

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,
Nephrologie, Rheumatologie)

Induktion von PMN-MDSCs durch Interleukine der IL-1
Familie am Beispiel des Muckle-Wells Syndroms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Hall, Tobias

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Ebinger

2. Berichterstatter:in: Privatdozentin Dr. N. Köstlin-Gille

Tag der Disputation: 13.12.2023

Für meine Familie, insbesondere meine Eltern Susanne, Bernhard und Schwester Veronika, sowie all jene, die mich bis hierhin unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	4
1.1 Myeloid-derived supressor cells	4
1.1.1 Geschichte	4
1.1.2 Vorkommen, Ursprung und Typisierung	4
1.1.3 Proliferation, Differenzierung und Aktivierung	6
1.1.4 Funktion	8
1.1.5 Rolle der MDSCs im Immunsystem und bei Krankheiten	9
1.1.6 Therapeutische Anwendung	10
1.2 Inflammasom	11
1.2.1 Aufbau des NLRP3 Inflammasomes	12
1.2.2 Funktion des NLRP3-Inflammasoms	13
1.2.3 Regulation des NLRP3-Inflammasoms	14
1.3 Interleukine der IL-1 Familie	14
1.3.1 Rezeptoren der Interleukine der IL-1 Familie	15
1.3.2 IL-1 α und IL-1 β	15
1.3.3 IL-18	20
1.3.4 IL-33	21
1.4 Cryporin-assoziierte periodische Syndrome (CAPS)	23
1.4.1 Muckle-Wells Syndrom (MWS)	24
1.5 Fragestellung der Dissertation	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.2 Reagenzien	27
2.1.3 Eigene Ansätze:	29
2.1.4 Geräte	30
2.1.5 Analysegeräte	31
2.2 Methoden	31
2.2.1 Ethikerklärung	31
2.2.2 Gewinnung der Blutproben	31

Inhaltsverzeichnis

2.2.3	Auftrennung der Blutproben	32
2.2.4	Zellkultur	33
2.2.5	<i>Transwell</i> -Co-Kultur	34
2.2.6	Nachweis von MDSCs mittels Durchflusszytometrie (FACS).....	35
2.2.7	Magnetic activated cell sorting (MACS).....	37
2.2.8	CFSE Proliferationsassay	38
2.2.9	ELISA.....	39
2.2.10	Statistische Auswertung.....	40
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Immunphäotypisierung der PMN-MDSCs.....	42
3.1.1	Gating nach FSC und SSC	43
3.1.2	Gating nach Antikörper	43
3.1.3	Verhalten der Negativkontrollen	45
3.2	Nachweis der PMN-MDSC Induktion durch GM-CSF	47
3.2.1	GM-CSF induziert PMN-MDSCs	47
3.3	Nachweis der immunsupprimierenden Wirkung durch CD33 positive Zellen im CFSE-T-Zell-Proliferationsassay	53
3.4	Nachweis einer Induktion von CD33⁺CD14⁻ MDSCs in Co-Kultur mit PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom.....	57
3.5	IL-1β Sekretion <i>in vitro</i> durch PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom.....	59
3.6	Induktion von PMN-MDSCs durch Interleukine der IL-1 Familie.....	61
3.6.1	IL-1 α	62
3.6.2	IL-1 β	65
3.6.3	IL-18	68
3.6.4	IL-33	71
3.6.5	Interleukine der IL-1 Familie im Vergleich	74
3.7	Immunsuppression durch von Interleukinen der IL-1 Familie induzierten PMN-MDSCs.....	77
4	Diskussion.....	79
4.1	Durchflusszytometrische Charakterisierung von <i>in vitro</i> kultivierten MDSCs in der Negativ- und Positivkontrolle.....	79
4.1.1	Negativkontrollen durch unstimulierte PBMCs von gesunden Probanden	79

Inhaltsverzeichnis

4.1.2	Positivkontrollen der Induktion von PMN-MDSCs mittels <i>in vitro</i> GM-CSF Stimulation	80
4.1.3	T-Zell suppressive Funktion von durch GM-CSF <i>in vitro</i> stimulierten MDSCs	81
4.2	MDSCs bei CAPS Patienten.....	82
4.2.1	IL-1 β Konzentration in Zellkulturüberständen von Proben von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom.....	82
4.2.2	Induktion von PMN-MDSCs in Co-Kultur mit PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom	83
4.3	Interleukine der IL-1 Familie als MDSC Induktoren.....	84
4.3.1	Immunsuppressive Funktion von durch Interleukine der IL-1 Familie induzierten MDSCs	87
4.3.2	IL-1 α	88
4.3.3	IL-1 β	89
4.3.4	IL-18	90
4.3.5	IL-33	90
4.4	Aussichten auf therapeutische Anwendung von MDSCs in Bezug auf das Inflammasom und Eingriffe in die IL-1 Signalwege Achse	91
4.5	Ausblick auf weitere Forschungsaspekte	93
5	Zusammenfassung.....	94
	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	95
	Tabellenverzeichnis.....	95
	Abbildungsverzeichnis.....	95
6	Literaturverzeichnis	96
7	Erklärung zum Eigenanteil	116
	Danksagung.....	117

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A		CSV	Comma-separated values Datenformat
AA-Amyloidose	Amyloidose auf Grund Ansammlung des AA Proteinanteils von Serumamyloid A (SAA)	CXCL	Chemokin Ligand
APC	Allophycocyanin	CXCR	CXC chemokine receptor
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain	D	
ATP	Adenosine triphosphate	DAMP	danger-associated molecular patterns
B		DC	Dendritic cell
BCL	B-cell lymphoma	E	
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit	ECP	extrakorporale Photopherese
C		ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein beta	eMDSC	early-stage MDSC
CAPS	Cryopyrin-assoziierten Syndrome, Cryopyrin-associated periodic syndrome	F	
CARD	caspase activation and recruitment domain	FACS	Fluorescence-activated cell sorting
CD	Cluster of differentiation	FCAS	Familiär assoziiertes Kältesyndrom
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester	FCS	fetal calf serum
CIITA	MHC class II transcription activator	FITC	Fluorescein isothiocyanate
CINCA	Chronisch infantilen neurologisch- kutan-artikulären Syndrom	FSC	Forward Scatter
c-KIT	Proto-oncogene c-KIT	G	
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i> / Prostaglandin- endoperoxide synthase 2	g	Gravitationskonstante
CRH	Corticotropin-releasing hormone	G-CSF	Granulozyten- Kolonie- stimulierender Faktor, Granulocyte colony-stimulating factor
CRP	C-reactive protein	GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen- Kolonie-stimulierender Faktor
		GrMDSCs	granulozytäre MDSCs
		GvHD	graft-versus-host disease, Graft- versus-Host-Disease

Abkürzungsverzeichnis

H

HCF	hepatocyte growth factor
HET-E	incompatibility locus protein from <i>Podospora anserina</i>
HGF	Hepatocyte growth factor
HGM	High gradient magnetic field
HIES	Hyper-IgE Syndrom
HIF-1 α	Hypoxia inducible Factor-1 α
HLA	human leukocyte antigen
HLA-DR	MHC Klasse II Rezeptor der human leucoyte antigens
HMGB	High mobility group box
HRP	horseradish peroxidase

I

ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin 1 receptor
IL-1RAcP	Interleukin-1 receptor accessory protein
IMC	immature myeloid cells
infl. DC	inflammatory dendritic cells
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase

J

JAK	Janus kinase
JSI-124	Cucurbitacin I

L

Lin	Lineage-Marker
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	leucine-rich repeat

M

MACS	Magnetic-activated cell sorting
------	---------------------------------

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MDSCs	Myeloid-derived suppressor cells
MEFV	Mediterranean fever
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
M-MDSC	mononuclear MDSC
MoMDSCs	monozytäre MDSCs
mRNA	messenger RNA (Ribonuclein acid)
MSC	Mesenchymal Stem Cells
MWS	Muckle-Wells Syndrom, Muckle-Wells Syndrom
MYC	Familie von Proto-Onkogenen, Regulator Genen (c-myc, l-myc, n-myc)
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88

N

NACHT	nucleotide-binding and oligomerization
NADPH Oxidase	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK-Zelle	Natural killer cell
NLR	nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat
NLRC	nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing CARD
NLRP	nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing Pyrin

Abkürzungsverzeichnis

NLRP3	Nod-like receptor family, pyrin domain containing 3	S	
NO	Stickstoffmonoxid	S100	Calcium bindendes Protein der S100 Gruppe
NOD	Nucleotide oligomerization domain	SAA	Serumamyloid A
NOMID	Neonatal Onset Multisystem Inflammatory Disease	SCF	stem cell factor
ns	statistisch nicht signifikant	siRNA	small interfering RNA
NSCLC	Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom	SSC	Side Scatter
P		sST2	soluble interleukin 1 receptor-like 1
PAMP	pathogen-associated molecular patterns	ST2L	membrane-bound soluble interleukin 1 receptor-like 1
PB	Peripheres Blut	STAT	signal transducer and activator of transcription
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	T	
PBS	Phosphate-buffered saline	TAM	tumor associated macrophages
PE	Phycoerythrin	TGF- β	Transforming growth factor beta
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex	Th	T-Helfer Zelle
PGE	Prostaglandin E	TIR	Toll/interleukin-1 receptor homology domain
PI	Propidium Iodid	TLR	Toll-like receptors
PLA	Phospholipase A	TNF- α	tumor necrosis factor alpha
PMN	Polymorphonuclear	TP1	telomerase-associated protein
PMN-MDSC	polymorphonuclear MDSC	TRAF	Tumor necrosis factor receptor-associated factor
PRR	Pattern recognition receptor	Tregs	regulatory T cells
PYD	pyrin domain	V	
R		VCAM	Vascular cell adhesion protein
RPMI	Eigenname Zellkulturmedium des Roswell Park Memorial Institute	VEGF	Vascular endothelial growth factor, Vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Myeloid-derived suppressor cells

1.1.1 Geschichte

Bereits im frühen 20. Jahrhundert wurde im Rahmen der Tumor Progression eine Neutrophilie beschrieben, im Verlauf wurde eine atypische myeloide Differenzierung sowie 1978 deren suppressive Wirkung auf Lymphozyten beobachtet¹. Die Zellen wurden Veto Zellen, Null Zellen (wegen fehlender Oberflächenmarker anderer hämatopoetischer Zellreihen) oder „*natural suppressor cells*“ genannt¹. M.R. Young *et al.* nannten, durch Injektion von Linolsäure induzierte Zellen im Mausmodell, „*bone marrow suppressor cells*“². Mitte der 90er Jahre wurde bei Stammzelltransplantationen eine reduzierte Inzidenz von *graft-versus-host disease* (GvHD) beobachtet. Dies wurde dem gehäuften Auftreten von, durch Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (*Granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) stimulierten, CD14⁺ (CD = *Cluster of differentiation*) Zellen zugeschrieben³.

2006 wurde, auf Grund der Verwechslungsgefahr mit den mesenchymalen Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSC) die Bezeichnung *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) eingeführt⁴. Es handelt sich dabei um einen Sammelbegriff für vielartige Zellen der myeloiden Zellreihe mit immunsuppressivem Potential⁵.

1.1.2 Vorkommen, Ursprung und Typisierung

Nach aktuellem Wissensstand treten MDSCs meist im Rahmen eines langandauernden oder ausgeprägten inflammatorischen Umfeld auf⁶. Folgerichtig wurden MDSCs daher hauptsächlich bei soliden Tumoren⁷, aber auch maligne hämatologische Erkrankungen⁸, Autoimmun-Erkrankungen⁹⁻¹¹, Infektionen¹²⁻¹⁵ und Traumata^{16,17} beobachtet und untersucht.

Außerdem konnten erhöhte Frequenzen von MDSCs bei Frühgeborenen sowohl im Nabelschnurblut als auch in der Neugeborenen-Periode beobachtet werden¹⁸,

Einleitung

welche potenziell einen Anteil an der Immuntoleranz der Mutter gegenüber dem Fötus haben.

Wie alle Blutzellen entstammen MDSCs primär den hämatopoetischen Stammzellen, aus welchen unreife myeloide Zellen (*immature myeloid cells*, IMCs)¹⁹ entstehen. Diese sind immunologisch inaktiv und differenzieren sich normalerweise zu Granulozyten, Monozyten oder dendritischen Zellen aus²⁰. Nach aktuellem Kenntnisstand sind MDSCs aktivierte, in der vollständigen Differenzierung gehemmte, meist unreife myeloide Zellen¹⁹ wobei auch Populationen reifer Neutrophiler mit suppressiver Funktion beschrieben wurden^{21,22}. Die genaue Reifungsabfolge der MDSCs ist noch nicht vollständig geklärt. Während myeloide Zellen normalerweise entweder einen granulozytären (zu polymorphnukleären Leukozyten (*polymorphonuclear leukocytes*, PMNs wie z.B. neutrophilen Granulozyten)) oder monozytären Weg (zu Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen) einschlagen, wurde für MDSCs ein Wechsel dieser Ausreifungspfade vom monozytären zum granulozytären Weg beschrieben²³. Im Tumorumfeld können sich MDSCs zu Tumor-assoziierten Makrophagen (*tumor associated macrophages*, TAM) oder inflammatorisch dendritische Zellen (*inflammatory dendritic cells*, infl. DC) differenzieren²⁴.

Bei MDSCs handelt es sich immun-/histologisch um eine heterogene Gruppe von Zellen, welche lichtmikroskopisch morphologisch meist unreifen Neutrophilen und Monozyten ähneln. Für humane MDSCs haben sich, auf Grund der Polymorphie der MDSCs sowie dem aktiven Forschungsumfeld, zahlreiche Definitionen von MDSCs anhand von Oberflächenmarkern etabliert. Bestandteil der Definition von MDSCs ist jedoch immer die Eigenschaft der T-Zell Suppression.

2016 postulierten Bronte *et al.*⁵ eine Nomenklatur im Maus-Modell und beim Menschen. Dabei werden drei verschiedene Untergruppen der MDSCs unterschieden. Von den bereits seit längerer Zeit bekannten monozytären (M-MDSC) und den granulozytären MDSCs (PMN-MDSC) werden die *early-stage*

Einleitung

MDSCs (eMDSC) mit fehlenden Differenzierungs-Markern (*Lineage-Marker*) abgegrenzt. eMDSC werden als unreife MDSC Vorläufer angesehen.

Die Unterscheidung erfolgt anhand folgender Oberflächenmarker:

eMDSCs sind CD33⁺HLA-DR⁻ und exprimieren keine *Lineage-Marker* Lin⁻ (d.h. negativ für CD3/14/15/19/56). PMN-MDSCs sind CD33⁺CD11b⁺CD14⁻ und CD15⁺ oder CD66⁺, M-MDSCs CD33⁺CD11b⁺ CD14⁺ CD15⁻ HLA-DR^{low/-}.

Von diesen Oberflächenmarkern wurden folgende für diese Arbeit verwendet:

- CD33 ist ein ausschließlich auf Zellen der myeloiden Zellreihe exprimierter Oberflächenmarker²⁵.
- CD14 ist ein klassischer Oberflächenmarker von Monozyten sowie Makrophagen und wird teils auf dendritischen Zellen exprimiert²⁶⁻²⁹.
- HLA-DR gehört zur Gruppe der MHC-Klasse-II-Zelloberflächenrezeptoren und damit zum antigenpräsentierenden System. Daher ist es fast nur auf Zellen wie B-Lymphozyten, dendritischen Zellen sowie Monozyten und Makrophagen vorzufinden^{30,31}.
- CXCR4 ist ein Chemokin-Rezeptor für CXCL12 (auch stromal cell-derived factor 1, SDF-1, genannt), welcher auf MDSCs nachgewiesen wurde³². Ihm wird eine entscheidende Rolle in der Entstehung eines prämetastatischen Milieus durch Chemotaxis von MDSCs zugeschrieben³³. Dabei spielt Prostaglandin E2 eine wichtige Rolle³⁴.

1.1.3 Proliferation, Differenzierung und Aktivierung

Analog zu Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen wird die Bildung von MDSCs durch die Granulozyten-Makrophagen- / Granulozyten- / Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktoren GM-CSF (*Granulocyte-macrophage stimulating factor*), G-CSF (*Granulocyte stimulating factor*) und M-CSF (*Macrophage stimulating factor*) induziert³⁵. Außerdem wurde für zahlreiche pro-inflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel IL-1 β ³⁶⁻³⁸, IL-6³⁹, S100A7/8/9/12/Calprotectin^{9,40}, IFN- γ (*Interferon gamma*)⁴¹, VEGF (*Vascular endothelial growth factor*)⁴² und Prostaglandin E2⁴³⁻⁴⁵ eine Induktion der MDSCs beschrieben.

Einleitung

Aktuell bestehen noch zahlreiche Unklarheiten über die genauen Zusammenhänge der Induktion und Aktivierung von MDSCs. Condamine und Gabrilovich haben 2011 ein 2-Signal-Modell aus Induktion und Aktivierung postuliert, wobei auch fließende Übergänge zu einem direkten Weg bestehen können⁴⁶:

Die Induktion oder Generation von MDSCs wird vornehmlich durch STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription*) Signalwege vermittelt.¹⁹ Wichtige Faktoren hierfür sind IL-6, IL-10, VEGF, HGF (*Hepatocyte growth factor*) und G-CSF/GM-CSF⁴⁷.

