierung zeigten nur marginale Ansprechraten (*Kruit et al. 2005*).

Durch Gewinnung dendritischer Zellen aus *in vitro*-stimulierten Vorläuferzellen konnten diese für Vakzinierungsstudien bei Patienten als antigenpräsentierende Zellen eingesetzt werden (*Grabbe et al. 1995*). Eine erste Studie 1998 erzielte komplette oder partielle Tumorreduktionen (*Nestle et al. 1998*), in einer späteren größeren Studie zeigte sich aber kein Vorteil gegenüber der üblichen Chemotherapie (*Schadendorf et al. 2006*).

Insgesamt liegt die Ansprechrate auf Vakzinierungen gegen das maligne Melanom bei 3,8% (7,1% bei DC-Vakzinierung, 4,2% bei tumorzellbasierten Vakzinen, 4,0% bei Peptidvakzinen sowie 0% bei pox-Virus-Vakzinen) (*Rosenberg et al. 2004*).

#### *Adoptive T-Zelltherapie*

Isolation zytotoxischer T-Zellen aus dem Blut von Melanompatienten, *in vitro*-Stimulation mit autologen antigenpräsentierenden Zellen und anschließender Rücktransfer expandierter Klone in den Patienten hat sich als praktikabel erwiesen. Ein Grund für bisher geringe klinische Erfolge könnte sein, dass die expandierten Zellen *in vivo* nur kurze Zeit überleben und Tumoren die Zielantigene selektiv verlieren (*Ho et al. 2002; Yee et al. 2002*).

Aus dem Tumor isolierte tumorinfiltrierende Lymphozyten können *in vitro* ebenfalls mit IL-2 aufbereitet, auf melanomantigenspezifische Klone selektiert, und in den Patienten rücktransferiert werden (*Dudley et al. 2003*). Bei vorhergehender Lymphozytendepletion der Patienten konnten Ansprechraten von bis zu 50% erzielt werden (*Dudley et al. 2005*). Der Erfolg dieser Behandlungsstrategie ist auch auf gleichzeitige Depletion von Treg zurückzuführen sowie die bessere Verfügbarkeit von stimulierenden Zytokinen für die transferierten Zellen (*Gattinoni et al. 2006*).

Adoptiver Transfer von T-Zellen mit einem genetisch veränderten T-Zellrezeptor, der für ein bestimmtes Tumorantigen hochaffin ist, hat sich als praktikabel erwiesen (*Morgan et al. 2003; Morgan et al. 2006*).

### 1.5 Das *ret* transgene Melanom-Mausmodell

Um die Immunantwort auf humane maligne Neoplasien zu untersuchen, bedarf es geeigneter präklinischer Modelle, die die Krankheit möglichst genau imitieren. Tumortransplantationsmodelle des malignen Melanoms wie B16 haben den Nachteil, dass Tumorwachstum mit einer Vielzahl Tumorzellen gleichzeitig ausgelöst wird. Es findet keine natürliche Tumor-Stroma-Interaktion statt und die klinische Situation kann nicht realitätsgetreu wiedergegeben werden (*Umansky et al. 2008*). Spontantumormodelle hingegen erlauben die Untersuchung der Tumorprogression und der Immunantwort gegen Tumore, die von einer einzigen transformierten Zelle ausgehen.

Das *MT/ret*-Mausmodell exprimiert das humane Protoonkogen *ret* als Transgen in melaninhaltigen Zellen unter Kontrolle des "Metallothionein I promoter-enhancer". Tumoren entwickeln sich spontan und metastasieren in Lymphknoten, Lunge, Gehirn, Niere und Milz (*Kato et al. 1998*). Das Metastasierungsprofil ähnelt sehr stark dem des humanen malignen Melanoms (*Houghton und Polsky 2002*) und auch die histopathologische Eingruppierung der Tumoren ist ähnlich (*Kato et al. 2004*).

Die Expressionsrate und auch die Aktivität von Rezeptortyrosinkinase Ret erhöht sich während der Tumorprogression (*Kato et al. 1999*). Vergleicht man das gutartige Vorstadium mit dem malignen Stadium, so ist die Ret-Aktivität aber vergleichbar. "Extracellular signal regulated kinase 2" (Erk2) und c-jun-Kinase liegen ausschließlich im malignen Tumorstadium phosphoryliert vor, Erk2 ist außerdem im malignen Tumor quantitativ erhöht (*Kato et al. 1998; Kato et al. 1999*). Zusätzlich sind im malignen Tumor, nicht jedoch im benignen Vorstadium, Matrix-Metalloproteinasen (MMP)- 2 und 9 erhöht (*Asai et al. 1999*), dies impliziert eine Beteiligung an Tumorzellinvasion und Metastasierung. ERK2, c-jun und MMP gelten damit als potenzielle Signalvermittler stromabwärts von Ret (*Kato et al. 1999*).

Ret ist natürlicherweise exprimiert in Geweben und Tumoren, die von der Neuralleiste abstammen. Mutationen im *ret*-Gen werden in Zusammenhang gebracht mit "Multiple endocrine neoplasia type II disease" (MEN2) und der Hirschsprung-Krankheit (*van Weering und Bos 1998; Eng 1999*). Es besteht ein Zusammenhang zwischen spezifischen *ret*-Mutationen und organspezifischer Tumorentwicklung, z. B. beim Schilddrüsenkarzinom und beim Phäochromozytom. Ret-Expression wurde außerdem nachgewiesen bei Neuroblastom- und

Leukämiezelllinien (Takahashi et al. 1991).

Nach Heterodimerisierung von Ret erfolgt Autophosphorylierung und intrazelluläre Signaltransduktion die zu morphologischen Veränderungen, Zellinvasion und Proliferation führt. Es existieren zwei verschiedene Ret-vermittelte Signaltransduktionswege: der Ras-Signalweg sowie der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg (*van Weering und Bos 1998*).

### **1.6 Fragestellung**

Das maligne Melanom weist eine ausgeprägte Chemo- und Strahlentherapieresistenz auf und ist deshalb mit herkömmlichen klinischen Therapieformen nur schwer zu behandeln. Es wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass maligne Melanome spezifisch von T- Lymphozyten erkannt werden können, so dass die Immuntherapie eine vielversprechende Option darstellt. Immunsuppressive Mechanismen des Tumors stehen der wirkungsvollen Erkennung durch das Immunsystem jedoch entgegen und verhindern die volle Reaktivität körpereigener oder adoptiv transferierter T-Zellen. Durch nur eingeschränkte T-Zellaktivität gegen Tumorzellen gelingt es malignen Neoplasien, trotz theoretisch vorhandener Immunogenität progressiv zu wachsen. Um effiziente Immuntherapien gegen das maligne Melanom zu entwickeln, müssen Strategien gefunden werden, um immunsuppressive Zellen bzw. die von ihnen sezernierten Faktoren zu neutralisieren.

Vielfach in der Forschung eingesetzte experimentelle Tumortransplantationsmodelle spiegeln die klinische Situation bei Melanompatienten weniger gut wieder. Spontanumormodelle hingegen imitieren die physiologische Situation der Tumorentwicklung, besonders die Tumor-Stroma-Interaktion, genauer und eignen sich besser, um tumorinduzierte Immunsuppression zu analysieren und immuntherapeutische Strategien für eine klinische Anwendung zu generieren. Das *ret* transgene Melanom-Mausmodell stellt eine gute Basis dar, um Strategien zur Neutralisierung myeloider Suppressorzellen bzw. der von ihnen sezernierten Faktoren zu entwickeln.

### **1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollen MDSC sowie ihre suppressiven Eigenschaften gegenüber T-Zellen im *ret* transgenen Melanommausmodell charakterisiert und durch pharmakologische Strategien blockiert werden, um verbesserte T-Zellkonstitution zu erreichen.

MDSC stellen eine wichtige Komponente der tumorinduzierten Immunsuppression dar. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass tumorassoziierte Faktoren Akkumulation von MDSC in lymphatischen Organen, Blut und im Tumorstroma induzieren. Von MDSC sekretiertes NO wirkt schädigend auf T-Zellen und bewirkt geringere Expression der TCR- $\zeta$ -Kette, so dass betroffene T-Zellen in einen anergischen Zustand übergehen, indem sie nicht mehr auf Antigenstimulation reagieren können. Neutralisierung immunsuppressiver MDSC oder ihrer sezernierten Faktoren ist ein wichtiger Schritt zur Verbesserung der T-Zellkonstitution *in vivo*, der zur verstärkten Eliminierung von Tumorzellen durch T-Lymphozyten beiträgt. Durch Entwicklung verbesserter Behandlungsstrategien, die die Neutralisierung immunsuppressiver Komponenten einschließen, eröffnen sich neue Wege für die Behandlung des humanen malignen Melanoms in der Klinik.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
DNA-Gelelektrophoresekammer 40-1214	PeqLab
DNA-Gel-Dokumentationsgerät Gel Jet Imager INTAS	UV Systems
Durchflusszytometer (FACS) Calibur	Becton Dickinson
Durchflusszytometer (FACS) Canto II	Becton Dickinson
Durchflusszytometer (FACS) Aria	Becton Dickinson
Gefrierschrank –20°C	Liebherr
Gefrierschrank –80°C	Heraeus
Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf
Inkubator HeraCell	Heraeus
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Laborabzug STA 120 1297	Prutcher
Lichtmikroskop DMIL	Leica
Lichtmikroskop MPS 60	Leica
Magnetrührer RCT basic	Kika
Mikrowellengerät R-352	Sharp
Mixer Vortex Genie	Scientific Industries
Netzgerät für DNA- Gelelektrophoresekammer EC 105	Apparatus Corporation
PCR-Gerät DNA-Engine DYAD	MJ Research
pH-Meter 766	Calimatic
Photometer UltraSpec 3100 pro	Amersham
Pipetten Pipe lite	Rainin
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand
Sterilbank Hera-Safe	Heraeus
Stoppuhr	Oregon scientific
Waage BP 3100P	Sartorius

Wasserbad DC3	GFL
Zählkammer Neubauer	Brand
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus
Zentrifuge Tr7 Plus	Sorvall
Zentrifuge Varifuge K	Heraeus

Tab. 2.1.1.1 Laborgeräte

### 2.1.2 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose	Roth
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck
β-Mercaptoethanol	Promega
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma
Bradford-Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Biomol
Di-Natrium-EDTA	Gerbu
EDTA 0,5M; pH 8,0	Gibco
Ethanol 96%	Roth
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH) 100%	Merck
Ethidiumbromid; 1% in H <sub>2</sub> O	Merck
Formalinlösung 40%	Riedel de Haen
"Fetal calf serum" (FCS)	Pan
Glycerin	Roth
HEPES-Lösung 1M	Sigma
Isofluoran	Delta Select
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Gerbu
Natriumpyruvatlösung 100 mM	Gibco
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA

Proteinase K	Sigma
Tris 99,9%	Roth
Trypanblaulösung 0,4%	Sigma
"Phosphate buffered saline" (PBS) für Zellkultur	PAA
PBS für Molekularbiologie	Biochrom
Viagra® (Sildenafil)	Pfizer
Xylencyanol	Roth

Tab. 2.1.2.1 Chemikalien

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser	Roth
Einwegpipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml)	Becton Dickinson
Kanülen Microlance	Becton Dickinson
Reagenzröhrchen Falcon (50 ml, 15 ml)	Becton Dickinson
Objektträger	Menzel
PCR-Reaktionsgefäße	Brand
Probenröhrchen für FACS	Becton Dickinson
Probenröhrchen für FACS, steril, mit Deckel	Becton Dickinson
Probenröhrchen für FACS, mit Siebdeckel	Becton Dickinson
Reaktionsgefäße (500µl, 1500µl, 2000µl)	Eppendorf
Sterilfilter 0,45µl Durchmesser	Roth
Spritzen (5 ml, 50 ml)	Becton Dickinson
Zellkulturplatten 24-well	Becton Dickinson
Zellsiebe 100µm	Becton Dickinson

Tab. 2.1.3.1 Verbrauchsmaterialien

### 2.1.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie

<b>Spezifität</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>
CD3	Armenian Hamster IgG1, κ	PerCP	145- 2C11	BD Pharmingen
CD3	Armenian Hamster IgG1, κ	APC	145- 2C11	BD Pharmingen
CD4	Rat (DA) IgG2a, κ	PE-Cy7	RM4-5	BD Pharmingen
CD4	Rat (DA) IgG2b, κ	APC	RM4-5	BD Pharmingen
CD8	Rat (LOU) IgG2b, κ	FITC	53-6.7	BD Pharmingen
CD8	Rat (DA) IgG2b, κ	PE	53-5.8	BD Pharmingen
CD11b	Rat (DA) IgG2b, κ	PE	M1/70	BD Pharmingen
CD11b	Rat (DA) IgG2b, κ	APC	M1/70	BD Pharmingen
CD16/CD32	Rat IgG2b, κ	ohne	2.4G2	BD Pharmingen
CD45.2	Mouse (SJL) IgG2α, κ	PerCP- Cy5.5	104	BD Pharmingen
CD45.2	Mouse (SJL) IgG2α, κ	FITC	104	BD Pharmingen
F4/80	Rat IgG2a	PE	BM8	Caltag
Gr-1	Rat IgG2b, κ	FITC	RB6-8C5	BD Pharmingen
Gr-1	Rat IgG2b, κ	PE-Cy7	RB6-8C5	BD Pharmingen
IL-4Rα	Rat IgG2a, κ	Biotin	mIL4R- M1	BD Pharmingen
IL-4Rα	Rat IgG2a, κ	PE	mIL4R- M1	BD Pharmingen
TCR-ζ-Kette	Armenian Hamster	Biotin	H146- 968	Prof. Baniyash, Jerusalem
TCR-ζ-Kette	Armenian Hamster	FITC	H146- 968	Prof. Baniyash, Jerusalem

**Tab. 2.1.4.1** Antikörper für die Durchflusszytometrie

### 2.1.5 Streptavidin für die Durchflusszytometrie

<b>Konjugat</b>	<b>Hersteller</b>
PE	BD Pharmingen
PE-Cy7	BD Pharmingen

Tab. 2.1.5.1 Streptavidin für die Durchflusszytometrie

### 2.1.6 Isotypkontrollen für die Durchflusszytometrie

<b>Isotypkontrolle</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Hersteller</b>
Rat IgG1, κ	PE	BD Pharmingen
Rat IgG2a, κ	FITC	BD Pharmingen
Rat IgG2a, κ	PE	BD Pharmingen
Rat IgG2a, κ	PE-Cy7	BD Pharmingen
Rat IgG2a, κ	APC	BD Pharmingen
Rat IgG2a, κ	Biotin	BD Pharmingen
Rat IgG2b, κ	FITC	BD Pharmingen
Rat IgG2b, κ	PE	BD Pharmingen
Rat IgG2b, κ	PE-Cy7	BD Pharmingen
Rat IgG2b, κ	APC	BD Pharmingen
Hamster IgG1, κ	PerCP	BD Pharmingen
Hamster IgG1, κ	APC	BD Pharmingen
Hamster IgG1, κ	FITC	BD Pharmingen
Hamster IgG1, κ	Biotin	BD Pharmingen

Tab. 2.1.6.1 Isotypkontrollen für die Durchflusszytometrie

### 2.1.7 Primer

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
<i>ret</i> forward	5'- ACT CGG GGA GGC GTT C -3'
<i>ret</i> reverse	5'- AAA ATG CAG TCA GAT ATG GA- 3'
<i>β-actin</i> forward	5'- CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA -3'
<i>β-actin</i> reverse	5'- GCT GGA ATT ACC GCG GCT -3'

Tab. 2.1.7.1 Primer

### 2.1.8 Kits

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>
Bio-Plex Cytokine-Assay Kit	BioRad
Cytofix/ Cytoperm-Kit für intrazelluläre FACS-Analyse	Becton Dickinson

Tab. 2.1.8.1 Kits

### 2.1.9 Mäuse

<i>Mäuse</i>	<i>Bezugsquelle</i>
C57BL/6 (BL/6)	Elevage Janvier
MT-1/ret transgen 304/B6 (genetischer Hintergrund C57BL/6, H2b)	Zur Verfügung gestellt von Dr. Nakashima, Nagoya

Tab. 2.1.9.1 Mäuse

### 2.1.10 Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>
Flowjo (Version 7.2.4)	Tree Star
GraphPad PRISM (Version 5)	GraphPad Software

Tab. 2.1.10.1 Software

### 2.1.11 Lösungen

#### 2.1.11.1 Puffer für Typisierung mittels PCR

##### Reaktionspuffer für Proteinase K-Verdau:

50 mM Tris pH 8.0; 20 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % SDS (v/v) in dest. H<sub>2</sub>O

##### 10x-Puffer für PCR-Reaktion:

200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl

##### 50x TAE-Puffer für Agarosegel:

242 g Tris; 100 ml 0,5 M EDTA; 57,1 ml Eisessig; auf 1L mit dest. H<sub>2</sub>O

Ladepuffer zur Gelelektrophorese:

0,25% Bromphenolblau (w/v); 0,25% Xylencyanol (v/v); 30% Glycerin (v/v);  
69,5% dest. H<sub>2</sub>O

**2.1.11.2 Puffer zur Durchflusszytometrie**

Erythrozyten-Lysepuffer 10x:

PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>; 16,6 g NH<sub>4</sub>Cl; 2,0 g KHCO<sub>3</sub>; 0,744 g Na<sub>2</sub>EDTA;  
auf 200 ml mit dest. H<sub>2</sub>O

FACS-Puffer:

PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>; 2% (v/v) FCS; 0,2% (w/v) NaN<sub>3</sub>; pH 8

2% Formalinlösung:

10 ml 4% (v/v) Formalinlösung in H<sub>2</sub>O; 10 ml PBS

**2.1.11.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur**

Waschmedium für die Zellkultur:

RPMI 1640 ohne Zusätze

Kulturmedium für T-Zell- MDSC- Kokultur:

RPMI 1640 (+Glutamin); 10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin;  
50µM β-Mercaptoethanol; 1mM Natriumpyruvat; 10mM HEPES

PBS-Lösung

Steril, ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Monitoring und Typisierung *ret* transgener Mäuse

*Ret* transgene Mäuse wurden zweimal pro Woche auf neue Tumoren untersucht. Das Tumorstadium wurde dokumentiert und statistisch erfasst. Aus Verpaarungen *ret* transgener Mäuse mit BL/6 Mäusen hervorgegangenen Nachkommen wurden Schwanzbiopsien entnommen, um durch PCR-Reaktion auf Anwesenheit des Transgens zu testen.

#### 2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA

Zur Genotypisierung *ret* transgener Mäuse wird zunächst aus einer Schwanzbiopsie genomische DNA isoliert. Hierzu wird die Probe mit 20 µl Reaktionspuffer und 2 mg/ml Proteinase K versetzt. Der Verdau erfolgt bei 56°C für 3 Stunden, anschließend wird der Ansatz mit 300 µl dest. H<sub>2</sub>O versetzt und für 3 min. bei 99°C inaktiviert. Bis zur Durchführung der PCR-Reaktion werden die Proben bei 4°C gelagert.

#### 2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

In einer Polymerasekettenreaktion werden die erzeugten DNA-Proben auf Anwesenheit des *ret*-Transgens untersucht.

Zur Herstellung des Reaktionsgemisches wurden folgende Komponenten verwendet:

- 34,5 µl dest. H<sub>2</sub>O
- 5,0 µl 10x Polymerase-Puffer
- 2,0 µl Primer 5`
- 2,0 µl Primer 3`
- 1,0 µl Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP (10 mM))
- 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
- 3,0 µl genomische DNA

Die PCR-Reaktion beinhaltet in 36 Zyklen folgende Schritte:

95°C 5 min. Denaturierung

94°C 1 min. Denaturierung

58°C 1 min. Primer-Bindung

72°C 1,5 min. Synthese

Nach Ende des letzten Zyklus erfolgt noch einmal eine verlängerte Synthesephase von 10 min. Bis zum Auftragen auf ein Agarosegel werden die Proben bei 4°C gelagert. Die PCR-Reaktion wird sowohl mit Primern für das *ret*-Transgen als auch für  *$\beta$ -Actin* als ubiquitär exprimiertem Kontrollantigen durchgeführt.

### **2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese**

Nach erfolgter PCR werden die Proben auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und das PCR-Produkt unter UV-Licht dokumentiert.

Zur Herstellung des 1,5% Agarosegels wird 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer im Mikrowellenofen aufgeköcht. Nach Zugabe von 4  $\mu$ l Ethidiumbromidlösung wird das Gemisch in die Gelelektrophoresekammer gegossen.

10  $\mu$ l des PCR-Reaktionsgemisches werden mit 3  $\mu$ l Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Als Fragmentgrößenreferenz dient ein Längenstandard. Elektrophorese erfolgt für ca. 1 Stunde bei 100 V, anschließend wird das DNA-Gel unter UV-Licht photographiert.

### **2.2.2 Präparation lymphatischer Organe und Tumorgewebes**

Nach Sedierung mit Isofluran erfolgt zervikale Dislokation und Präparation von Tumorgewebe, Milz, Knochenmark sowie inguinaler, axillärer und manibulärer Lymphknoten.

### **2.2.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen**

Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen werden Milz- oder Tumorgewebe über einem Zellsieb ("cell strainer") mit 100  $\mu$ m Porengröße zerrieben und in PBS aufgenommen.

Knochenmarkzellen werden mittels einer Kanüle aus den geöffneten Knochen gespült und ebenfalls in PBS aufgenommen. Auf einem Objektträger platzierte Lymphknoten werden anschließend mit einem zweiten Objektträger gleichmäßig zerrieben, abgespült und in PBS aufgenommen.

Um in der Milz- wie auch in der Knochenmarksuspension vorhandene Erythrozyten zu lysieren, werden die Proben bei 1200 rpm und 4°C 5 min. abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend in 1 ml 1x Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Es erfolgt 5 min. Inkubation bei Raumtemperatur, anschließend wird die Probe gewaschen (1 ml FACS-Puffer, 1200 rpm, 5 min., 4°C).

Nach erfolgter Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau können die Proben für weiterführende Experimente eingesetzt werden.

#### **2.2.4 Durchflusszytometrie**

Mittels Durchflusszytometrie ("Fluorescence activated cell sorting", FACS) erfolgt die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen sowie intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörperreaktion, welche mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die fluoreszenzmarkierten Zellen im FACS-Gerät in einem Probenstrom vereinzelt, durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht und an einem monochromatischen Laserstrahl vorbeigeleitet. Der Laserstrahl bewirkt Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes, so dass dieser auf ein höheres Energieniveau gehoben wird und unter Abgabe von Photonen auf sein Ursprungsniveau zurückfällt. Die emittierte Photonenkonzentration, die von einem Photodetektor erfasst wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und Granularität gewonnen.

Werden in einer Probe fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, deren Fluoreszenzspektren überlappen, so ist vor der Messung eine Kompensation des FACS-Gerätes mit einzelgefärbten Proben der jeweiligen Antikörper durchzuführen.

### **2.2.4.1 Extrazelluläre FACS-Färbung**

Zur extrazellulären Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern werden Zellen in FACS-Puffer im Röhrchen vorgelegt und zunächst mit 1 µg anti-CD16/ anti-CD32-Antikörper pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen in 50 µl FACS-Puffer inkubiert, um Fc-Rezeptoren auf den zu färbenden Zellen zu blockieren. Diese vermögen Antikörper über den Fc-Teil zu binden und führen zu unspezifischer Hintergrundfärbung in der Probe. Nach anti-CD16/ anti-CD32-Antikörper-Zugabe werden die Proben gemixt und für 5 min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Waschschrift, die Proben werden mit 1 ml FACS-Puffer versetzt, für 5 min. bei 1200 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach erfolgt Antikörperzugabe nach Anweisungen des Herstellers, i. d. R. 0,5-1 µg pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen in 50 µl FACS-Puffer. Zur Bindung der fluoreszenzgekoppelten Antikörper werden die Zellen gut gemischt und 20 min. auf Eis im Dunklen inkubiert. Abschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift (1 ml FACS-Puffer, 1200 rpm, 5 min., 4°C, Überstand verwerfen), bevor die Zellen in 150 µl FACS-Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert werden können. Wird die Probe nicht unmittelbar nach der Antikörperfärbung analysiert, besteht die Möglichkeit, die Zellen durch Zugabe von 2% Formalinlösung zu fixieren und maximal 24 Stunden bei 4°C zu lagern.

### **2.2.4.2 Biotin-Streptavidinmarkierung**

Erfolgt die Inkubation mit biotinkonjugierten Antikörpern, so werden die Zellen im Anschluss an den letzten Waschschrift nach Anweisungen des Herstellers mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin versetzt, i. d. R. 0,25 µg in 50 µl FACS-Puffer, und gut gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min. auf Eis im Dunkeln werden die Zellen zweimal gewaschen (1 ml FACS-Puffer, 1200 rpm, 5 min., 4°C, Überstand verwerfen), mit 150 µl FACS-Puffer versetzt und können anschließend im Durchflusszytometer analysiert oder mit 2% Formalinlösung fixiert werden.

### **2.2.4.3 Intrazelluläre FACS- Färbung**

Um zusätzlich zu extrazellulären Antigenen auch intrazelluläre Marker wie die TCR-ζ-Kette in den Zellen detektieren zu können, müssen die Zellen vor der Antikörperinkubation fixiert und permeabilisiert werden. Dies erfolgt mit Hilfe des Cytofix-Cytoperm-Reaktionskits. Nach Oberflächenmarkierung mit extrazellulär

gebundenen Antikörpern werden die Zellen mit 100  $\mu$ l pro  $1 \cdot 10^6$  Zellen Fixierlösung versetzt und 20 min. auf Eis im Dunklen inkubiert. Anschließend werden sie zweimal mit einem saponinhaltigen Waschpuffer ("Perm-Puffer") gewaschen (1 ml Puffer, 1200 rpm, 5 min., 4°C, Überstand verwerfen), der die Zellemembran permeabilisiert. Der danach zugegebene Antikörper gegen das intrazelluläre Antigen kann durch die Permeabilisierung in die Zelle gelangen und binden. Inkubation des intrazellulären Antikörpers erfolgte in "Perm-Puffer" für 20 min bei 4°C im Dunkeln. Nach einem abschließenden Waschschrift (1 ml "Perm-Puffer", 1200 rpm, 5 min., 4°C, Überstand verwerfen) werden die Zellen in 150  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

Die Menge des verwendeten TCR- $\zeta$ -Ketten-Antikörpers variiert, da die Stärke des gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes starken Schwankungen ausgesetzt ist. Deshalb wird der "Mean fluorescence intensity" (MFI)-Wert des TCR- $\zeta$ -Ketten-Antikörpers jeweils vor Ingebrauchnahme einer neuen Antikörpercharge ausgetestet. Außerdem müssen die MFI-Werte für den TCR- $\zeta$ -Ketten-Antikörper normalisiert werden, um Messungen mehrerer unabhängiger Experimente vergleichen zu können. Hierzu wird zunächst der MFI-Wert für TCR- $\zeta$ -Ketten-Antikörper in der CD4<sup>+</sup>TCR $\zeta$ <sup>-</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>TCR $\zeta$ <sup>-</sup> Population durch 5 dividiert. Dadurch ermittelt man den MFI-Wert der "idealen" doppelt-negativen Population, die in der ersten Dekade des Dotplots lokalisiert ist. Der erhaltene Quotient dient als ermittelter Schwankungsfaktor. Der MFI-Wert für den TCR- $\zeta$ -Ketten-Antikörper in der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> bzw. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Population wird anschließend durch diesen Schwankungsfaktor dividiert, um den normalisierten MFI-Wert für die TCR- $\zeta$ -Kette in der Lymphozytenprobe zu erhalten.