STAT3 fördert die Proliferation und Apoptose-Resistenz (Bax abhängig)⁴⁸ der MDSCs über die Expression verschiedener Proteine der Zellzyklus-Regulation wie BCL-XL, MYC, cyclin D1 oder survivin^{19,49}. Für TLR-4 (*Toll-like receptor*) wird eine erhöhte Apoptose-Resistenz von MDSCs berichtet⁵⁰ wobei TLR-4 auch über STAT3 vermittelt⁵¹. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass STAT3 Einfluss auf die Aktivierung von MDSCs hat (vgl. 1.1.4)⁵².

Bei selektiver STAT3-Inhibition mittels JSI-124 konnte eine vermehrte Differenzierung zu DCs und ein verminderter Tumorprogress beobachtet werden⁵³. Ein STAT3 Knock-out in hämatopoetischen Zellen führte bei Mäusen zur Ausbildung eines Morbus Crohn ähnlichen Krankheitsbildes⁵⁴. Beim Menschen können Mutationen von STAT3 das Hyper IgE Syndrom (HIES) auslösen^{55,56}.

Die weitere Differenzierung von MDSCs zu adulten myeloiden Zellen wird unter anderem durch, auch autokrin ausgeschüttetes, S100A8/9 zum Arrest gebracht^{40,53,57}, weshalb MDSCs insbesondere im Tumorumfeld akkumulieren⁵⁸. Die isolierte in vitro Induktion von MDSCs durch S100A7/8/9/12 ist hingegen gering⁹.

Die Aktivierung der suppressiven Aktivität von MDSCs wird durch proinflammatorische Zytokine, Mediatoren des Tumormilieus, Zellzerfallsprodukte, den *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) oder im

Einleitung

Rahmen von mikrobiologischen oder viralen Infektionen durch *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) initiiert.

Weitere wichtige MDSC aktivierende Signalwege und Faktoren sind:

- Der MyD88 / NF- κ B (Myeloid differentiation primary response 88 / Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) Signalweg kann durch TLR- (insbesondere TLR-2^{52,59} sowie TLR-4⁶⁰ mit CD14⁶¹) sowie IL-1 Rezeptoren aktiviert werden⁴⁶. Mögliche Liganden sind IL-1 β ⁶², mikrobielle Antigene⁶³ (PAMPs) wie LPS (Lipopolysaccharid)⁶¹, Flagellin²² sowie Alarmine / DAMPs, welche unter anderem bei Zellnekrose ausgeschüttet werden, wie S100A8/9 und HMGB-1 (High mobility group box)⁶⁴. Ein weiterer NF- κ B Aktivator ist TNF- α ⁴⁶.
- STAT1 wird durch Interferon- γ aus aktivierten T-Zellen sowie IL-1 β aktiviert und fördert die Expression von Arginase 1 und iNOS (Inducible nitric oxide synthase)^{46,65}.
- STAT6, aktiviert durch IL-13 und IL-4 über den IL-4R α (CD124), bedingt ebenfalls die Arginase 1 Produktion⁴¹. IL-13 und IL-4 werden im Tumorumfeld produziert, ihre Blockade erhöht die antitumoröse T-Zell-Aktivität⁶⁶.
- Der Stammzellfaktor (stem cell factor, SCF) führt über seinen Rezeptor c-Kit (Proto-oncogene c-KIT) zu einer Expansion von MDSCs⁶⁷.

1.1.4 Funktion

MDSCs gelten als wichtige Regulatoren des adaptiven, aber auch angeborenen Immunsystems^{19,68}. Ihre Funktion sticht heraus, da sie als Teil des angeborenen Immunsystems besonders die T-Zell Funktion supprimieren⁶⁹. Es wird sogar eine antigen-spezifische CD8⁺-T-Zell Hemmung beschrieben⁷⁰. Auch die B-Zell-Proliferation, Antikörperproduktion⁷¹ und NK-Zellen (*Natural killer-cells*)⁷² können durch MDSCs gehemmt werden.

Zahlreiche Mechanismen der Immunsuppression durch MDSCs wurden beschrieben, im Folgenden sollen die Wichtigsten genannt werden.

Allgemein wird davon ausgegangen, dass die suppressiven Wirkungen entweder durch direkten Zellkontakt vermittelt werden oder auf Grund der kurzen Halbwertszeit der beteiligten Substanzen lediglich im nahen Umfeld wirken¹⁹. Art und Ausprägung der Suppression variieren je nach MDSC Subgruppe und Umfeld²⁴.

PMN-MDSCs produzieren mit hoher STAT3 und NADPH-Oxidase (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) Aktivität⁷³ Sauerstoffradikale^{74,75} und supprimieren damit auf bislang nicht genau geklärte Weise T-Zellen⁷³ und NK-Zellen⁷⁶.

In M-MDSCs^{74,75} erfolgt eine Aktivierung der Enzyme Arginase-1 und iNOS, vor allem über den STAT1-Weg⁴⁶, wodurch L-Arginin abgebaut wird. Arginase 1 wird dabei sogar ins Blut ausgeschüttet⁷⁷. L-Arginin ist essentiell für die Proliferation von T-Lymphozyten^{78,79}. Das durch die iNOS produzierte Stickstoffmonoxid (NO) hemmt die T-Zell-Funktion auf verschiedene Arten¹⁹.

MDSCs können durch Sekretion von TGF- β (*Transforming growth factor beta*) und IL-10 regulatorische T-Zellen (Tregs) induzieren^{80,81}. Mittels IL-10 und IL-6 beeinflussen sich MDSCs, Monozyten und DCs untereinander, wobei das jeweilige immunsuppressive Potential verstärkt wird⁸².

MDSCs werden im Rahmen von malignen Tumoren weitere Effekte, wie die Förderung der Angiogenese mittels VEGF⁸³ sowie die Ausbildung begünstigender Umstände für eine Metastasierung durch Etablierung einer „prä-metastatischen-Nische“⁸⁴, zugeschrieben

1.1.5 Rolle der MDSCs im Immunsystem und bei Krankheiten

MDSCs scheinen eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems zu spielen. Ihr vermehrtes Auftreten wird meist im Rahmen chronischer oder akuter Inflammation - oft im Rahmen einer „*emergency granulopoiesis*“^{63,85} beschrieben

Einleitung

- beobachtet, während sie im peripheren Blut bei gesunden Probanden kaum nachzuweisen sind.

Bislang wurden vornehmlich unerwünschte Wirkungen von MDSCs wie die Förderung der Immuntoleranz gegenüber Tumoren²⁴ und der Verdacht der Mitwirkung bei der post-Sepsis Immunschwäche⁶³ untersucht. Weitere Beobachtungen sind das vermehrte Auftreten von MDSCs im peripheren Blut bei schwerer Depression⁸⁶ oder der Nachweis von MDSCs bei Organtransplantierten⁸⁷.

Eine evolutionär wichtige Funktion der MDSCs könnte ihre Dämpfung beziehungsweise Beendigung inflammatorischer Zustände sein¹². Im Rahmen von Infektionen könnte die Produktion bakterizider Moleküle, wie Sauerstoffradikale und NO, sowohl die Erregerbekämpfung unterstützen als auch parallel einer Hyperinflammation und einem Zytokinsturm entgegenwirken^{12,63}.

Eine klinische Anwendung der Messung der MDSC Frequenz im Patientenblut wird aktuell nicht standardisiert durchgeführt, sodass keine vergleichbaren Ergebnisse zu systemischen Pathologien wie der Sepsis bestehen⁶³. In meist retrospektiver Betrachtung ergeben sich jedoch Hinweise, dass ein vermehrtes Auftreten von MDSCs im peripheren Blut mit dem Vorliegen nosokomialer Infektionen⁸⁸ und der Mortalität im Rahmen einer Sepsis korreliert⁸⁹. Es wird postuliert, dass sich unter den im Differentialblutbild als unreife Granulozyten bezeichneten Zellen, zumindest teilweise MDSCs finden könnten⁶³.

1.1.6 Therapeutische Anwendung

Bei Patienten mit GvHD fand sich nach extrakorporaler Photopherese (ECP)⁹⁰ eine erhöhte PMN-MDSC-Frequenz, sodass diese in Zusammenhang mit dem Ansprechen der Therapie gesehen wurde.

Es gibt Hinweise, dass das Multiple Sklerose Medikament Glatiramer seine Wirkung unter anderem durch eine verstärkte MDSC Funktion ausübt⁹¹.

Einleitung

Für die Tumorthherapie wurden verschiedene Therapieansätze zur Reduktion der MDSC-bedingten Immunsuppression etabliert. In einem Review von Law *et al.*⁹² werden diese in vier Angriffspunkte unterteilt.

- Durch Chemotherapeutika wie 5-Fluorouracil⁹³, Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wie Sunitinib⁹⁴ (durch Blockade des c-KIT Signalweges Hemmung der VEGF Stimulation) oder durch selektive Blockade der S100A Proteine⁹⁵ können MDSC Populationen abgebaut werden.
- Chemokin-Inhibitoren verhindern die Migration von MDSCs in das Tumormilieu, einige werden bereits in klinischen Studien getestet⁹².
- Ein weiterer Angriffspunkt ist die immunsuppressive Funktion der MDSCs. Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitoren führen zu einer Reduktion von Prostaglandin E2 (PGE2). Dieses vermittelt eine Generation⁴⁵ der MDSCs und Expression der Arginase 1⁹⁶. Auch für Phosphodiesterase-5 Inhibitoren⁹⁷, die Hemmung der Enzyme NADPH⁹⁸ und iNOS⁹⁹ sowie eine STAT3 Inhibition¹⁰⁰ sind positive antitumoröse Effekte gezeigt worden.
- Die Differenzierung der MDSCs zu reifen antigen-präsentierenden Zellen kann beispielsweise mittels All-trans-Retinoinsäure gefördert werden¹⁰¹.

Im Mausmodell konnte ein deutlicher Erfolg einzelner oben genannter Wirkstoffe bei Kombination mit Immuntherapie¹⁰² oder Checkpoint Inhibitoren¹⁰³ erreicht werden.

Ein interessanter Ansatz verwendet MDSCs als „intelligente Träger“ für onkolytische Viren, um diese zielgenau im Tumorgewebe freizusetzen¹⁰⁴.

1.2 Inflammasom

Inflammasome sind Multiproteinkomplexe, welche nach Aktivierung von *pattern-recognition* Rezeptoren (PRR) durch PAMPs oder DAMPs geformt werden und mittels Aktivierung von Caspasen proinflammatorische Mediatoren freisetzen¹⁰⁵. Inflammasome finden sich hauptsächlich im Zytosol¹⁰⁶ von Makrophagen sowie Epithelien¹⁰⁷. Dabei dienen Inflammasome, ebenso wie die transmembranären Toll-like Rezeptoren (TLR)¹⁰⁸, als entscheidende erste Regulationsstelle des

angeborenen Immunsystems. Nach Erkennung von DAMPs oder PAMPs vermitteln sie die Aktivierung des Immunsystems¹⁰⁶.

Es sind verschiedene PRRs bekannt, welche sich bezüglich der detektierten Muster sowie der Caspase Aktivierungssequenz unterscheiden¹⁰⁹. Am besten untersucht wurde die Familie der NLR (*nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat*), welche in NLRs mit CARD- oder NLRPs mit Pyrin als endständiger Domäne unterteilt werden^{109,110}. Das NLRP3 Inflammasom, auch Cryopyrin genannt¹⁰⁵, soll im Folgenden auf Grund seiner pathomechanistischen Signifikanz im Rahmen der Cryopyrin-assoziierten Syndrome (CAPS) näher beleuchtet werden.

1.2.1 Aufbau des NLRP3 Inflammasomes

Als PRR des NLRP3-Inflammasom dient, namensgebend, NLRP3. Er besteht aus drei Domänen, der c-terminalen LRR- (*leucine-rich repeat*), zentralen NACHT- (*nucleotid binding and oligomerization domain* - bestehend aus NAIP, CIITA, HET-E und IP1^{111,112}) und n-terminalen PYD-Domäne (*Pyrin domain*)¹¹³. Das Inflammasom entsteht nach Aktivierung und Oligomerisierung von NLRP3s durch die NACHT-Domäne¹¹¹. Hierfür wird zwingend ATP benötigt¹¹⁴. Anschließend kommt es zur Anlagerung der jeweiligen PYD-Domänen des ASC-Protein (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain*) und des NLRP3s woraufhin zahlreiche ASC-Moleküle ein tubuläres Filament bilden¹¹⁵ (Abb. 1¹¹⁶⁻¹¹⁸). Es kommt zur Assoziation der CARD-Domänen (*caspase activation and recruitment domain*) des ASC und der pro-Caspase-1⁸¹. Dieses Konstrukt wird als Inflammasom bezeichnet. Die Anlagerung der pro-Caspase-1 führt zu einer eigenständigen Konformationsänderung zum aktiven Caspase-1-Heterotetramer¹¹³ (nicht abgebildet).

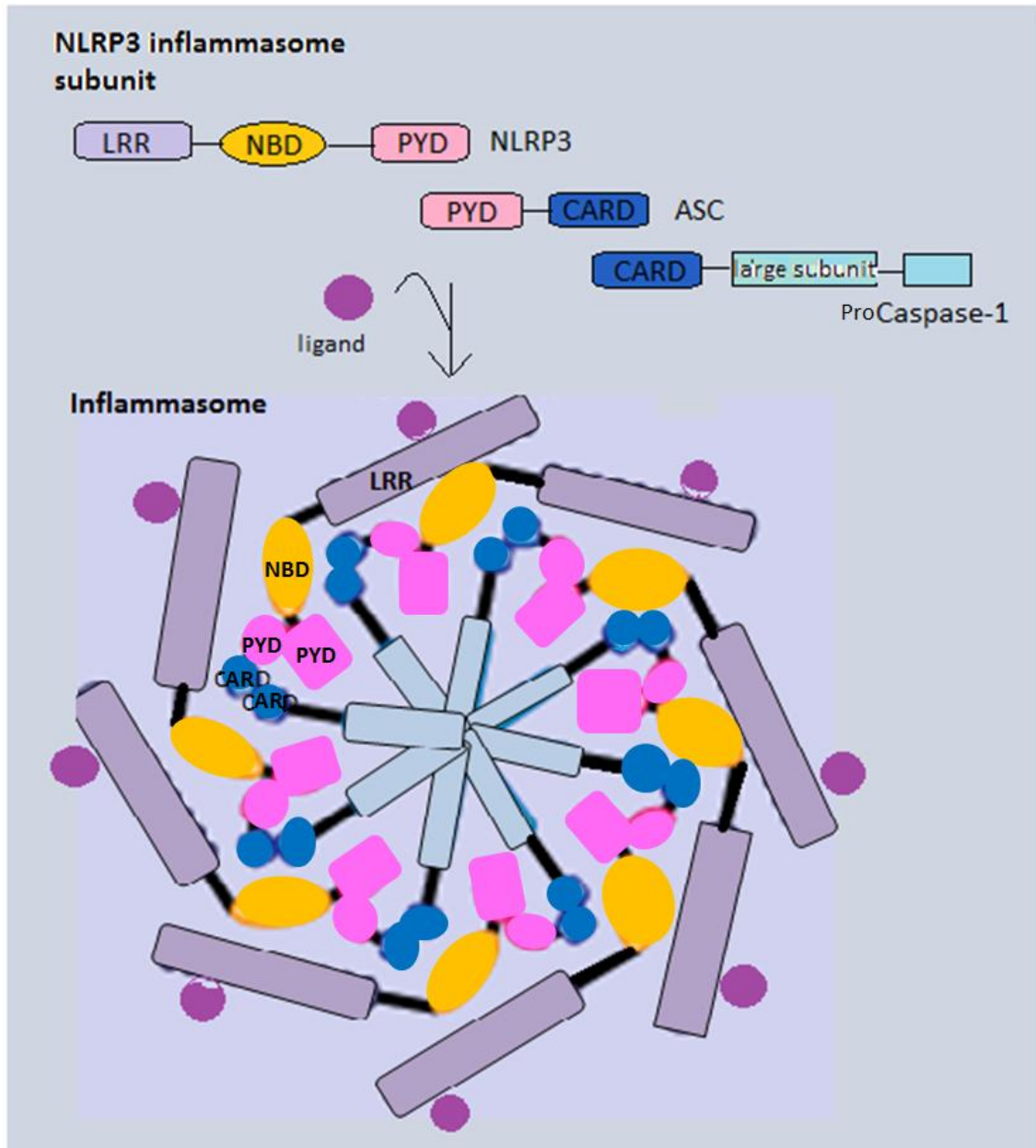


Abb. 1: Zweidimensionale Struktur eines NLRP3-Inflammasomes

Aus englischsprachigem Wikipedia Artikel: „*Inflammasome*“. Titel: „*Inflammasome structure*“.
Nach Bergsbaken et al 2009, Dagenais et al 2012.

Lizenz BY-SA 3.0 Lizenz. Erstellt: 23 März 2012. Zugriff 10. Januar 2022 ¹¹⁶

1.2.2 Funktion des NLRP3-Inflammasoms

Durch die Caspase-1 werden hauptsächlich pro-IL-1 β und pro-IL-18 in deren aktive Form umgewandelt. Außerdem wird Gasdermin D aktiviert, welches als Multimer Poren in die Zellmembran einbaut. Hierdurch kommt es zum Verlust des osmotischen Gradienten und einer speziellen Form des Zelltods mit

Freisetzung intrazellulärer Bestandteile, der sogenannten Pyroptose¹⁰⁹. Diese ist entscheidend für die Freisetzung von IL-1 β und IL-18^{119,120}, IL-1 α und weiterer DAMPs wie HMGB1 und S100 Proteine¹²⁰.

1.2.3 Regulation des NLRP3-Inflammasoms

Die Ausbildung eines NLRP3 Inflammasomes wird, nach aktuellem Wissensstands, über zwei Schritte reguliert.

Im ersten Schritt wird die Translation von pro-IL1 β und NLRP3 zum Beispiel durch LPS (TLR-4 Rezeptor) oder TNF- α über den MyD88 / NF- κ B Signalweg induziert¹²¹.

Im zweiten Schritt erfolgt die Aktivierung des NLRP3. Diese kann im Fall von NLRP3 durch zahlreiche DAMPs und PAMPs geschehen. Es wird davon ausgegangen, dass diese nicht alle direkt sondern vermutlich indirekt über einen gemeinsamen intrazellulären Signalweg auf NLRP3 wirken¹²². Neben Zell-Bestandteilen bei lysosomalen oder mitochondrialen Schäden, Toxinen oder Erbgut von Bakterien, Viren, Pilzen werden auch extrazelluläres ATP, Elektrolytschwankungen, Harnsäurekristalle und anorganische Materie wie Asbest und Aluminium-Salze als Aktivatoren angesehen^{113,122}.

Die Aktivität des NLRP3 Inflammasoms kann posttranslational verändert werden¹²³. Unter anderem wurde eine Hemmung für Stickstoffmonoxid (NO) beschrieben¹²⁴.

1.3 Interleukine der IL-1 Familie

Interleukine der IL-1 Familie wurden bereits 1974 durch Dinarello *et al.*¹²⁵ beschrieben, als nach Gabe von menschlichen „Pyrogenen“ aus Monozyten bei Mäusen eine erhöhte Körpertemperatur gemessen wurde.

Als Interleukine der IL-1 Familie können im engeren Sinn IL-1 α , IL-1 β sowie der IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1Ra) gesehen werden¹²⁶.

Insgesamt werden jedoch 11 Zytokine und 10 Rezeptoren der Familie zugerechnet¹²⁷, wobei diese sowohl pro- als auch anti-inflammatorische

Wirkungen aufweisen¹²⁷. Neben den IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra sind IL-18 und IL-33 am besten untersucht¹²⁶.

Ihre Gemeinsamkeit beruht vor allem auf der Art der Freisetzung, den Rezeptoren sowie folgenden Signalwegen¹²⁶. Eine Besonderheit im Vergleich zu anderen Zytokinen liegt in der Translation im Zytosol, ohne Abhängigkeit von Endoplasmatischem Retikulum oder Golgi Apparat¹²⁸, und damit in einer atypischen, nicht-vesikulären Ausschüttung.

1.3.1 Rezeptoren der Interleukine der IL-1 Familie

Die intrazelluläre Rezeptordomäne (*toll interleukin receptor (TIR) homology domain*) der pro-inflammatorischen IL-1 Rezeptoren (IL-1R) ist in ihrem Aufbau sehr gut konserviert und homolog zu der von TLR-Rezeptoren¹²⁷. Beiden Rezeptorentypen nachgeschaltet wird das angeborene Immunsystem aktiviert und damit eine Inflammation getriggert¹²⁷. Am Beispiel des IL-1R1 Rezeptor erklärt, erfolgt nach Bindung von IL-1 α oder IL-1 β eine Konformationsänderung und Anlagerung des Co-Rezeptors IL-1R3. Die TIR phosphoryliert anschließend MyD88 und IL-1 Rezeptor aktivierte Kinasen (IRAK), welche eine Kaskade proinflammatorischer und transkriptioneller Effekte in Gang setzen¹²⁷.

Insgesamt sind 10 verschiedene Rezeptoren sowie weitere Bindungs-Proteine bekannt. Je nach Vorliegen der einzelnen Rezeptoren, als membrangebundene oder gelöste intra-/extrazelluläre Domänen, üben sie pro- oder anti-inflammatorische Wirkungen aus. Diese komplexen Wechselwirkungen balancieren die Inflammation aus¹²⁷.

1.3.2 IL-1 α und IL-1 β

Beide Interleukine werden als inaktive Vorläufer translatiert, können zu einer aktiven Form überführt werden und binden an den gleichen pro-inflammatorischen IL-1R1¹²⁹. Ansonsten ergeben sich deutliche Unterschiede.

Es scheint als wirke IL-1 α , als wichtiges DAMP, insbesondere lokal und im Rahmen von aseptischen Entzündungsreaktionen. IL-1 β scheint eine Rolle in der

septischen Inflammation und insbesondere deren Amplifikation mit systemischen Effekten zu haben.

1.3.2.1 IL-1 α

Für IL-1 α sind komplexe Regulations- und Wirkungsmechanismen beschrieben, wobei noch zahlreiche Unklarheiten zum IL-1 α Stoffwechsel bestehen¹²⁹.

Pro-/IL-1 α findet sich konstitutionell in vielen gesunden Zellen¹²⁷, insbesondere in „Barriere-Zellen“¹²⁹ wie Epithelien und Endothelien¹³⁰. Die Expression kann durch physiologische Stimuli wie oxidativen Stress, Fettüberladung, Zytokin- (u.a. IL-1) und TLR-Stimulation erhöht werden¹²⁹.

Pro-IL-1 α ist biologisch aktiv. Durch pro-inflammatorische Proteasen kann es posttranslationelle Modifikationen erfahren. Trotz der Vermutung, dass die Modifikationen eine Aktivierung bedingen, bestehen noch Unklarheiten über deren Auswirkungen¹²⁹. Für IL-1 α welches, durch Granzym B, Elastase und durch calcium-aktiviertes Calpain modifiziert wurde, konnte eine höhere Aktivität nachgewiesen werden¹³¹. Auch Caspase-5 und -11 können eine Aktivierung und Ausschüttung von IL-1 α bedingen¹³².

IL-1 α kann wie die meisten Zytokine als freies Molekül extrazellulär agieren. Zudem kann pro-IL-1 α nach Glykosylierung membrangebunden präsentiert werden und damit juxtakrin wirken¹³³. In beiden Fällen wird eine Transmembran-Rezeptor-Transduktion über den IL-1R1 initiiert¹²⁹.

IL-1 α ist ein Zytokin mit „dualer Funktion“¹²⁷. Neben oben genannter Rezeptor-abhängiger transmembranöser Wirkung kann pro-IL-1 α , IL-1R1 unabhängig, als pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktor in den Nukleus der Ursprungszelle translozieren¹³⁴ und steht im Verdacht die Zell-Seneszenz (permanenter Stopp des Zellzyklus) zu beeinflussen¹³⁵.

Der Aufenthaltsort des pro-IL-1 α innerhalb der Zelle wird komplex reguliert. Im Zytosol wird es durch den IL-1R2 gebunden und damit gehemmt. IL-1R2 kann wiederum durch die Caspase-1 deaktiviert werden¹³⁶.

Einleitung

Während der physiologischen Apoptose wird IL-1 α in den Nukleus aufgenommen, bindet eng an das Chromatin um keine Inflammation auszulösen¹³⁷. Bei nekrotischem Zelltod, insbesondere bei Hypoxie¹³⁷⁻¹³⁹, kommt es hingegen zu einer Translokation aus dem Nukleus in das Zytosol und passiven Freisetzung in den Extrazellulärraum¹³¹. Dort kann es unter anderem durch Granzym B, aus zytotoxischen T-Zellen oder NK-Zellen, aktiviert werden¹³¹.

Der überwiegende Teil der Literatur zu IL-1 α geht aktuell von einer vorwiegend passiven Inflammation-unabhängigen IL-1 α Ausschüttung aus, während Yazdi *et al.* sowie Groß *et al.* zeigen, dass es bei Inflammation-Aktivierung zur Calpain-abhängigen Ausschüttung von IL-1 α parallel zu IL-1 β kommt. Auf Aktivierung von Calpain durch Calcium Einstrom hin konnte zudem auch eine Inflammation-unabhängige Aktivierung und Sekretion von IL-1 α gezeigt werden^{140,141}.

IL-1 α scheint im Vergleich zu IL-1 β eine geringe Relevanz in der Vermittlung systemisch inflammatorischer Effekte wie der Induktion von Fieber oder der Glukokortikoid-Synthese zu haben^{127,142}.

Für die Ausschüttung relevanter Mengen IL-1 α wird, im Gegensatz zu IL-1 β , nicht notwendigerweise ein Priming über TNF- α oder TLRs und die Aktivierung des Inflammation-somes benötigt. Daher wird IL-1 α als wichtiges DAMP angesehen und ihm wird eine wichtige Rolle bei der Initiierung der neutrophilen Entzündungsreaktion bei steriler Nekrose zugeordnet^{137,143}.

Im Mausmodell konnte bei einer induzierten Inflammationsreaktion am Tag 1 eine hohe IL-1 α Expression bei minimaler IL-1 β Expression gemessen werden. Am Tag 5 hingegen zeigte sich ein gegensätzliche Bild, IL-1 β war deutlich hochreguliert, IL-1 α kaum nachweisbar¹³⁸.

Die Induktion von IL-1 α und IL-1 β über den IL-1R1 Signalweg bedingt einen „inflammatorischen Zyklus“¹²⁹. Membranständiges IL-1 α bindet an den IL-1R1 benachbarter Zellen und führt zur Ausschüttung von sekundären Zytokinen wie das Neutrophilen Chemokin IL-8¹³³.

Einleitung

IL-1 α wurde als Pathogenitätsfaktor in der frühen Atherosklerose¹⁴⁴ und Systemischen Sklerose¹⁴⁵ beschrieben. Genetische Polymorphismen von IL-1 α wurden mit der Entstehung von Morbus Alzheimer^{146,147} und Paradontitis¹⁴⁸ in Verbindung gebracht. IL-1 α defiziente Mäuse wiederum überlebten deutlich kürzer eine *M. tuberculosis* Infektion, da sie keine Granulome bilden konnten¹⁴⁹.

1.3.2.2 IL-1 β

Die Produktion von IL-1 β erfolgt lediglich in Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen sowie Mikroglia-Zellen¹⁵⁰.

IL-1 β wird primär als Vorläufer, dem pro-IL-1 β , auf Stimulus von TLR-Liganden sowie IL-1 α/β selbst translatiert¹⁵¹. Im Gegensatz zu pro-IL-1 α ist pro-IL-1 β inaktiv und nur im Zytosol zu finden. Weniger als 20% werden durch die Caspase eines Inflammasoms (häufig NLRP3) oder Fas-vermittelte Caspase-8 aktiviert^{150,152,153}. Dieser Aktivierungsschritt bestimmt daher die Geschwindigkeit der Produktion von aktivem IL-1 β . Auch Caspase-unabhängige Aktivierungswege für IL-1 β durch extrazellulär vorkommende Proteasen insbesondere aus Neutrophilen^{154,155} sind beschrieben. Diese könnten im Rahmen einer Pyroptose oder Zellschädigung deren Auswirkungen nochmals verstärken.

Bemerkenswert ist, dass die mRNA für pro-IL-1 β bei Stimulus über einen PAMP wie LPS lediglich wenige Stunden, bei autokriner Stimulation (also durch eigene IL-1 β Stimulation) einen Tag im Zytosol nachweisbar erhöht ist¹⁵⁶. Dies könnte partiell die überschießende IL-1 Produktion beim CAPS erklären, da hier der folgende sekundäre Schritt der Aktivierung von IL-1 β unkontrolliert abläuft.

Die Ausschüttung von aktiviertem IL-1 β kann über verschiedene Mechanismen erfolgen. Die Pyroptose¹²⁰ stellt die Endstrecke der inflammatorischen Aktivierung dar, bei welcher große Mengen IL-1 β freigesetzt werden. Zudem wurden auch kontrollierte Sekretionswege¹²⁷ mittels Exozytose sekretorischer Lysosomen, Mikrovesikel, Transporter oder Multivesikel von Exosomen beobachtet. Hierdurch könnte sich die Wirksamkeit in entfernten Geweben trotz

Einleitung

kurzer Plasma-Halbwertszeit erhöhen¹⁵². Die Art der Sekretion hängt dabei vom Signal sowie der Stärke der inflammatorischen Reize ab¹⁵².

IL-1 β zirkuliert hormonähnlich im Blut¹⁵⁷ und wirkt in nahezu alle Gewebetypen und Zellen¹⁵⁷ über den IL-1R1 Rezeptor. IL-1 β induziert die COX-2, Phospholipase A₂ (PLA₂) und iNOS, deren Produkte hochwirksame proinflammatorische lokale Zytokine darstellen¹⁵⁷. Über das Produkt PGE₂ der COX-Enzyme erfolgt im Gehirn die Induktion von Fieber¹⁵⁸ auch nach lokaler Entzündungsreaktion¹⁴².

IL-1 β induziert zahlreiche Zytokine und Faktoren¹⁵⁷ wie beispielsweise IL-6¹⁵⁹, IL-2, TGF- β , GM-CSF und nimmt damit eine zentrale Rolle in der Regulation des Immunsystems ein.

IL-1 β gilt als potenter Stimulator der myeloiden Zellreihe^{160,161}. IL-1 β beziehungsweise der IL-1R1 gelten als essentiell für die T_H17 Differenzierung¹⁶². Diese Zellen vermitteln über IL-17 und G-CSF eine Neutrophilen Proliferation, womit primär die Bekämpfung extrazellulärer Erreger erreicht wird¹⁶³. T_H17-Zellen werden jedoch auch mit zahlreichen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht¹⁶³.

IL-1 β wird eine wichtige Rolle beim Tumorwachstum¹⁶⁴ beispielsweise durch seine angiogenetische Funktion¹⁶⁵ sowie bei der Metastasierung durch die Induktion von MDSCs und regulatorischen T-Zellen (Treg) zugeschrieben¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Im Gegensatz dazu triggert IL-1 α im Tumormodell eine Entzündungsreaktion¹⁶⁹. IL-1 β ist ein Treiber der Einwanderung von Immunzellen in entzündetes Gewebe und damit auch für das Tissue remodeling beispielsweise nach einem Myokardinfarkt¹⁷⁰ verantwortlich.

IL-1 β stimuliert, CRH (*corticotropin-releasing hormone*) unabhängig, die hypothalamisch-adrenokortikale Achse¹⁷¹, wobei Corticosteroide eine negative Rückkopplung auf die IL-1 β Produktion ausüben¹⁷².

1.3.3 IL-18

IL-18 wird vornehmlich von mesenchymalen Zellen¹⁷³ - neben hämatopoetischen Zellen auch Kupffer-Zellen - sowie intestinalen und endothelialen Epithelzellen gebildet¹⁷⁴.

Ähnlich wie IL-1 β wird IL-18 als Vorläufer-Form ohne Signalpeptid produziert, im Zytosol gespeichert und durch die Caspase-1 aktiviert¹⁷⁵. Neben NLRP3 setzen auch weitere Inflammasome wie NLRP1 IL-18 frei¹⁷⁶. Auch Enzyme wie die Fas-vermittelte Caspase-8 oder Proteinase 3 können IL-18 aktivieren¹⁷⁴.

Der IL-18 Rezeptor IL-1R5 gehört zur IL-1R Familie mit pro-inflammatorischer Wirkung und vermittelt Signale über eine TIR Domäne auf den intrazellulären Messenger MyD88 sowie über Zwischenschritte auf die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*)¹⁷⁴.

Die Wirkung von IL-18 wird durch ein hochaffines *binding* Protein (IL-18BP), welches durch IFN- γ stimuliert wird, und das strukturell ähnliche IL-37 gehemmt¹⁷⁴.

IL-18 hat ebenso wie IL-1 β pleiotrope Effekte, welche durch das vorherrschende Milieu determiniert werden. In Kombination mit IL-12 kommt IL-18 eine wichtige Rolle in der Induktion der IFN- γ Produktion in T_h1 Zellen sowie der Aktivität von NK-Zellen und Zytotoxizität von T_h1 Zellen zu¹⁷⁷. Dies ist entscheidend für die Abwehr mikrobieller und viraler intrazellulärer Erreger¹⁷⁸, bedingt jedoch auch die Beteiligung von IL-18 an zahlreichen Autoimmunerkrankungen, Makrophagen-Aktivierungssyndrom und Colitis ulcerosa¹⁷³. Letztere wird unter anderem durch eine IL-18 vermittelt erniedrigte Barrierefunktion der intestinalen Zellen bedingt¹⁷⁹.

Im murinen CAPS-Modell konnte gezeigt werden, dass IL-18 neben IL-1 β eine wichtige Rolle in der Ausbildung der phänotypischen Symptome, insbesondere bei früher Manifestation spielt¹⁸⁰.

Bei Tumorerkrankungen wurden anti-tumoröse Effekte durch IL-18, vorwiegend durch die Induktion von IFN- γ , beobachtet¹⁸¹.

Zahlreiche Studien zeigen jedoch auch einen cancerogenen Effekt von IL-18 bei Krebserkrankungen auf. Beim Multiplen Myelom und weiteren Malignomen konnte eine signifikante Korrelation der IL-18 Konzentration mit der Induktion von MDSCs und damit einhergehende lokale Immunsuppression im Knochenmark beobachtet werden^{182,183}.