#### **2.2.4.4 Zellsortierung mittels Durchflusszytometer**

Aus murinen Knochenmarkproben werden myeloide Suppressorzellen mittels Durchflusszytometer selektiert. Hierzu werden Knochenmarkzellen aus Femur und Tibia isoliert, mit anti-CD16- und anti-CD32 Antikörper nach Standardprotokoll blockiert und anschließend mit Antikörpern gegen Gr-1 sowie CD11b nach Standardprotokoll gefärbt. Isolation wie auch Antikörperfärbung erfolgen unter sterilen Bedingungen, um die Zellen nach dem Sortiervorgang kultivieren zu können. Nach Antikörperfärbung werden die Zellen gewaschen (1 ml PBS steril, 1200 rpm, 5

min., 4°C, Überstand verwerfen), mit 1 ml pro  $20 \cdot 10^6$  Zellen FACS-Puffer versetzt und über einem 35 µm Zellsieb gefiltert. Sie stehen dann für den Sortiervorgang zur Verfügung. Um bei einer Mehrfachfärbung die zu selektionierenden Zellen auszuwählen, wird das FACS-Aria-Gerät wie auch bei einer FACS-Analyse mit einzelgefärbten Proben der jeweils verwendeten Antikörper kompensiert. Zusätzlich können tote oder apoptotische Zellen mittels Propidiumjodid- und Annexin-V-Färbung sichtbar gemacht und aussortiert werden. Die zu selektierenden Zellen werden während des Sortiervorgangs im FACS-Aria mit einer elektrischen Ladung versehen, in einem von zwei geladenen Metallplatten erzeugten Spannungsfeld abgelenkt und in ein mit Medium gefülltes Auffangröhrchen geleitet.

### **2.2.5 MDSC-Milz-Kokultur mit anschließender TCR-ζ-Ketten-Messung**

Per Durchflusszytometrie selektierte MDSC werden in einer Kokultur mit Milzzellen gesunder Mäuse inkubiert. MDSC werden nach dem Sortiervorgang abzentrifugiert und die Pellets in einem Röhrchen vereinigt. Nach Zellzahlbestimmung werden  $0,6 \cdot 10^6$  Zellen in 500 µl Medium aufgenommen und in die Vertiefung einer 24-well-Platte pipettiert. Eine unter sterilen Bedingungen hergestellte Milzellsuspension aus BL/6 wird ausgezählt, anschließend  $2 \cdot 10^6$  Zellen ebenfalls in 500 µl Medium aufgenommen und zu den MDSC gegeben. Als Kontrollansatz erfolgt die Kultivierung von  $2 \cdot 10^6$  Milzzellen ohne MDSC in 1 ml Medium. Die Kulturplatte wird für 14 Stunden im Brutschrank bei 37°C sowie 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgt Abspülen der Zellen von der Kulturplatte, Überführung in ein Probenröhrchen und extrazelluläre Antikörperfärbung mit anti-CD3 sowie intrazelluläre Antikörperfärbung mit anti-TCR-ζ-Ketten-Antikörper. Bei anschließender FACS-Analyse ist zu bedenken, dass die kokultivierten MDSC noch ihre Antikörpermarkierung tragen und diese Antikörper zur FACS-Messung mit kompensiert werden müssen.

### **2.2.6 Bio-Plex-Assay**

Eine Bio-Plex-Analyse ermöglicht zeitgleiche Analyse von bis zu 100 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen. Es werden magnetische Partikel mit einem Durchmesser von 8  $\mu\text{m}$  verwendet, die mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und dem Antikörper gegen ein bestimmtes Zytokin oder Chemokin beschichtet sind. Jeder für ein spezielles Zytokin spezifische Partikel trägt eine charakteristische Fluoreszenzmarkierung aus den zwei verschiedenen Fluorochromen und kann spektralphotometrisch detektiert werden, so dass viele verschiedene Zytokine in einer einzigen Probe gemessen werden können. Anhand einer zusätzlichen Biotinkopplung der beads können gebundene Zytokine zusätzlich über Streptavidin-PE quantifiziert werden.

Aus tiefgefrorenen Gewebeproben werden in Bioplex-Lysepuffer unter Proteaseinhibition mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Lysate hergestellt. Anschließend erfolgt eine Proteinbestimmung nach Bradford, so dass der Proteingehalt der Proben mit Bio-Plex-Lysepuffer auf 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingestellt werden kann. Zytokinanalyse erfolgt mit Hilfe des "Bio-Plex Array-Readers" nach Herstellerangaben.

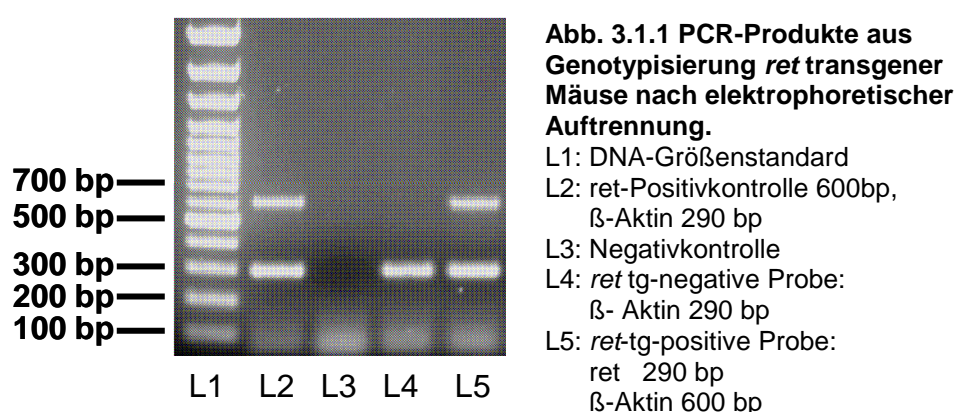
### **2.2.7 Behandlung *ret* transgener Mäuse mit Sildenafil (Viagra®)**

*Ret* transgene Mäuse werden ab einem Alter von fünf Wochen über das Trinkwasser mit Sildenafil behandelt. Hierzu wird nach Serafini (2006) eine 50 mg-Tablette in 375 ml Wasser aufgelöst und diese Lösung den Mäusen oral anstelle des normalen Trinkwassers verabreicht. Eine BL/6-Maus nimmt durchschnittlich 5 ml Lösung pro Tag zu sich, dies entspricht einer Menge von 20 mg/kg Körpergewicht/ Tag.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Typisierung und Monitoring *ret* transgener Mäuse

Genomische DNA der aus Verpaarungen von *ret* transgenen x BL/6 Mäusen hervorgegangenen Nachkommen wurden durch PCR-Reaktion mit spezifischen Primern auf Expression des *ret*-Transgens getestet. Als Positivkontrolle wurde eine DNA-Probe einer bereits typisierten *ret* transgenen Maus verwendet. Die Negativkontrolle enthielt keine Template-DNA. Alle PCR-Proben wurden sowohl für *ret*, als auch für  $\beta$ -Actin als ubiquitär exprimiertes Kontrollgen durchgeführt. Nach erfolgter PCR-Reaktion wurden die Proben auf einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht dokumentiert. Abbildung (Abb.) 3.1.1 zeigt ein Agarosegel mit den jeweiligen verwendeten Proben.

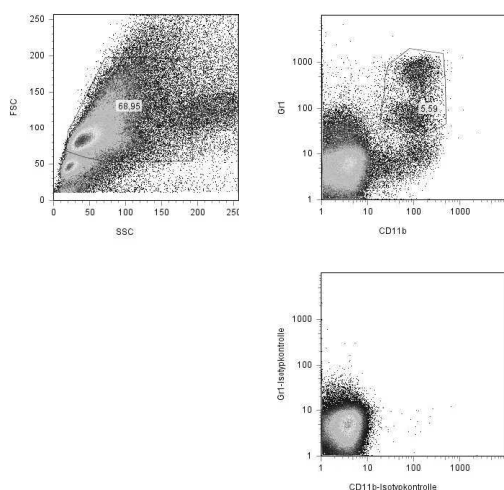


25% der *ret* transgenen Mäuse entwickeln innerhalb der ersten drei Monate Melanome, die bevorzugt um Augen, Ohren, Nacken und Schwanzwurzel lokalisiert sind. Makroskopisch sichtbare Metastasen des Primärtumors bilden sich in Lymphknoten und sind an einer deutlichen Schwarzfärbung zu erkennen. In der Vergangenheit wurden immunhistologisch auch Metastasen in Lunge, Gehirn und Leber festgestellt.

### 3.2 MDSC-Quantifizierung in lymphatischen Organen *ret* transgener Mäuse

Um immuntherapeutische Strategien gegen MDSC im *ret* transgenen Melanommausmodell entwickeln zu können, müssen diese Zellen zunächst auf ihr Vorkommen und ihre immunsuppressiven Mechanismen hin untersucht werden. Der erste Schritt war die Ermittlung der MDSC-Anzahlen in peripheren lymphatischen Organen sowie im Tumorstroma bei tumortragenden *ret* transgenen Mäusen. Als Vergleichswerte wurden lymphatische Organe von nicht transgenen BL/6- Mäusen sowie *ret* transgenen tumorfreen Mäusen herangezogen. Aus Milz, Knochenmark, Lymphknoten und Tumorgewebe wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt und mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern inkubiert. Anschließend erfolgte durchflusszytometrische Messung und Analyse per Flow-Jo-Software. Zur Kontrolle auf unspezifisch gebundene Antikörper in der Probe wurden für jeden eingesetzten Antikörper Isotypkontrollen herangezogen.

Abb. 3.2.1 zeigt die für lymphatische Organe verwendete Auswertestrategie am Beispiel einer BL/6-Milzzellanalyse. Aus dem gesamten gemessenen Zellpool wurde anhand der charakteristischen Parameter Größe im "forward scatter" (FSC) gegen Granularität im "side scatter" (SSC) auf lebende granulozytäre Zellen selektiert und zusätzlich Zelltrümmer und Zellaggregate aussortiert. Alle lebenden leukozytären Zellen wurden auf Koexpression von Gr-1 und CD11b analysiert.

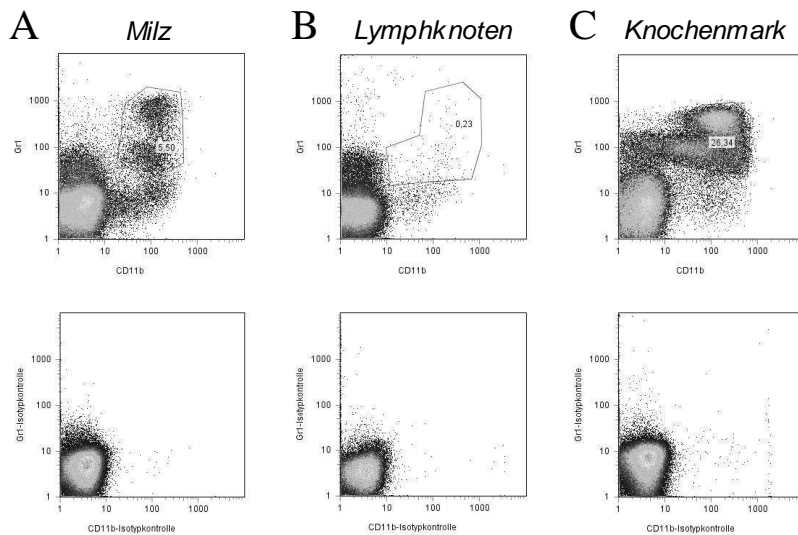


**Abb. 3.2.1 Auswertestrategie für durchflusszytometrische Quantifizierung der MDSC in lymphatischen Organen.**

Anhand der FSC vs. SSC-Darstellung wurde auf lebende Zellen selektiert und anschließend der Anteil Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Abgrenzung negativer Zellen erfolgte mit Hilfe der Isotypkontrolle. Pro Probe wurden 100000 Zellen aufgenommen.

Milz, Lymphknoten und Knochenmark unterscheiden sich hinsichtlich der Infiltration mit MDSC. Abb. 3.2.2 stellt die MDSC-Populationen in den einzelnen Organen beispielhaft an lymphatischen Organen einer BL/6-Maus dar. MDSC in der Milz

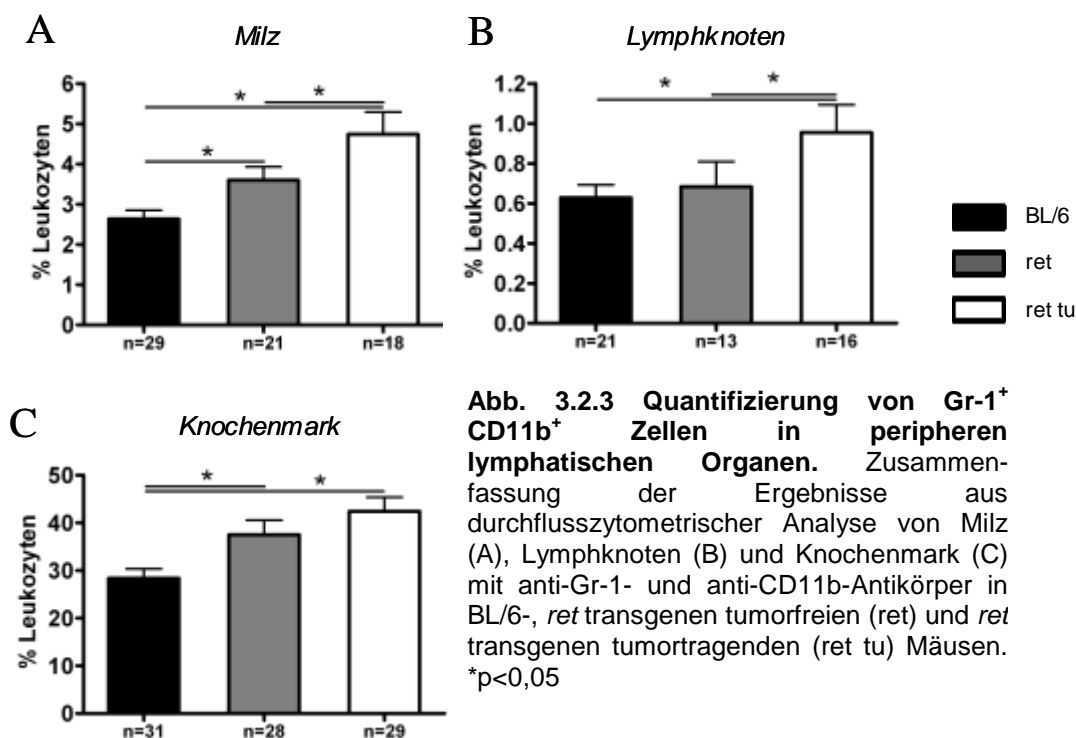
bestehen aus zwei Subpopulationen, die als Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>++</sup> und Gr-1<sup>++</sup>CD11b<sup>++</sup> bezeichnet werden (Abb. 3.2.2A). In Lymphknoten (Abb. 3.2.2B) und Knochenmark (Abb. 3.2.2C) sind je drei MDSC-Populationen zu unterscheiden, diese gliedern sich auf in Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>++</sup> und Gr-1<sup>++</sup>CD11b<sup>++</sup>.



**Abb. 3.2.2 Populationen Von MDSC verschiedener lymphatischer Organe.** Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen aus Milz (A), Lymphknoten (B) und Knochenmark (C) nach durchflusszytometrischer Messung mit spezifischen Antikörpern.

Abb. 3.2.3 stellt die MDSC-Mengen in den einzelnen Organen der drei verglichenen Mausgruppen dar. Für die statistische Auswertung wurden alle gemessenen Proben der jeweiligen Gruppen zusammengefasst.

Vergleicht man MDSC aus den einzelnen Organen quantitativ, so fällt auf, dass MDSC in der Milz von BL/6-Mäusen durchschnittlich 2,7% aller lebenden Leukozyten ausmachen (Abb. 3.2.2A). In den Lymphknoten sind es nur 0,6% (Abb. 3.2.2B) und im Knochenmark von BL/6-Mäusen akkumulieren mit 28,2% die meisten MDSC (Abb. 3.2.2C). Bei *ret* transgenen tumortragenden Mäusen liegen MDSC in allen drei analysierten Organen gegenüber BL/6 signifikant angereichert vor ( $p < 0,05$ ). Bei tumortragenden Mäusen sind es in der Milz durchschnittlich 4,9% MDSC (Abb. 3.2.2A), in den Lymphknoten 0,95% (Abb. 3.2.2B) und im Knochenmark 42,5% (Abb. 3.2.2C). MDSC-Zahlen in *ret* transgenen tumorfreen Mäusen sind zwischen den Werten für BL/6 und *ret* transgenen tumortragenden Mäusen angesiedelt. Signifikante Unterschiede zwischen den MDSC-Werten in *ret* transgenen tumorfreen Mäusen und BL/6 liegen in der Milz wie auch im Knochenmark vor. Hier sind die MDSC-Zahlen auch in *ret* transgenen tumorfreen Mäusen gegenüber BL/6-Mäusen signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ).

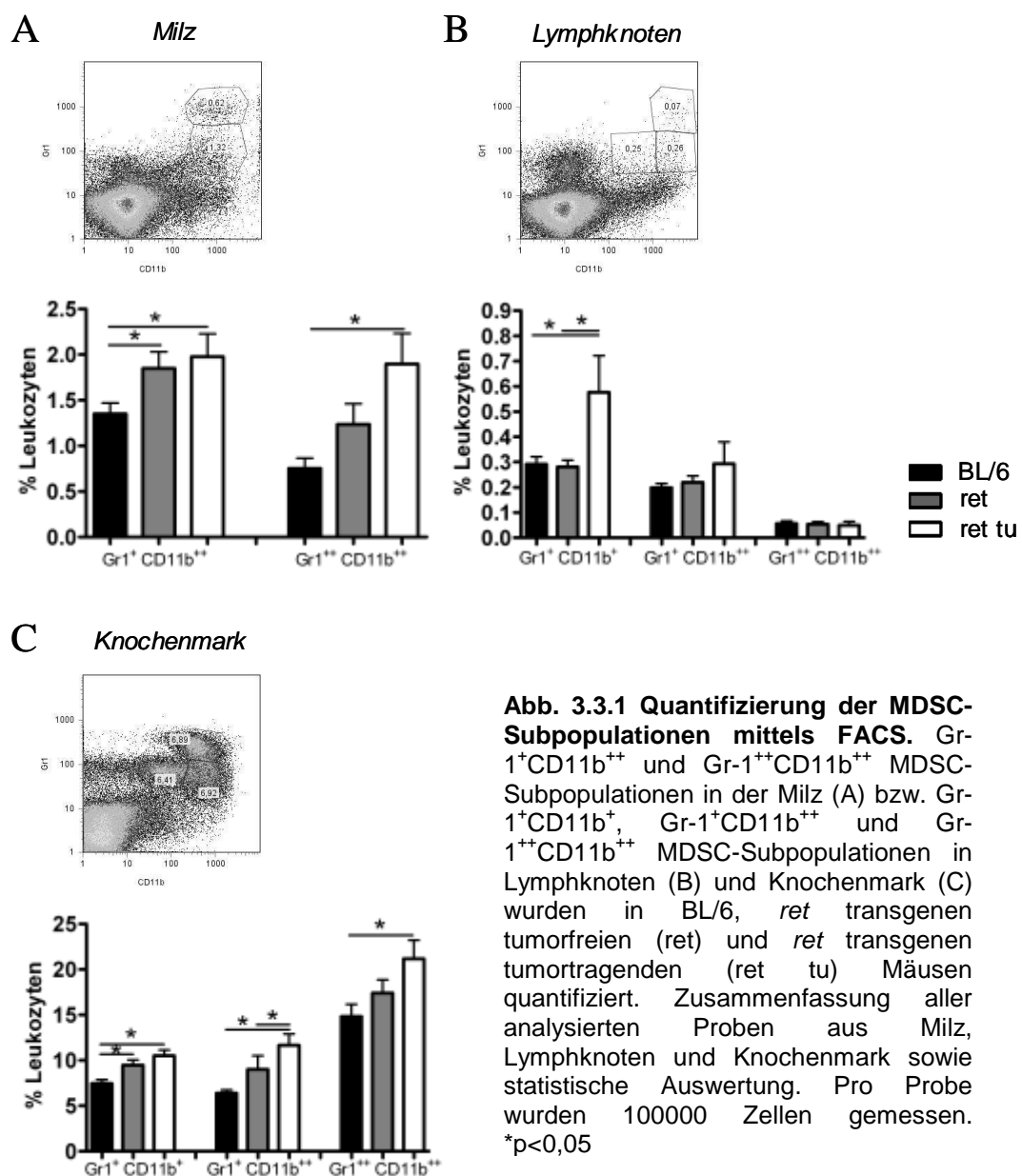


Insgesamt kann durch diesen Versuch gezeigt werden, dass MDSC in Milz, Lymphknoten und Knochenmark aus verschiedenen Subpopulationen bestehen und diese in tumortragenden *ret* transgenen Mäusen signifikant angereichert vorliegen.

### 3.3 MDSC-Subpopulationen in *ret* transgene Mäusen

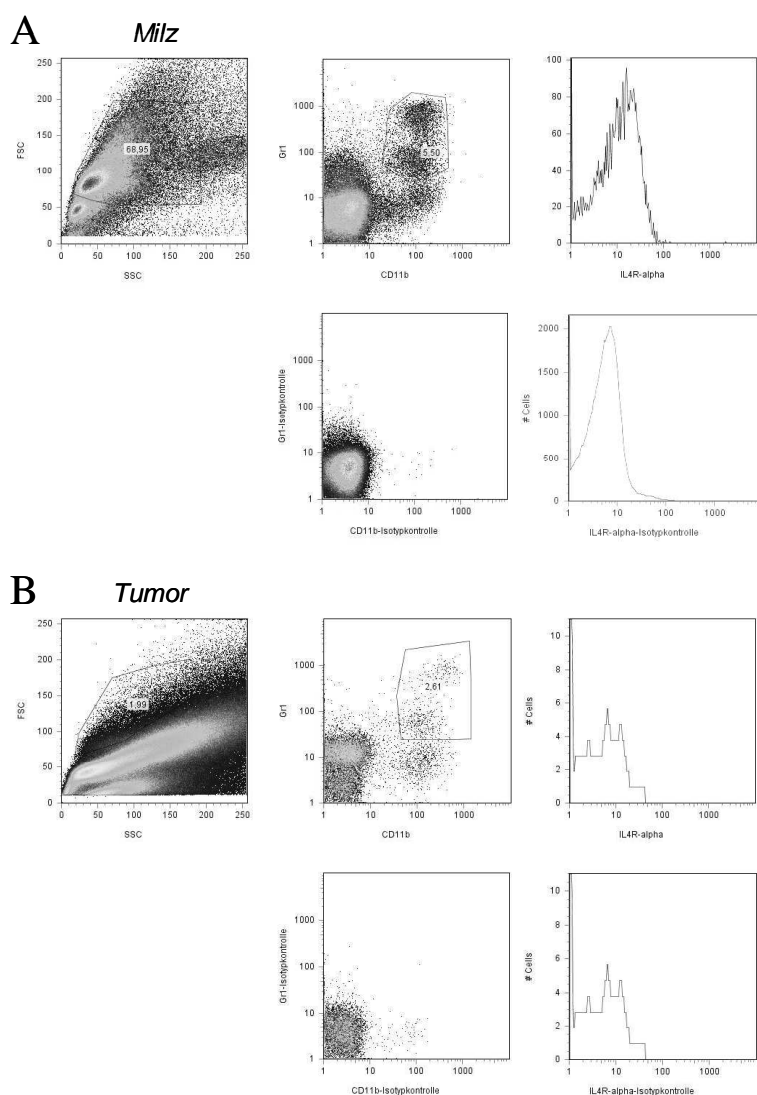
In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, welche der MDSC-Subpopulationen bei tumortragenden Mäusen angereichert vorliegen. Hierzu wurden die Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>++</sup> und Gr-1<sup>++</sup>CD11b<sup>++</sup> Zellen in der Milz sowie Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>++</sup> und Gr-1<sup>++</sup>CD11b<sup>++</sup> Populationen in Lymphknoten und Knochenmark getrennt analysiert. Abb. 3.3.1 stellt die Ergebnisse für alle drei lymphatischen Organe Milz (Abb. 3.3.1A), Lymphknoten (Abb. 3.3.1B) und Knochenmark (Abb.3.3.1C) dar. Sowohl in der Milz als auch im Knochenmark sind alle Subpopulationen in tumortragenden Mäusen gegenüber BL/6 signifikant angereichert (p<0,05). Die Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>++</sup> MDSC in der Milz sowie die Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Population im Knochenmark liegen auch in *ret* transgenen tumorfreien Mäusen schon signifikant

angereichert vor ( $p < 0,05$ ) und werden in tumortragenden Mäusen nur geringfügig erhöht. Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen in den Lymphknoten wie auch die Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>++</sup> Zellen im Knochenmark liegen bei *ret* transgenen tumortragenden Mäusen gegenüber *ret* transgenen tumorfreen ebenfalls signifikant angereichert vor ( $p < 0,05$ ). MDSC aus den Lymphknoten reichern sich bei tumortragenden Mäusen ausschließlich in der Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Population signifikant an ( $p < 0,05$ ). Dieses Versuchsergebnis verdeutlicht Unterschiede in der MDSC-Akkumulation in Lymphknoten, verglichen mit Milz und Knochenmark.



### 3.4 IL-4R $\alpha$ -Expression bei MDSC aus *ret* transgenen Mäusen

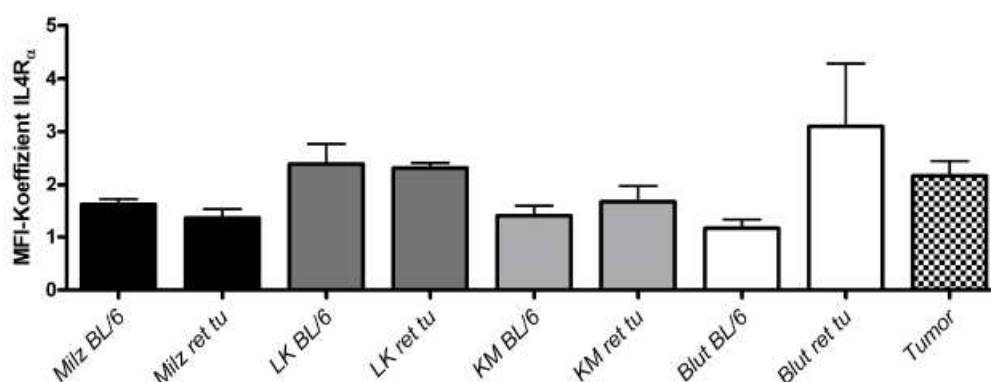
Aufgrund der Heterogenität der MDSC-Population wurde in der Vergangenheit versucht, Marker zu identifizieren, mit denen suppressive Zellen innerhalb der Gesamtpopulation detektiert werden können. IL-4R $\alpha$  wurde als möglicher suppressionsspezifischer MDSC-Marker beschrieben (*Gallina et al. 2006*). Um die Expression von IL-4R $\alpha$  auf MDSC in *ret* transgenen Mäusen zu testen, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Abb. 3.4.1 stellt die verwendete Auswertestrategie am Beispiel einer BL/6-Milzprobe (Abb. 3.4.1A) sowie einer Tumorseite (Abb. 3.4.1B) dar. Aus der gesamten Zellpopulation wurde zunächst auf lebendige leukozytäre Zellen selektiert und in einem weiteren Schritt die Fluoreszenzintensität des IL-4R $\alpha$ -Antikörpers in der MDSC-Population bestimmt. Der "Mean fluorescence intensity" (MFI)-Quotient ergibt sich aus dem Fluoreszenzintensitätswert der gemessenen Probe dividiert durch die Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle.