In murinen Modellen zu post-ischämischen Schäden von Leber und Niere wurde IL-18 als wichtige Ursache ausgemacht^{184,185}. Durch Hypoxie induziertes IL-18 fördert die Expression von HIF-1 α (*Hypoxia inducible Factor-1 α*).

Außergewöhnlich ist die protektive Wirkung von durch NLRP1 freigesetztem IL-18 gegen Fettleibigkeit und das metabolische Syndrom, während IL-1 β nach Aktivierung durch das NLRP3-Inflammasom diese fördert¹⁷⁶.

1.3.4 IL-33

IL-33 wird von zahlreichen Stroma-/parenchymatösen Zellen und ähnlich wie IL-1 α in endo-/epithelialen Zellen konstitutionell in größeren Mengen produziert^{173,186}. Bis 2016 war die gängige Ansicht der Literatur (wie im Weiteren aufgeführt), dass IL-33 ähnlich wie IL-1 α als Zytokin mit dualer Funktion (als direkter Transkriptionsfaktor sowie Rezeptor-vermitteltes Zytokin) agiert.

Es wird als lange (270 Aminosäuren), aktive Form translatiert und anschließend in den Nukleus aufgenommen, wo es an Heterochromatin bindet und die Transkription regulieren soll^{187,188}. Im Gegensatz zu IL-1 α führe es aber nicht zu einer Induktion, sondern zu einer Unterdrückung der eigenen Transkription¹⁸⁹ sowie der von NF- κ B abhängigen inflammatorischen Produkte wie TNF- α ¹⁸⁸.

2016 publizierten Gautier *et al.*¹⁹⁰ Ergebnisse welche den bis zu diesem Zeitpunkt geltenden Stand der Wissenschaft widersprachen. Sie konnten mittels Blockade der intrazellulären IL-33 Translation durch eine siRNA (*small interfering RNA*, Deutsch „kleiner eingreifender RNA“) zeigen, dass intranukleäres IL-33 keine transkriptionelle Funktion ausübt.¹⁹⁰ Es wurde postuliert, dass die Migration in

Einleitung

den Nukleus eine embryologisch gut konservierte Schutzfunktion vor einer überschießenden Immunantwort auf extrazellulär ausgeschüttetes IL-33 darstellt¹⁹⁰.

IL-33 wird, im Gegensatz zu IL-1 β und IL-18, durch die Caspase-1 inaktiviert¹⁸⁶. Die pro-inflammatorische Wirkung von IL-33 während der Apoptose kann durch Inaktivierung mittels der apoptogenen Caspasen 3 und 7 verhindert werden¹⁹¹. Die Ausschüttung erfolgt als endogenes Alarmin insbesondere bei Zelltod von endothelialen Zellen sowie bei Nekrose, worin sich eine weitere Gemeinsamkeit mit IL-1 α findet^{186,187}.

Die Überführung in bis zu 30-fach aktivere, reiferen Formen (IL-33₉₅₋₂₇₀, IL-33₁₀₇₋₂₇₀, IL-33₁₀₉₋₂₇₀) erfolgt im extrazellulären Raum durch Enzyme wie Calpain, Chymase und Elastase aus Neutrophilen oder Mastzellen¹⁹²⁻¹⁹⁴.

Als Rezeptor für IL-33 fungiert die membrangebundene ST2L-Domäne (1989 entdeckt¹⁹⁵ und initial „*suppression of tumorigenicity 2*“ genannt). In Zusammenspiel mit dem *IL-1 Rezeptor accessory protein* (IL-1RAcP) vermittelt der Rezeptor unter anderem über MyD88, IRAKs, TRAF6 (*Tumor necrosis factor receptor-associated factor*) intrazellulär^{173,196,197}. Im Gegensatz zum nukleären IL-33 (siehe oben) fördert rezeptorgebundenes IL-33 die NF- κ B abhängige Transkription proinflammatorischer Faktoren¹⁹⁰. Außerdem werden in T_H2 Zellen typische T_H2 Faktoren wie IL-5, IL-9, IL-13 gebildet¹⁹⁶.

Als Gegenstück kann der gelöste sST2-Rezeptor IL-33 binden und damit dessen Wirkung am oben genannten membrangebundenen Rezeptor unterbinden¹⁹⁸.

IL-33 bedingt zuvorderst eine T_H2 Immunreaktion und stimuliert Mastzellen, Basophile, Eosinophile und Makrophagen aber auch NK-Zellen^{173,199}. Studien zeigen im Maus-Modell einen hemmenden Effekt von IL-33 auf die Aktivität des NLRP3 Inflammasoms sowie konsekutiv der IL-1 β Ausschüttung²⁰⁰.

IL-33 wird mit zahlreichen Erkrankungen des atopisch/allergischen Formenkreises in Verbindung gebracht¹⁹⁹.

Neuerdings wurden auch Th1 stimulatorische Effekte von IL-33 beschrieben²⁰¹. IL-33 kann das Tumorumfeld sowohl Tumor-fördernd, beispielsweise durch Induktion von MDSCs über autokrine GM-CSF-Ausschüttung sowie der Aktivierung ihrer suppressiven Funktion²⁰², als auch Tumor-hemmend^{203,204}, beispielsweise durch Hemmung von PMN-MDSCs²⁰⁵ oder Förderung der CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen²⁰⁶, beeinflussen¹⁹⁴.

Praktische klinische Bedeutung besitzt die IL-33 Achse aktuell vor allem durch seinen ST2-Rezeptor, dessen Serum-Konzentration zur Risikostratifizierung bei Herzinsuffizienz-Patienten herangezogen werden kann²⁰⁷.

1.4 Cryoporin-assoziierte periodische Syndrome (CAPS)

Die Cryoporin-assoziierten periodischen Syndrome stellen eine Gruppe von Erkrankungen aus dem Formenkreis der hereditären autoinflammatorischen Syndrome dar, welche den gleichen Pathomechanismus bei unterschiedlich ausgeprägter Klinik teilen²⁰⁸.

Es wird zwischen dem mild ausgeprägten familiär assoziierten Kältesyndrom (*familial cold autoinflammatory syndrome (FCAS)*), dem Muckle-Wells Syndrom (MWS) sowie dem früh manifesten und schwer ausgeprägten chronisch infantilen neurologisch-kutan-artikulären Syndrom (*chronic infantile neurological cutaneous and articular (CINCA)* bzw. *neonatal onset multisystem inflammatory disease (NOMID)*) unterschieden. Hierbei können keine distinkten Abgrenzungen getroffen werden, da sich viele Symptome überschneiden und lediglich in ihrer Ausprägung unterscheiden²⁰⁹. Allen gemeinsam ist der flüchtige, makulopapulös, Urtikaria-ähnliche Hautauschlag, welcher sich bereits früh im Neonatal- oder Säuglingsalter manifestiert²¹⁰. Als Abgrenzung zur Urtikaria wird selten über Jucken berichtet, Antihistaminika wirken nicht, histologisch finden sich granulozytäre statt lymphozytär/eosinophile Infiltrate²¹⁰. Weitere Symptome sind Kopfschmerz, Arthralgie/Myalgie und Abgeschlagenheit sowie Konjunktivitis/Keratitis²⁰⁹.

Während beim FCAS der Hauptauslöser für die kurzen Schübe von unter einem Tag Dauer eine niederschwellige Kälteexposition zum Beispiel in klimatisierten

Räumen ist, werden beim MWS zahlreiche weitere Trigger wie Stress und Anstrengung beschrieben²¹⁰. Die Schübe beim MWS sind ausgeprägter und dauern dabei circa ein bis drei Tage an. Beim CINCA kommt es bereits neonatal oder frühinfantil zu einer ausgeprägten Symptomatik mit Ausschlag, teils destruierender Arthritis, sowie einer aseptischen Meningitis, welche neben Kopfschmerzen, mentaler Retardierung sogar durch Hirndruck zu einem Papillenödem mit Gefahr der Erblindung oder Auslösung epileptischer Anfälle führen kann²¹⁰.

Mit zunehmender Häufigkeit der Schübe und Krankheitsaktivität kann es zu Langzeitschäden kommen. So werden beim MWS Nierenversagen als Folge einer AA-Amyloidose sowie charakteristisch ein pathogenetisch nicht vollständig verstandener Hochtton-Hörverlust beobachtet^{209,211}.

Ursächlich für die CAPS sind autosomal dominante Mutationen im NLRP3 Gen (auch CIAS1-Gen genannt²¹²), welches für den gleichnamigen Nod-like Rezeptor codiert (siehe Kapitel Inflammasom)²⁰⁹. Es sind bereits circa 100 Mutationen bekannt, welche sich hauptsächlich in der NOD Domäne finden. Diese Veränderungen führen zu einer Überaktivität des NLRP3 Inflammasoms indem dieses ohne Einfluss eines 2. Signals wie eines DAMPs in aktiver Form vorliegt. Die Folge ist die Formierung des Inflammasoms ohne Vorliegen eines adäquaten Stimulus mit konsekutiv übermäßiger IL-1 β ²¹³ und vermutlich auch IL-18 Reifung.

1.4.1 Muckle-Wells Syndrom (MWS)

Auf das MWS soll explizit eingegangen werden, da das Universitätsklinikum Tübingen auf Grund einer endemisch erhöhten Inzidenz im Einzugsgebiet eine hohe Patientenzahl aufweist. In diesem Kollektiv haben wir wie in 1.5 erläutert eine erhöhte MDSC Frequenz im peripheren Blut nachweisen können²¹⁴.

Wie bereits aufgeführt, kommt es beim MWS zu plötzlich beginnenden Episoden - auf vielfältige, oft unklar bleibende Trigger²¹⁰- mit Hautausschlag, Fieber, muskuloskelettalen Beschwerden und Konjunktivitis von einem Tag bis zwei Wochen Dauer²¹⁵. Die Beschwerden manifestieren sich meist in der frühen

Kindheit oder Adoleszenz²¹⁰. Als pathognomisch gelten die Kombination aus Konjunktivitis und zunehmendem Hörverlust²¹¹, welcher bei circa 70% der Patienten auftritt²¹⁰. Der Hörverlust gilt als Risikofaktor für einen schwerwiegenden Verlauf²¹⁵.

1.5 Fragestellung der Dissertation

Unsere Arbeitsgruppe konnte in Vorarbeiten bereits ein vermehrtes Auftreten von PMN-MDSCs bei Patienten mit MWS, einer autoinflammatorischen Erkrankung, im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisen^{9,214}. Diese Beobachtung ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass sich die Patienten, zum Zeitpunkt der Blutentnahme, unter einer klinisch und laborchemisch effektiven antiinflammatorischen spezifischen IL-1 β Blockade mit dem Antikörper Canakinumab befanden.

In der vorliegenden Dissertation sollte nun die Frage geklärt werden, ob PBMCs von Patienten mit MWS *in vitro* eine vermehrte IL-1 β Sekretion und verstärkte Induktion von PMN-MDSCs zeigen.

Durch die vermehrte Aktivität des Inflammasoms sind auch erhöhte Sekretionen anderer pro-inflammatorischer Zytokine zu erwarten. Daher sollte *in vitro* der induktive Einfluss anderer Zytokine der IL-1 Familie (IL-1 α , IL18, IL-33) mit dem von IL-1 β auf PMN-MDSCs verglichen werden. Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, wie stark die suppressive Kapazität der induzierten PMN-MDSCs ist.

Ziel dieser Arbeit ist insgesamt, ein besseres Verständnis für die Funktionsweise beziehungsweise Induktionswege von PMN-MDSCs zu schaffen und Hinweise auf ihre Rolle im Rahmen autoinflammatorischer Erkrankungen zu geben. Langfristig könnte somit die Grundlage für gezielte therapeutische Manipulationen im Bereich der PMN-MDSCs gelegt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Art	Modell/Typ	Hersteller
Blutabnahme	Safety-Multify-Set	Sarstedt
	Inject Spritzen 10ml/20ml	Braun
	Inject F solo 1ml	Braun
	Membran-Adapter	Sarstedt
	Microlance 3	BD
	S-Monovette EDTA KE/9ml	Sarstedt
	Sterican 0,90x40mm	Braun
ELISA Kit	IL-1 β ELISA Kit - Cat.N. DY201	R&D Systems
Eppendorf GefäÙe	Reaction Tube 1,5ml, PP, granulated, attached cap, natural	Greiner bio-one
MACS	MACS Separation Columns LD Column	Miltenyi Biotec
Parafilm	Parafilm "M" Laboratory Film	Bemis
Pasteur-Pipette	2,5ml	Ratiolab
Pipettenspitzen	Spitzen, 10 μ l, farblos	Biozym Scientific GmbH
	ultratyp 1ml	Greiner bio-one
	Pipettenspitze 200 μ l, gelb	Sarstedt
Röhrchen	50ml	Greiner bio-one
	15ml	Greiner bio-one
	FACS Round-Bottom Tubes 5ml Polystyrene, 12x75mm Non-Sterile	BD
Stabpipetten	5/10/25ml Stripette	Corning / Costar
Transferpipette	Transferpipette 3,5ml steril	Sarstedt

Material und Methoden

Transwell Einsatz	ThinCerts-TC Einsatz, 24-Well, Porengröße 0,4µm, transparent	Greiner bio-one
Zellkulturflaschen	Costar 175/75 cm ²	Corning
Zellkulturplatten	Costar 12-Well Platte	Corning
	Costar 24-Well Platte	Corning
	96-Well Platte	Greiner bio-one

2.1.2 Reagenzien

Tabelle 2: Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Trivialname
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG	Biocoll
Detachin	Genlantis	<i>Cell Detachment Solution</i>
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
FCS	PAA Laboratories	<i>Fetal calf serum</i> fetales Kälberserum
GM-CSF	Genzyme	<i>Leukine sargramostim</i> Granulozyten- Makrophagen-Kolonie- stimulierender Faktor
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm	Natrium-Heparin
HMGB1	Genway Biotech	<i>High-Mobility-Group-Protein</i>
IL-18	MBL Medical & Biological Laboratories Co., LTD.	
IL-1 β	PeptoTech, Inc	
IL-1 α	Pepto-Tech, Inc	
IL-2	R&D Systems	
IL-33	Genway Biotech	
IL-6	Sigma	HumanKine
L-Glutamin	Sigma Aldrich	
LPS	Sigma Aldrich	Lipopolysaccharid

Material und Methoden

OKT3	Janssen-Cilag	Muromonab-CD3
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH	
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG	RPMI
Trypanblau	Sigma-Aldrich	
Rabbit Serum		

Tabelle 3: FACS-Antikörper / Färbereagenzien

FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*)

Bezeichnung	Hersteller
Anti-CD14 FITC (MΦP-9)	Becton Dickinson
Anti-HLA-DR PerCP	BD Biosciences
Anti-Human CD184 (CXCR4) APC	eBioscience
APC anti-human CD8a	BioLegend
CD33-PE	Miltenyi Biotec
CFSE	Invitrogen
PE anti-human CD4	BioLegend
Propidium Iodide Staining Solution	BD Pharmingen

Tabelle 4: MACS Materialien

MACS (*Magnetic-activated cell sorting*)

Bezeichnung	Hersteller
anti-CD33-MicroBeads	Miltenyi Biotec
autoMACS Rinsing Solution	Miltenyi Biotec
MACS-BSA Stock Solution	Miltenyi Biotec
MACS-Säule	Miltenyi Biotec

Material und Methoden

2.1.3 Eigene Ansätze:

Tabelle 5: Zellkulturmedium ³⁷

Medium	Anteil
RPMI	88%
Fetales Kälber Serum (FCS)	10%
Penicillin-Streptomycin	1%
L-Glutamin	1%

Tabelle 6: CFSE-Medium

CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*)

Medium	Anteil
RPMI	88%
Humanes Plasma des jeweiligen Spenders der Target-Zellen	10%
Penicillin-Streptomycin 10.000U/ml / 10.000 µg/ml	1%
L-Glutamin 200mM	1%

Tabelle 7: MACS Pufferlösung

Medium	Anteil
autoMACS Rinsing solution	90 %
MACS-BSA	10%

Tabelle 8: FACS-Antikörper Mix für Zellkultur

Bezeichnung	µl pro Tube
CD14-FITC (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)	2,5
CD33-PE (<i>Phycoerythrin</i>)	1
HLA-DR-PerCP (<i>Peridinin Chlorophyll Protein Complex</i>)	2,5
CXCR-4-APC (<i>Allophycocyanin</i>)	1
Rabbit Serum	0,2
Insgesamt	7,2

Material und Methoden

2.1.4 Geräte

Tabelle 9: Geräte

Typ	Modell	Hersteller
Elektrische Pipettierhilfen	Easypet	Eppendorf
	SwiftPET	Abimed
Feinwaage	BP121S	Sartorius
Gefrierschrank	Froster Labex-95	Kirsch
Kühl-Gefrier-Kombi		Liebherr
		Liebherr
	HC-698WEN	Gorenje
Kühlschrank	FKU 1800 Index 11 / 001	Liebherr
Mikroskop	IX 50	Olympus
Mixer (Vortex)	Vortex Mixer 7-2020	NeoLab
	REAX Top	Heidolph
	VF2	Janke & Funkel
Neubauer Kammer	0,1mm Tiefe, 0,0025mm ²	Assistent
Pipetten	Pipetman	Gilson
	Research Series Adjustable Volume Pipette	Eppendorf
Sterilbänke	Herasafe HS 15	Heraeus Instruments
	Herasafe HS 18	Heraeus Instruments
Steriler Wasserspender	MiliQ biocel + Q-Gard 2 + Quantum EX	Millipore
Wasserbad	WB 7	Memmert
Zellkulturschrank	HeraCell	Heraeus Instruments
Zellseparatoren	AutoMACS ProSeparator	Miltenyi Biotech
	MACS Separator	Miltenyi Biotech
Zentrifugen	Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments

Material und Methoden

	Varifuge 3.2RS	Heraeus Instruments
	Rotixa 50 RS	Hettich Zentrifugen
	Centrifuge 5414C	Eppendorf
	Mikro 22 R	Hettich Zentrifugen

2.1.5 Analysegeräte

Tabelle 10: Analysegeräte

Typ	Modell	Hersteller
FACS Messegerät	FACS Calibur	BD
FACS Mess-/Auswerterechner	CellQuest 3.3 auf Macintosh Mac OS 9.2.2	BD, Apple Inc.
	CellQuestPro 4.0.1 auf Macintosh Mac OS 9.1	BD, Apple Inc.
Photometer	Photometer Victor 1420	PerkinElmer; Rodgau, GER
Zellzählgerät	ABX MICROS CRP	ABX Diagnostics
	ABX MICROS CRP 200	ABX Diagnostics

2.2 Methoden

2.2.1 Ethikerklärung

Die Experimente dieser Arbeit wurden unter dem Votum 178/2011B01 der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen durchgeführt.

2.2.2 Gewinnung der Blutproben

2.2.2.1 gesunde Spender

Das Vollblut von gesunden Angehörigen der Universität Tübingen wurde, unter freiwilliger Teilnahme, mittels Safety-Multifly-Set aus der gestauten Cubitalvene abgenommen und in mit 500 µl entsprechend 2500 IE Natrium-Heparin gefüllte und mit Membranadapter verschlossene 10 oder 20 ml Spritzen aufgenommen.

2.2.2.2 Patienten mit Muckle-Wells Syndrom

Analog zur Gewinnung bei gesunden Spendern wurde das Vollblut bei den Patienten mit MWS durch einen Arzt der rheumatologischen Sprechstunde entnommen und anschließend von mir entgegengenommen. Zuvor war die Aufklärung vorgenommen und die Einwilligung des Patienten beziehungsweise der Erziehungsberechtigten zur Verwendung des Blutes zu Forschungszwecken eingeholt worden. In der elektronischen Dokumentation und Auswertung wurde die Identität der Patienten pseudonymisiert verschlüsselt.

2.2.2.3 Buffy Coats

Für große Mengen an PBMCs wurden Buffy Coats genutzt, welche als Nebenprodukt in der Herstellung von Erythrozyten-Konzentraten und Frischplasma durch zentrifugale Auftrennung anfallen. Der Bezug erfolgte über die Blutspendezentrale Tübingen. Die Konserven stammten aus der Blutspendezentrale Ulm. Erhalt und Verarbeitung erfolgten innerhalb von 24 Stunden nach der Spende.

2.2.3 Auftrennung der Blutproben

Das gewonnene Vollblut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Auf Grund der höheren Zellkonzentration in den Buffy Coats wurden diese im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt.

Anschließend erfolgte eine Ficoll-Hypaque-Gradientenzentrifugation. Hierbei wurde das verdünnte Blut auf die vorgelegte Ficoll-Lösung geschichtet und anschließend (30 Minuten bei 400 g, 20 °C) zentrifugiert.²¹⁶

Bei der Zentrifugation bilden sich mehrere Phasen von unterschiedlicher spezifischer Dichte aus. Die oberste Phase enthält das Blutplasma sowie Thrombozyten (relative Dichte 1.025-1.029). Darunter liegt die Ficoll-Phase (relative Dichte 1.077) an deren Übergang zum Plasma sich die Interphase (relative Dichte 1.070), auch „Buffy Coat“ genannt, befindet. In dieser sammeln sich die PBMCs. Als Sediment (relative Dichte 1.087-1.096) setzen sich Erythrozyten und PMNs am Boden des Falcons ab.²¹⁷

2.2.3.1 Gewinnung von Plasma

Wenn benötigt, zum Beispiel bei CFSE-Versuchen, wurde ein Teil des durch Zentrifugation separierten Plasmas entnommen und bis zur Verwendung als Serumanteil bei 4°C in einem Falcon aufbewahrt, anderenfalls wurde es verworfen.

2.2.3.2 Gewinnung von PBMCs

Nach Abnehmen des Plasmas wurde die Interphase möglichst vollständig mit einer sterilen Transferpipette in ein frisches Falcon überführt.

Die entnommenen Zellen wurden zwei Mal mit RPMI Medium (10 Minuten bei 400 g) gewaschen, um Restmengen der Trennlösung auszuwaschen²². Nach dem zweiten Waschvorgang wurde das Pellet aus Zellen in, auf 37 °C vorgewärmtes, Zellkulturmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 5) aufgenommen und die Zellzahl durch ein ABX-Gerät bestimmt.

2.2.4 Zellkultur

Für die Zellkulturen wurden die PBMCs auf eine Konzentration von 500.000 Zellen pro ml Zellkulturmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 5³⁷) verdünnt und in 12-/24-Well-Kulturplatten oder Zellkulturflaschen für insgesamt 6 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Den Proben wurden die in den Abbildungen genannten Stimulantien zugesetzt. Je Ansatz und Donor wurden mindestens zwei Wells ohne Zusätze als Negativkontrollen angesetzt.

Medium und Stimulantien wurden am dritten oder vierten Tag gewechselt. Hierzu wurden die Zellkulturplatten zentrifugiert (10 Minuten bei 400 g, 20 °C) und anschließend 70% des ursprünglich eingebrachten Zellkulturmediums abgenommen. Einige dieser Überstände wurden in Eppendorf-Gefäße überführt und bei -18 °C gelagert um für die Bestimmung der IL-1 β Konzentration mittels ELISA verwendet zu werden. Im Anschluss wurde wieder frisches Zellkulturmedium und gegebenenfalls Stimulans dazugegeben (jeweils 100% der anfangs eingebrachten Menge beziehungsweise Konzentration). Im nächsten

Schritt erfolgte die Resuspension der basal zentrifugierten Zellen und die Rückführung in den Brutschrank.

Nach 6 Tagen wurde die Zellsuspension aus den Wells in Falcons überführt und adhärente Zellen mit Trypsin-freier Detachin-Lösung nach Vorgaben des Herstellers abgelöst.^{22,37}

2.2.5 *Transwell*-Co-Kultur

Um eine Stimulation von PBMCs von gesunden Probanden durch PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom zu untersuchen, wurde eine sogenannte Co-Kultur angewandt. Dabei sind die zwei Proben durch eine zelldichte Membran voneinander getrennt.

Für den Kulturansatz wurden in die Wells (entspricht unteres Kompartiment der Co-Kultur, siehe Abb. 2) einer 24-Well Platte je 480 µl Zellsuspension mit PBMCs gesunder Spender mit einer Konzentration von 500.000 Zellen pro ml gegeben. Dann wurden die *Transwells*²¹⁸ (entspricht im Folgenden dem *Transwell*-Einsatz der Co-Kultur, siehe Abb. 2), welche basal eine Membran mit 0,4 µm Porenweite besitzen, eingehängt. Durch die Poren können keine Zellen migrieren, es kommt jedoch zu passiver Diffusion von ausgeschütteten Mediatoren. In das *Transwell* (entspricht oberes Kompartiment der Co-Kultur, siehe Abb. 2) wurden PBMCs von gesunden Spendern oder Muckle-Wells Syndrom Patienten jeweils in einer Konzentration von 500.000 oder 2 Millionen pro µl gegeben oder Zellkulturmedium als Negativkontrolle, GM-CSF und IL-1β als Positivkontrolle. Der Mediumwechsel erfolgte wie bei den oben aufgeführten Versuchen am dritten oder vierten Tag jeweils separat für das untere und obere Kompartiment. Für die Auswertung mit dem FACS wurde der Inhalt des oberen Kompartiments verworfen, die Zellen des unteren Kompartiments nach dem unter 2.2.4 beschriebenen Vorgehen aus dem Well entnommen und wie unter 2.2.6 beschrieben gefärbt und per Durchflusszytometrie analysiert.

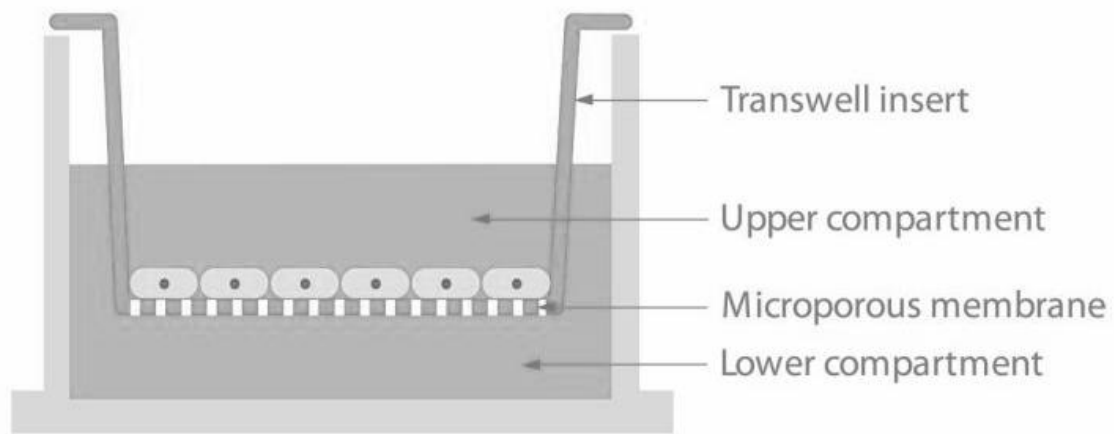


Abb. 2: schematischer Aufbau einer *Transwell*-Co-Kultur

Transwell insert = *Transwell* Einsatz; *Upper compartment* = oberes Kompartiment; *Microporous membrane* = mikroporöse Membran; *Lower compartment* = unteres Kompartiment
Bild von englischsprachiger Website des Herstellers Corning Inc.: „*Transwell*®, *Snapwell*™, *Netwell*®, and *Falcon*® Permeable Supports“; Zugriff 1. Mai 2023 ²¹⁸

2.2.6 Nachweis von MDSCs mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem physikalische Eigenschaften einzelner Zellen quantitativ gemessen werden. In den Versuchen wurde die Fluoreszenz-basierte Durchflusszytometrie verwendet.

Hierbei wird die Zellsuspension durch Überdruck im Probenröhrchen in eine Mikroküvette gedrückt. Der Probenstrom wird durch einen Hüllstrom gebündelt und verdünnt, sodass der Abstand zwischen den Zellen vergrößert wird. Hierdurch können die Zellen einzeln erfasst und gemessen werden.

In der Messkammer treffen Laserstrahlen auf die passierenden Zellen. Zwei Detektoren messen standardmäßig die Lichtbeugung und -streuung durch die Zellen. Der „Forward Scatter“ FSC-Detektor, in der Achse des Lichtes, erfasst die an der Zelloberfläche entstandene Lichtbeugung, welche mit dem Zellvolumen korreliert. Der „Side Scatter“ SSC- Detektor ist orthogonal zur Lichtachse angeordnet und misst die Lichtstreuung, welche an den Membranen oder Vesikeln innerhalb der Zelle entsteht. Diese ist ein Maß für die strukturelle Komplexität der Zellen, die sogenannte Granularität.

Durch Laserlicht angeregte Farbstoffmoleküle, die Fluorochrome, emittieren Licht einer bestimmten Spektralfarbe. Fluorochrome werden meist an

Material und Methoden

monoklonale Antikörper gekoppelt, welche an Oberflächenantigene binden. Manche Fluorochrome können aber auch den Intrazellulärraum anfärben (beispielsweise CFSE, PI). Die Intensität des emittierten Lichts korreliert mit der Konzentration des Fluorochroms und damit beispielsweise mit der Menge an gefärbtem Ziel-Antigen auf der gemessenen Zelle²¹⁹. Somit kann die kumulative Intensität der fluoreszierten Emissionen einzelner Zellen durch Detektoren bestimmt werden. Um selektiv eine Wellenlänge zu detektieren werden Farbfilter verwendet. Der verwendete FACS-Calibur besitzt 2 Anregungslaser (488 nm, 635 nm) und 4 Farbdetektoren²²⁰.

Tabelle 11: Messkanäle des FACS-Calibur²²⁰ und verwendete Antikörper
Tabelle 11 zeigt die Nutzung der vier Kanäle zum Nachweis/zur Messung der Färbung von Oberflächenstrukturen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper sowie nicht Antikörper gebundener intrazellulärer Färbungen (CFSE und PI).

In dieser Arbeit wurde die 2010 von Lechner *et al.*³⁷ etablierte, Methode^{15,22} zur *in vitro* Stimulation von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cell*) und Isolation von PMN-MDSCs anhand positiver CD33 und negativer CD14 Expression angewandt.

Tabelle 11: Messkanäle des FACS-Calibur²²⁰ und verwendete Antikörper

Kanal	Filter (nm)	Fluorochrom	Antikörper
FL 1	530	FITC und CFSE	Anti-CD14
FL 2	585	PE und PI	Anti-CD33
FL 3	661	APC	Anti-CXCR4
FL 4	>670	PerCP	Anti-HLA-DR

Nach 6-tägiger Inkubation und Entnahme aus dem Kulturgefäß (siehe 2.2.4) wurde die Zellsuspension mit PBS gewaschen und zentrifugiert (10 Minuten bei 400 g). Das Pellet wurde in 1ml PBS aufgenommen und die Zellkonzentration unter Färbung mit Trypanblau in der Neubauerkammer ausgezählt. Eine Excel-Tabelle mit selbst programmiertem Makro mit Speicherfunktion berechnete Zellkonzentration und Gesamtmenge sowie das zu entnehmendes Volumen für 400.000 Zellen. Bei unzureichender Gesamtzahl an Zellen wurde die gesamte

Material und Methoden

Menge an Zellen eingesetzt. Das Volumen wurde mit 3 ml PBS versetzt, zentrifugiert (10 min bei 300 g, 20 °C) und der Überstand abgekippt. Auffüllen der abgekippten FACS-Röhrchen mit PBS auf 200 µl anhand entsprechender Einkerbung der Röhrchen. Nach guter Resuspendierung, Übertragen von 100µl in das Röhrchen mit 7,2 µl vorgelegtem Antikörper-Mix (Zusammensetzung nach Tabelle 8) und gutes Mischen. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden beide Röhrchen mit 3ml PBS (10 Minuten bei 300 g, 20 °C) gewaschen und zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Die Röhrchen wurden bis zur Analyse lichtgeschützt auf Eis gelagert und kurz vor der Messung mit einem Vortex-Mischer in Suspension gebracht.

Die FACS-Messungen (inklusive der unter 2.2.8 aufgeführten Messungen) wurden an einem FACS Calibur-Gerät mit BD CellQuest Software durchgeführt.

2.2.7 Magnetic activated cell sorting (MACS)

MACS ist ein Verfahren zur Sortierung großer Zellmengen aus einem in Suspensionen befindlichen Zellgemisch anhand von Oberflächenmarkern. Hierfür werden die Zellen mit Oberflächen-Antigen spezifischen Antikörpern markiert, an welche ein superparamagnetisches Nano-Partikel ($\varnothing \ll 0,5\mu\text{m}$) gebunden ist. Diese sogenannten MicroBeads haben sehr vorteilhafte Eigenschaften: Sie binden schnell an die Zellen, die optische Eigenschaften der Zellen bleiben unverändert und es kommt nicht zur Aggregation der Zellen. Fließt eine durch MicroBeads behandelte Zellsuspension an ferromagnetischen, durch einen Permanentmagneten angeregten Oberflächen entlang, werden die MicroBeads und damit die markierten Zellen magnetisch gebunden. Unmarkierte Zellen fließen ungestört vorbei und können aufgefangen werden. Anschließend können die markierten Zellen nach Entfernen des Permanentmagneten problemlos ausgespült werden. Beide Populationen können weiterverwendet werden.²²¹ In unseren Versuchen wurden anti-CD33-MicroBeads verwendet.

Nach Auszählen der kultivierten Zellen wurde jeweils das Volumen mit maximal 10 Millionen Zellen zentrifugiert (10 Minuten bei 400g, 20°C), der Überstand abgenommen und die Zellen in 80µl gekühltem MACS-Puffer resuspendiert. Es

wurden 20 µl CD33-MicroBeads hinzugegeben, 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen (10 Minuten bei 300g, 4°C), in 500µl gekühltem MACS-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Die Proben wurden entsprechend der Herstellervorgaben im Auto-MACS-Gerät mit den Einstellungen "Posseld2" und "QRinse" über 2 Säulen sortiert. Die resultierende CD33-positive Fraktion wurde (analog zu 2.2.6) ausgezählt und in CFSE-Kulturmedium auf eine Zellzahl von 500.000 Zellen pro ml eingestellt.

2.2.8 CFSE Proliferationsassay

Der CFSE Proliferationsassay ist eine Methode zur quantitativen Bestimmung abgelaufener Mitosen einer analysierten Zelle nach deren Färbung. Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) ist ein fluoreszierendes Färbereagens welches membrangängig ist und kovalent an intrazelluläre Proteine bindet. Bei jeder mitotischen Teilung kommt es zu einer hälftigen Verteilung des CFSE auf die beiden Tochterzellen.²²²

In diesem Versuch soll die supprimierende Wirkung der kultivierten und MACS-sortierten CD33⁺ Zellen auf die T-Lymphozyten-Proliferation nachgewiesen werden.