**Abb. 3.4.1 Auswertestrategie für IL-4R $\alpha$  in MDSC aus lymphatischen Organen und Tumorstroma.**

Einzelzellsuspensionen aus lymphatischen Organen (A) bzw. Tumorgewebe (B) wurden mit anti-Gr-1-, anti-CD11b- sowie anti-IL-4R $\alpha$ -Antikörper inkubiert und durchflusszytometrisch bestimmt. Mit Hilfe der spezifischen Isotypkontrollen wurde der Quotient der Fluoreszenzintensität des IL-4R $\alpha$ -Antikörpers bestimmt. 100000 Zellen aus lymphatischen Organen bzw. 1000000 Zellen aus Tumorseiten wurden aufgenommen.

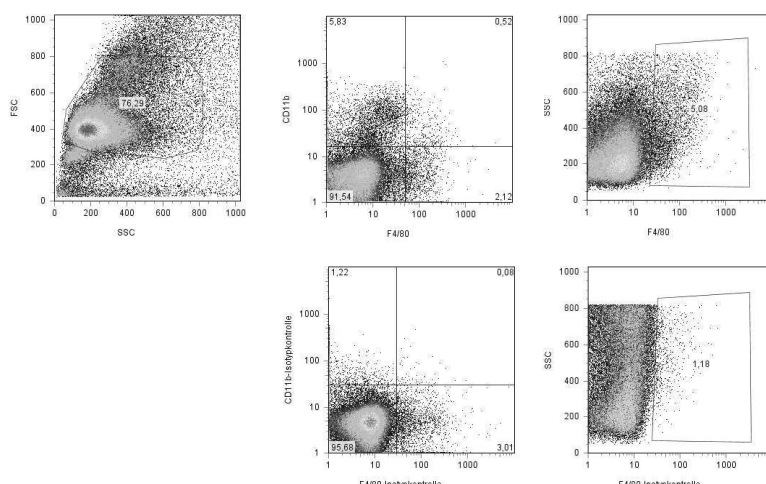
Wie in Abb. 3.4.2 zu erkennen ist, besteht kein signifikanter Unterschied in der IL-4R $\alpha$ -Expression zwischen lymphatischen Organen aus BL/6- und *ret* transgenen tumortragenden Mäusen. Auch die IL-4R $\alpha$ -Expression auf tumorinfiltrierenden MDSC unterscheidet sich nicht signifikant von der auf MDSC aus lymphatischen Organen. Daraus kann geschlossen werden, dass IL-4R $\alpha$  im *ret* transgenen Melanommausmodell keinen Marker für MDSC aus tumortragenden Mäusen darstellt.



**Abb. 3.4.2 IL-4R $\alpha$ -Expression auf MDSC aus lymphatischen Organen und Tumor.** Einzelzellsuspensionen von Milz- (n=4), Lymphknoten (LK)- (n=6), Knochenmark (KM)- (n=5) und Tumorgewebe (n=14) sowie Blutproben (n=7) aus BL/6-, *ret* transgenen tumorfreien (*ret*) sowie *ret* transgenen tumortragenden (*ret tu*) Mäusen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Gr-1, CD11b und IL4-R $\alpha$  inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. MFI-Koeffizient für IL-4R $\alpha$ -Fluoreszenzaktivität ist dargestellt.

### 3.5 Analyse von F4/80 als Marker myeloider Suppressorzellen bei *ret* transgenen Mäusen

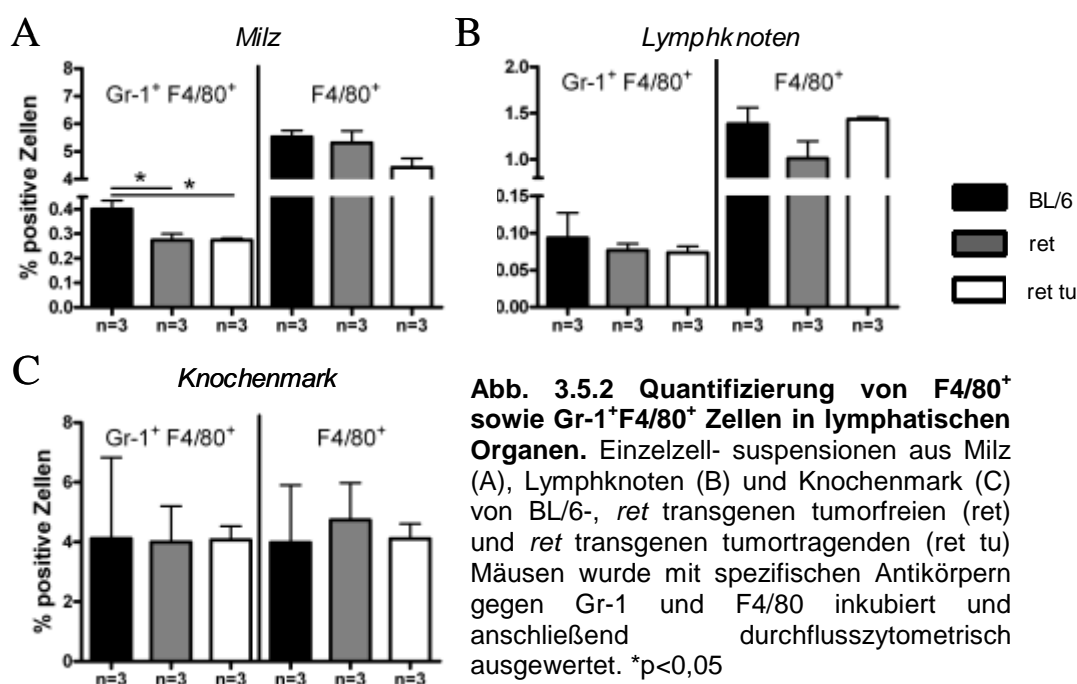
Neben CD11b sind MDSC auch alternativ mit F4/80 charakterisiert worden. Da F4/80 nicht in jedem experimentellen System von Bedeutung ist, sollte die Expression dieses Markers in MDSC aus *ret* transgenen Mäusen überprüft werden. Einzelzellsuspensionen aus lymphatischen Organen von BL/6-, *ret* transgenen tumorfreien und *ret* transgenen tumortragenden Mäusen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Gr-1 und F4/80 inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch ausgewertet. Abb. 3.5.1 stellt die verwendete Auswertestrategie am Beispiel der BL/6-Milz dar. Nach Selektion auf lebendige leukozytäre Zellen in FSC vs. SSC-Darstellung wurden, mit Hilfe der jeweiligen Isotypkontrolle, F4/80<sup>+</sup> Zellen sowie Gr-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Zellen quantifiziert.



**Abb. 3.5.1 Auswertestrategie zur Quantifizierung von F4/80 als MDSC-Marker in lymphatischen Organen.** In der FSC vs. SSC-Darstellung wurde auf lebende Zellen selektiert und anschließend mit Hilfe der jeweiligen Isotypkontrolle der Anteil F4/80<sup>+</sup> sowie Gr-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Pro Probe wurden 100000 Zellen gemessen.

Abb. 3.5.2 fasst die Daten aller gemessenen Proben zusammen. Bei Analyse der Gr-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Zellen in der Milz (Abb. 3.5.2A) ergibt sich für BL/6-Mäuse ein durchschnittlicher Anteil von 0,4%. Bei *ret* transgenen tumorfreen sowie *ret tu* transgenen tumortragenden Mäusen werden je 0,27% gemessen, hier besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zur BL/6-Probe ( $p < 0,05$ ). Für F4/80<sup>+</sup> Zellen liegen in der Milz keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den verglichenen Gruppen vor.

In den Lymphknoten (Abb. 3.5.2B) wie auch im Knochenmark (Abb. 3.5.2C) ergibt sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied im Anteil Gr-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Zellen bzw. F4/80<sup>+</sup> Zellen.

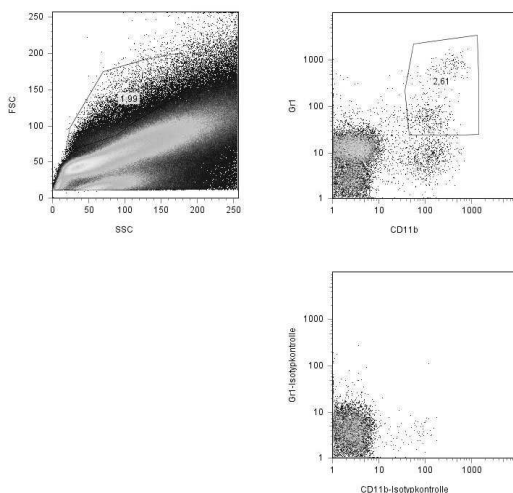


**Abb. 3.5.2 Quantifizierung von F4/80<sup>+</sup> sowie Gr-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Zellen in lymphatischen Organen.** Einzelzell-suspensionen aus Milz (A), Lymphknoten (B) und Knochenmark (C) von BL/6-, *ret* transgenen tumorfreen (*ret*) und *ret tu* transgenen tumortragenden (*ret tu*) Mäusen wurde mit spezifischen Antikörpern gegen Gr-1 und F4/80 inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch ausgewertet. \* $p < 0,05$

Insgesamt zeigen diese Daten, dass F4/80 in *ret* transgenen Mäusen im Gegensatz zu CD11b nicht als MDSC-Marker herangezogen werden kann. Es werden keine statistisch signifikanten Unterschiede in F4/80-Expression der einzelnen lymphatischen Organe zwischen BL/6- und *ret* transgenen tumortragenden Mäusen detektiert. Die vorher ermittelte Akkumulation von Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen in lymphatischen Organen tumortragender Mäuse lässt sich mit F4/80 nicht nachweisen.

### 3.6 MDSC im Tumorstroma *ret* transgener Mäuse

Neben den MDSC in lymphatischen Organen wurden auch tumorinfiltrierende Zellen quantifiziert. Abb. 3.6.1 stellt die verwendete Auswertestrategie dar. FFS vs. SSC-Darstellung erlaubte Selektion der lebendigen leukozytären Zellen, die zur Analyse herangezogen wurden. Tumorzellen sterben durch Probenaufbereitung und wurden als tote Zellen aussortiert.

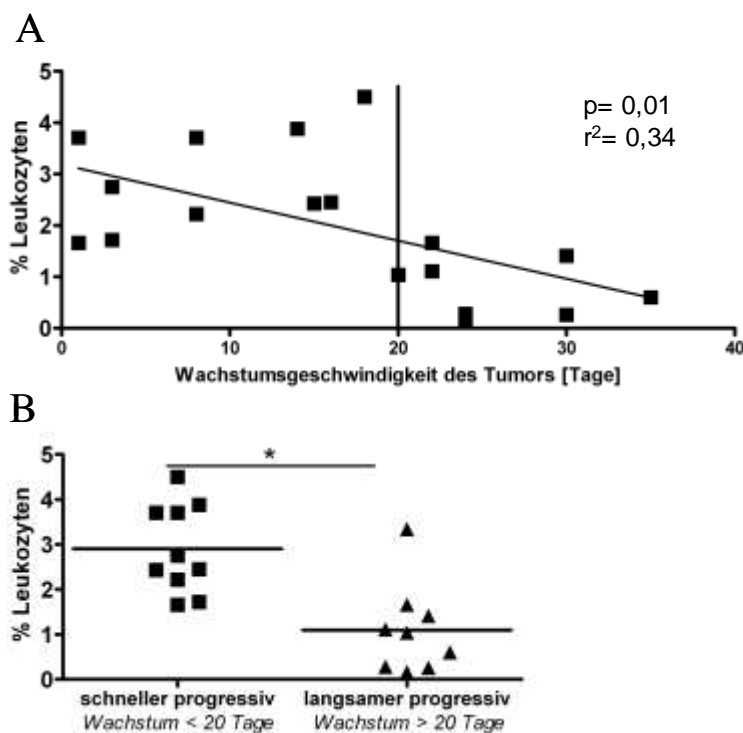


**Abb. 3.6.1 Auswertestrategie für durchflusszytometrische Quantifizierung der MDSC im Tumorstroma.**

Anhand der FSC vs. SSC-Darstellung wurde auf lebende Zellen selektiert und anschließend der Anteil Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Pro Probe wurden 1000000 Zellen aufgenommen.

Analyse der MDSC im Tumorstroma ergibt eine Korrelation der Anzahl tumorinfiltrierender MDSC mit der Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors (Abb. 3.6.2A). Es besteht ein statistisch signifikanter Wert für den Abfall der Regressionsgraden ( $r^2 = 0,34$ ;  $p = 0,01$ ). Wie in Abb. 3.6.2B zu erkennen, akkumulieren Tumoren mit schneller Progressionsrate, die weniger als 20 Tage bis zum Erreichen des finalen Krankheitsstadium wachsen, mit 2,9% signifikant mehr MDSC als Tumoren, die 20 Tage oder länger *in vivo* wachsen. Hier werden

durchschnittlich 1,1% MDSC gemessen ( $p < 0,05$ ). Es besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen MDSC-Infiltration und Tumorgröße. In *ret* transgenen Mäusen kann die Anzahl tumorinfiltrierender MDSC deshalb als Marker für die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors fungieren.



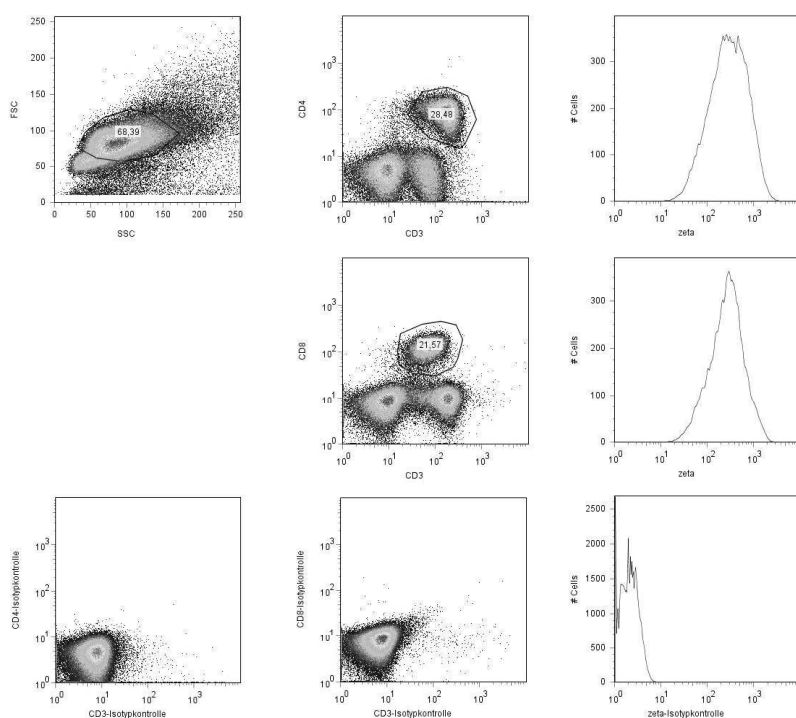
**Abb. 3.6.2 Quantifizierung von MDSC im Tumorstroma.**

Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Tumor-Einzelzellsuspensionen *ret* transgener tumortragender Mäuse mit anti-Gr-1- und anti-CD11b-Antikörper. Statistische Auswertung in Korrelation zur Wachstumsgeschwindigkeit (A) sowie in Gruppen von schneller progressiven Tumoren (<20 Tage Tumorwachstum) und langsamer progressiven Tumoren ( $\geq 20$  Tagen Tumorwachstum) (B). \* $p < 0,05$

### 3.7 Analyse der TCR- $\zeta$ -Kette in T-Lymphozyten bei *ret* transgenen Mäusen

Nachdem eine MDSC-Akkumulation in lymphatischen Organen bei tumortragenden *ret tg* Mäusen nachgewiesen werden konnte, sollte dessen Auswirkung auf T-Zellen in den entsprechenden Organen überprüft werden. Hierzu wurden intrazelluläre FACS-Färbungen durchgeführt, um Expression des TCR- $\zeta$ -Ketten-Moleküls in der  $CD3^+CD4^+$  und  $CD3^+CD8^+$  T-Zellpopulation zu analysieren. Abb. 3.7.1 zeigt die zur TCR- $\zeta$ -Ketten-Analyse in lymphatischen Organen verwendete Auswertestrategie am Beispiel einer BL/6-Milzmessung. Nach Inkubation mit anti-CD3-, anti-CD4-, anti-

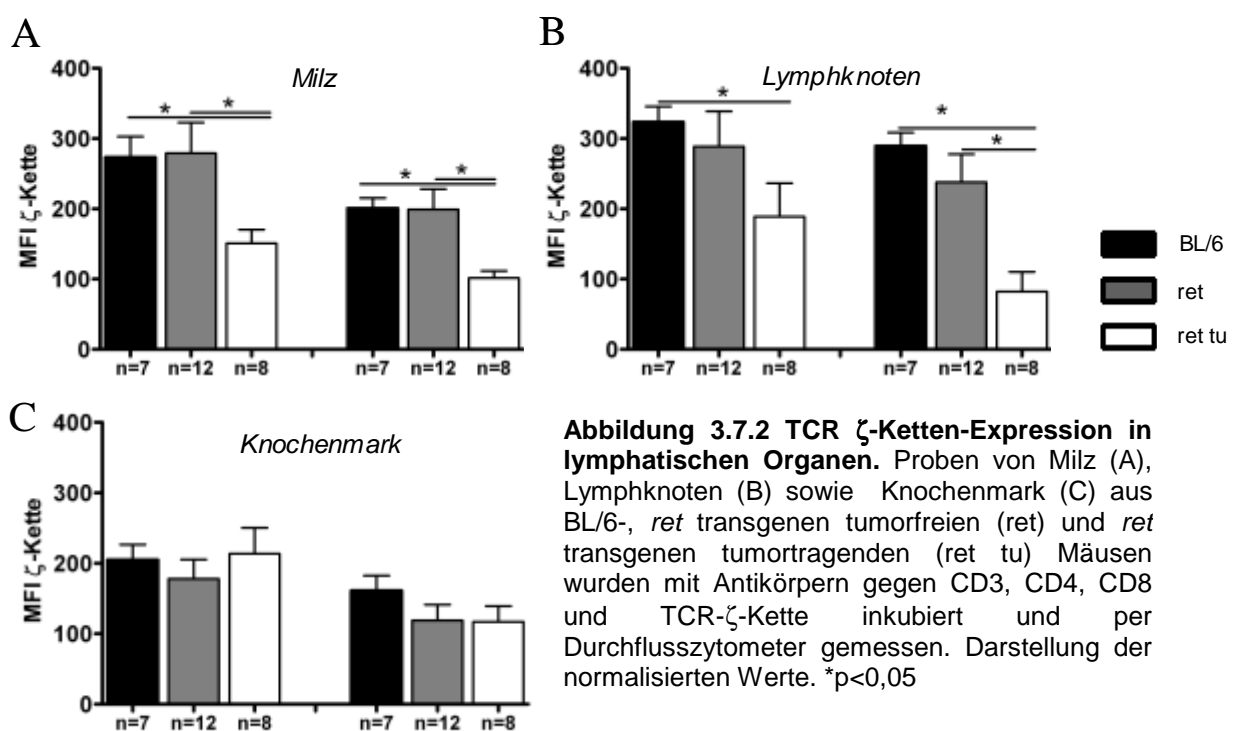
CD8- und anti-TCR- $\zeta$ -Ketten-Antikörper wurde die TCR- $\zeta$ -Ketten-Fluoreszenzintensität in der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> sowie der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation bestimmt und zur statistischen Auswertung normalisiert (siehe Material und Methoden).



**Abb. 3.7.1**  
**Auswertestrategie zur Analyse der TCR  $\zeta$ -Ketten-Expression in lymphatischen Organen bei *ret* transgenen Mäusen.** Nach Selektion auf mononukleäre Zellen in FSC vs. SSC-Darstellung wurden mit Hilfe der jeweiligen Isotypkontrollen CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen selektiert. Aus beiden Populationen wurde die Fluoreszenzintensität des TCR- $\zeta$ -Antikörpers bestimmt. Pro Probe wurden 100000 Zellen analysiert.

Abb. 3.7.1 fasst die Ergebnisse der TCR- $\zeta$ -Ketten-Analyse in lymphatischen Organen zusammen. In den Milzproben (Abb. 3.7.2A) liegen die MFI-Werte für BL/6 bei 273,2 in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen und bei 201,6 in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen. Die Proben *ret* transgener tumorfreier Mäuse zeigen keinen Unterschied in TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression gegenüber BL/6, jedoch konnten in Lymphozyten *ret* transgener tumortragender Mäuse signifikant geringere Werte festgestellt werden. Hier liegt die TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression bei einem MFI von 150,9 in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen sowie 101,6 in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3.7.2A). Die höchsten MFI-Werte für TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression finden sich in den Lymphknoten (Abb. 3.7.2B), hier liegen sie für CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen in BL/6 bei 323,3 und für CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen bei 289,3. In den Proben *ret* transgener tumorfreier Mäuse wurden geringfügig herabgesetzte MFI-Werte gemessen, während sie in den Proben *ret* transgener tumortragender Mäuse gegenüber BL/6 signifikant reduziert sind. Sie betragen nur 188,6 bei CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ) und 82,1

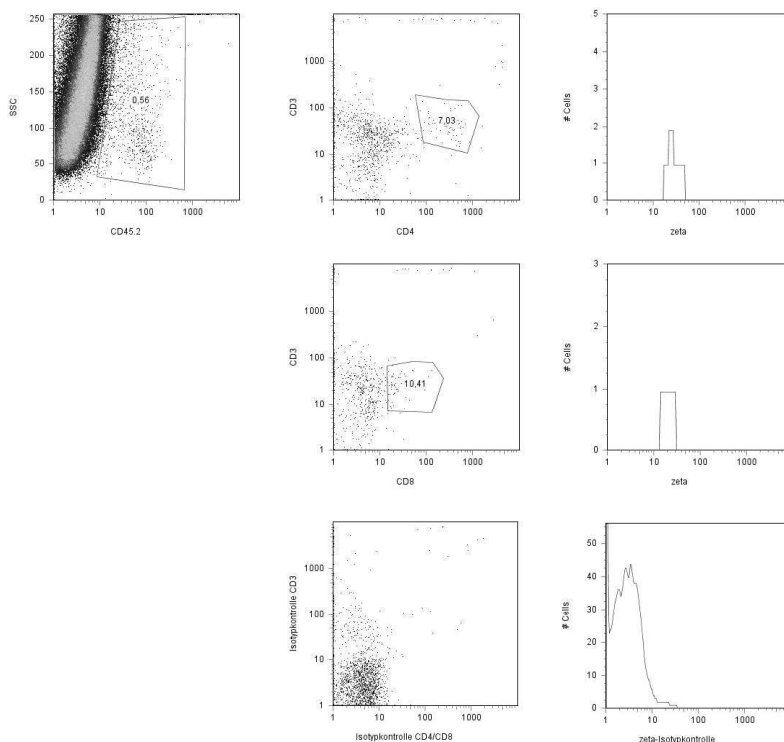
bei CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen ( $p < 0,05$ ). In der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Population ist die Differenz zwischen TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in *ret* transgenen tumorfreien sowie tumortragenden Mäusen ebenfalls statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3.7.2B). Im Knochenmark (Abb. 3.7.2C) wurden im Vergleich zu Milz und Lymphknoten generell geringere TCR- $\zeta$ -Ketten-Expressionsraten gemessen. Bei BL/6-Mäusen liegen die MFI-Werte für CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Zellen bei 204,7 und bei CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen bei 161,1 (Abb. 3.7.2C). Verglichen mit den Expressionsraten aus *ret* transgenen tumorfreien und *ret* transgenen tumortragenden Mäusen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.



Insgesamt kann mit diesem Experiment gezeigt werden, dass die TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression im TCR bei tumortragenden Mäusen in Milz und Lymphknoten signifikant reduziert ist und dass im Knochenmark, verglichen mit den anderen gemessenen lymphatischen Organen, generell in allen drei Gruppen geringere TCR- $\zeta$ -Ketten-Level exprimiert werden.

### 3.8 TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in tumorinfiltrierenden Lymphozyten

Um das TCR- $\zeta$ -Ketten-Molekül in tumorinfiltrierenden Lymphozyten zu messen, wurden ebenfalls FACS-Analysen durchgeführt. Abb. 3.8.1 stellt die verwendete Auswertestrategie dar. Zur Analyse der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) wurde aus der Einzelzellsuspension des Tumorgewebes zunächst auf CD45.2<sup>+</sup> Leukozyten selektiert. Dieser Schritt war notwendig, da für die intrazelluläre Antikörperfärbung mit anti- $\zeta$ -Ketten-Antikörper eine PFA-Saponin-Fixierung und -Permeabilisierung der Probe erfolgte und mononukleäre Zellen in FSC vs. SSC-Darstellung nicht mehr ausreichend von Tumorzellen zu trennen waren. Ausgehend von der Leukozytenpopulation wurden CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> sowie CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen auf Fluoreszenzintensität des gebundenen anti- $\zeta$ -Ketten-Antikörpers analysiert und normalisiert.