Im Vergleich zum in 2.2.3 und 2.2.4 beschriebenen Vorgehen, wurde zum verlässlichen Erhalt von 40.000 MACS-sortierten CD33⁺ Zellen, eine große Menge an Ausgangs-PBMCs benötigt. Diese wurden aus Buffy coat oder einer Vollblutspende gewonnen. Die Kultivierung erfolgte in 75 / 175 cm² Zellkulturflaschen gefüllt mit 25 / 50 ml Zellkultursuspension.

Nach circa 4-tägiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen aus dem Well in ein FACS-Röhrchen transferiert und mit PBS gewaschen (10 Minuten bei 450 g). Die Zellen wurden mit anti-CD4-PE sowie anti-CD8-APC FACS Antikörpern gefärbt. Nach 10 Minuten lichtgeschützter Inkubation wurde erneut gewaschen (10 Minuten bei 300 g). 2 Minuten vor Messung im FACS-Gerät wurde Propidium Iodid hinzugegeben, welches nur in nekrotisierenden Zellen zum Kern penetrieren und daher die DNA interkalieren und anfärben kann.²²³ Zur

Material und Methoden

Analyse der CFSE-Intensität wurden lediglich PI negative Zellen ausgewählt (per Gating während Auswertung) und nach CD4 und CD8 Positivität unterschieden.²²

Als Target-Zellen wurden PBMC aus frischem peripherem Blut eines gesunden Spenders isoliert und mittels ABX-Gerät gezählt. Je nach Anzahl der Zellen wurde CFSE-Färbereagenz (1µl CFSE in 5,625 ml PBS) zugegeben und dies für 10 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Färbereaktion wurde mit FCS gestoppt und nach zwei Minuten überschüssiges CFSE durch einen Waschschrift entfernt (Zugabe von 6ml RPMI, Zentrifugation für 5 Minuten bei 350 g, Abnehmen des Überstandes und Auflösen in 2 ml Donor spezifischem Zellkulturmedium siehe im Folgenden). Die Zellkonzentration wurde erneut bestimmt, auf 500.000 Zellen pro ml CFSE-Zellkulturmedium (siehe Tabelle 6) eingestellt und mit 100 U/ml IL-2 und 1 µg/ml OKT3 stimuliert. Als Plasma-Anteil des Zellkulturmediums diente, bei der Isolation der Target-PBMCs gewonnenes (siehe 2.2.3.1), humanes Plasma. Die Suspension wurde je Ansatz paarweise mit je 60.000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte gegeben.

Je Paar wurden 30.000 und 10.000 MACS-sortierte CD33⁺ Zellen hinzugefügt. Diese Zellen waren, wie im unter 2.2.3 und 2.2.4 beschriebenen Vorgehen, stimuliert oder als Negativkontrolle ohne Stimulanz kultiviert worden. Als Negativkontrolle der ungehinderten T-Zell-Proliferation ohne Zusatz von Zellen wurde in 4 Wells keine Zellen zugegeben.

2.2.9 ELISA

Der quantitative Nachweis von IL-1β aus den Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA (IL1-β-ELISA Duo Set von R&D) nach Vorgaben des Herstellers.

Hierbei handelt es sich um ein Antikörper-Sandwich Verfahren. Der Analyt spezifische Capture-Antikörper wurde über Nacht in der 96-Well Platte inkubiert. Der nun an die Wand des Wells gebundene Antikörper bindet das nachzuweisende Analyt.

Material und Methoden

100 µl der Zellkulturüberstände, welche beim Mediumwechsel von Stimulationsversuchen entnommen wurden (vgl. 2.2.4), oder eine Standard-Lösung des Sets zur Qualitätskontrolle wurden für 2 Stunden in den Wells inkubiert. Nach Auswaschen des Zellkulturüberstandes wird ein biotinylierter spezifischer Detection-Antikörper inkubiert. Dieser bindet an ein, vom oben genannten Capture-Antikörper abweichenden, Epitop des Analysates. Nach Auswaschen der überschüssigen Antikörper wird Streptavidin-HRP zugegeben. Dabei interagiert Streptavidin mit Biotin und HRP wandelt ein weiteres Substrat (TMP) in einen blauen Farbstoff um. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Säure gestoppt, wobei es zu einem Farbumschlag zu Gelb kommt. Die Farbintensität, welche mit der Menge des nachzuweisenden Analysates in der eingebrachten Probe korreliert, wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm, Wellenlängenkorrektur 570 nm, gemessen.

Jede Probe wurde sowohl pur und zur Erweiterung des Messbereiches 1:10 verdünnt untersucht. Hiervon wurden jeweils zwei Proben analysiert und die Messwerte anschließend gemittelt.

2.2.10 Statistische Auswertung

Die FACS-Rohdaten wurden mit der CellQuest Pro 4.0.1 Software von BD Biosciences ausgewertet. Die Stimulationsversuche wurden mittels der Funktion „Batch“ in eine CSV-Datei exportiert.

Bei einzelnen CFSE Versuchen wurde alternativ Flowjo von Flowjo LLC zur Auswertung der FACS Rohdaten verwendet.

Die in der CSV-Datei zweidimensional vorliegenden Datensätze wurden durch ein selbst programmiertes Excel-Makro in eindimensionale Tabellenzeilen konvertiert. Jede Zeile repräsentiert das FACS-Messergebnis eines Ansatzes (z.B. von IL-1 β mit 0,1 µg/ml), wobei die einzelnen Spalten die jeweiligen separaten Messwerte oder Beschreibungen des Ansatzes beinhalteten. Die Datenformate lagen im CSV Format teils als Text und mit falschem Dezimaltrennzeichen vor sodass dieses durch das Makro von Text in Zahlen korrigiert wurden. Das Makro fasste verschiedene Ausschlusskriterien, welche generell (siehe Tabelle 12) sowie manuell (z.B. bei Fehlern oder im

Material und Methoden

Versuchsablauf gravierenden Abweichungen) festgelegt werden konnten, in einer Spalte zusammen. Die in Tabelle 12 aufgeführten Mindestwerte für den Einschluss einer Messung in die Auswertung sollten eine Mindestgenauigkeit der Statistik für 0,1% im Bereich des Anteils der myeloischen Zellen an den gesamten Zellen (unten als R1 aufgeführt) sowie 1% innerhalb der möglichen MDSC Population garantieren.

Das Makro erkannte die Proben der Negativkontrollen eines Versuches und berechnete den Mittelwert jedes einzelnen Messwertes dieser Negativkontroll-Ansätze. Durch zusätzliche Rechenschritte wurden die unten aufgeführten Induktionsfaktoren von Einzelmessungen (Negativkontrollen und Stimulationsansätze) ins Verhältnis zum Mittelwert der Negativkontrollen gesetzt. Das Makro ermöglicht die Abarbeitung mehrerer, hintereinander ablaufender, Rechenoperationen. Hierdurch wurde es beispielsweise möglich, die Messungen der Gates R2 (CD33⁺CD14⁻) und R4 (CD33⁺CD14⁺) zu einer Population (CD33⁺CD14^{+/-}) zusammenzufassen (siehe unten).

Die Datenzusammenstellung erfolgte aus der Excel-Tabelle mittels Excel PivotTables.

Die Werte aus Excel PivotTables wurden zur Erstellung der Abbildungen in GraphPad Prism 9 für MacOS von GraphPad Software Inc oder JMP 16 von SAS Institute Inc exportiert.

Die statistische Auswertung erfolgte, ohne Annahme Gauß-Verteilung, wie in den Abbildungen angegeben mittels Mann-Whitney-Test.

In Graphpad Prism wurde ein Wert bei Stimulation von IL-1 α 0,1 μ g/ml mittels eines Grubb's Test mit einem Alpha von 0,0001 entfernt, da dieser die Statistik außergewöhnlich verändert hätte (2,5% Anteil der PMN-MDSCs statt durchschnittlich 94,4% bei den anderen 8 Proben).

Tabelle 12: Ausschluss Kontrollen oder Proben nach folgenden Kriterien

Messwert	Zu erfüllendes Kriterium
Total Events	> 1000
Total Gated Events	> 100

Total Events umfasst alle erfassten Zellen, Total Gated Events die gemessenen Zellen in R1.

3 Ergebnisse

Die Pathophysiologie des Muckle-Wells-Syndroms basiert auf einer erhöhten Aktivität des NLRP3 Inflammasomes und konsekutiv vermehrter IL-1 β Ausschüttung²¹³. Bei Patienten mit genetisch gesichertem Muckle-Wells Syndrom zeigen sich im Vergleich zu gesunden Probanden vermehrt MDSCs im peripheren Blut²¹⁴.

Zum Nachweis eines kausalen Zusammenhangs wurden *in vitro* Zellkulturen durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss mononukleärer Zellen von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom auf PMN-MDSCs sowie die direkte Induktion von PMN-MDSCs durch Interleukine der IL-1 Familie untersucht.

Die für PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom zu erwartende, charakteristisch erhöhte IL-1 β Ausschüttung wurde im ELISA-Assay auf ihre Übertragbarkeit in einer *in vitro* Umgebung überprüft.

Die stimulierten myeloischen CD33⁺ Zellen wurden auf ihre, für die MDSCs charakteristische immunsuppressive Wirkung auf T-Zellen untersucht.

3.1 Immunphänotypisierung der PMN-MDSCs

Für die Beurteilung der Induktion von PMN-MDSCs durch Interleukine der IL-1 Familie wurden Zellkulturen stimuliert und anschließend per Durchflusszytometrie analysiert.

Hierfür wurden 27 Blutproben von 6 gesunden Probanden sowie 10 Blutproben von Patienten mit genetisch gesichertem Muckle-Wells Syndrom verwendet.

Die Zellen wurden nach 6- bis 7-tägiger Kultivierung (vgl. 2.2.6) aus den Zellkulturplatten entnommen und gefärbt. Es resultierten pro Well je paarweise eine ungefärbte und eine mit FACS-Antikörpern gefärbte Probe.

Dieses Vorgehen wurde auch für die *Transwell*-Co-Kulturen angewandt, wobei lediglich die Target-Zellen im unteren Kompartiment analysiert wurden.

Die Messergebnisse wurden nach, im Folgendem beschriebenen, Verfahren analysiert.

3.1.1 Gating nach FSC und SSC

Die ungefärbte Probe wurde jeweils als Erstes im FACS-Calibur gemessen. Die Vorauswahl mittels Region R1 (Abb. 3) beinhaltet den Bereich welcher im peripheren Vollblut die PMNs und Monozyten einschließt. Neutrophile sind in der PBMC Fraktion nicht vorhanden²²⁴. Die Lymphozyten (Bereich mit niedrigem FSC und SSC) sowie tote Zellen (mit sehr niedrigem FSC) wurden damit ausgeschlossen²²⁵. Dieses *Gating* wurde durchgängig für alle Proben genutzt und nicht verändert.

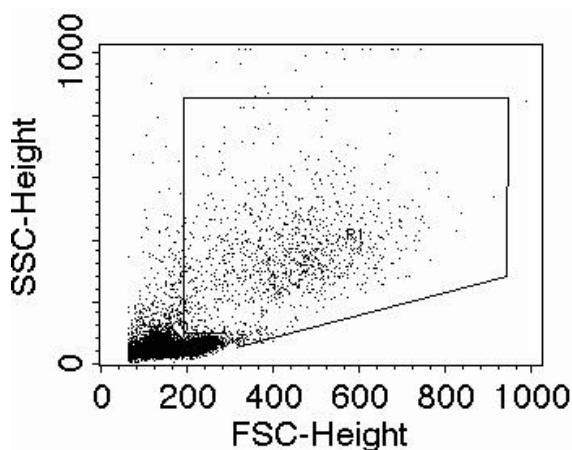


Abb. 3: FSC-SSC Gating einer Negativkontrolle

PBMCs aus peripherem Blut gesunder Probanden wurden für 6-7 Tage kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert. Das Schaubild zeigt als Punktwolke die Verteilung der Zellen je nach FSC und SSC-Intensität. Diese korrelieren mit dem Volumen und der Granularität jeder einzelnen Zelle. Die Region R1 selektiert die im Weiteren analysierten Zellen.

3.1.2 Gating nach Antikörper

In der Publikation unserer Ergebnisse (Ballbach, Hall *et al.* 2016⁹) wurde die Induktion der CD33⁺CD14⁻ PMN-MDSCs betrachtet, in der vorliegenden Arbeit werden zusätzliche Aspekte der zu Grunde liegenden Daten betrachtet.

Um eine feine Differenzierung der Subpopulationen zu erreichen, wurden die *Gating*-Regionen jeder einzelnen Probe entsprechend dem Autofluoreszenzmuster der ungefärbten Zellen angepasst (Abb. 4A). Im Falle von CD33 und CD14 wurden die Regionen um den Autofluoreszenz-Streifen gelegt.

Ergebnisse

R2 beinhaltet die CD33⁺CD14⁻ Zellen (PMN-MDSCs), R4 die CD33⁺CD14⁺-Zellen (sonstige myeloische PBMCs), R3 die CD33⁻CD14⁺-Zellen (Abb. 4B).

Für die Auswertung sind die Regionen sind R2 und R4 relevant. Beide beinhalten CD33⁺, also myeloische Zellen und decken somit den Bereich ab, in welchem MDSCs zu erwarten sind³⁷. Das Expressionsmuster von R4 (CD33⁺CD14⁺) charakterisiert monozytäre Zellen in der PBMC Fraktion.

Zur Auswertung der HLA-DR und CXCR4-Expression der Zellen in den jeweiligen Regionen (R1-4) wurde ein Quadranten-*Gating* vorgenommen. Das Quadranten Kreuz wurde jeweils an das Ende des Autofluoreszenz-Streifens gelegt. In Abb. 4D ist beispielhaft eine dominante HLA-DR⁺CXCR4⁺-Zellpopulation zu sehen.

Die Anzahl der jeweils im Gate vorhandenen Zellen wird als Verhältnis zu der Gesamtzahl der gemessenen Zellen angegeben und „% total“ genannt.

Abb. 4 zeigt exemplarisch das Bild des Gatings für den Negativkontroll-Ansatz in Abb. 3, es zeigt sich eine deutliche CD33⁺CD14⁺ Zellpopulation (Abb. 4B).

Ergebnisse

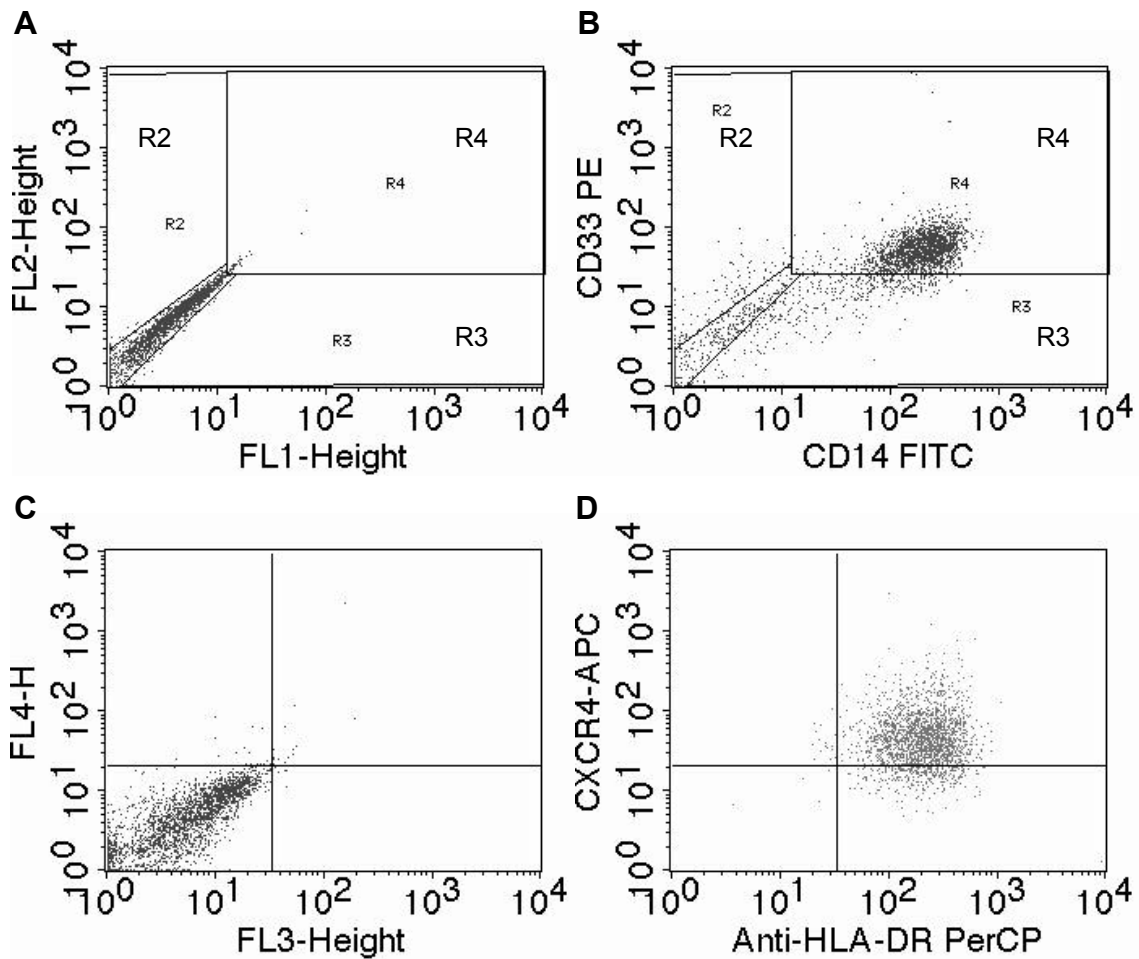


Abb. 4: Antikörper Gating einer Negativkontrolle

PBMCs aus peripherem Blut gesunder Probanden wurden für 6-7 Tage kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Adaptation der Gates um den Autofluoreszenzstreifen in FL1 und FL2 in der ungefärbten Negativ-Kontrolle.

B: Beispielhaft entsprechender Graph der CD33 und CD14 gefärbten Probe.

C: Adaptation des Quadranten-Kreuz an den Autofluoreszenzstreifen in FL3 und FL4 in der ungefärbten Negativkontrolle.

D: Beispielhaft entsprechender Graph einer Subpopulation der HLA-DR und CXCR4 gefärbten Probe.

3.1.3 Verhalten der Negativkontrollen

Die CD33⁺ myeloischen und PMN-MDSC Zellpopulationen der Negativ-Kontrollen zeigten sehr heterogene Ergebnisse bezüglich ihrer Frequenz (% total) (Abb. 5A) und Expression (*Mean fluorescence intensity, MFI*) von CD14 und CD33 (Abb. 5C). Der Anteil der PMN-MDSCs an den CD33⁺ myeloischen

Ergebnisse

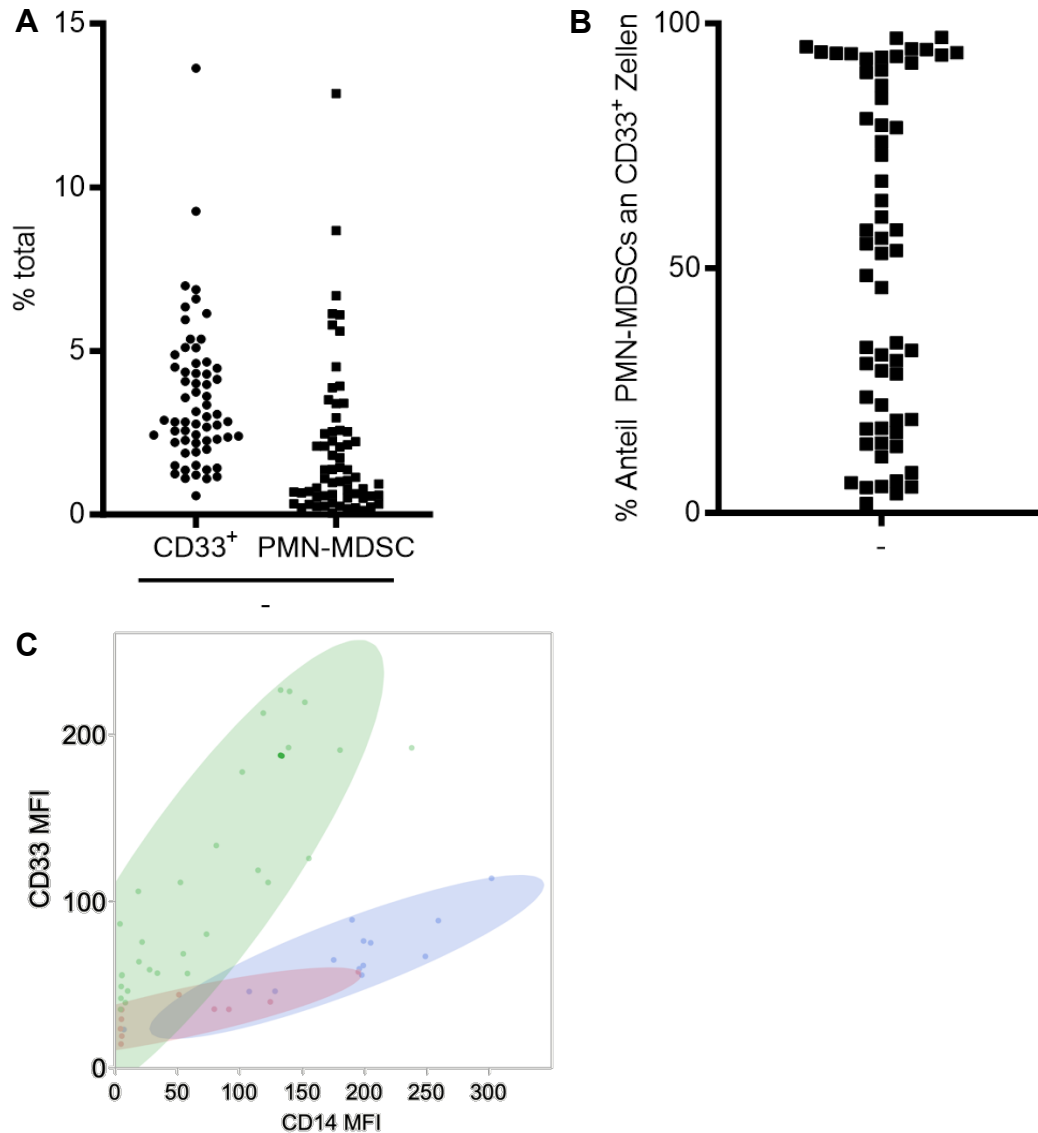


Abb. 5: Anteil CD33+ Zellpopulationen sowie Charakterisierung nach CD33- und CD14-Mean fluorescence intensity (MFI)

PBMCs aus peripherem Blut gesunder Probanden wurden für 6-7 Tage als Negativkontrolle (-) rein in Zellkulturmedium kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert. Myeloische CD33+ Zellen wurden definiert als CD33+CD14^{+/+}, PMN-MDSCs als CD33+CD14⁻.

A: CD33+ Zellen als % Anteil an den durchflusszytometrisch erfassten Zellen der Negativkontrollen (% total). (n = 61)

B: Anteil der PMN-MDSCs an den CD33+ Zellen in Prozent. (n = 61)

C: CD33 und CD14 MFI (*Mean fluorescence intensity*) der CD33+ Zellpopulationen bei Negativkontrollen. Farblich hervorgehoben sind Negativkontrollen drei verschiedener Spender. Die Punkte repräsentieren jeweils eine Messung.

Zellen unterlag einer hohen Schwankungsbreite (Abb. 5B). Dies zeigte sich nicht nur interindividuell, sondern auch zu verschiedenen Zeitpunkten beim gleichen Spender (Abb. 5C). Es konnten sowohl dominierende monozytäre CD14⁺, CD14⁻ PMN-MDSC als auch das gleichzeitige Vorkommen beider Populationen beobachtet werden.

3.2 Nachweis der PMN-MDSC Induktion durch GM-CSF

Als Positivkontrolle für die Induktion von PMN-MDSCs wurde die Stimulation mit GM-CSF verwendet. GM-CSF ist ein etablierter Induktor für PMN-MDSCs^{226,227}.

3.2.1 GM-CSF induziert PMN-MDSCs

Die Stimulation erfolgte in allen Versuchen mit einer GM-CSF Konzentration von 0,01 µg/ml und führte zu einer starken, circa 15-fachen Induktion von PMN-MDSCs (Abb. 6B&D). Die gesamt betrachtete CD33⁺ myeloische Zellpopulation erreichte im Vergleich dazu eine circa 4-fache Induktion durch GM-CSF (Abb. 6A&C). Bei der monozytären Population kam es zu einer „negativen“ Induktion (Abb. 6D).

Der Induktionsfaktor gibt das Verhältnis des Anteils der näher bezeichneten Zellpopulation an den gesamt gemessenen Zellen (*% total*) zu dem, auf 1 normalisierten, gemittelten Anteil der gleichen Population in den Negativkontrollen an.

Ergebnisse

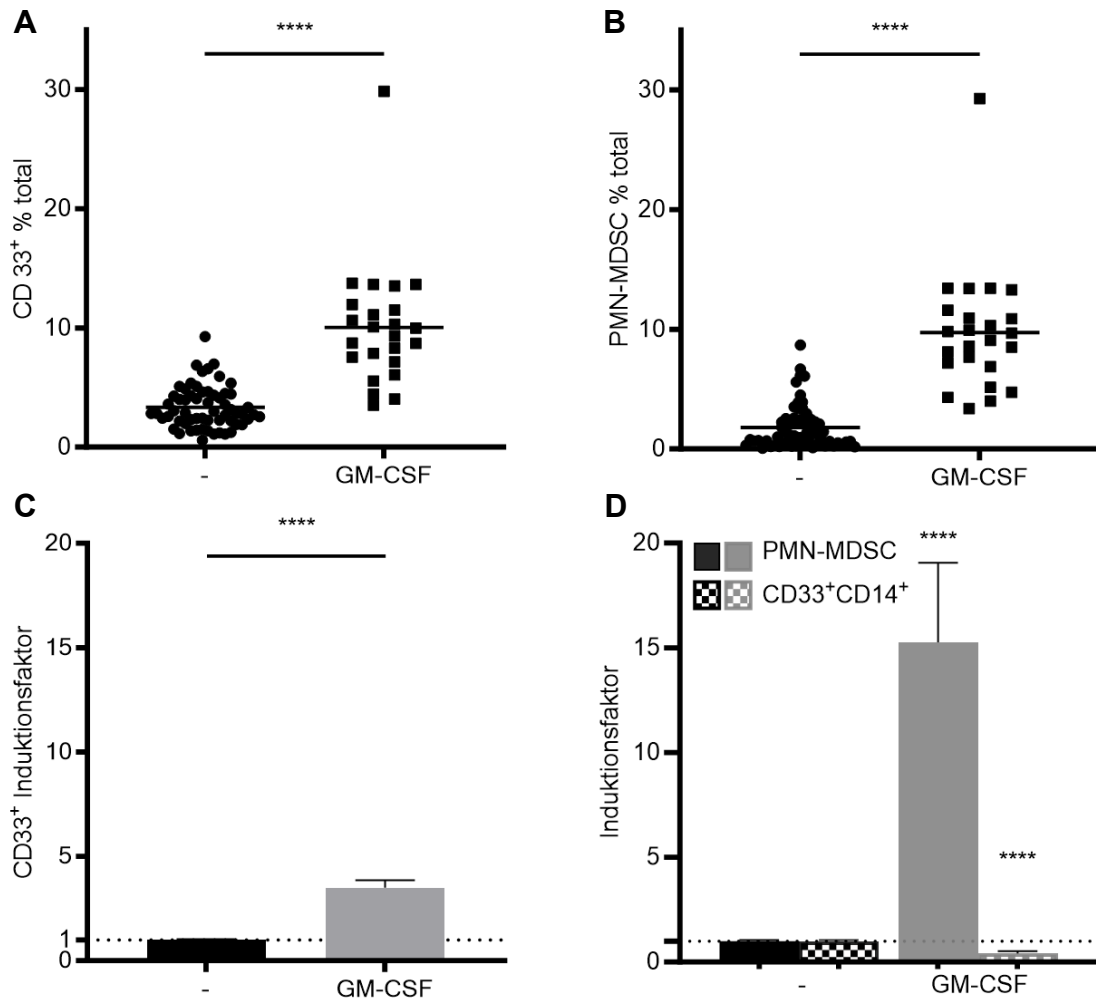


Abb. 6: GM-CSF induziert PMN-MDSCs

PBMCs aus peripherem Blut gesunder Probanden wurden für 6-7 Tage unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61) oder GM-CSF 0,01 µg/ml (n = 24) als Positivkontrolle kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Prozentualer Anteil der myeloischen CD33⁺ Zellen an den insgesamt gemessenen Zellen

B: Prozentualer Anteil der PMN-MDSCs (CD33⁺CD14⁻) Zellen an den insgesamt gemessenen Zellen.

C: Induktion der CD33⁺ Zellen als Multiplikator auf den gemittelten Wert der Negativkontrollen

D: Induktion der PMN-MDSCs als Multiplikator auf den gemittelten Wert der Negativkontrollen

Für B und C ist der Mittelwert, für C und D jeweils der auf die Negativkontrolle normalisierte Mittelwert ± SEM angegeben. Mann-Whitney-Test im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle: **** zeigt p < 0,0001.

Ergebnisse

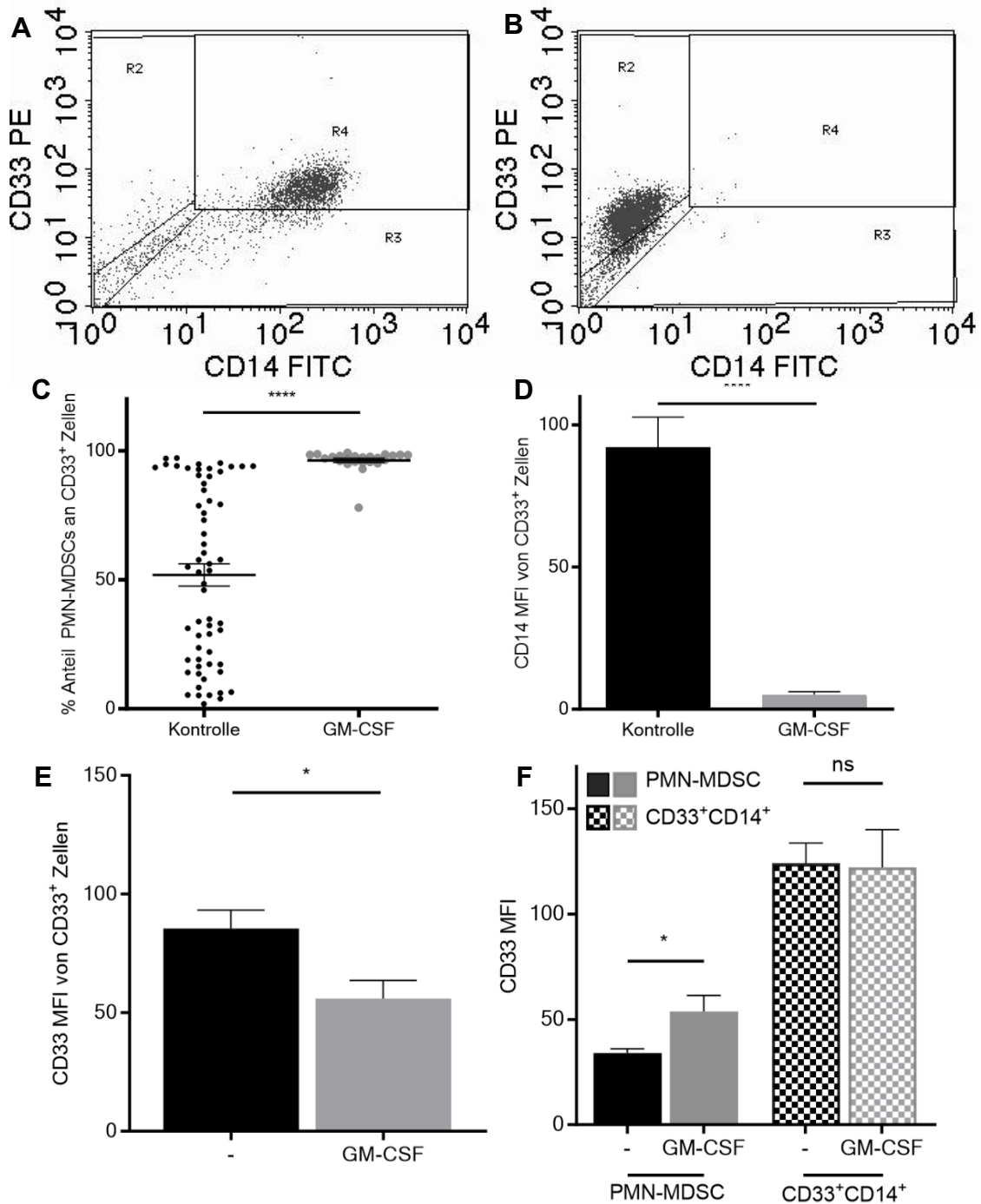


Abb. 7: PMN-MDSCs nach GM-CSF Stimulation mit niedriger CD33 und CD14 Expression

PBMCs aus peripherem Blut gesunder Probanden wurden für 6-7 Tage unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61) oder GM-CSF 0,01 µg/ml (n = 24) als Positivkontrolle kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A & B: Exemplarische FACS Graphen der CD33 und CD14 Expression der Negativkontrolle (**A**) im Vergleich zu den durch GM-CSF (**B**) stimulierten PBMC des identischen Spenders.

C: Anteil der CD33⁺CD14⁻ Zellen an den CD33⁺ Zellpopulation

D: CD14 Expression der CD33⁺ Zellen

E: CD33 Mean fluorescence intensity (MFI) der CD33⁺ Zellen

F: CD33 Mean fluorescence intensity (MFI) jeweils der PMN-MDSCs sowie CD33⁺CD14⁺ Zellen. Mittelwerte sowie ± SEM. Mann-Whitney-Test: * zeigt p < 0,05; **** zeigt p < 0,0001; ns zeigt p > 0,05.

Ergebnisse

Bei den durch GM-CSF induzierten Zellpopulationen zeigte sich eine deutliche Veränderung der Oberflächenmarker im Vergleich zu den Negativkontrollen.