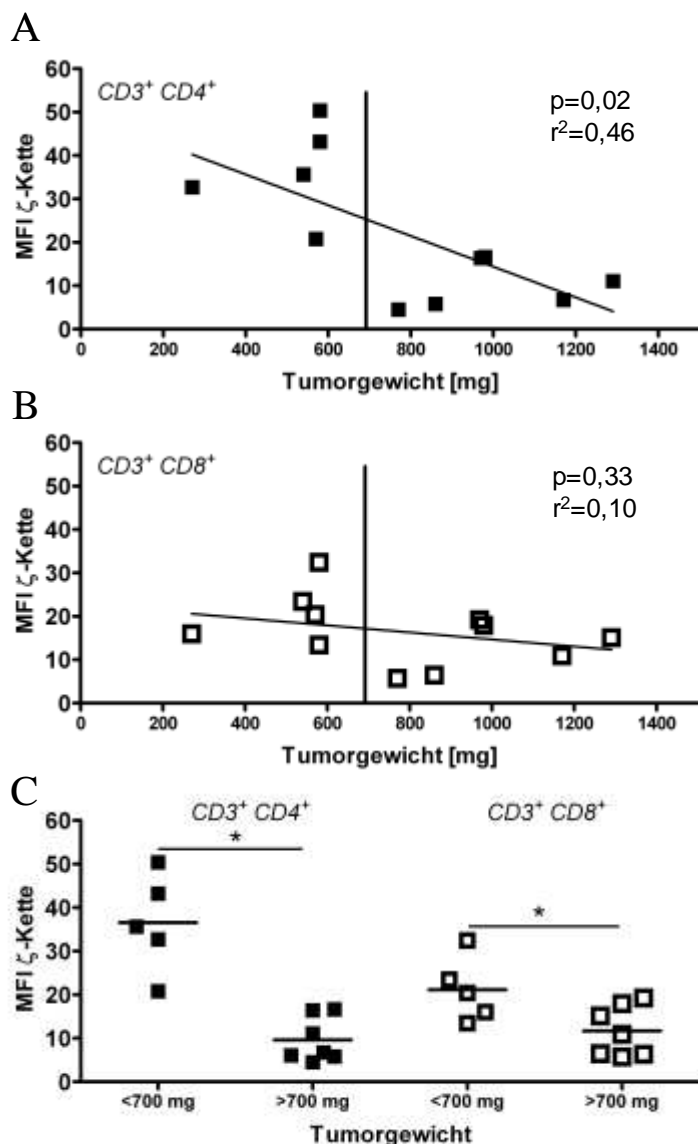


**Abb. 3.8.1**  
Auswertestrategie für  
Messung der TCR- $\zeta$ -  
Ketten-Expression in  
tumorinfiltrierenden  
Lymphozyten.

Einzelzellsuspensionen lymphatischer Organe wurden per Durchflusszytometer quantifiziert. In FSC-SSC-Darstellung wurde zunächst auf CD45.2<sup>+</sup> Leukozyten selektiert und diese in der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> sowie CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Population auf Fluoreszenzintensität des  $\zeta$ -Ketten-Antikörpers überprüft. Pro Probe wurden 100000 Zellen gemessen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> tumorinfiltrierenden Lymphozyten statistisch signifikant mit dem Gewicht des jeweiligen Tumors korreliert (Abb. 3.8.2A). Der Abfall der Regressionsgrade beträgt  $r^2=0,46$  ( $p=0,02$ ). Für die CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Population ist dieser Effekt nur tendenziell zu beobachten (Abb. 3.8.2B). Sowohl für CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> als auch für CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>

tumorinfiltrierende T-Zellen wird deutlich, dass in Tumoren, deren Gewicht unter 700 mg liegt, eine signifikant höhere TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression festgestellt werden kann als in Tumoren, deren Gewicht über 700 mg liegt (Abb. 3.8.2C). Für die CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation in Tumor liegt die TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in Tumoren mit weniger als 700 mg Tumorgewicht bei einem MFI-Wert von 36,6, bei größeren Tumoren jedoch nur noch 8,9 ( $p < 0,05$ ). Für die CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Population werden MFI-Werte von 21,2 in kleinen bzw. 10,5 in größeren Tumoren gemessen ( $p < 0,05$ ). Ein Zusammenhang zwischen TCR- $\zeta$ -Ketten-Suppression und Geschwindigkeit des Tumorstwachstums konnte nicht nachgewiesen werden.



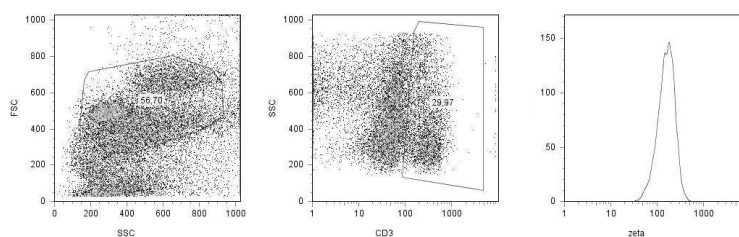
**Abb. 3.8.2 TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in tumor-infiltrierenden Lymphozyten.** Einzellellsuspensionen verschiedener Tumorproben wurden mit Antikörpern gegen CD45.2, CD3, CD4, CD8 und TCR- $\zeta$ -Kette inkubiert und durchflusszytometrisch gemessen. Darstellung der normalisierten MFI-Werte für TCR- $\zeta$ -Kette in Korrelation zum Tumorgewicht bei CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (A) sowie CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Zellen (B). TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in Tumoren < / > 700 mg (C). \* $p < 0,05$

Diese Ergebnisse zeigen, dass in größeren Tumoren ein höherer Grad an

Immunsuppression gegen T-Zellen erzielt wird als in kleineren Tumoren.

### 3.9 Analyse der MDSC-vermittelten Immunsuppression *in vitro*

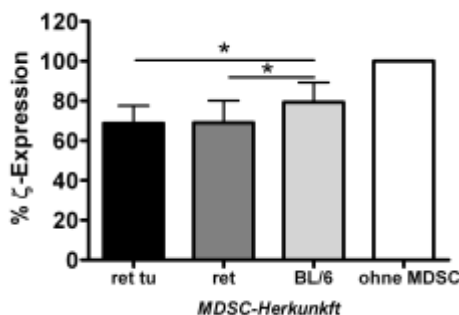
Nach phänotypischer Analyse mit Feststellung von MDSC-Akkumulation und verringerter TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression sollte die immunsuppressive Auswirkung von MDSC auf T-Zellen *in vitro* belegt werden. Hierzu wurden MDSC aus dem Knochenmark durch "Fluorescence Activated Cell Sorting" (FACS) isoliert und mit Milzzellen aus gesunden Mäusen für 14 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte durchflusszytometrische Analyse der TCR- $\zeta$ -Kette in den kokultivierten Milzzellen. Abb. 3.9.1 zeigt die verwendete Auswertestrategie. Aus allen lebenden Zellen der Kultur wurde auf CD3<sup>+</sup> Zellen selektiert und diese auf Fluoreszenzstärke des TCR- $\zeta$ -Ketten-Antikörpers überprüft.



**Abb. 3.9.1 Auswertestrategie für Analyse der TCR- $\zeta$ -Kette in mit MDSC kokultivierten Milzzellen.** Kokultivierte Zellen wurden mit Antikörper gegen CD3 sowie TCR- $\zeta$ -Kette inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. In FSC vs. SSC-Darstellung wurde auf lebende Zellen selektiert und anschließend die CD3<sup>+</sup> Population markiert. Alle CD3<sup>+</sup> Zellen wurden auf Fluoreszenzintensität des anti- $\zeta$ -Ketten-Antikörpers überprüft. Pro Probe wurden 100000 Zellen aufgenommen.

In den Zellkulturversuchen wurde die suppressorische Aktivität von MDSC aus BL/6-, *ret* transgenen sowie *ret* transgenen tumortragenden Mäusen *in vitro* verglichen. Abb. 3.9.2. fasst die Ergebnisse von vier unabhängigen Versuchen zusammen. Die TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in kokultivierten T-Zellen wird angegeben in Prozent der TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in Milzzellen, die ohne MDSC kultiviert wurden. TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in den mit MDSC kokultivierten Milzzellen fällt signifikant schwächer aus, wenn MDSC aus *ret* transgenen tumortragenden Mäusen zur Kokultur verwendet werden ( $p < 0,05$ ). Hier beträgt der MFI-Wert des TCR- $\zeta$ -Ketten-

Antikörpers 68% des Wertes für allein kultivierte Milzzellen, im gegensatz zu 79% bei Verwendung von MDSC aus BL/6-Mäusen.



**Abb. 3.9.2. %TCR-ζ-Ketten-Expression in mit MDSC kultivierten Milzzellen.** MDSC aus BL/6-, *ret* transgenen tumorfreien (*ret*) bzw. *ret* transgenen tumortragenden (*ret tu*) Mäusen wurden mit BL/6-Milzzellen inkubiert. Färbung der Kultur mit Antikörpern gegen CD3 sowie TCR-ζ-Kette und durchflusszytometrische Analyse. Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten, Angabe der TCR-ζ-Ketten-Expression in % zur Expression in allein kultivierten Kontroll-Milzzellen. \* $p < 0,05$

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass MDSC bei tumortragenden *ret* transgenen Mäusen im Knochenmark nicht nur angereichert vorliegen, sondern auch signifikant stärker suppressorisch gegenüber T-Zellen sind als BL/6-MDSC.

### 3.10 Analyse des Zytokinprofils *ret* transgener Mäuse

Um einen Überblick zu erhalten, welche Zytokine im *ret* transgenen Mausmodell an der Rekrutierung von MDSC sowie an MDSC-vermittelter Immunsuppression beteiligt sind, wurden Bioplex-Analysen mit Primärtumor- und metastasenhaltigem Lymphknotengewebe durchgeführt. Hierzu inkubierte die jeweilige Probe mit fluoreszenzgekoppelten "beads". Mittels Bioplex-Technologie erfolgte einerseits Detektion der in der Probe vorhandenen Zytokine über die spezifische Fluoreszenzmarkierung der beads, andererseits zusätzlich Quantifizierung der jeweiligen Zytokine über PE-gekoppeltes Streptavidin, das an eine Biotinmarkierung der beads bindet. Im Kontext myeloider Suppressorzellen sind IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , MCP-1, GM-CSF, M-CSF und VEGF von Bedeutung und waren mit Hilfe der Bio-Plex-Technologie zu analysieren.

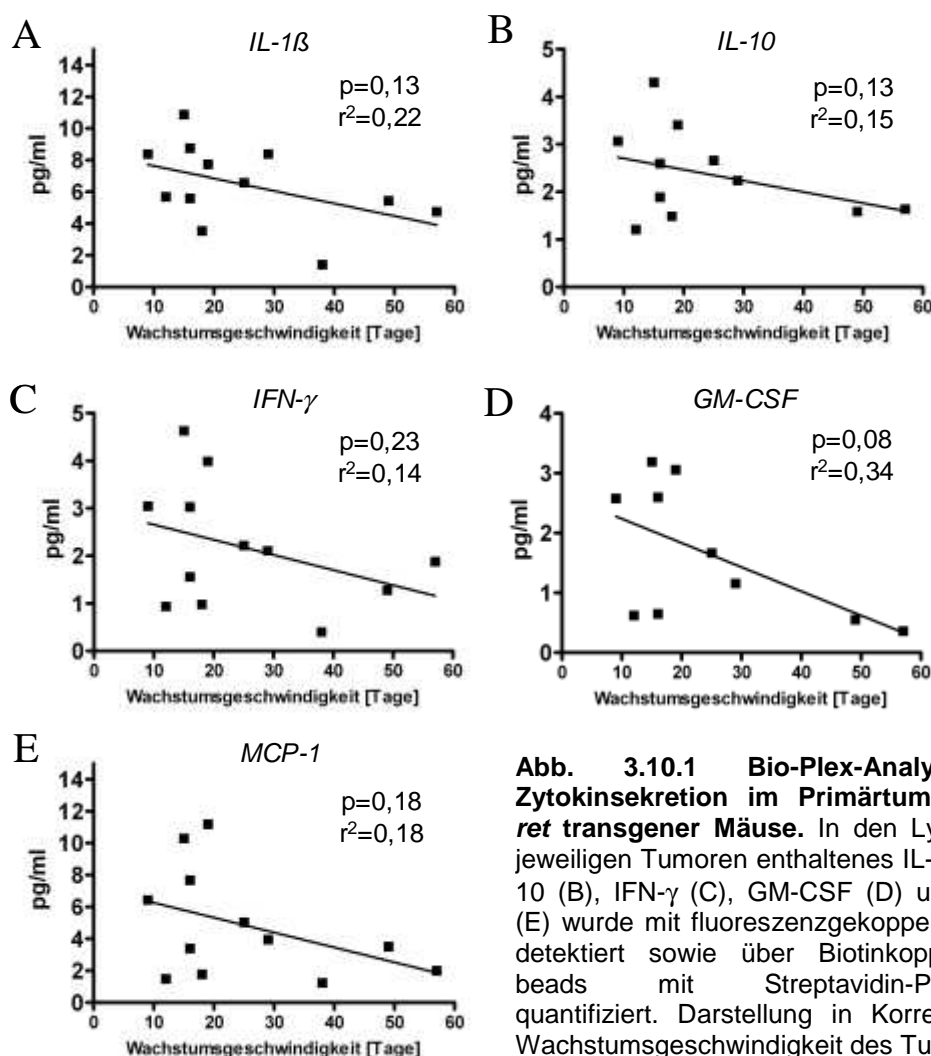
#### 3.10.1 Zytokinprofil im Primärtumorgewebe

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde in unserem Labor bereits eine signifikante Korrelationen zwischen Gewicht des Primärtumors und der Menge an sezerniertem VEGF im Tumorgewebe festgestellt (*Zhao et al. 2009*). Des weiteren wurde eine tendenzielle Korrelation des Tumorgewichts mit IL-10, IFN- $\gamma$ - sowie MCP-1-Spiegeln

ersichtlich (*Kimpfler 2008*).

Weitere Zytokinanalyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab bei Messung von IL-6-, IL-12, IL-13- und M-CS- Expression im Tumorstroma keine signifikante Änderung in Korrelation zum Gewicht oder der Wachstumsgeschwindigkeit analysierten Tumoren. Alle diese Zytokine werden jedoch, in unterschiedlichen Anteilen, detektiert.

Statistische Auswertung von IL-1 $\beta$  (Abb.3.10.1A), IL-10 (Abb.3.10.1B), IFN- $\gamma$  (Abb.3.10.1C), GM-CSF (Abb.3.10.1D), und MCP-1 (Abb.3.10.1E) im Tumorstroma ergibt eine tendenzielle Korrelation zur Wachstumsgeschwindigkeit des jeweiligen Tumors. Die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors wurde erfasst als Zeitraum von Tumordetektion bis zum Erreichen des finalen Krankheitsstadiums. IL-1 $\beta$ -Analyse im Tumorstroma (Abb. 3.10.1A) ergibt Werte zwischen 1,4 und 10,9 pg/ml. Die Konzentrationen von IL-10 (Abb. 3.10.1B) sowie IFN- $\gamma$  (Abb. 3.10.1C) liegen zwischen 1,2 und 4,3 pg/ml bzw. 0,4 und 4,6 pg/ml. Für GM-CSF (Abb. 3.10.1D) werden Anteile zwischen 0,36 und 3,2 pg/ml sowie für MCP-1 (Abb. 3.10.1E) zwischen 1,2 und 11,2 pg/ml detektiert.



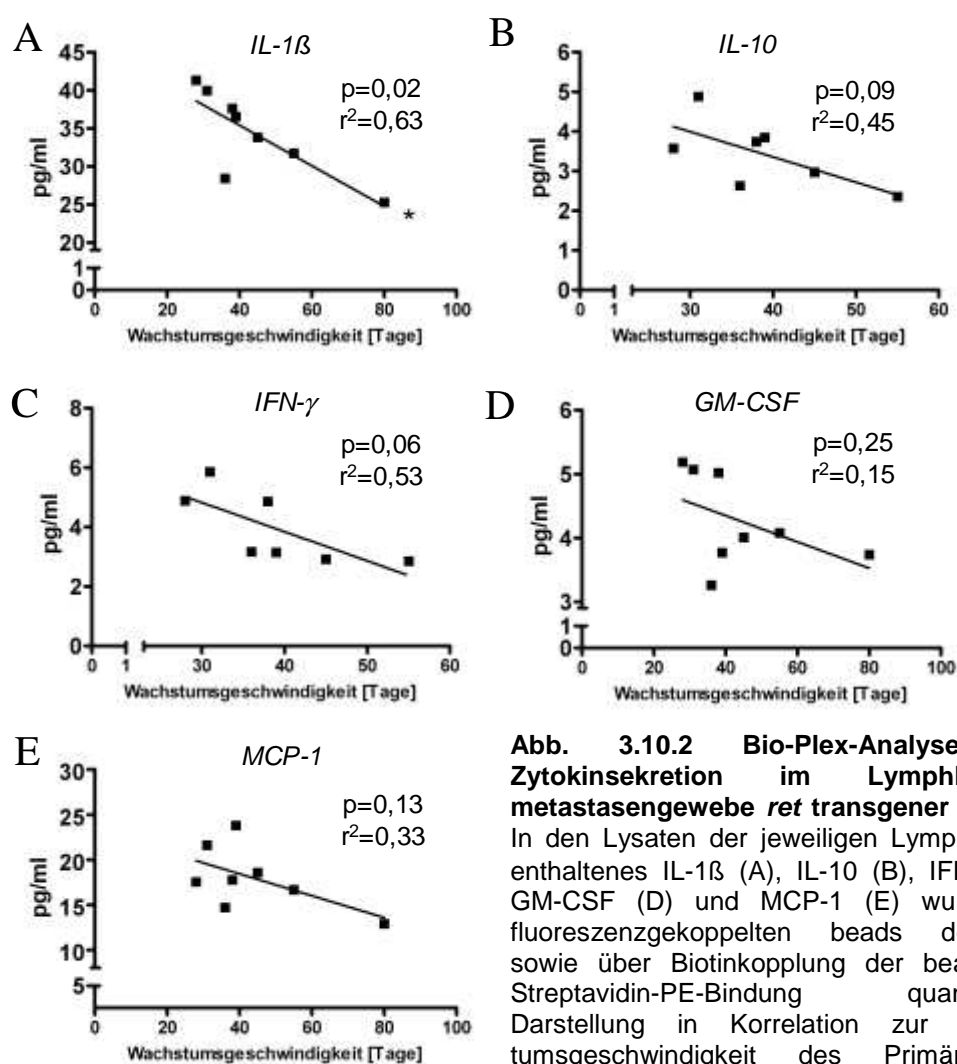
**Abb. 3.10.1 Bio-Plex-Analyse der Zytokinsekretion im Primärtumorgewebe *ret* transgener Mäuse.** In den Lysaten der jeweiligen Tumoren enthaltenes IL-1 $\beta$  (A), IL-10 (B), IFN- $\gamma$  (C), GM-CSF (D) und MCP-1 (E) wurde mit fluoreszenzgekoppelten beads detektiert sowie über Biotinkopplung der beads mit Streptavidin-PE-Bindung quantifiziert. Darstellung in Korrelation zur Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors.

Zusammenfassend kann durch dieses Experiment gezeigt werden, dass fünf der getesteten Zytokine, für die eine Beteiligung an der Rekrutierung myeloider Suppressorzellen beschrieben ist, im Tumorstroma schneller wachsender *ret*-Tumoren tendenziell stärker angereichert sind als in langsamer wachsenden Tumoren. Diese Zytokine spielen somit im *ret* transgenen Mausmodell eine größere Rolle bei Manifestierung der Immunsuppression während der schnell fortschreitenden Tumorprogression verglichen mit eher langsam wachsenden Tumoren.

### 3.10.2 Zytokinprofil in metastasenbefallenen Lymphknoten

Vorausgegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen signifikant erhöhte Mengen an IFN- $\gamma$  in metastasenbefallenem Lymphknotengewebe, verglichen mit metastasenfremen Lymphknoten tumortragender *ret* transgener Mäuse. Anreicherung von IL-10 und MCP-1 in metastasenhaltigem Lymphknotengewebe gegenüber metastasenfremem wurde tendenziell detektiert (*Kimpfler 2008*). Hingegen ergab weitere Analyse im Rahmen dieser Arbeit keine veränderte Expression von IL-6-, IL-12, IL-13-, M-CSF- und VEGF im metastasenbefallenen Lymphknotengewebe im Zusammenhang mit unterschiedlicher Größe oder Wachstumsgeschwindigkeit des Primärtumors.

Wie auch schon im Primärtumorgewebe ergibt sich jedoch bei IL-1 $\beta$  (Abb. 3.10.2A), IL-10 (Abb. 3.10.2B), IFN- $\gamma$  (Abb. 3.10.2C), GM-CSF (Abb. 3.10.2D), und MCP-1 (Abb. 3.10.2E) eine Korrelation mit der Wachstumsgeschwindigkeit des jeweiligen Primärtumors. Die detektierte Korrelation zwischen in metastasenhaltigen Lymphknoten angereicherten Zytokinmengen und der Wachstumsgeschwindigkeit des Primärtumors ist für die IL-1 $\beta$ -Messung bei einem Abfall der Regressionsgraden um  $r^2=0,633$  signifikant ( $p= 0,02$ ). Für IL-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF und MCP-1 ist der detektierte Effekt nur tendenziell. Die gemessenen Werte für IL-1 $\beta$  im Lymphknotengewebe (Abb. 3.10.2A) betragen zwischen 25,3 und 41,2 pg/ml, IL-10 (Abb. 3.10.2B) wird zwischen 2,4 und 4,9 pg/ml detektiert, IFN- $\gamma$  (Abb. 3.10.2C) zwischen 2,9 und 5,9 pg/ml. Bei Messung von GM-CSF (Abb. 3.10.2D) und MCP-1 (Abb. 3.10.2E) ergeben sich Werte zwischen 3,3 und 25,2 pg/ml bzw. 12,9 und 23,81 pg/ml.



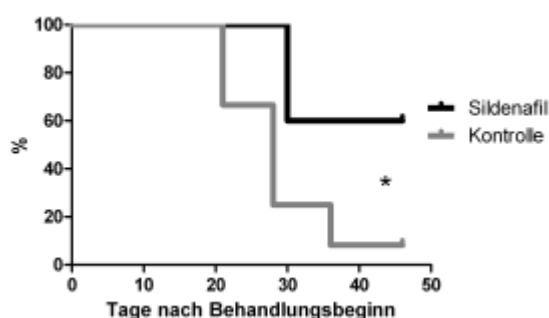
**Abb. 3.10.2 Bio-Plex-Analyse der Zytokinsekretion im Lymphknotenmetastasengewebe *ret* transgener Mäuse.** In den Lysaten der jeweiligen Lymphknoten enthaltenes IL-1 $\beta$  (A), IL-10 (B), IFN- $\gamma$  (C), GM-CSF (D) und MCP-1 (E) wurde mit fluoreszenzgekoppelten beads detektiert sowie über Biotinkopplung der beads mit Streptavidin-PE-Bindung quantifiziert. Darstellung in Korrelation zur Wachstumsgeschwindigkeit des Primärtumors. \* $p<0,05$

Bei Analyse des Zytokinprofils in metastasenhaltigem Lymphknotengewebe *ret* transgener Mäuse ergibt sich ein ähnliches Muster wie im Primärtumor. IL-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, und MCP-1, für die Beteiligung an MDSC-Rekrutierung und Induktion des immunsuppressiven Milieus bereits beschrieben sind, sind in Lymphknotenmetastasen schnell progressiver Tumoren eher angereichert als in Metastasen, die von langsamer progressiven Tumoren abstammen.

### 3.11 Auswirkungen von Sildenafilbehandlung auf Melanomentwicklung und MDSC-vermittelte Immunsuppression

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass orale Applikation von PDE-5-Inhibitor Sildenafil (Viagra®) in verschiedenen Tumortransplantationsmodellen Tumorwachstum verlangsamen kann (*Serafini et al. 2006*). Bisher liegen keinerlei Erkenntnisse über die Wirkung von PDE-5-Inhibitoren auf die anti-Tumor-Immunität in autochthonen Mausmodellen vor. Diese imitieren die klinische Situation besser als in der Vergangenheit verwendete Transplantationsmodelle und erlauben direkteren Vergleich mit der Therapiesituation von Tumorpatienten. Im *ret* transgenen Melanommausmodell sollte deshalb die Wirkung von Sildenafil auf die Überlebenszeit tumortragender Mäuse analysiert werden wie auch auf MDSC-Akkumulation und TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in Primärtumor und Lymphknotenmetastasen.

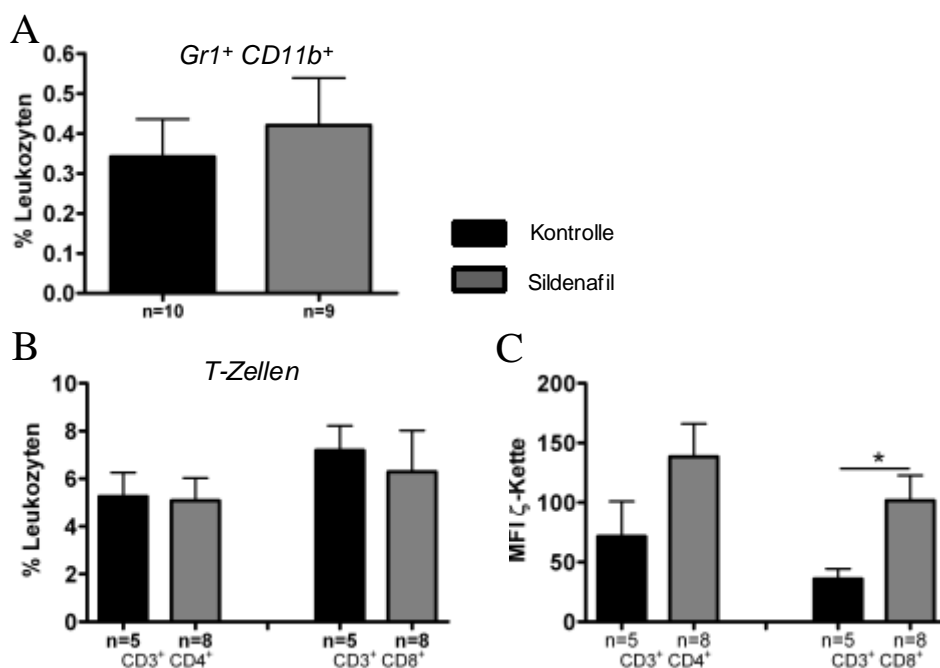
*Ret* transgenen tumortragenden Mäusen wurde Sildenafil als therapeutische Behandlung mit dem Trinkwasser verabreicht. Diese Dosis entspricht 20 mg/kg Körpergewicht/Tag. Eine zweite Gruppe Mäuse mit gleichem Tumorstadium zu Beginn des Experiments wurde als Kontrolle herangezogen. Zunächst wurde das Überleben beider Gruppen über einen Zeitraum von 45 Tagen nach Behandlungsbeginn statistisch erfasst. Abb. 3.11.1 stellt das erhaltene Ergebnis eines von zwei unanhängigen Experimenten dar. Es wird anhand dieser Daten deutlich, dass die Sildenafil behandelten tumortragenden Mäuse eine signifikant verbesserte Überlebensrate haben ( $p < 0,05$ ) und es zu Stabilisierung des Tumorwachstums kommt. Nach 45 Tagen waren noch 60% der behandelten Mäuse am Leben, in der Kontrollgruppe lediglich 10%.



**Abb. 3.11.1** Effekt von Sildenafilbehandlung auf Überleben *ret* transgener tumortragender Mäuse. Über einen Zeitraum von 45 Tagen wurde mit Sildenafil behandelt und das Überleben statistisch erfasst. \* $p < 0,05$

In einem nächsten Schritt wurden die Primärtumoren behandelter Mäuse auf MDSC- und T-Zellinfiltration sowie TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in tumorinfiltrierenden Lymphozyten untersucht. Hierzu wurden Einzelzellsuspensionen der Tumoren hergestellt, mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch gemessen.

Der Anteil tumorinfiltrierender MDSC (Abb. 3.11.2A) ist unter Sildenafilbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Auch die Menge tumorinfiltrierender T-Zellen (Abb. 3.11.2B) verändert sich nicht. Trotz gleichbleibender T-Zellanzahl werden Unterschiede in der Expression der TCR- $\zeta$ -Kette detektiert (Abb.3.11.2C). Für  $CD3^+CD4^+$  T-Zellen ergibt sich ein tendenzieller Anstieg der TCR- $\zeta$ -Expression. Ohne Sildenafilbehandlung beträgt der MFI-Wert des TCR- $\zeta$ -Ketten-Antikörpers 71,95, mit Behandlung steigt er auf 183,3.  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen zeigen ohne Sildenafilbehandlung einen MFI-Wert von 35,9, nach Behandlung erhöht sich der Wert auf 101,8. Dieser Effekt ist statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

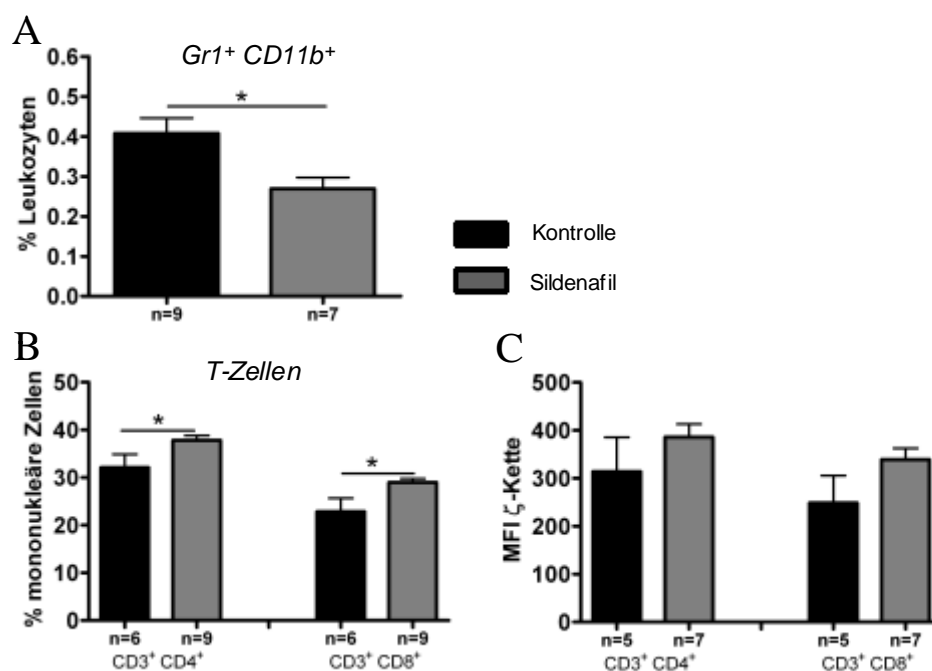


**Abb. 3.11.2 MDSC und T-Zellen in Primärtumoren *ret* transgener tumortragender Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung.** Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert und tumorinfiltrierende MDSC (A) sowie T-Zellanzahl (B) und TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression (C) durchflusszytometrisch gemessen. Pro Probe wurden 1000000 Zellen aufgenommen. \* $p < 0,05$

Dieses Versuchsergebnis macht deutlich, dass T-Zellen im Tumorstroma von Sildenafilbehandlung profitieren und die Auswirkungen des immunsuppressiven Milieus auf die TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression geringer ist, was in einer erhöhten Expression detektierbar ist.

Neben Analyse des Primärtumorgewebes war es von Interesse, auch die von Metastasen befallenen Lymphknoten auf MDSC- sowie T-Zell-Status nach der Behandlung mit Sildenafil zu überprüfen. Hier erfolgte ebenfalls durchflusszytometrische Auswertung nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern. Abb. 3.11.3 fasst die gemessenen Ergebnisse zusammen. Die Anzahl an MDSC in den Lymphknoten (Abb. 3.11.3A) beträgt in der Kontrollgruppe 0,41% und ist nach der Sildenafilbehandlung mit 0,27% signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ).

Die Anzahl tumorinfiltrierender  $CD3^+CD4^+$  sowie  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen (Abb. 3.11.3B) unterscheidet sich in beiden gemessenen Gruppen ebenfalls signifikant. Während ohne Sildenafilbehandlung 32,1%  $CD3^+CD4^+$  T-Zellen sowie 22,9%  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen detektiert werden, sind es nach der Behandlung 37,8%  $CD3^+CD4^+$  ( $p < 0,05$ ) sowie 29,0%  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen ( $p < 0,05$ ). Untersuchung der  $\zeta$ -Ketten-Expression im T-Zellrezeptor (Abb.3.11.3C) zeigt eine tendenzielle Erhöhung der MFI-Werte des TCR- $\zeta$ -Ketten-Antikörpers von 313,8 in  $CD3^+CD4^+$  sowie 248,7 in  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen für die unbehandelte Gruppe auf 386,1 in  $CD3^+CD4^+$  und 339,4 in  $CD3^+CD8^+$  T-Zellen nach Sildenafilbehandlung.



**Abb. 3.11.3 MDSC und T-Zellen in von Metastasen befallenen Lymphknoten *ret* transgener tumortragender Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung.** Einzelzellsuspensionen der Lymphknoten wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert und MDSC (A), T-Zellinfiltration (B) und TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression durchflusszytometrisch gemessen. Pro Probe wurden 100000 Zellen aufgenommen. \* $p < 0,05$

Insgesamt kann durch diesen Versuch gezeigt werden, dass Sildenafilbehandlung die MDSC-Anzahl in von Metastasen befallenen Lymphknoten reduziert und gleichzeitig die T-Zellanzahl erhöht. Die in tumortragenden Mäusen beobachtete Suppression der TCR- $\zeta$ -Kette fällt nach Sildenafilbehandlung wesentlich schwächer aus.

Mit der von uns durchgeführten Sildenafilbehandlung *ret* transgener tumortragender Mäuse sind wir in der Lage, die Überlebenszeit tumortragender Mäuse signifikant zu verlängern und Stabilisierung des Tumorwachstums zu erreichen. Im Primärtumor wie auch im metastasenhaltigen Lymphknotengewebe ist die T-Zellkonstitution verbessert, da die bei der Kontrollgruppe herunterregulierte TCR- $\zeta$ -Kette in tumorinfiltrierenden Lymphozyten wieder verstärkt exprimiert wird. Im Metastasengewebe der Lymphknoten kommt es außerdem zu einer erhöhten Infiltration mit T-Zellen sowie Verringerung des Anteils myeloider Suppressorzellen.

## 4. Diskussion

---

In der vorliegenden Arbeit wurden Gr1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> myeloide Suppressorzellen in einem Spontanmelanommausmodell des malignen Melanoms charakterisiert, mit dem Ziel eine Strategie zu entwickeln, die immunsuppressorische Aktivität dieser Zellen auf T-Zellen zu unterbinden oder abzuschwächen.

Das verwendete Tumormodell ist hinsichtlich einiger wesentlicher Faktoren wie Metastisierungsmuster der Tumorzellen, genetische Veränderung, Tumorlokalisierung und Tumorantigenexpression der klinischen Melanomsituation sehr ähnlich. Ein großer Vorteil gegenüber herkömmlichen Tumortransplantationsmodellen ist das spontane Tumorwachstum ausgehend von einer einzigen transformierten Zelle. Es wird eine natürliche Tumor-Stroma-Interaktion aufgebaut, wie sie bei Melanompatienten während des Tumorwachstums auftritt (*Umansky et al. 2008*).

### 4.1 Akkumulation myeloider Suppressorzellen in lymphatischen Organen

Obwohl Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen einheitlich als "Myeloid derived suppressor cells" (*Gabrilovich et al. 2007*) bzw. myeloid suppressor cells (*Bronte et al. 2001*) oder immature myeloid cells (*Gabrilovich et al. 2001*) bezeichnet werden, werden in einigen experimentellen Studien CD11b<sup>+</sup> Zellen mit MDSC gleichgesetzt. Gallina et al. zeigten 2006 (*Gallina et al. 2006*) in einem Modell des Kolonkzinoms, dass nach Tumorapplikation in der Milz zwei myelomonozytische Zellpopulationen angereichert sind. Phänotypische Charakterisierung ergab eine Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> sowie eine CD11<sup>+</sup> Population. Beide Fraktionen waren, isoliert aus tumortragenden Mäusen, in der Lage, Proliferation von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu unterdrücken. Die entsprechenden Populationen aus nicht tumortragenden Mäusen waren nicht suppressiv. In Folgeexperimenten wurden aus der Milz isolierte CD11b<sup>+</sup> Zellen, die, wie vorherige Analyse ergab teilweise Gr-1<sup>+</sup> waren, als MDSC eingesetzt (*Gallina et al. 2006*). In einer weiteren Studie 2008 wurden ebenfalls CD11b<sup>+</sup> Zellen als MDSC charakterisiert (*Serafini et al. 2008*). Da CD11b auf allen myeloiden Zellen und auch auf NK-Zellen exprimiert ist, wurde zur genauen Charakterisierung myeloider Suppressorzellen neben CD11b in dieser Arbeit immer Gr-1 eingeschlossen und nur

Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen als MDSC bezeichnet.

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass MDSC im Knochenmark, in der Milz sowie in Lymphknoten tumortragender *ret* transgener Mäuse akkumuliert sind und dass ihre Anzahl gegenüber BL/6-Wildtypmäusen signifikant erhöht ist. Dies bestätigt Ergebnisse von vorhergehenden Studien an anderen präklinischen Modellen solider oder hematopetischer Neoplasien (*Serafini et al. 2004; Serafini et al. 2006; Serafini et al. 2008*). Allerdings existieren auch widersprüchliche Ergebnisse aus anderen Studien, wonach Tumorwachstum und chronische Inflammation nicht mit einer Akkumulation von MDSC einhergehen. Terabe et al. (2003) untersuchten Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen in einem Fibrosarkommodell mit BALB/c-Hintergrund und detektierten keine signifikante Erhöhung der MDSC in der Milz tumortragender Mäuse. Produktion des immunsuppressiven Zytokins TGF- $\beta$  hingegen war bei MDSC aus Tumormäusen deutlich erhöht. In einer weiteren Untersuchung am B-Zell-Lymphom wurde festgestellt, dass bei Tumormäusen keine Akkumulation der MDSC in lymphatischen Organen erfolgt, jedoch die IL-4R $\alpha$ -Expression, einhergehend mit der suppressiven Funktion der Zellen, zunimmt (*Serafini et al. 2008*).

Die während unserer Messungen in BL/6-Mäusen detektierten MDSC-Zahlen von 28,2% im Knochenmark und 2,7% in der Milz korrelieren sehr gut mit Werten die aus anderen MDSC-Studien an BL/6 berichtet werden (*Gabrilovich und Nagaraj 2009; Li et al. 2009*). In *ret* transgenen tumortragenden Mäusen werden MDSC zusätzlich in den Lymphknoten während der Tumorentwicklung akkumuliert. In anderen Krankheits- Modellen, z.B. unter chronischer Bakterieller Infektion, migrieren MDSC nicht in Lymphknoten, obwohl Akkumulation von MDSC in der Milz auftritt und sowohl Lymphknoten als auch Milz stark vergrößert sind (*Ezernitchi et al. 2006*). Eine mögliche Erklärung für die Einwanderung myeloider Suppressorzellen in Lymphknoten bei *ret* transgenen Mäusen ist das Vorhandensein von Metastasen. Die Lymphknoten fungieren als Sekundärtumorgewebe, in das MDSC aufgrund tumorassoziierter Faktoren rekrutiert werden.

## 4.2 Phänotypische Charakterisierung von MDSC in lymphatischen Organen

Die im *ret* transgenen Melanommausmodell detektierten Subpopulationen der Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> MDSC weichen z. T. von der phänotypischen Erscheinung in Gr-1 vs. CD11b-Darstellung bei anderen Mausmodellen ab. Kürzlich veröffentlichte Studien belegen, dass diese Unterschiede auf tumorzellvermittelte Faktoren des jeweiligen Modells, nicht jedoch auf den Mausstamm zurückzuführen sind (Youn et al. 2008). Movahedi et al. (2008) verglichen Milz-MDSC aus dem BW-Sp3-Lymphommodell im AKR-Stamm sowie aus dem EL-4-Thymommodell in BL/6-Mäusen. Bei Analyse beider Tumortalinien auf einem gemischten AKR x BL/6-Hintergrund behielten die aus der Milz isolierten MDSC die vorher im ursprünglichen Mausstamm beobachteten Eigenschaften bei.

Da in allen drei gemessenen lymphatischen Organen bei *ret* transgenen tumortragenden Mäusen unterschiedliche MDSC-Populationen auftreten, liegt es nahe, dass diese heterogene morphologische Eigenschaften aufweisen, wie kürzlich von Movahedi et al. (2008) berichtet. Weitere Analysen sind notwendig, um zu klären, inwieweit im *ret* transgenen Mausmodell mononukleäre und polymorphnukleäre MDSC unterschieden werden können. Außerdem bleibt zu klären, ob die suppressive Aktivität aller Subpopulationen, wie sie von Movahedi et al. (2008) am Transplantations-Lymphommodell nachgewiesen wurde, auf das *ret* transgene Spontanmelanommodell übertragen werden kann.

Im Rahmen der MDSC-Analyse in *ret* transgenen Mäusen wurde deutlich, dass im Knochenmark als auch in der Milz alle Subpopulationen der MDSC gleichermaßen in tumortragenden Mäusen angereichert werden. Dies entspricht den Beobachtungen von Movahedi et al. (2008) an am BW-Sp3- sowie EL-4-Modell. Sie konnten außerdem zeigen, dass es in der Population der mononukleären MDSC zu einer Anreicherung von Monozyten, nicht jedoch Eosinophilen kommt. In anderen Tumormodellen hingegen werden entweder nur die polymorphnukleäre oder sowohl die polymorphnukleäre als auch die mononukleäre Population angereichert (Youn et al. 2008). Wie bereits erwähnt, ist die MDSC-Infiltration metastasenhaltiger Lymphknoten im *ret* transgenen Melanommodell auf die Anwesenheit von Tumorzellen bzw. sekretierten tumorzellassoziierten Faktoren zurückzuführen. Aus der gesamten MDSC-Population in Lymphknoten wird nur die Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Population in tumortragenden Mäusen angereichert, die Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>++</sup> und Gr-

$1^{++}CD11b^{++}$  Populationen verändern sich nicht. Dies ist ein erster Hinweis auf eine potenzielle Bedeutung der  $Gr-1^{+}CD11b^{+}$  Population bei der Immunsuppression.

#### 4.2.1 F4/80-Expression auf MDSC

Analyse der F4/80-Expression auf MDSC in lymphatischen Organen ergab, dass im *ret* transgenen Melanommausmodell nur ein kleiner Bruchteil aller  $Gr-1^{+}CD11b^{+}$  Zellen auch F4/80 exprimiert. Damit spielt die F4/80-Expression auf MDSC in diesem Mausmodell eine nur untergeordnete Rolle.

Bisherige Studien konnten die Rolle von F4/80 in MDSC bei tumorinduzierter chronischer Inflammation nicht komplett klären. Während Sinha et al. (2008) marginale bis keine F4/80-Expression bei MDSC aus Milz, Knochenmark und peripherem Blut eines Brustkrebsmodells detektieren können, finden Unemura et al. (2008) in einem murinen Adenokarzinom sowie Gliom mehr als 90% F4/80<sup>+</sup> Zellen in der CD11b<sup>+</sup> Population. Diese Ergebnisse sind jedoch nur bedingt mit unseren Daten vergleichbar, da die F4/80-Analyse bei Unemura et al. nicht in der  $Gr-1^{+}CD11b^{+}$  Population erfolgte.

Möglicherweise hängt die F4/80-Expression mit dem Reifestadium zusammen, in dem die Vorläuferzellen während der MDSC-Akkumulation blockiert wurden. Kusmartsev und Gabrilovich (2005) konnten durch adoptiven Transfer zeigen, dass immunsuppressive  $Gr-1^{+}CD11b^{+}F4/80^{+}$  tumorassoziierte Makrophagen aus  $Gr-1^{+}CD11b^{+}$  Vorläuferzellen entstehen. Das gleiche Ergebnis wurde von in Zellkulturversuchen erreicht. Bronte et al. (1998; 1999) wiesen nach, dass  $Gr-1^{+}CD11b^{+}$  MDSC, die einige Tage in Abwesenheit von Zytokinstimulation kultiviert werden, zu  $Gr-1^{+}CD11b^{+}F4/80^{+}$  Zellen reifen.

#### 4.2.2 IL-4R $\alpha$ -Expression auf MDSC

Unsere Analyse der IL-4R $\alpha$ -Expression auf MDSC im *ret* transgenen Melanommausmodell ergab, dass MDSC sowohl aus lymphatischen Organen als auch aus peripherem Blut und Tumorgewebe IL-4R $\alpha$  exprimieren, jedoch detektieren wir nur sehr geringe Expressionsraten von weniger als 4% positiver Zellen in den getesteten Proben. Dabei besteht kein signifikanter Unterschied in der IL-4R $\alpha$ -Expression zwischen MDSC aus tumortragenden Mäusen und dem entsprechenden Wildtyp, wie sie von Serafini et al. (2008) beobachtet wurde. Dies impliziert einige

Unterschiede in der IL-4R $\alpha$ -Expression bei MDSC aus verschiedenen Tumormodellen. In einer Studie wurden kürzlich MDSC aus zehn verschiedenen Mausmodellen untersucht, von denen die meisten IL-4R $\alpha$ -Expression zeigten (Youn *et al.* 2008; Gabrilovich und Nagaraj 2009). Signifikant erhöhte Level dieses Markers in tumortragenden Mäusen gegenüber Wildtyp wurde aber nur im EL-4, DA3- sowie CT26-Modell festgestellt. Von Gallina *et al.* (2006) wurde IL-4R $\alpha$  als Marker aller suppressiven Zellen innerhalb der gesamten MDSC-Population vorgeschlagen. Diese Überlegung gründet sich auf die Beobachtung, dass MDSC aus der Milz von IFN- $\gamma$ -"knock out" (KO)-Mäusen wie auch IL-4R $\alpha$ -KO-Mäusen nicht in der Lage sind, Induktion zytotoxischer Aktivität in einer "mixed leukocyte culture" zu unterdrücken. In der CD11b<sup>+</sup> MDSC-Population der Milz wurden sowohl IL-4R $\alpha$ <sup>+</sup> als auch IL4R $\alpha$ <sup>-</sup> Zellen gefunden, jedoch zeigen nur die IL-4Ra<sup>+</sup> Population suppressive Eigenschaften gegenüber T-Zellen. Gezielte Ausschaltung von IL-4R $\alpha$  in Makrophagen und Neutrophilen bestätigte, dass IL-4R $\alpha$  im C26-Kolonkarzinommodell als Marker für suppressive MDSC fungiert (Herbert *et al.* 2004; Gallina *et al.* 2006). Da sich Gallina *et al.* und auch Serafini *et al.* nur auf die CD11b<sup>+</sup> Population beschränken, in unserer Arbeit wie auch bei der von Youn *et al.* (2008) durchgeführten Studie aber Gr-1<sup>+</sup>CD11<sup>+</sup> Zellen untersucht werden, können den Unterschieden in der detektierten IL-4R $\alpha$ -Expression auch unterschiedlich verwendete Zellpopulationen zugrunde liegen.

#### 4.3 Tumorinfiltrierende MDSC

Analyse myeloider Suppressorzellen im Tumorstroma *ret* transgener Mäuse ergab, dass schnell wachsende Tumoren von höheren Anteilen MDSC infiltriert werden als Tumoren mit langsamerem Wachstum. Somit ist das immunsuppressive Milieu in schneller wachsenden Tumoren stärker. Da sich die Infiltration des Tumors mit MDSC bei schneller bzw. langsamer Tumorprogression signifikant unterscheidet, kann die im Tumor detektierte Menge myeloider Suppressorzellen als Marker der Tumorprogressionsrate herangezogen werden. Bei Tumorpatienten wurde in der Vergangenheit festgestellt, dass fortgeschrittene Tumorstadien ebenfalls mit größeren Mengen myeloider Suppressorzellen im Blut korrelierten (Nagaraj und

*Gabrilovich 2007*), Diaz-Montero et al. (2008) fanden ebenfalls erhöhte Mengen MDSC im peripheren Blut von Patienten mit soliden Tumoren.

#### 4.4 Verminderte Expression der TCR- $\zeta$ -Kette in lymphatischen Organen

Analyse der TCR- $\zeta$ -Expression in lymphatischen Organen bei *ret* transgenen Mäusen ergab signifikant erniedrigte Werte bei Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten in tumortragenden Mäusen. Im Knochenmark sind die MFI-Werte des  $\zeta$ -Ketten-Antikörpers verglichen mit denen in Milz und Lymphknoten in BL/6-, *ret* transgenen und auch *ret* transgenen tumortragenden Mäusen gleichermaßen erniedrigt. Dies ist zurückzuführen auf die generell sehr hohen MDSC-Zahlen, die wir im Knochenmark detektiert haben und ist möglicherweise ein physiologischer Mechanismus, T-Zellreaktivität im Knochenmark gering zu halten, bevor die Lymphozyten in die Peripherie entlassen werden. Dies zeigt, dass in tumortragenden *ret* transgenen Mäusen akkumulierte MDSC T-Lymphozyten beeinflussen und diese anergisch werden. Unsere Ergebnisse untermauern die Feststellung, dass chronische Antigenstimulation, die bei Tumorwachstum eintritt, mit Induktion einer MDSC-vermittelten Immunsuppression verbunden ist (*Baniyash 2004*).

Es ist bereits aus Studien im murinen wie im humanen System bekannt, dass chronische Antigenstimulation mit veränderter Expression der TCR- $\zeta$ -Kette einhergeht (*Matsuda et al. 1998; Horiguchi et al. 1999; Ezernitchi et al. 2006; Gruber et al. 2008*). Koexpression von Arg1 und iNOS in MDSC bewirkt, dass die Produktion von NO durch iNOS teilweise hin zu Superoxidradikalen verschoben wird (*Bronte und Zanovello 2005*). Superoxidradikale reagieren mit H<sub>2</sub>O-Molekülen zu Wasserstoffperoxid, das sich negativ auf die TCR- $\zeta$ -Expression auswirkt. Auch durch Arginaseaktivität wird TCR- $\zeta$ -Verlust vermittelt, da der Argininmetabolismus die Verfügbarkeit von Arginin drosselt und Anreicherung unbeladener "transporter-ribonucleic acid" (tRNA)-Moleküle bewirkt, die dann zu einer veränderten mRNA-Translation und TCR- $\zeta$ -Herunterregulation führen (*Bronte und Zanovello 2005*).

Im *ret* transgenen Melanommausmodell werden sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz, Lymphknoten und Knochenmark gleichermaßen supprimiert. Über die Beeinflussung beider T-Zell-Subpopulationen gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Sinha et al. (2005) stellen am 4T1-Tumorsystem in BALB/c-Mäusen fest,

dass MDSC lediglich in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Milz die ζ-Kette unterdrücken, nicht jedoch in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Andere Autoren wiederum detektieren, übereinstimmend mit den in unserer Untersuchung erzielten Ergebnissen, herunterregulierte TCR-ζ-Ketten-Expression in beiden T-Zellpopulationen (*Bronstein-Sitton et al. 2003; Fallarino et al. 2006*).

#### 4.5 Verminderte TCR-ζ-Ketten-Expression in Tumor-infiltrierenden

##### Lymphozyten

Abhängig vom Gewicht des jeweiligen Tumors zeigen *ret* transgene Mäuse unterschiedlich starke Expression der TCR-ζ-Kette in tumorinfiltrierenden Lymphozyten. Bei CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> TIL ergibt der Abfall der Regressionsgrade eine signifikant inverse Korrelation zwischen Tumorgewicht und TCR-ζ-Ketten-Expression. Bei Messung der TCR-ζ-Ketten-Expression in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TIL ergibt sich der gleiche Trend, der aber nicht statistisch signifikant ist. Betrachtet man die gemessenen Tumoren in je zwei Gruppen von mehr bzw. weniger als 700 mg Tumorgewicht, so ist das TCR-ζ-Ketten-Level in der Gruppe der größeren Tumoren jeweils signifikant erniedrigt.

Die von uns erzielten Ergebnisse bestätigen zahlreiche weitere Studien an murinen Modellen und auch im Humansystem, bei denen gezeigt werden konnte, dass tumorinfiltrierende Lymphozyten durch TCR-ζ-Ketten-Herunterregulation geschwächt sind (*Horiguchi et al. 1999; Reichert et al. 2001; Ishigami et al. 2002*). In unserer Analyse fällt auf, dass Tumoren unter 700 mg eine wesentlich bessere TCR-ζ-Expression in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufweisen als CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Da in unserem Labor in vergangenen Studien hohe Anzahlen an Treg besonders in kleineren Tumoren detektieren konnten (*Kimpfler 2008*), liegt es nahe, dass höhere TCR-ζ-Ketten-Spiegel bei CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> TIL durch erhöhte Treg-Infiltration dieser Tumoren verursacht werden. Bisher ist nicht bekannt, ob in einem immunsuppressiven Milieu Treg ebenfalls ihre TCR-ζ-Kette herunterregulieren. Erste Publikationen zu diesem Thema deuten an, dass Treg weniger empfindlich auf oxidativen Stress reagieren und somit ein immunsuppressives Umfeld, wie es von tumorinfiltrierenden MDSC verursacht wird, eher tolerieren können (*Mougiakakos et al. 2008*).

#### 4.6 Effekt von MDSC auf TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression

Um nachzuweisen, dass im *ret* transgenen Melanommodell, parallel mit bisherigen Publikationen, MDSC für die Herunterregulation der TCR- $\zeta$ -Kette verantwortlich sind, wurden aus dem Knochenmark isolierte MDSC mit Milzzellen kultiviert. Neben MDSC aus *ret* transgenen tumortragenden Mäusen wurden auch MDSC aus *ret* transgenen tumorfreien- und BL/6-Mäusen eingesetzt. Es ist wichtig, Kulturzeiten von MDSC möglichst kurz zu halten, da einige Studien in der Vergangenheit gezeigt haben, dass MDSC in Kultur zur suppressiven Makrophagen heranreifen und nicht mehr als MDSC analysiert werden können (*Movahedi et al. 2008; Youn et al. 2008*). TCR- $\zeta$ -Ketten-Messung nach einer Inkubationszeit von 14 Stunden ergibt signifikant erniedrigte Werte in Milzzellen, die mit MDSC aus *ret* transgenen tumortragenden bzw. *ret* transgenen tumorfreien Mäusen kultiviert wurden im Vergleich zur Kokultur mit BL/6-MDSC. Zur Kalkulation der TCR- $\zeta$ -Ketten-Werte wurde die Expressionsrate in allein kultivierten BL/6-Milzzellen als 100% angesehen, um TCR- $\zeta$ -Ketten-Veränderungen, die durch endogene MDSC in der Milz verursacht werden, abzuziehen. Die von uns erzielten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass MDSC aus tumortragenden Mäusen nicht nur angereichert vorliegen, wie die vorangegangenen Versuche gezeigt haben, sondern auch stärker suppressiv sind. Interessanterweise waren die MDSC aus dem Knochenmark *ret* transgener tumorfreier Tiere ebenso suppressiv wie solche aus tumortragenden Mäusen. Da das Knochenmark als Quelle myeloider Suppressorzellen angesehen wird (*Serafini et al. 2006*) und *ret* transgene tumorfreie Mäuse das Potenzial besitzen chronische Inflammation, Immunsuppression und Tumorwachstum zu entwickeln, lässt sich spekulieren, ob stark suppressive MDSC im Knochenmark ein erstes Zeichen für eine beginnende Immunsuppression in diesen Mäusen sind.

Marigo et al publizierten (2008), dass MDSC aus dem Knochenmark in Kultur nur in nicht-physiologischen Verdünnungen suppressiv auf T-Zellen wirken. Im *ret* transgenen Melanommodell konnten wir im Knochenmark tumortragender Mäuse bis zu 40% MDSC detektieren, der T-Zellanteil lag bei 3-4%.

Das physiologische Effektor-Target-Verhältnis von MDSC zu T-Zellen im Knochenmark liegt mit 10:1 wesentlich über dem in der Kultur verwendeten Verhältnis von 0,6 MDSC zu 1 T-Zelle. Unsere Ergebnisse am *ret* transgenen Mausmodell zeigen, dass MDSC aus dem Knochenmark auch in nicht

physiologischen Verhältnissen suppressiv auf T-Zellen wirken.

#### **4.7 Analyse des Zytokinprofils im Primärtumor sowie in Lymphknotenmetastasen *ret* transgener Mäuse**

Vorangegangene Versuche im Rahmen dieser Arbeit konnten zeigen, dass im *ret* transgenen Melanommodell myeloide Suppressorzellen angereichert vorliegen und T-Zellsuppression über Verminderung der TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression ausüben. Die nachfolgende Analyse des Zytokinprofils in Primärtumoren sowie in Lymphknotenmetastasen sollte Aufschluss darüber geben, welche Zytokine an Entstehung des immunsuppressiven Milieus beteiligt sind. Sowohl Tumorzellen selbst als auch die umgebenden Zellen des Tumorstromas tragen mit ihrer jeweiligen Zytokinsekretion zur Entstehung der charakteristischen Tumormikroumgebung bei. Tumorstromazellen bilden keine passive Mikroumgebung sondern interagieren mit malignen Zellen. Diese spezifische Interaktion ist in der Lage, Tumorprogression zu fördern und Metastasierung maligner Neoplasien zu bewirken (*Witz 2008*).

Im Rahmen dieser Arbeit per Bio-Plex-Assay analysierte Zytokine waren IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , MCP-1, GM-CSF, G-CSF, M-CSF sowie VEGF. Diese Zytokinkombination stellt nur einen Teil des gesamten aus anderen experimentellen Modellen bekannten Zytokinprofils von MDSC dar (*Gabrilovich und Nagaraj 2009*), jedoch kann diese Auswahl bereits ein differentielles Bild vermitteln und eine Einschätzung der an der Immunsuppression beteiligten Komponenten ermöglichen.

Die durchgeführte Analyse ergab, dass Tumoren mit schnellerer Wachstumsgeschwindigkeit IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF und MCP-1 sowohl im Primärtumor als auch in Lymphknotenmetastasen vermehrt anreichern.

Das in dieser Arbeit festgestellte unterschiedliche Zytokinprofil in schneller und langsamer wachsenden *ret*-Tumoren geht mit einer unterschiedlichen Akkumulation myeloider Suppressorzellen in schneller und langsamer wachsenden Tumoren einher und impliziert eine Beteiligung von IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF und MCP-1 an Rekrutierung dieser Zellen in den Primärtumor und Lymphknotenmetastasen.

Die Bedeutung des vorherrschenden Zytokinprofils zur MDSC-vermittelten Immunsuppression wurde in einer Studie *in vivo* belegt (*Kusmartsev und Gabrielovich 2003*). MDSC, die in tumortragende Mäuse transferiert werden, behalten ihren

suppressiven Phänotyp bei, während MDSC in gesunden Mäusen zu antigenpräsentierenden Zellen differenzieren (*Kusmartsev und Gabrilovich 2003*).

Aufgrund ihres bisher beschriebenen Zytokinprofils lassen sich MDSC nicht in die bisher gängige Einteilung nach klassisch aktivierten M1- bzw. alternativ aktivierten M2-Makrophagen einteilen, da sie sowohl proinflammatorische M1-Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IFN- $\gamma$  produzieren als auch immunsuppressives M2-Zytokin TGF- $\beta$  sezernieren (*Gallina et al. 2006; Umemura et al. 2008*).

Die Rolle von IL-1 $\beta$  während einer chronischen Entzündungsreaktion ist in mehreren Studien untersucht worden. Bunt et al. (2006) konnten nachweisen, dass erhöhte IL-1 $\beta$ -Spiegel Rekrutierung von MDSC auslösen. Diese Ergebnisse wurden kürzlich bestätigt (*Tu et al. 2008*). Umemura et al. (2008) gelang der Nachweis, dass neben Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen auch MDSC IL-1 $\beta$  produzieren.

IL-10 ist aus der Literatur bereits als Marker für Immunsuppression und T-Zell-Anergie bekannt. Es wird von Tumorzellen, aber auch von MDSC selbst sezerniert (*Chen et al. 2001*). Cheng et al. (2001) konnten zeigen, dass MDSC nach Stimulation durch IFN- $\gamma$  IL-10 ausschütten und die Entwicklung regulatorischer T-Zellen induzieren können. Serafini et al. (2006) beobachteten, dass IL-10 einen wichtigen Faktor zur Expression von Arg1 und iNOS bei MDSC darstellt und zur Vermittlung inhibitorischer Funktionen wichtig ist.

IFN- $\gamma$  wird von hyperaktivierten T-Zellen während einer chronischen Entzündungsreaktion in großen Mengen ausgeschüttet (*Baniyash 2004*). Baniyash et al. (2004) entwickelten die Theorie, dass dies zur MDSC-Rekrutierung in lymphatische Organe führt. Des Weiteren gelang Gallina et al. (2006) der Nachweis, dass MDSC IFN- $\gamma$  produzieren und dieses Zytokin nur von der suppressiven IL-4R $\alpha$ -positiven Population sezerniert wird. MDSC isoliert aus der Milz von IFN- $\gamma$ -KO-Mäusen war nicht suppressiv gegenüber T-Zellen.

Obwohl GM-CSF lange Zeit immunstimulatorische Wirkung zugeschrieben wurde und es als Adjuvanz in Tumorstoffen zum Einsatz kam (*Bronte et al. 1999*), wurden in den letzten Jahren vermehrt immunsuppressorische Eigenschaften entdeckt (*Bronte et al. 1999*). Es wird von einem großen Teil aller Tumorzelllinien sezerniert. Bronte et al. (1999) wiesen nach, dass exogen zugeführtes oder von Tumorzellen produziertes GM-CSF MDSC in sekundäre lymphatische Organe rekrutieren kann und deren Suppression zytotoxischer T-Zellen auslöst. Von Tumorzellen sezerniertes

MCP-1 (CCL2) war lange Zeit als wichtiger Faktor zur Chemoattraktion von Monozyten in den Inflammationsherd bekannt (*Neumark et al. 1999*). Eine neuere Studie konnten zeigen, dass MCP-1-Ligand CCR-2 ebenfalls auf MDSC exprimiert ist und MCP-1 auch zur MDSC-Rekrutierung beiträgt. *In vitro*-Migrationsexperimente ergaben, dass MCP-1 aus humanem Tumorgewebe für Rekrutierung der CCR2-positiven MDSC verantwortlich ist (*Huang et al. 2007*).

Viele der gemessenen Zytokine und Chemokine können als lösliche Mediatoren des Immunsystems komplexe Wirkung auf eine Vielzahl an Zielzellen und Signaltransduktionswegen ausüben und vermögen Tumorummunantworten sowohl zu verstärken als auch zu unterdrücken (*Ben-Baruch 2006*). Betrachtet man die Ergebnisse der von uns gemessenen Zytokine im Kontext der MDSC-Akkumulation, die im *ret* transgenen Mausmodell beobachtet wird, so korreliert die erhöhte Freisetzung von IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF und MCP-1 im Primärtumorgewebe schneller progressiver Tumoren mit der verstärkten Rekrutierung von MDSC. Langsam progressive Tumoren sezernieren geringere Mengen dieser Zytokine und sind von einem geringeren Anteil MDSC infiltriert.

Aus allen im Rahmen dieser Arbeit analysierten Zytokinen kann IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF und MCP-1 eine Rolle bei Induktion des immunsuppressorischen Milieus und Rekrutierung myeloider Suppressorzellen zugeschrieben werden und bestätigt, dass die Ergebnisse der oben genannten Studien auch für das *ret* transgene Melanommausmodell gelten.

#### **4.8 Wirkung von Sildenafilbehandlung auf Melanomprogression und immunsuppressorische Effekte der MDSC**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der PDE-5-Inhibitor Sildenafil (Viagra<sup>®</sup>) als antiinflammatorische pharmakologische Komponente eingesetzt, um NO-Produktion bei MDSC zu schwächen und TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in tumorinfiltrierenden T-Zellen zu verbessern. Es wurde in der Vergangenheit nachgewiesen, dass durch eine solche Behandlung die Zytotoxizität gegen den Tumor *in vivo* verstärkt wird und Tumoren vermehrt mit aktivierten T-Zellen infiltriert werden (*Serafini et al. 2006*). Auf intratumoralen MDSC bewirkte Sildenafil geringere Arg1- sowie iNOS-Expression. Zellkulturversuche zeigten außerdem geringere IL-4R $\alpha$ -Expression auf MDSC sowie

verstärkte Proliferation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bei Inkubation mit Sildenafil (*Serafini et al. 2006*).

Es liegen bisher keine Ergebnisse über sildenafilvermittelte Effekte zur Reduktion der Immunsuppression in murinen autochthonen Tumormodellen vor. Da diese der klinischen Situation hinsichtlich der Interaktion des Tumors mit dem Immunsystem bei Melanompatienten wesentlich ähnlicher sind als Transplantationsmodelle, sind eher Rückschlüsse auf einen möglichen Therapieerfolg gegeben. Außerdem gibt es bisher keinerlei Daten über die TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in TIL nach Sildenafilapplikation, die nötig sind, um die T-Zellkonstitution nach Behandlung einschätzen zu können.

Die nach statistischer Auswertung unseres Experiments erhaltenen Daten verdeutlichen, dass sildenafilbehandelte tumortragende *ret* transgene Mäuse, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine signifikant verbesserte Überlebensrate haben. Um zu untersuchen, ob dem erzielten Behandlungsvorteil immunologische Ursachen zugrunde liegen, wurden Primärtumoren wie auch Lymphknotenmetastasen auf MDSC- sowie T-Zellinfiltration untersucht. Im Primärtumorgewebe sind die Anteile an MDSC bzw. TIL nach Behandlung nicht signifikant verändert, jedoch ist die TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression in TIL deutlich erhöht. In metastasenhaltigen Lymphknoten wurden neben verbesserter TCR- $\zeta$ -Ketten-Expression des Weiteren höhere T-Zellinfiltration sowie reduzierte MDSC-Anzahlen detektiert. Unsere Ergebnisse bestätigen die von anderen Gruppen bereits berichtete Abschwächung immunsuppressiver MDSC durch Sildenafilbehandlung (*Serafini et al. 2006; Serafini et al. 2008; Capuano et al. 2009*) und zeigen zum ersten Mal, dass Sildenafilbehandlung in der Lage ist, die Expression der TCR- $\zeta$ -Kette in tumorinfiltrierenden Lymphozyten zu erhöhen.

Erhöhung der TCR- $\zeta$ -Kette in tumorinfiltrierenden Lymphozyten nach Therapie gilt als positiver prognostischer Marker für Therapieerfolg und Überlebensrate (*Reichert et al. 2001; Ishigami et al. 2002; Whiteside 2004*). Dies impliziert eine verbesserte T-Zellkonstitution und bessere Erfolgsaussichten für eine Vakzinierung gegen Tumorantigene oder auch adoptiven Transfer nach Sildenafilbehandlung.

Wie von *Serafini et al. (2006)* bereits veröffentlicht, kann Sildenafilbehandlung in murinen Kolonkarzinom- und Brustkrebsmodellen Tumorwachstum verlangsamen. Außerdem wurde die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen den Tumor erhöht und

---

T-Zellinfiltration des Tumors verstärkt. Der zugrundeliegende Mechanismus ist der der cGMP-Akkumulation durch intrazelluläres Blockieren von PDE-5. Erhöhte cGMP-Spiegel hemmen auf mRNA-Ebene iNOS, so dass weniger NO sekretiert wird (Serafini et al. 2006).

Orale Applikation von Sildenafil hat sich in der Klinik bei Behandlung zahlreicher Krankheiten, darunter erektile Dysfunktion (Setter et al. 2005), Hypertonie (Takimoto et al. 2005) sowie pulmonale Hypertonie (Lee et al. 2005) bewährt. Das Medikament ist somit bereits verfügbar und kann rasch in klinischen Studien auch bei Tumorpatienten eingesetzt werden. Die von uns für orale Applikation bei *ret* transgenen tumortragenden Mäusen verwendete Sildenafilosis von 20 mg/Tag/kg Körpergewicht entspricht einer wesentlich höheren Menge als die standardmäßig bei Patienten verwendete Menge von 0,71 mg/Tag/kg Körpergewicht. Es bleibt abzuwarten, inwieweit die bisher für Behandlung anderer Krankheiten verwendete Dosis angewandt werden kann, oder ob eine Anpassung vorzunehmen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MDSC im *ret* transgenen Melanommodell hinsichtlich ihres Phänotyps, ihrer Verteilung sowie ihrer immunsuppressorischen Wirkung auf T-Zellen charakterisiert. Wir konnten nachweisen, dass MDSC während des Tumorwachstums akkumulieren und die Expression der  $\zeta$ -Kette im TCR herunterregulieren. Durch T-Zell-Suppression in tumortragenden Organismen sind die Möglichkeiten für erfolgreiche Durchführung adoptiver T-Zelltransfers oder anti-Tumor-Vakzinierungen limitiert. Das Ziel, die immunsuppressorischen Auswirkungen der MDSC auf T-Zellen zu schwächen und T-Zellkonstitution im Tumor sowie Metastasengewebe zu verbessern, wurde mit Sildenafilbehandlung tumortragender Mäuse erreicht. Neutralisierung des immunsuppressorischen Milieus schafft wesentlich bessere Voraussetzung für eine erfolgreiche Tumor-Immuntherapie, da durch Vakzinierung aktivierte oder adoptiv transferierte T-Zellen nicht im immunsuppressorischen Milieu unterdrückt werden.

Der von uns entwickelte Weg, MDSC-vermittelte Immunsuppression *in vivo* abzuschwächen und die Konstitution tumorinfiltrierender T-Zellen zu verbessern, ermöglicht neue Perspektiven für die Immuntherapie bei Melanompatienten in der Klinik.

## 5. Literatur

---

Ahmadzadeh, M. und Rosenberg, S. A. (2005) "*TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells*" J Immunol 174(9): 5215-23

Ahmadzadeh, M. und Rosenberg, S. A. (2006) "*IL-2 administration increases CD4+ CD25(hi) Foxp3+ regulatory T cells in cancer patients*" Blood 107(6): 2409-14

al-Ramadi, B. K., Brodtkin, M. A., Mosser, D. M. und Eisenstein, T. K. (1991) "*Immunosuppression induced by attenuated Salmonella. Evidence for mediation by macrophage precursors*" J Immunol 146(8): 2737-46

Alarcon, B., Gil, D., Delgado, P. und Schamel, W. W. (2003) "*Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers*" Immunol Rev 191: 38-46

Almand, B., Clark, J. I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N. R., Knight, S. C., Carbone, D. P. und Gabrilovich, D. I. (2001) "*Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer*" J Immunol 166(1): 678-89

Ambrosini, G., Adida, C. und Altieri, D. C. (1997) "*A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma*" Nat Med 3(8): 917-21

Angulo, I., Jimenez-Diaz, M. B., Garcia-Bustos, J. F., Gargallo, D., de las Heras, F. G., Munoz-Fernandez, M. A. und Fresno, M. (2002) "*Candida albicans infection enhances immunosuppression induced by cyclophosphamide by selective priming of suppressive myeloid progenitors for NO production*" Cell Immunol 218(1-2): 46-58

Asai, M., Kato, M., Asai, N., Iwashita, T., Murakami, H., Kawai, K., Nakashima, I. und Takahashi, M. (1999) "*Differential regulation of MMP-9 and TIMP-2 expression in malignant melanoma developed in metallothionein/RET transgenic mice*" Jpn J Cancer Res 90(1): 86-92

Ashley, D. M., Faiola, B., Nair, S., Hale, L. P., Bigner, D. D. und Gilboa, E. (1997) "*Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors*" J Exp Med 186(7): 1177-82

Azim, H. und Azim, H. A., Jr. (2008) "*Targeting Her-2/neu in breast cancer: as easy as this!*" Oncology 74(3-4): 150-7

Bakker, A. B., Schreurs, M. W., de Boer, A. J., Kawakami, Y., Rosenberg, S. A., Adema, G. J. und Figdor, C. G. (1994) "*Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes*" J Exp Med 179(3): 1005-9

- Balch, C. M. (2002) "*Surgical margins for melanoma: is 2 cm too much?*" ANZ J Surg 72(4): 251-2
- Banchereau, J. und Steinman, R. M. (1998) "*Dendritic cells and the control of immunity*" Nature 392(6673): 245-52
- Baniyash, M. (2004) "*TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response*" Nat Rev Immunol 4(9): 675-87
- Baniyash, M., Hsu, V. W., Seldin, M. F. und Klausner, R. D. (1989) "*The isolation and characterization of the murine T cell antigen receptor zeta chain gene*" J Biol Chem 264(22): 13252-7
- Barth, A., Wanek, L. A. und Morton, D. L. (1995) "*Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases*" J Am Coll Surg 181(3): 193-201
- Ben-Baruch, A. (2006) "*Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators*" Semin Cancer Biol 16(1): 38-52
- Blank, C., Gajewski, T. F. und Mackensen, A. (2005) "*Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy*" Cancer Immunol Immunother 54(4): 307-14
- Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D. und Gilboa, E. (1996) "*Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo*" J Exp Med 184(2): 465-72
- Bodor, J., Fehervari, Z., Diamond, B. und Sakaguchi, S. (2007) "*ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells*" Eur J Immunol 37(4): 884-95
- Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., Stoll, S., Schild, H., Staeger, M. S., Stassen, M., Jonuleit, H. und Schmitt, E. (2007) "*Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*" J Exp Med 204(6): 1303-10
- Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De Plaen, E., Lethe, B., Coulie, P. und Boon, T. (1993) "*The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas*" J Exp Med 178(2): 489-95
- Bronstein-Sitton, N., Cohen-Daniel, L., Vaknin, I., Ezernitchi, A. V., Leshem, B., Halabi, A., Hourri-Hadad, Y., Greenbaum, E., Zakay-Rones, Z., Shapira, L. und Baniyash, M. (2003) "*Sustained exposure to bacterial antigen induces interferon-gamma-dependent T cell receptor zeta down-regulation and impaired T cell function*" Nat Immunol 4(10): 957-64
- Bronte, V. (2008) "*Th17 and cancer: friends or foes?*" Blood 112(2): 214

- 
- Bronte, V., Apolloni, E., Cabrelle, A., Ronca, R., Serafini, P., Zamboni, P., Restifo, N. P. und Zanovello, P. (2000) "*Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells*" *Blood* 96(12): 3838-46
- Bronte, V., Chappell, D. B., Apolloni, E., Cabrelle, A., Wang, M., Hwu, P. und Restifo, N. P. (1999) "*Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation*" *J Immunol* 162(10): 5728-37
- Bronte, V., Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F. und Viola, A. (2005) "*Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers*" *J Exp Med* 201(8): 1257-68
- Bronte, V., Serafini, P., Apolloni, E. und Zanovello, P. (2001) "*Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells*" *J Immunother* 24(6): 431-46
- Bronte, V., Wang, M., Overwijk, W. W., Surman, D. R., Pericle, F., Rosenberg, S. A. und Restifo, N. P. (1998) "*Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells*" *J Immunol* 161(10): 5313-20
- Bronte, V. und Zanovello, P. (2005) "*Regulation of immune responses by L-arginine metabolism*" *Nat Rev Immunol* 5(8): 641-54
- Bubenik, J. (1996) "*Cytokine gene-modified vaccines in the therapy of cancer*" *Pharmacol Ther* 69(1): 1-14
- Bunt, S. K., Sinha, P., Clements, V. K., Leips, J. und Ostrand-Rosenberg, S. (2006) "*Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression*" *J Immunol* 176(1): 284-90
- Butcher, E. C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L. und Briskin, M. (1999) "*Lymphocyte trafficking and regional immunity*" *Adv Immunol* 72: 209-53
- Capuano, G., Rigamonti, N., Grioni, M., Freschi, M. und Bellone, M. (2009) "*Modulators of arginine metabolism support cancer immunosurveillance*" *BMC Immunol* 10: 1
- Cauley, L. S., Miller, E. E., Yen, M. und Swain, S. L. (2000) "*Superantigen-induced CD4 T cell tolerance mediated by myeloid cells and IFN-gamma*" *J Immunol* 165(11): 6056-66
- Cederbom, L., Hall, H. und Ivars, F. (2000) "*CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells*" *Eur J Immunol* 30(6): 1538-43

- Cesana, G. C., DeRaffele, G., Cohen, S., Moroziewicz, D., Mitcham, J., Stoutenburg, J., Cheung, K., Hesdorffer, C., Kim-Schulze, S. und Kaufman, H. L. (2006) "*Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma*" J Clin Oncol 24(7): 1169-77
- Chen, M. L., Wang, F. H., Lee, P. K. und Lin, C. M. (2001) "*Interleukin-10-induced T cell unresponsiveness can be reversed by dendritic cell stimulation*" Immunol Lett 75(2): 91-6
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J. und Mountz, J. D. (1994) "*Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule*" Science 263(5154): 1759-62
- Cheng, P., Corzo, C. A., Luetkeke, N., Yu, B., Nagaraj, S., Bui, M. M., Ortiz, M., Nacken, W., Sorg, C., Vogl, T., Roth, J. und Gabrilovich, D. I. (2008) "*Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein*" J Exp Med 205(10): 2235-49
- Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T. und Lucas, S. (2001) "*An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family*" Cancer Res 61(14): 5544-51
- Chung, D. R., Kasper, D. L., Panzo, R. J., Chitnis, T., Grusby, M. J., Sayegh, M. H. und Tzianabos, A. O. (2003) "*CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism*" J Immunol 170(4): 1958-63
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. und Vignali, D. A. (2007) "*The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*" Nature 450(7169): 566-9
- Coulie, P. G., Brichard, V., Van Pel, A., Wolfel, T., Schneider, J., Traversari, C., Mattei, S., De Plaen, E., Lurquin, C., Szikora, J. P., Renauld, J. C. und Boon, T. (1994) "*A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas*" J Exp Med 180(1): 35-42
- Danna, E. A., Sinha, P., Gilbert, M., Clements, V. K., Pulaski, B. A. und Ostrand-Rosenberg, S. (2004) "*Surgical removal of primary tumor reverses tumor-induced immunosuppression despite the presence of metastatic disease*" Cancer Res 64(6): 2205-11
- Dannull, J., Su, Z., Rizzieri, D., Yang, B. K., Coleman, D., Yancey, D., Zhang, A., Dahm, P., Chao, N., Gilboa, E. und Vieweg, J. (2005) "*Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells*" J Clin Invest 115(12): 3623-33
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson,

B. A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J. W., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Weber, B. L., Seigler, H. F., Darrow, T. L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C. J., Wooster, R., Stratton, M. R. und Futreal, P. A. (2002) "*Mutations of the BRAF gene in human cancer*" *Nature* 417(6892): 949-54

de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H. und Scheffold, A. (2004) "*Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function*" *Eur J Immunol* 34(9): 2480-8

De Santo, C., Serafini, P., Marigo, I., Dolcetti, L., Bolla, M., Del Soldato, P., Melani, C., Guiducci, C., Colombo, M. P., Iezzi, M., Musiani, P., Zanovello, P. und Bronte, V. (2005) "*Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(11): 4185-90

de Visser, K. E., Eichten, A. und Coussens, L. M. (2006) "*Paradoxical roles of the immune system during cancer development*" *Nat Rev Cancer* 6(1): 24-37

Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B. und Robson, S. C. (2007) "*Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*" *J Exp Med* 204(6): 1257-65

Delano, M. J., Scumpia, P. O., Weinstein, J. S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K. M., O'Malley, K. A., Wynn, J. L., Antonenko, S., Al-Quran, S. Z., Swan, R., Chung, C. S., Atkinson, M. A., Ramphal, R., Gabrilovich, D. I., Reeves, W. H., Ayala, A., Phillips, J., Laface, D., Heyworth, P. G., Clare-Salzler, M. und Moldawer, L. L. (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): 1463-74

Diaz-Montero, C. M., Salem, M. L., Nishimura, M. I., Garrett-Mayer, E., Cole, D. J. und Montero, A. J. (2008) "*Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy*" *Cancer Immunol Immunother*

Dolcetti, L., Marigo, I., Mantelli, B., Peranzoni, E., Zanovello, P. und Bronte, V. (2008) "*Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation*" *Cancer Lett* 267(2): 216-25

Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V. A., Celis, E. und Chen, L. (2002) "*Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*" *Nat Med* 8(8): 793-800

Drake, C. G., Jaffee, E. und Pardoll, D. M. (2006) "*Mechanisms of immune evasion by tumors*" *Adv Immunol* 90: 51-81

Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Shelton, T. E., Even, J. und Rosenberg, S. A.

(2003) "Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients" *J Immunother* 26(4): 332-42

Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Royal, R. E., Kammula, U., White, D. E., Mavroukakis, S. A., Rogers, L. J., Gracia, G. J., Jones, S. A., Mangiameli, D. P., Pelletier, M. M., Gea-Banacloche, J., Robinson, M. R., Berman, D. M., Filie, A. C., Abati, A. und Rosenberg, S. A. (2005) "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma" *J Clin Oncol* 23(10): 2346-57

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. und Schreiber, R. D. (2002) "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape" *Nat Immunol* 3(11): 991-8

Dunn, G. P., Old, L. J. und Schreiber, R. D. (2004) "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting" *Immunity* 21(2): 137-48

Dunn, G. P., Old, L. J. und Schreiber, R. D. (2004) "The three Es of cancer immunoediting" *Annu Rev Immunol* 22: 329-60

Emanuel, P. O., Mannion, M. und Phelps, R. G. (2008) "Complete regression of primary malignant melanoma" *Am J Dermatopathol* 30(2): 178-81

Eng, C. (1999) "RET proto-oncogene in the development of human cancer" *J Clin Oncol* 17(1): 380-93

Enk, A. H. (2005) "Dendritic cells in tolerance induction" *Immunol Lett* 99(1): 8-11

Enk, A. H., Jonuleit, H., Saloga, J. und Knop, J. (1997) "Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma" *Int J Cancer* 73(3): 309-16

Ezernitchi, A. V., Vaknin, I., Cohen-Daniel, L., Levy, O., Manaster, E., Halabi, A., Pikarsky, E., Shapira, L. und Baniyash, M. (2006) "TCR zeta down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs" *J Immunol* 177(7): 4763-72

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L. und Puccetti, P. (2003) "Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells" *Nat Immunol* 4(12): 1206-12

Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Volpi, C., Santamaria, P., Fioretti, M. C. und Puccetti, P. (2006) "The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells" *J Immunol* 176(11): 6752-61

Fang, L., Lonsdorf, A. S. und Hwang, S. T. (2008) "Immunotherapy for advanced melanoma" *J Invest Dermatol* 128(11): 2596-605

Fathman, C. G. und Lineberry, N. B. (2007) "Molecular mechanisms of CD4+ T-cell

*anergy*" Nat Rev Immunol 7(8): 599-609

Ferrandina, G., Ranelletti, F. O., Legge, F., Salutari, V., Martinelli, E., Fattorossi, A., Lorusso, D., Zannoni, G., Vellone, V., Paglia, A. und Scambia, G. (2006) "*Celecoxib up-regulates the expression of the zeta chain of T cell receptor complex in tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer*" Clin Cancer Res 12(7 Pt 1): 2055-60

Figdor, C. G., de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J. und Melief, C. J. (2004) "*Dendritic cell immunotherapy: mapping the way*" Nat Med 10(5): 475-80

Filipazzi, P., Valenti, R., Huber, V., Pilla, L., Canese, P., Iero, M., Castelli, C., Mariani, L., Parmiani, G. und Rivoltini, L. (2007) "*Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine*" J Clin Oncol 25(18): 2546-53

Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A. und Rudensky, A. Y. (2005) "*A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*" Nat Immunol 6(11): 1142-51

Forni, G., Cavallo, F., Consalvo, M., Allione, A., Dellabona, P., Casorati, G. und Giovarelli, M. (1995) "*Molecular approaches to cancer immunotherapy*" Cytokines Mol Ther 1(4): 225-48

Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E. und Lipp, M. (1999) "*CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*" Cell 99(1): 23-33

Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R. und Honjo, T. (2000) "*Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*" J Exp Med 192(7): 1027-34

Frey, A. B. und Monu, N. (2008) "*Signaling defects in anti-tumor T cells*" Immunol Rev 222: 192-205

Frydecka, I., Kaczmarek, P., Bocko, D., Kosmaczewska, A., Morilla, R. und Catovsky, D. (1999) "*Expression of signal-transducing zeta chain in peripheral blood T cells and natural killer cells in patients with Hodgkin's disease in different phases of the disease*" Leuk Lymphoma 35(5-6): 545-54

Gabrilovich, D. (2004) "*Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects*" Nat Rev Immunol 4(12): 941-52

Gabrilovich, D. I., Bronte, V., Chen, S. H., Colombo, M. P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S. und Schreiber, H. (2007) "*The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells*" Cancer Res 67(1): 425; author reply 426

Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D. und Carbone, D. P. (1996) "*Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells*" Nat Med 2(10): 1096-103

Gabrilovich, D. I. und Nagaraj, S. (2009) "*Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*" Nat Rev Immunol 9(3): 162-74

Gabrilovich, D. I., Velders, M. P., Sotomayor, E. M. und Kast, W. M. (2001) "*Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells*" J Immunol 166(9): 5398-406

Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Colombo, M. P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., Biccato, S. und Bronte, V. (2006) "*Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells*" J Clin Invest 116(10): 2777-90

Gattinoni, L., Powell, D. J., Jr., Rosenberg, S. A. und Restifo, N. P. (2006) "*Adoptive immunotherapy for cancer: building on success*" Nat Rev Immunol 6(5): 383-93

Geertsma, M. F., Stevenhagen, A., van Dam, E. M. und Nibbering, P. H. (1999) "*Expression of zeta molecules is decreased in NK cells from HIV-infected patients*" FEMS Immunol Med Microbiol 26(3-4): 249-57

Geginat, J., Sallusto, F. und Lanzavecchia, A. (2003) "*Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory and effector memory CD4+ T cells*" Pathol Biol (Paris) 51(2): 64-6

Geiser, M., Schultz, D., Le Cardinal, A., Voshol, H. und Garcia-Echeverria, C. (1999) "*Identification of the human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan antigen epitope recognized by the antitumor monoclonal antibody 763.74 from a peptide phage library*" Cancer Res 59(4): 905-10

Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O. und Durandy, A. (1999) "*TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells*" J Immunol 162(8): 4567-75

Gerlini, G., Tun-Kyi, A., Dudli, C., Burg, G., Pimpinelli, N. und Nestle, F. O. (2004) "*Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions*" Am J Pathol 165(6): 1853-63

Gissmann, L., Boshart, M., Durst, M., Ikenberg, H., Wagner, D. und zur Hausen, H. (1984) "*Presence of human papillomavirus in genital tumors*" J Invest Dermatol 83(1 Suppl): 26s-28s

Glennie, M. J., French, R. R., Cragg, M. S. und Taylor, R. P. (2007) "*Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies*" Mol Immunol 44(16): 3823-37

- Goldenberg, D. M. und Sharkey, R. M. (2007) "*Novel radiolabeled antibody conjugates*" *Oncogene* 26(25): 3734-44
- Goldrath, A. W. und Bevan, M. J. (1999) "*Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire*" *Nature* 402(6759): 255-62
- Gonzalo, J. A., Delaney, T., Corcoran, J., Goodearl, A., Gutierrez-Ramos, J. C. und Coyle, A. J. (2001) "*Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation*" *J Immunol* 166(1): 1-5
- Grabbe, S., Beissert, S., Schwarz, T. und Granstein, R. D. (1995) "*Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy?*" *Immunol Today* 16(3): 117-21
- Grimm, E. A., Robb, R. J., Roth, J. A., Neckers, L. M., Lachman, L. B., Wilson, D. J. und Rosenberg, S. A. (1983) "*Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells*" *J Exp Med* 158(4): 1356-61
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Tollefsen, B. L., Kemper, C., Atkinson, J. P. und Ley, T. J. (2004) "*Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells*" *Blood* 104(9): 2840-8
- Gruber, I. V., El Yousfi, S., Durr-Storzer, S., Wallwiener, D., Solomayer, E. F. und Fehm, T. (2008) "*Down-regulation of CD28, TCR-zeta (zeta) and up-regulation of FAS in peripheral cytotoxic T-cells of primary breast cancer patients*" *Anticancer Res* 28(2A): 779-84
- Henry, J., Miller, M. M. und Pontarotti, P. (1999) "*Structure and evolution of the extended B7 family*" *Immunol Today* 20(6): 285-8
- Herbert, D. R., Holscher, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., Leeto, M., Kirsch, R., Hall, P., Mossmann, H., Claussen, B., Forster, I. und Brombacher, F. (2004) "*Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology*" *Immunity* 20(5): 623-35
- Hieber, U. und Heim, M. E. (1994) "*Tumor necrosis factor for the treatment of malignancies*" *Oncology* 51(2): 142-53
- Ho, W. Y., Yee, C. und Greenberg, P. D. (2002) "*Adoptive therapy with CD8(+) T cells: it may get by with a little help from its friends*" *J Clin Invest* 110(10): 1415-7
- Hoechst, B., Ormandy, L. A., Ballmaier, M., Lehner, F., Kruger, C., Manns, M. P., Greten, T. F. und Korangy, F. (2008) "*A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells*" *Gastroenterology* 135(1): 234-43
- Hori, S., Nomura, T. und Sakaguchi, S. (2003) "*Control of regulatory T cell*

*development by the transcription factor Foxp3*" Science 299(5609): 1057-61

Horiguchi, S., Petersson, M., Nakazawa, T., Kanda, M., Zea, A. H., Ochoa, A. C. und Kiessling, R. (1999) "*Primary chemically induced tumors induce profound immunosuppression concomitant with apoptosis and alterations in signal transduction in T cells and NK cells*" Cancer Res 59(12): 2950-6

Houghton, A. N. und Polsky, D. (2002) "*Focus on melanoma*" Cancer Cell 2(4): 275-8

Huang, B., Lei, Z., Zhao, J., Gong, W., Liu, J., Chen, Z., Liu, Y., Li, D., Yuan, Y., Zhang, G. M. und Feng, Z. H. (2007) "*CCL2/CCR2 pathway mediates recruitment of myeloid suppressor cells to cancers*" Cancer Lett 252(1): 86-92

Huang, B., Pan, P. Y., Li, Q., Sato, A. I., Levy, D. E., Bromberg, J., Divino, C. M. und Chen, S. H. (2006) "*Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host*" Cancer Res 66(2): 1123-31

Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D. und Levitsky, H. (1998) "*The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response*" J Exp Med 188(12): 2357-68

Hurst, R., White, D. E., Heiss, J., Lee, D. S., Rosenberg, S. A. und Schwartzentruber, D. J. (1999) "*Brain metastasis after immunotherapy in patients with metastatic melanoma or renal cell cancer: is craniotomy indicated?*" J Immunother 22(4): 356-62

Igney, F. H. und Krammer, P. H. (2002) "*Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*" Nat Rev Cancer 2(4): 277-88

Ilkovitch, D. und Lopez, D. M. (2008) "*Immune modulation by melanoma-derived factors*" Exp Dermatol

Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Higashi, H., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S. und Aikou, T. (2002) "*CD3-zetachain expression of intratumoral lymphocytes is closely related to survival in gastric carcinoma patients*" Cancer 94(5): 1437-42

Jager, E., Chen, Y. T., Drijfhout, J. W., Karbach, J., Ringhoffer, M., Jager, D., Arand, M., Wada, H., Noguchi, Y., Stockert, E., Old, L. J. und Knuth, A. (1998) "*Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes*" J Exp Med 187(2): 265-70

Jäger, E., Knuth, A. (2002) "*Tumorimmunologie*" Der Onkologe 8 (1): 63-65

Janeway, C. A., Jr. und Bottomly, K. (1994) "*Signals and signs for lymphocyte responses*" Cell 76(2): 275-85

Janeway, C. A., Jr., Carding, S., Jones, B., Murray, J., Portoles, P., Rasmussen, R., Rojo, J., Saizawa, K., West, J. und Bottomly, K. (1988) "*CD4+ T cells: specificity and*

*function*" Immunol Rev 101: 39-80

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002). "Immunologie". Heidelberg/ Berlin, Spektrum Akademischer Verlag

Jantzer, P. und Schendel, D. J. (1998) "*Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo*" Cancer Res 58(14): 3078-86

Johansson, C. C., Egyhazi, S., Masucci, G., Harlin, H., Mougiakakos, D., Poschke, I., Nilsson, B., Garberg, L., Tuominen, R., Linden, D., Stolt, M. F., Hansson, J. und Kiessling, R. (2008) "*Prognostic significance of tumor iNOS and COX-2 in stage III malignant cutaneous melanoma*" Cancer Immunol Immunother

Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tuting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T. B., Paragnik, L., Kandemir, A., Lee, P. P., Schuler, G., Knop, J. und Enk, A. H. (2001) "*A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection*" Int J Cancer 93(2): 243-51

Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. und Enk, A. H. (2000) "*Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells*" J Exp Med 192(9): 1213-22

June, C. H. (2007) "*Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic*" J Clin Invest 117(6): 1466-76

Kalialis, L. V., Drzewiecki, K. T., Mohammadi, M., Mehlsen, A. B. und Klyver, H. (2008) "*Spontaneous regression of metastases from malignant melanoma: a case report*" Melanoma Res 18(4): 279-83

Kato, M., Liu, W., Akhand, A. A., Dai, Y., Ohbayashi, M., Tuzuki, T., Suzuki, H., Isobe, K., Takahashi, M. und Nakashima, I. (1999) "*Linkage between melanocytic tumor development and early burst of Ret protein expression for tolerance induction in metallothionein-I/ret transgenic mouse lines*" Oncogene 18(3): 837-42

Kato, M., Takahashi, M., Akhand, A. A., Liu, W., Dai, Y., Shimizu, S., Iwamoto, T., Suzuki, H. und Nakashima, I. (1998) "*Transgenic mouse model for skin malignant melanoma*" Oncogene 17(14): 1885-8

Kato, M., Takeda, K., Kawamoto, Y., Tsuzuki, T., Hossain, K., Tamakoshi, A., Kunisada, T., Kambayashi, Y., Ogino, K., Suzuki, H., Takahashi, M. und Nakashima, I. (2004) "*c-Kit-targeting immunotherapy for hereditary melanoma in a mouse model*" Cancer Res 64(3): 801-6

Kelly, M. N., Kolls, J. K., Happel, K., Schwartzman, J. D., Schwarzenberger, P., Combe, C., Moretto, M. und Khan, I. A. (2005) "*Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against Toxoplasma gondii infection*" Infect Immun 73(1): 617-21

- Kiessling, R., Petransy, G., Karre, K., Jondal, M., Tracey, D. und Wigzell, H. (1976) "*Killer cells: a functional comparison between natural, immune T-cell and antibody-dependent in vitro systems*" J Exp Med 143(4): 772-80
- Kim, R., Emi, M. und Tanabe, K. (2006) "*Functional roles of immature dendritic cells in impaired immunity of solid tumour and their targeted strategies for provoking tumour immunity*" Clin Exp Immunol 146(2): 189-96
- Kimpfler, S. (2008) "*Charakterisierung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen im ret transgenen Spontanmelanom-Mausmodell und bei Melanompatienten*" Dissertation an der Universität Heidelberg
- King, M., Spooner, D. und Rowlands, D. C. (2001) "*Spontaneous regression of metastatic malignant melanoma of the parotid gland and neck lymph nodes: a case report and a review of the literature*" Clin Oncol (R Coll Radiol) 13(6): 466-9
- Kobie, J. J., Shah, P. R., Yang, L., Rebhahn, J. A., Fowell, D. J. und Mosmann, T. R. (2006) "*T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine*" J Immunol 177(10): 6780-6
- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J. und Schreiber, R. D. (2007) "*Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state*" Nature 450(7171): 903-7
- Kono, K., Takahashi, A., Ichihara, F., Amemiya, H., Iizuka, H., Fujii, H., Sekikawa, T. und Matsumoto, Y. (2002) "*Prognostic significance of adoptive immunotherapy with tumor-associated lymphocytes in patients with advanced gastric cancer: a randomized trial*" Clin Cancer Res 8(6): 1767-71
- Korman, A., Yellin, M. und Keler, T. (2005) "*Tumor immunotherapy: preclinical and clinical activity of anti-CTLA4 antibodies*" Curr Opin Investig Drugs 6(6): 582-91
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. und Kuchroo, V. K. (2009) "*IL-17 and Th17 Cells*" Annu Rev Immunol
- Krieg, A. M. (2002) "*CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects*" Annu Rev Immunol 20: 709-60
- Krieg, A. M. (2004) "*Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides*" Curr Oncol Rep 6(2): 88-95
- Kruit, W. H., van Ojik, H. H., Brichard, V. G., Escudier, B., Dorval, T., Dreno, B., Patel, P., van Baren, N., Avril, M. F., Piperno, S., Khammari, A., Stas, M., Ritter, G., Lethe, B., Godelaine, D., Brasseur, F., Zhang, Y., van der Bruggen, P., Boon, T., Eggermont, A. M. und Marchand, M. (2005) "*Phase 1/2 study of subcutaneous and intradermal immunization with a recombinant MAGE-3 protein in patients with detectable metastatic melanoma*" Int J Cancer 117(4): 596-604

- Kumar, V. und Sercarz, E. (1996) "*Genetic vaccination: the advantages of going naked*" *Nat Med* 2(8): 857-9
- Kurte, M., Lopez, M., Aguirre, A., Escobar, A., Aguillon, J. C., Charo, J., Larsen, C. G., Kiessling, R. und Salazar-Onfray, F. (2004) "*A synthetic peptide homologous to functional domain of human IL-10 down-regulates expression of MHC class I and Transporter associated with Antigen Processing 1/2 in human melanoma cells*" *J Immunol* 173(3): 1731-7
- Kusmartsev, S., Cheng, F., Yu, B., Nefedova, Y., Sotomayor, E., Lush, R. und Gabrilovich, D. (2003) "*All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination*" *Cancer Res* 63(15): 4441-9
- Kusmartsev, S. und Gabrilovich, D. I. (2002) "*Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression*" *Cancer Immunol Immunother* 51(6): 293-8
- Kusmartsev, S. und Gabrilovich, D. I. (2003) "*Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species*" *J Leukoc Biol* 74(2): 186-96
- Kusmartsev, S. und Gabrilovich, D. I. (2005) "*STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion*" *J Immunol* 174(8): 4880-91
- Kusmartsev, S. und Gabrilovich, D. I. (2006) "*Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer*" *Cancer Metastasis Rev* 25(3): 323-31
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D. und Gabrilovich, D. I. (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): 989-99
- Ladanyi, A., Kiss, J., Somlai, B., Gilde, K., Fejos, Z., Mohos, A., Gaudi, I. und Timar, J. (2007) "*Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor*" *Cancer Immunol Immunother* 56(9): 1459-69
- Lanier, L. L., Yu, G. und Phillips, J. H. (1989) "*Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells*" *Nature* 342(6251): 803-5
- Lanzavecchia, A. und Sallusto, F. (2000) "*From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation*" *Curr Opin Immunol* 12(1): 92-8
- Lavrik, I., Golks, A. und Krammer, P. H. (2005) "*Death receptor signaling*" *J Cell Sci* 118(Pt 2): 265-7
- Lee, A. J., Chiao, T. B. und Tsang, M. P. (2005) "*Sildenafil for pulmonary hypertension*" *Ann Pharmacother* 39(5): 869-84
- Lee, J. H., Torisu-Itakara, H., Cochran, A. J., Kadison, A., Huynh, Y., Morton, D. L. und Essner, R. (2005) "*Quantitative analysis of melanoma-induced cytokine-*

- mediated immunosuppression in melanoma sentinel nodes*" Clin Cancer Res 11(1): 107-12
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L. und Bluestone, J. A. (1996) "*CD28/B7 system of T cell costimulation*" Annu Rev Immunol 14: 233-58
- Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M. und Cao, X. (2009) "*Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1*" J Immunol 182(1): 240-9
- Li, Q., Pan, P. Y., Gu, P., Xu, D. und Chen, S. H. (2004) "*Role of immature myeloid Gr-1+ cells in the development of antitumor immunity*" Cancer Res 64(3): 1130-9
- Liossis, S. N., Ding, X. Z., Dennis, G. J. und Tsokos, G. C. (1998) "*Altered pattern of TCR/CD3-mediated protein-tyrosyl phosphorylation in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. Deficient expression of the T cell receptor zeta chain*" J Clin Invest 101(7): 1448-57
- Lob, S. und Konigsrainer, A. (2008) "*Is IDO a key enzyme bridging the gap between tumor escape and tolerance induction?*" Langenbecks Arch Surg 393(6): 995-1003
- Mackensen, A., Herbst, B., Chen, J. L., Kohler, G., Noppen, C., Herr, W., Spagnoli, G. C., Cerundolo, V. und Lindemann, A. (2000) "*Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells*" Int J Cancer 86(3): 385-92
- Maecker, B., Mougiakakos, D., Zimmermann, M., Behrens, M., Hollander, S., Schrauder, A., Schrappe, M., Welte, K. und Klein, C. (2006) "*Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients*" Leukemia 20(4): 645-9
- Maeurer, M. J., Gollin, S. M., Martin, D., Swaney, W., Bryant, J., Castelli, C., Robbins, P., Parmiani, G., Storkus, W. J. und Lotze, M. T. (1996) "*Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen*" J Clin Invest 98(7): 1633-41
- Maher, J. und Davies, E. T. (2004) "*Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy*" Br J Cancer 91(5): 817-21
- Mahnke, K., Johnson, T. S., Ring, S. und Enk, A. H. (2007) "*Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship*" J Dermatol Sci 46(3): 159-67
- Marigo, I., Dolcetti, L., Serafini, P., Zanovello, P. und Bronte, V. (2008) "*Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells*" Immunol Rev 222: 162-79
- Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J. und Ferrone, S. (2000) "*Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance*" Adv Immunol 74: 181-273

- Matsuda, M., Ulfgren, A. K., Lenkei, R., Petersson, M., Ochoa, A. C., Lindblad, S., Andersson, P., Klareskog, L. und Kiessling, R. (1998) "*Decreased expression of signal-transducing CD3 zeta chains in T cells from the joints and peripheral blood of rheumatoid arthritis patients*" Scand J Immunol 47(3): 254-62
- Melani, C., Chiodoni, C., Forni, G. und Colombo, M. P. (2003) "*Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity*" Blood 102(6): 2138-45
- Melief, C. J. (2005) "*Cancer immunology: cat and mouse games*" Nature 437(7055): 41-2
- Mellor, A. L. und Munn, D. H. (2004) "*IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*" Nat Rev Immunol 4(10): 762-74
- Mencacci, A., Montagnoli, C., Bacci, A., Cenci, E., Pitzurra, L., Spreca, A., Kopf, M., Sharpe, A. H. und Romani, L. (2002) "*CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis*" J Immunol 169(6): 3180-90
- Mendenhall, W. M., Amdur, R. J., Grobmyer, S. R., George, T. J., Jr., Werning, J. W., Hochwald, S. N. und Mendenhall, N. P. (2008) "*Adjuvant radiotherapy for cutaneous melanoma*" Cancer 112(6): 1189-96
- Midis, G. P., Shen, Y. und Owen-Schaub, L. B. (1996) "*Elevated soluble Fas (sFas) levels in nonhematopoietic human malignancy*" Cancer Res 56(17): 3870-4
- Mizoguchi, H., O'Shea, J. J., Longo, D. L., Loeffler, C. M., McVicar, D. W. und Ochoa, A. C. (1992) "*Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice*" Science 258(5089): 1795-8
- Mocellin, S., Mandruzzato, S., Bronte, V., Lise, M. und Nitti, D. (2004) "*Part I: Vaccines for solid tumours*" Lancet Oncol 5(11): 681-9
- Morgan, R. A., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., Royal, R. E., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Restifo, N. P., Zheng, Z., Nahvi, A., de Vries, C. R., Rogers-Freezer, L. J., Mavroukakis, S. A. und Rosenberg, S. A. (2006) "*Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes*" Science 314(5796): 126-9
- Morgan, R. A., Dudley, M. E., Yu, Y. Y., Zheng, Z., Robbins, P. F., Theoret, M. R., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Restifo, N. P. und Rosenberg, S. A. (2003) "*High efficiency TCR gene transfer into primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens*" J Immunol 171(6): 3287-95
- Morton, D. L., Foshag, L. J., Hoon, D. S., Nizze, J. A., Famatiga, E., Wanek, L. A., Chang, C., Davtyan, D. G., Gupta, R. K., Elashoff, R. und et al. (1992) "*Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new*

---

*polyvalent melanoma vaccine*" Ann Surg 216(4): 463-82

Mosmann, T. R. und Coffman, R. L. (1989) "*TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*" Annu Rev Immunol 7: 145-73

Mosmann, T. R. und Sad, S. (1996) "*The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*" Immunol Today 17(3): 138-46

Mougiakakos, D., Johansson, C. C. und Kiessling, R. (2008) "*Naturally occurring regulatory T cells show reduced sensitivity towards oxidative stress induced cell death*" Blood in press

Movahedi, K., Guilliams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P. und Van Ginderachter, J. A. (2008) "*Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity*" Blood 111(8): 4233-44

Muller, A. J., DuHadaway, J. B., Donover, P. S., Sutanto-Ward, E. und Prendergast, G. C. (2005) "*Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy*" Nat Med 11(3): 312-9

Nagaraj, S. und Gabilovich, D. I. (2007) "*Myeloid-derived suppressor cells*" Adv Exp Med Biol 601: 213-23

Nair, S. K., Heiser, A., Boczkowski, D., Majumdar, A., Naoe, M., Lebkowski, J. S., Vieweg, J. und Gilboa, E. (2000) "*Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells*" Nat Med 6(9): 1011-7

Nair, S. K., Morse, M., Boczkowski, D., Cumming, R. I., Vasovic, L., Gilboa, E. und Lyerly, H. K. (2002) "*Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells*" Ann Surg 235(4): 540-9

Nakamura, K., Kitani, A. und Strober, W. (2001) "*Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*" J Exp Med 194(5): 629-44

Nefedova, Y., Huang, M., Kusmartsev, S., Bhattacharya, R., Cheng, P., Salup, R., Jove, R. und Gabilovich, D. (2004) "*Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer*" J Immunol 172(1): 464-74

Neumark, E., Anavi, R., Witz, I. P. und Ben-Baruch, A. (1999) "*MCP-1 expression as a potential contributor to the high malignancy phenotype of murine mammary adenocarcinoma cells*" Immunol Lett 68(1): 141-6

NIH-Science-Education (2003). "*Understanding the immune system - How it works*".

- Norden, A. D., Drappatz, J. und Wen, P. Y. (2008) "*Antiangiogenic therapy in malignant gliomas*" *Curr Opin Oncol* 20(6): 652-61
- Norment, A. M., Salter, R. D., Parham, P., Engelhard, V. H. und Littman, D. R. (1988) "*Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules*" *Nature* 336(6194): 79-81
- Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C. M. und Ivars, F. (2006) "*Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression*" *Immunology* 118(2): 240-9
- Pak, A. S., Ip, G., Wright, M. A. und Young, M. R. (1995) "*Treating tumor-bearing mice with low-dose gamma-interferon plus tumor necrosis factor alpha to diminish immune suppressive granulocyte-macrophage progenitor cells increases responsiveness to interleukin 2 immunotherapy*" *Cancer Res* 55(4): 885-90
- Pak, A. S., Wright, M. A., Matthews, J. P., Collins, S. L., Petruzzelli, G. J. und Young, M. R. (1995) "*Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*" *Clin Cancer Res* 1(1): 95-103
- Pan, P. Y., Wang, G. X., Yin, B., Ozao, J., Ku, T., Divino, C. M. und Chen, S. H. (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): 219-28
- Pardoll, D. und Allison, J. (2004) "*Cancer immunotherapy: breaking the barriers to harvest the crop*" *Nat Med* 10(9): 887-92
- Parmiani, G., Castelli, C., Pilla, L., Santinami, M., Colombo, M. P. und Rivoltini, L. (2007) "*Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients*" *Ann Oncol* 18(2): 226-32
- Parnes, J. R. (1989) "*Molecular biology and function of CD4 and CD8*" *Adv Immunol* 44: 265-311
- Patel, D. K. (2008) "*Clinical use of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer*" *Pharmacotherapy* 28(11 Pt 2): 31S-41S
- Paust, S., Lu, L., McCarty, N. und Cantor, H. (2004) "*Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28): 10398-403
- Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., Duray, P. H., Steinberg, S. M., Allison, J. P., Davis, T. A. und Rosenberg, S. A. (2003) "*Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma*"

---

Proc Natl Acad Sci U S A 100(14): 8372-7

Pinzon-Charry, A., Ho, C. S., Maxwell, T., McGuckin, M. A., Schmidt, C., Furnival, C., Pyke, C. M. und Lopez, J. A. (2007) "*Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer*" Br J Cancer 97(9): 1251-9

Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C. J., Sherwood, S. W., Baldwin, D. T., Godowski, P. J., Wood, W. I., Gurney, A. L., Hillan, K. J., Cohen, R. L., Goddard, A. D., Botstein, D. und Ashkenazi, A. (1998) "*Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer*" Nature 396(6712): 699-703

Polat, M. F., Taysi, S., Polat, S., Boyuk, A. und Bakan, E. (2003) "*Elevated serum arginase activity levels in patients with breast cancer*" Surg Today 33(9): 655-61

Porembaska, Z., Luboinski, G., Chrzanowska, A., Mielczarek, M., Magnuska, J. und Baranczyk-Kuzma, A. (2003) "*Arginase in patients with breast cancer*" Clin Chim Acta 328(1-2): 105-11

Porembaska, Z., Skwarek, A., Mielczarek, M. und Baranczyk-Kuzma, A. (2002) "*Serum arginase activity in postsurgical monitoring of patients with colorectal carcinoma*" Cancer 94(11): 2930-4

Preynat-Seauve, O., Schuler, P., Contassot, E., Beermann, F., Huard, B. und French, L. E. (2006) "*Tumor-infiltrating dendritic cells are potent antigen-presenting cells able to activate T cells and mediate tumor rejection*" J Immunol 176(1): 61-7

Quezada, S. A., Peggs, K. S., Simpson, T. R., Shen, Y., Littman, D. R. und Allison, J. P. (2008) "*Limited tumor infiltration by activated T effector cells restricts the therapeutic activity of regulatory T cell depletion against established melanoma*" J Exp Med 205(9): 2125-38

Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D. und Sotomayor, E. M. (2007) "*Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells*" Annu Rev Immunol 25: 267-96

Rahimi-Movaghar, V. und Karimi, M. (2003) "*Meningeal melanocytoma of the brain and oculodermal melanocytosis (nevus of Ota): case report and literature review*" Surg Neurol 59(3): 200-10

Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J. C. und Perucho, M. (1997) "*Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype*" Science 275(5302): 967-9

Ray, C. M., Kluk, M., Grin, C. M. und Grant-Kels, J. M. (2005) "*Successful treatment of malignant melanoma in situ with topical 5% imiquimod cream*" Int J Dermatol 44(5): 428-34

Read, S., Malmstrom, V. und Powrie, F. (2000) "*Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*" J Exp Med 192(2): 295-302

- Reed, R. J. und Martin, P. (1997) "*Variants of melanoma*" *Semin Cutan Med Surg* 16(2): 137-58
- Reichert, T. E., Scheuer, C., Day, R., Wagner, W. und Whiteside, T. L. (2001) "*The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma*" *Cancer* 91(11): 2136-47
- Reiner, S. L. (2007) "*Development in motion: helper T cells at work*" *Cell* 129(1): 33-6
- Ribas, A., Camacho, L. H., Lopez-Berestein, G., Pavlov, D., Bulanhagui, C. A., Millham, R., Comin-Anduix, B., Reuben, J. M., Seja, E., Parker, C. A., Sharma, A., Glaspy, J. A. und Gomez-Navarro, J. (2005) "*Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206*" *J Clin Oncol* 23(35): 8968-77
- Rice, J., Ottensmeier, C. H. und Stevenson, F. K. (2008) "*DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer*" *Nat Rev Cancer* 8(2): 108-20
- Rivoltini, L., Carrabba, M., Huber, V., Castelli, C., Novellino, L., Dalerba, P., Mortarini, R., Arancia, G., Anichini, A., Fais, S. und Parmiani, G. (2002) "*Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction*" *Immunol Rev* 188: 97-113
- Robertson, M. J. und Ritz, J. (1990) "*Biology and clinical relevance of human natural killer cells*" *Blood* 76(12): 2421-38
- Rockmann, H. und Schadendorf, D. (2003) "*Drug resistance in human melanoma: mechanisms and therapeutic opportunities*" *Onkologie* 26(6): 581-7
- Rodriguez, P. C., Hernandez, C. P., Quiceno, D., Dubinett, S. M., Zabaleta, J., Ochoa, J. B., Gilbert, J. und Ochoa, A. C. (2005) "*Arginase 1 in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma*" *J Exp Med* 202(7): 931-9
- Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K. und Levings, M. K. (2006) "*Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans*" *Immunol Rev* 212: 28-50
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T. und et al. (1985) "*Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer*" *N Engl J Med* 313(23): 1485-92
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C. und Restifo, N. P. (2004) "*Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines*" *Nat Med* 10(9): 909-15
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzenuber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Dudley, M. E., Schwarz, S. L., Spiess, P. J., Wunderlich, J. R., Parkhurst, M. R., Kawakami, Y., Seipp, C. A., Einhorn, J. H. und

- White, D. E. (1998) *"Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma"* Nat Med 4(3): 321-7
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Restifo, N. P., Haworth, L. R., Seipp, C. A., Freezer, L. J., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A. und White, D. E. (2003) *"Inability to immunize patients with metastatic melanoma using plasmid DNA encoding the gp100 melanoma-melanocyte antigen"* Hum Gene Ther 14(8): 709-14
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., Weber, J. S., Parkinson, D. R., Seipp, C. A., Einhorn, J. H. und White, D. E. (1994) *"Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2"* JAMA 271(12): 907-13
- Rosenberg, S. A., Zhai, Y., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Restifo, N. P., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., Roberts, B. und White, D. E. (1998) *"Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens"* J Natl Cancer Inst 90(24): 1894-900
- Roth, W., Isenmann, S., Nakamura, M., Platten, M., Wick, W., Kleihues, P., Bahr, M., Ohgaki, H., Ashkenazi, A. und Weller, M. (2001) *"Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis"* Cancer Res 61(6): 2759-65
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. und Toda, M. (1995) *"Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases"* J Immunol 155(3): 1151-64
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. und Lanzavecchia, A. (1999) *"Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions"* Nature 401(6754): 708-12
- Sawanobori, Y., Ueha, S., Kurachi, M., Shimaoka, T., Talmadge, J. E., Abe, J., Shono, Y., Kitabatake, M., Kakimi, K., Mukaida, N. und Matsushima, K. (2008) *"Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice"* Blood 111(12): 5457-66
- Schadendorf, D., Ugurel, S., Schuler-Thurner, B., Nestle, F. O., Enk, A., Brocker, E. B., Grabbe, S., Rittgen, W., Edler, L., Sucker, A., Zimpfer-Rechner, C., Berger, T., Kamarashev, J., Burg, G., Jonuleit, H., Tuttonberg, A., Becker, J. C., Keikavoussi, P., Kampgen, E. und Schuler, G. (2006) *"Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG"* Ann Oncol 17(4): 563-70
- Scheffold, A., Murphy, K. M. und Hofer, T. (2007) *"Competition for cytokines: T(reg) cells take all"* Nat Immunol 8(12): 1285-7

- Schlienger, K., Craighead, N., Lee, K. P., Levine, B. L. und June, C. H. (2000) "*Efficient priming of protein antigen-specific human CD4(+) T cells by monocyte-derived dendritic cells*" *Blood* 96(10): 3490-8
- Schmielau, J. und Finn, O. J. (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): 4756-60
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. und Melief, C. J. (1998) "*T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions*" *Nature* 393(6684): 480-3
- Schreiber, H. und Rowley, D. A. (2008) "*Cancer. Quo vadis, specificity?*" *Science* 319(5860): 164-5
- Schultz, E. S. und Schuler, G. (2008) "*[Immunization strategies for treating melanoma]*" *Hautarzt* 59(10): 785-92
- Serafini, P., Borrello, I. und Bronte, V. (2006) "*Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression*" *Semin Cancer Biol* 16(1): 53-65
- Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Cingarlini, S., Dolcetti, L., Gallina, G., Zanovello, P. und Bronte, V. (2004) "*Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells*" *Cancer Immunol Immunother* 53(2): 64-72
- Serafini, P., Meckel, K., Kelso, M., Noonan, K., Califano, J., Koch, W., Dolcetti, L., Bronte, V. und Borrello, I. (2006) "*Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function*" *J Exp Med* 203(12): 2691-702
- Serafini, P., Mgebhoff, S., Noonan, K. und Borrello, I. (2008) "*Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells*" *Cancer Res* 68(13): 5439-49
- Sercan, O., Hammerling, G. J., Arnold, B. und Schuler, T. (2006) "*Innate immune cells contribute to the IFN-gamma-dependent regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis*" *J Immunol* 176(2): 735-9
- Serrone, L., Zeuli, M., Sega, F. M. und Cognetti, F. (2000) "*Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview*" *J Exp Clin Cancer Res* 19(1): 21-34
- Setter, S. M., Iltz, J. L., Fincham, J. E., Campbell, R. K. und Baker, D. E. (2005) "*Phosphodiesterase 5 inhibitors for erectile dysfunction*" *Ann Pharmacother* 39(7-8): 1286-95
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. und Sakaguchi, S. (2002) "*Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance*" *Nat Immunol* 3(2): 135-42

Simons, J. W., Mikhak, B., Chang, J. F., DeMarzo, A. M., Carducci, M. A., Lim, M., Weber, C. E., Baccala, A. A., Goemann, M. A., Clift, S. M., Ando, D. G., Levitsky, H. I., Cohen, L. K., Sanda, M. G., Mulligan, R. C., Partin, A. W., Carter, H. B., Piantadosi, S., Marshall, F. F. und Nelson, W. G. (1999) "*Induction of immunity to prostate cancer antigens: results of a clinical trial of vaccination with irradiated autologous prostate tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using ex vivo gene transfer*" *Cancer Res* 59(20): 5160-8

Sinha, P., Clements, V. K., Fulton, A. M. und Ostrand-Rosenberg, S. (2007) "*Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells*" *Cancer Res* 67(9): 4507-13

Sinha, P., Clements, V. K. und Ostrand-Rosenberg, S. (2005) "*Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis*" *Cancer Res* 65(24): 11743-51

Sinha, P., Clements, V. K. und Ostrand-Rosenberg, S. (2005) "*Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease*" *J Immunol* 174(2): 636-45

Sinha, P., Okoro, C., Foell, D., Freeze, H. H., Ostrand-Rosenberg, S. und Srikrishna, G. (2008) "*Proinflammatory s100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells*" *J Immunol* 181(7): 4666-75

Speiser, D. E., Lienard, D., Rufer, N., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Lejeune, F., Krieg, A. M., Cerottini, J. C. und Romero, P. (2005) "*Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909*" *J Clin Invest* 115(3): 739-46

Squier, M. K. und Cohen, J. J. (1994) "*Cell-mediated cytotoxic mechanisms*" *Curr Opin Immunol* 6(3): 447-52

Stanglmaier, M., Faltin, M., Ruf, P., Bodenhausen, A., Schroder, P. und Lindhofer, H. (2008) "*Bi20 (fBTA05), a novel trifunctional bispecific antibody (anti-CD20 x anti-CD3), mediates efficient killing of B-cell lymphoma cells even with very low CD20 expression levels*" *Int J Cancer* 123(5): 1181-9

Stefanova, I., Saville, M. W., Peters, C., Cleghorn, F. R., Schwartz, D., Venzon, D. J., Weinhold, K. J., Jack, N., Bartholomew, C., Blattner, W. A., Yarchoan, R., Bolen, J. B. und Horak, I. D. (1996) "*HIV infection--induced posttranslational modification of T cell signaling molecules associated with disease progression*" *J Clin Invest* 98(6): 1290-7

Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J. und Enk, A. H. (1997) "*Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells*" *J Immunol* 159(10): 4772-80

Steinman, R. M., Hawiger, D. und Nussenzweig, M. C. (2003) "*Tolerogenic dendritic cells*" *Annu Rev Immunol* 21: 685-711

- Steinmann, A., Funk, J. O., Schuler, G. und von den Driesch, P. (2000) "*Topical imiquimod treatment of a cutaneous melanoma metastasis*" J Am Acad Dermatol 43(3): 555-6
- Sutmoller, R. P., van Duivenvoorde, L. M., van Elsas, A., Schumacher, T. N., Wildenberg, M. E., Allison, J. P., Toes, R. E., Offringa, R. und Melief, C. J. (2001) "*Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses*" J Exp Med 194(6): 823-32
- Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A. S., Kaiser, L. R. und Albelda, S. M. (2005) "*Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity*" Clin Cancer Res 11(18): 6713-21
- Tabuchi, K., Kirsch, W. M., Low, M., Gaskin, D., Van Buskirk, J. und Maa, S. (1978) "*Screening of human brain tumors for SV40-related T antigen*" Int J Cancer 21(1): 12-7
- Takahashi, M., Buma, Y. und Taniguchi, M. (1991) "*Identification of the ret proto-oncogene products in neuroblastoma and leukemia cells*" Oncogene 6(2): 297-301
- Takimoto, E., Champion, H. C., Li, M., Belardi, D., Ren, S., Rodriguez, E. R., Bedja, D., Gabrielson, K. L., Wang, Y. und Kass, D. A. (2005) "*Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy*" Nat Med 11(2): 214-22
- Terabe, M., Matsui, S., Park, J. M., Mamura, M., Noben-Trauth, N., Donaldson, D. D., Chen, W., Wahl, S. M., Ledbetter, S., Pratt, B., Letterio, J. J., Paul, W. E. und Berzofsky, J. A. (2003) "*Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence*" J Exp Med 198(11): 1741-52
- Terabe, M., Park, J. M. und Berzofsky, J. A. (2004) "*Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth*" Cancer Immunol Immunother 53(2): 79-85
- Thery, C. und Amigorena, S. (2001) "*The cell biology of antigen presentation in dendritic cells*" Curr Opin Immunol 13(1): 45-51
- Thomas, D. A. und Massague, J. (2005) "*TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance*" Cancer Cell 8(5): 369-80
- Thorn, M., Bergstrom, R., Hedblad, M., Lagerlof, B., Ringborg, U. und Adami, H. O. (1996) "*Predictors of late mortality in cutaneous malignant melanoma--a population-based study in Sweden*" Int J Cancer 67(1): 38-44
- Thornton, A. M. und Shevach, E. M. (1998) "*CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*" J

Exp Med 188(2): 287-96

Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E. A., Rickman, B., Betz, K. S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J. G. und Wang, T. C. (2008) "*Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice*" Cancer Cell 14(5): 408-19

Ugurel, S., Rappl, G., Tilgen, W. und Reinhold, U. (2001) "*Increased soluble CD95 (sFas/CD95) serum level correlates with poor prognosis in melanoma patients*" Clin Cancer Res 7(5): 1282-6

Umansky, V., Abschuetz, O., Osen, W., Ramacher, M., Zhao, F., Kato, M. und Schadendorf, D. (2008) "*Melanoma-specific memory T cells are functionally active in Ret transgenic mice without macroscopic tumors*" Cancer Res 68(22): 9451-8

Umemura, N., Saio, M., Suwa, T., Kitoh, Y., Bai, J., Nonaka, K., Ouyang, G. F., Okada, M., Balazs, M., Adany, R., Shibata, T. und Takami, T. (2008) "*Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics*" J Leukoc Biol 83(5): 1136-44

Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T. und Van den Eynde, B. J. (2003) "*Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase*" Nat Med 9(10): 1269-74

Vaknin, I., Blinder, L., Wang, L., Gazit, R., Shapira, E., Genina, O., Pines, M., Pikarsky, E. und Baniyash, M. (2008) "*A common pathway mediated through Toll-like receptors leads to T- and natural killer-cell immunosuppression*" Blood 111(3): 1437-47

Van Den Eynde, B. J., Gaugler, B., Probst-Kepper, M., Michaux, L., Devuyst, O., Lorge, F., Weynants, P. und Boon, T. (1999) "*A new antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription*" J Exp Med 190(12): 1793-800

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. und Boon, T. (1991) "*A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*" Science 254(5038): 1643-7

Van Der Bruggen, P., Zhang, Y., Chaux, P., Stroobant, V., Panichelli, C., Schultz, E. S., Chapiro, J., Van Den Eynde, B. J., Bresseur, F. und Boon, T. (2002) "*Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells*" Immunol Rev 188: 51-64

van Essen, D., Kikutani, H. und Gray, D. (1995) "*CD40 ligand-transduced co-stimulation of T cells in the development of helper function*" Nature 378(6557): 620-3

Van Gool, S. W., Van Den Hove, L. und Ceuppens, J. L. (2000) "*Activation of the immune system in cancer patients*" Med Pediatr Oncol 34(1): 1-9

- van Weering, D. H. und Bos, J. L. (1998) "*Signal transduction by the receptor tyrosine kinase Ret*" *Recent Results Cancer Res* 154: 271-81
- Varga, G., Ehrchen, J., Tsianakas, A., Tenbrock, K., Rattenholl, A., Seeliger, S., Mack, M., Roth, J. und Sunderkoetter, C. (2008) "*Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells*" *J Leukoc Biol* 84(3): 644-50
- Vieweg, J. und Jackson, A. (2005) "*Modulation of antitumor responses by dendritic cells*" *Springer Semin Immunopathol* 26(3): 329-41
- Vieweg, J., Su, Z., Dahm, P. und Kusmartsev, S. (2007) "*Reversal of tumor-mediated immunosuppression*" *Clin Cancer Res* 13(2 Pt 2): 727s-732s
- Vignali, D. A., Collison, L. W. und Workman, C. J. (2008) "*How regulatory T cells work*" *Nat Rev Immunol* 8(7): 523-32
- Villadangos, J. A. (2001) "*Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them*" *Mol Immunol* 38(5): 329-46
- Weide, B., Garbe, C., Rammensee, H. G. und Pascolo, S. (2008) "*Plasmid DNA- and messenger RNA-based anti-cancer vaccination*" *Immunol Lett* 115(1): 33-42
- Weissman, A. M., Baniyash, M., Hou, D., Samelson, L. E., Burgess, W. H. und Klausner, R. D. (1988) "*Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor*" *Science* 239(4843): 1018-21
- Westermann, J., Ehlers, E. M., Exton, M. S., Kaiser, M. und Bode, U. (2001) "*Migration of naive, effector and memory T cells: implications for the regulation of immune responses*" *Immunol Rev* 184: 20-37
- Whiteside, T. L. (2004) "*Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer?*" *Cancer Immunol Immunother* 53(10): 865-78
- Whiteside, T. L. (2006) "*Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention*" *Semin Cancer Biol* 16(1): 3-15
- Whiteside, T. L. und Herberman, R. B. (1995) "*The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer*" *Curr Opin Immunol* 7(5): 704-10
- Winder, A., Kobayashi, T., Tsukamoto, K., Urabe, K., Aroca, P., Kameyama, K. und Hearing, V. J. (1994) "*The tyrosinase gene family--interactions of melanogenic proteins to regulate melanogenesis*" *Cell Mol Biol Res* 40(7-8): 613-26
- Wing, K., Ekmark, A., Karlsson, H., Rudin, A. und Suri-Payer, E. (2002) "*Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood*" *Immunology* 106(2): 190-9
- Witz, I. P. (2008) "*Yin-yang activities and vicious cycles in the tumor*

*microenvironment*" Cancer Res 68(1): 9-13

Wolchok, J. D. und Saenger, Y. (2008) *"The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation"* Oncologist 13 Suppl 4: 2-9

Woo, E. Y., Yeh, H., Chu, C. S., Schlienger, K., Carroll, R. G., Riley, J. L., Kaiser, L. R. und June, C. H. (2002) *"Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation"* J Immunol 168(9): 4272-6

Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A. E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D. P., Matrisian, L. M., Richmond, A., Lin, P. C. und Moses, H. L. (2008) *"Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis"* Cancer Cell 13(1): 23-35

Yang, R., Cai, Z., Zhang, Y., Yutzy, W. H. t., Roby, K. F. und Roden, R. B. (2006) *"CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells"* Cancer Res 66(13): 6807-15

Yannelli, J. R. und Wroblewski, J. M. (2004) *"On the road to a tumor cell vaccine: 20 years of cellular immunotherapy"* Vaccine 23(1): 97-113

Yee, C., Thompson, J. A., Byrd, D., Riddell, S. R., Roche, P., Celis, E. und Greenberg, P. D. (2002) *"Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells"* Proc Natl Acad Sci U S A 99(25): 16168-73

Yee, C., Thompson, J. A., Roche, P., Byrd, D. R., Lee, P. P., Piepkorn, M., Kenyon, K., Davis, M. M., Riddell, S. R. und Greenberg, P. D. (2000) *"Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of t cell-mediated vitiligo"* J Exp Med 192(11): 1637-44

Youn, J. I., Nagaraj, S., Collazo, M. und Gabrilovich, D. I. (2008) *"Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice"* J Immunol 181(8): 5791-802

Young, M. R., Lozano, Y., Ihm, J., Wright, M. A. und Prechel, M. M. (1996) *"Vitamin D3 treatment of tumor bearers can stimulate immune competence and reduce tumor growth when treatment coincides with a heightened presence of natural suppressor cells"* Cancer Lett 104(2): 153-61

Young, M. R., Wright, M. A., Lozano, Y., Prechel, M. M., Benefield, J., Leonetti, J. P., Collins, S. L. und Petruzzelli, G. J. (1997) *"Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells"* Int J Cancer 74(1): 69-74

Zea, A. H., Culotta, K. S., Ali, J., Mason, C., Park, H. J., Zabaleta, J., Garcia, L. F. und Ochoa, A. C. (2006) *"Decreased expression of CD3zeta and nuclear transcription factor kappa B in patients with pulmonary tuberculosis: potential mechanisms and reversibility with treatment"* J Infect Dis 194(10): 1385-93

- 
- Zea, A. H., Rodriguez, P. C., Atkins, M. B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., Mier, J. und Ochoa, A. C. (2005) "*Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion*" *Cancer Res* 65(8): 3044-8
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F. und Sprent, J. (1998) "*Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15*" *Immunity* 8(5): 591-9
- Zhao, F., Falk, C., Osen, W., Kato, M., Schadendorf, D. und Umansky, V. (2009) "*Activation of p38 MAPK Drives Dendritic Cells to Become Tolerogenic in Ret Transgenic Mice Spontaneously Developing Melanoma*" *Clin Cancer Res in press*
- Zinkernagel, R. M., Bachmann, M. F., Kundig, T. M., Oehen, S., Pirchet, H. und Hengartner, H. (1996) "*On immunological memory*" *Annu Rev Immunol* 14: 333-67
- Zitvogel, L., Tesniere, A. und Kroemer, G. (2006) "*Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*" *Nat Rev Immunol* 6(10): 715-27

#### IV. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Arg	Arginase
ATRA	All rans etinoic acid
BCL	B cell lymphoma
BRAF	V-raf-murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DC	Dendritic cell
DcR	Decoy receptor
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ENA	Epithelial-derived neutrophil-activating peptide
Erk	Extracellular signal regulated kinase
FACS	Fluorescence activated cells sorting
FCS	Fetal calf serum
FDA	Food and drug administration
FFS	Forward scatter
FoxP3	Forkhead box P3
GCN	General control non depressable kinase
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
gp	glycoprotein
GITR	Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
HLA	Human leukocyte antigen
IDO	Indoleamine 2,3-dioxigenase
i. d. R.	In der Regel
IFN	Interferon

IL	Interleukin
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
ITAM	Immunoreceptor tyrosine based activation motif
Jak	Janus kinase
KO	Knock out
LAG	Lymphocyte activated gene
LAK	Lymphokine activated killer
MAGE	Melanoma associated antigen
MCP	Monocyte chemotactic protein
MCSP	Melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan
MDSC	Myeloid derived suppressor cell
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex
min.	Minuten
MMP	Matrix metalloproteinase
mRNA	Messenger-ribonucleic acid
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PMSF	Phenylmethanylsulfonylfluorid
RNOS	Reactive nitrogen-oxide species
ROR	Retinoid-related orphan receptor
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Rounds per minute
SCDF	Stromal cell derived factor
SCF	Stem cell factor
SSC	Side scatter

---

SDS	Sodium dodecyl sulfate
Stat	Signal transducer and activator of transcription
Tab.	Tabelle
TAP	Transporters associated with antigen processing
TCR	T cell receptor
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
Th-Zellen	T-Helferzellen
TIL	Tumor infiltrating lymphocyte
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor Node Metastasis
tRNA	Transporter ribonucleic acid
Trp	Tyrosinase related protein
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
z. T.	Zum Teil

**Tab. IV.1** Abkürzungen

## V. Danksagung

---

Meinem Arbeitsgruppenleiter Prof. Viktor Umansky danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung dieses interessanten Dissertationsthemas sowie die stetig gewährte Betreuung und Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

Herzlichen Dank auch an Prof. Dirk Schadendorf für seine Unterstützung und zahlreiche interessante Diskussionen. Dr. Anne Regnier-Vigouroux danke ich für Tipps und Ratschläge sowie die Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen. Für wichtige Materialien sowie Unterstützung bei einigen Experimenten danke ich Dr. Wolfram Osen und Dr. Sabine Soltek. Vielen Dank an Dr. Christine Falk für die Möglichkeit, unsere Bio-Plex-Analysen in ihrer Abteilung durchzuführen. Dr. Steffen Schmitt, Klaus Hexel und Melanie Ficht sorgten für reibungsloses FACS-Sorten, für das ich ihnen sehr dankbar bin. Außerdem lösten sie mit mir bei viel Kaffee große und kleine Probleme rund ums FACS.

Bei Oliver Abschütz, Fernando Flores-Guzmán, Kathrin Frank, Suleyha Friedel, Julia Haderer, Sarah Karnert, Silvia Kimpfler, Marcel Ramacher, Haniyeh Sabouri-Khameneh, Hiltrud Schönhaber, Alexandra Sevko und Fang Zhao möchte ich mich für stete Hilfsbereitschaft, moralische Unterstützung und ein freundliches Arbeitsklima bedanken, ebenso bei allen anderen Mitarbeitern der Dermato-Onkologie. Ich hatte eine schöne Zeit mit Euch in - und auch außerhalb des Labors!

Vielen Dank an Prof. Michal Baniyash für die nette Zusammenarbeit im Rahmen der DKFZ-MOST-Kooperation. Analia Ezernitchi, Eliran Ish-Shalom, Yair Klieger, Efrat Manaster, Moshe Sade-Feldman, Ilan Vaknin und Lynn Wang sowie auch Liat Edri-Botzer und Elad Horwitz danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und besonders für ihre Gastfreundschaft, mit der sie meine Aufenthalte in Israel zu einer unvergesslichen Zeit gemacht haben! Toda raba!

Ganz besonders möchte ich meiner Familie für ihr Verständnis, bedingungslose Unterstützung, Geduld und Rückhalt danken, sowie dafür, dass sie Hochs und Tiefs dieser Arbeit mit mir geteilt haben.