Im Dot-Blot der FACS-Auswertung zeigt sich, auch bei Ansätzen mit prädominant CD33⁺CD14⁺ Zellpopulation in der Negativkontrolle (Abb. 7A), durch GM-CSF-Stimulation eine Änderung zu CD33⁺CD14⁻ PMN-MDSC Zellpopulationen (Abb. 7B). Dieses Verhalten konnte bei allen Messungen beobachtet werden. Entsprechend finden sich in den GM-CSF stimulierten Proben fast ausschließlich PMN-MDSCs in der CD33⁺ myeloischen Zellpopulation (Abb. 7C).

Die durchschnittliche CD14 Expression (MFI = *mean fluorescence intensity*) sinkt entsprechend drastisch (Abb. 7D).

Die CD33 Expression (MFI) der CD33⁺ myeloischen Zellpopulation sinkt bei GM-CSF Stimulation (Abb. 7E). Dies ist durch die niedrigere CD33 Expression von PMN-MDSCs im Vergleich zu CD33⁺CD14⁺ monozytären Zellpopulationen (Abb. 7F) bedingt. Die CD33 Expression von PMN-MDSCs hingegen steigt nach GM-CSF Stimulation leicht an (Abb. 7F).

Die Beobachtung der Varianz der CD33 und CD14 Expression in den Negativkontrollen sowie die Veränderung durch GM-CSF soll Abb. 8 im Vergleich zu Abb. 5C darstellen.

Ergebnisse

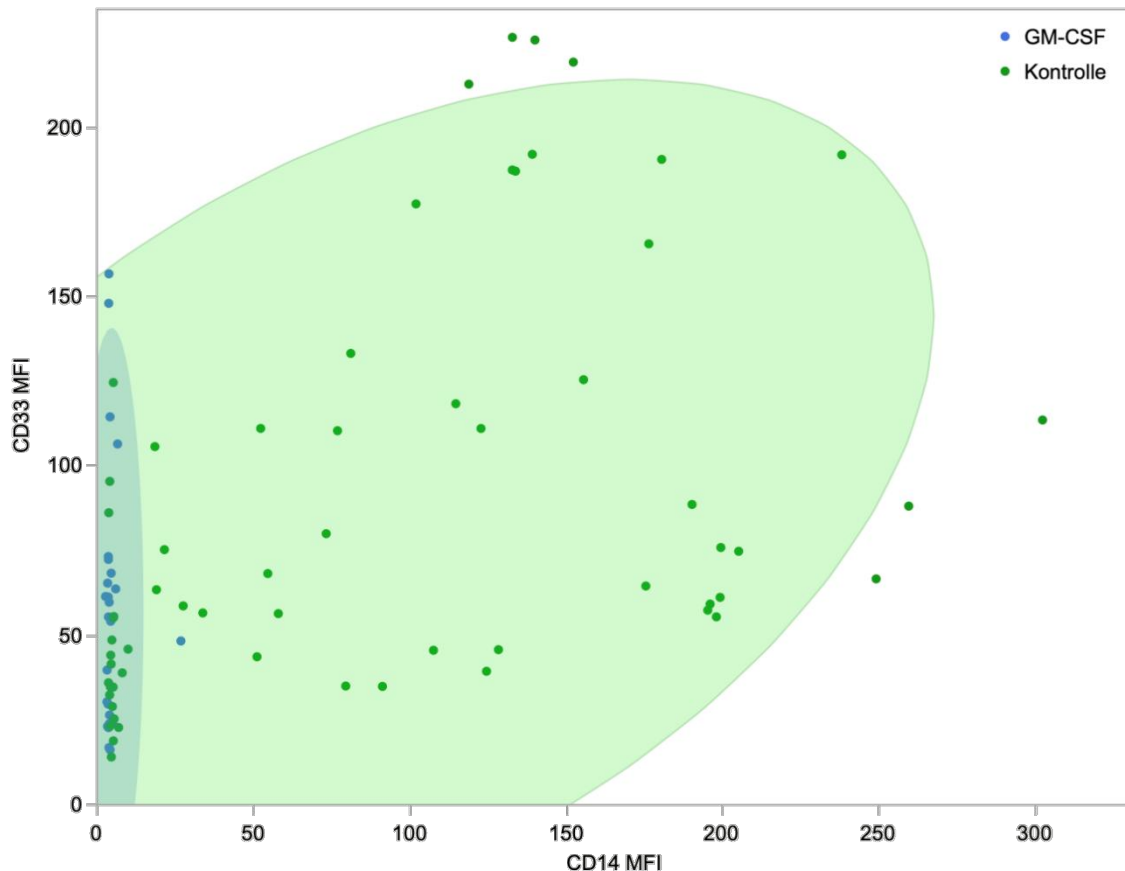


Abb. 8: CD33 und CD14 Expression der CD33⁺ Zellpopulationen

PBMCs aus peripherem Blut gesunder Probanden wurden für 6-7 Tage unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (n = 61) oder GM-CSF 0,01 µg/ml (n = 24) als Positivkontrolle kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

Die Abbildung zeigt die Expression von CD33 und CD14 der CD33⁺ Zellen anhand deren *Mean fluorescence intensity* (MFI). Jeder Punkt entspricht einer Messung.

Die GM-CSF stimulierten CD33⁺ myeloischen Zellen zeigten eine Reduktion der Expression von HLA-DR und CXCR4 (Abb. 9A).

Die negative Expression von HLA-DR gilt bei monozytären CD14⁺ Zellen als ein typischer Marker für M-MDSCs, außerdem sind eMDSCs typischerweise HLA-DR⁻. Durch GM-CSF werden CD33⁺HLA-DR⁻ Zellen induziert (Abb. 9B). Die Induktion von HLA-DR⁻ Zellen konnte jedoch lediglich in der PMN-MDSC Zellpopulation beobachtet werden (Abb. 9B& C). Der Anteil an HLA-DR⁻ Zellen liegt bei den PMN-MDSCs höher als bei monozytären CD33⁺CD14⁺ Zellen (Abb. 9D). Im Vergleich zu den Negativkontrollen sinkt bei GM-CSF Stimulation der Anteil HLA-DR⁻ Zellen bei den PMN-MDSCs (Abb. 9D).

Ergebnisse

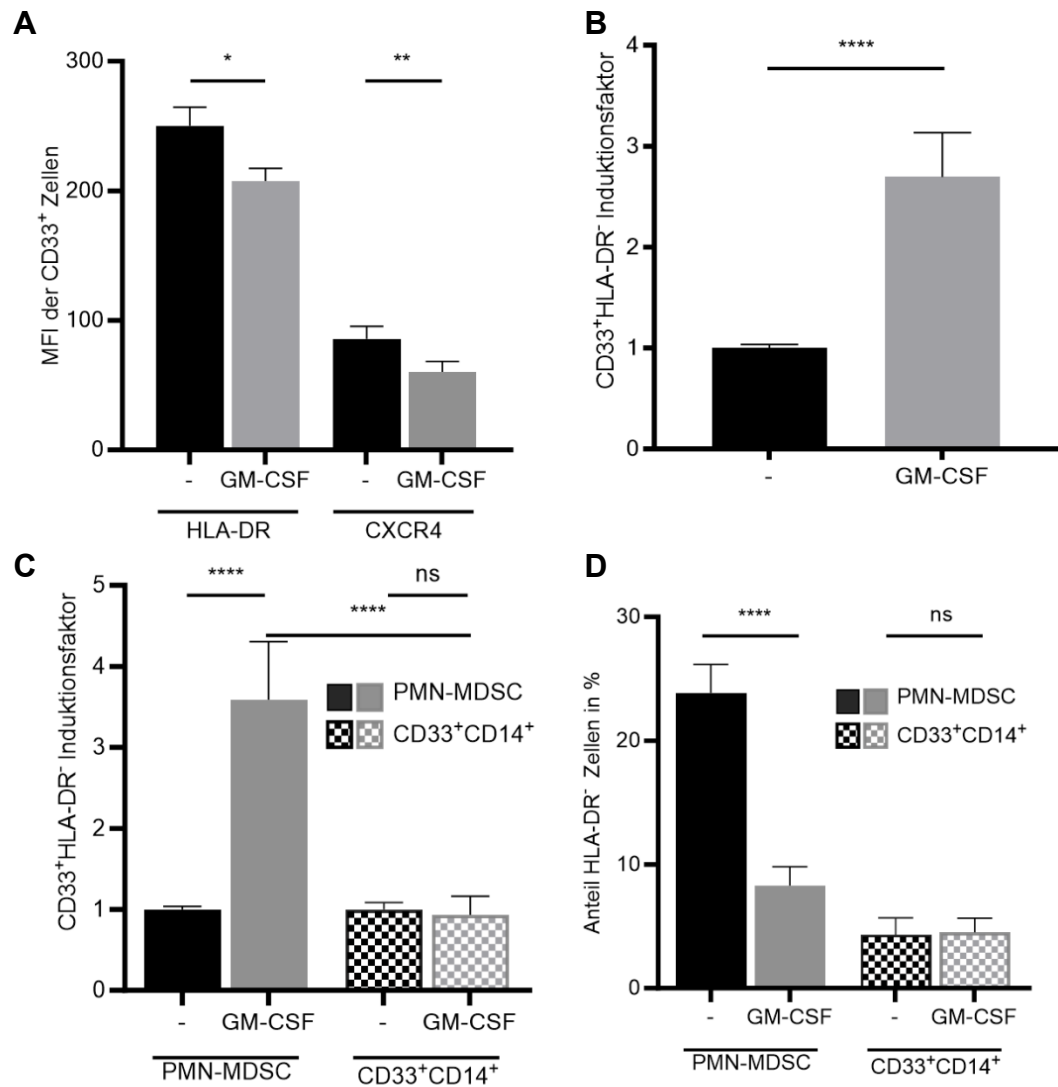


Abb. 9: GM-CSF senkt Expression von HLA-DR und CXCR4 in CD33⁺ Zellen und induziert HLA-DR⁻ PMN-MDSCs. Höherer Anteil an HLA-DR⁻ Zellen bei PMN-MDSCs.

PBMCs aus peripherem Blut gesunder Probanden wurden für 6-7 Tage unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61) oder GM-CSF 0,01 µg/ml (n = 24) als Positivkontrolle kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) für HLA-DR und CXCR4 jeweils bei Negativkontrolle und GM-CSF stimulierten CD33⁺ Zellen

B: Induktion der CD33⁺HLA-DR⁻ Zellen durch GM-CSF aufgeschlüsselt nach CD14⁻ und CD14⁺ Subpopulationen, jeweils im Vergleich zum normalisierten Mittelwert der entsprechenden Negativkontrollen.

C: Induktion der CD33⁺HLA-DR⁻ Zellen durch GM-CSF aufgeschlüsselt nach CD33⁺CD14⁻HLA-DR⁻ PMN-MDSC und CD33⁺CD14⁺HLA-DR⁻ M-MDSC Subpopulationen, jeweils im Vergleich zum normalisierten Mittelwert der entsprechenden Negativkontrollen.

D: Anteil der HLA-DR⁻ Zellen jeweils an den CD33⁺CD14⁻HLA-DR⁻ PMN-MDSC und CD33⁺CD14⁺HLA-DR⁻ M-MDSC Zellpopulationen

Angaben als Mittelwerte ± SEM. Mann-Whitney-Test: * zeigt p < 0,05; ** zeigt p < 0,01; **** zeigt p < 0,0001; ns zeigt p > 0,05.

3.3 Nachweis der immunsupprimierenden Wirkung durch CD33 positive Zellen im CFSE-T-Zell-Proliferationsassay

MDSCs zeichnen sich vor allem durch ihre immunsuppressive Wirkung auf T-Zellen aus. Mithilfe dieser Eigenschaft soll die Methode der Phäntotypisierung der PMN-MDSCs als Teil der CD33⁺ Zellen der PBMC-Fraktion bestätigt werden.

Zum Nachweis ihrer charakteristischen Funktion wurden MACS-sortierte CD33⁺ Zellen (Methode siehe 2.2.7) aus vorangegangener Stimulations-Zellkultur mit CFSE gefärbten und mit OKT3 und IL-2 stimulierten PBMCs aus Frischblut von gesunden Probanden (*Target*-Zellen) in Co-Kultur gebracht. Die Reduktion der Zellteilungsaktivität von CD4⁺ und CD8⁺ *Target*-Zellen wurde anschließend anhand des intrazellulären CFSE-Gehaltes untersucht (Methode siehe 2.2.8):

Nach dem in Abb. 10 dargestellten Gating wurden jeweils die CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten-Populationen unterschieden. Die Region 1 (Abb. 10A) enthält die Lymphozytenfraktion. Anschließend wurden Propidiumiodid-negative und damit vitale Zellen selektiert (Abb. 10B), welche dann in CD4⁺ (Abb. 10C) und CD8⁺ (Abb. 10D) Subpopulationen gruppiert wurden.

Ergebnisse

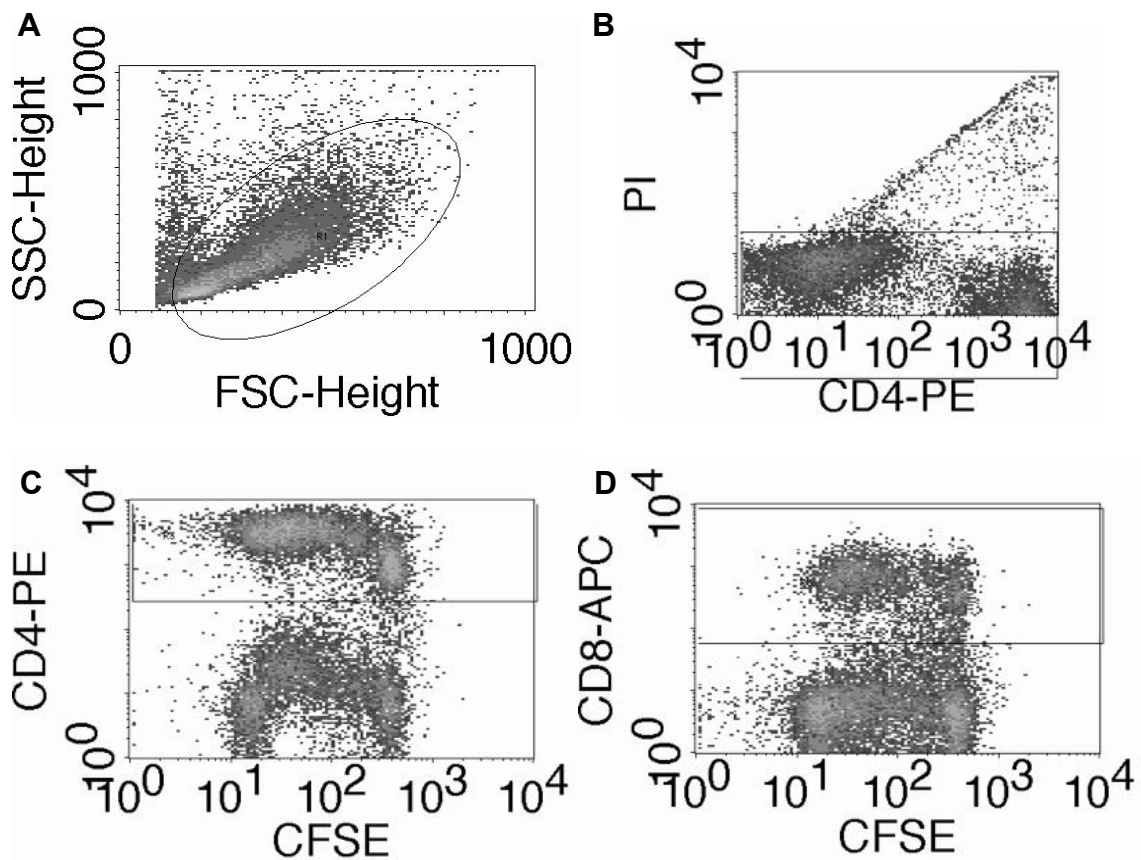


Abb. 10: Gating der jeweils CD4⁺ und CD8⁺ Zellpopulation

Nach intrazellulärer Anfärbung mit CFSE wurden die peripheren PBMCs von gesunden Probanden mit CD33⁺ MACS sortierten Zellen aus Stimulationsansätzen von Buffy-Coat PBMCs in Co-Kultur gegeben und mit OKT3 und IL-2 stimuliert. Nach 4-tägiger Kultivierung wurden die Zellen mit PI sowie Anti-CD4 und -CD8 gefärbt.

A: Gating der Lymphozyten-Fraktion

B: Ausschluss von avitalen Zellen durch sekundäres Gating auf negatives PI

C: Gating der CD4⁺ Zellen

D: Gating der CD8⁺ Zellen

Ergebnisse

Zellen, welche sich nach der CFSE-Färbung und während des Co-Kulturzeitraumes geteilt haben, enthalten einen Bruchteil der intrazellulären CFSE Konzentration der ungeteilten Zellen mit maximaler CFSE Konzentration. Hierdurch entstehen mehrere Peaks in der CFSE Konzentration in regelmäßigen Abständen. Zur Beurteilung der Proliferation der Lymphozyten wurden alle mindestens einmalig geteilten Zellen (geringere CFSE Konzentration als die Zellen der am weitesten rechts befindlichen Spitze mit der maximalen CFSE Konzentration) selektiert (Abb. 11) und deren %-Anteil angegeben.

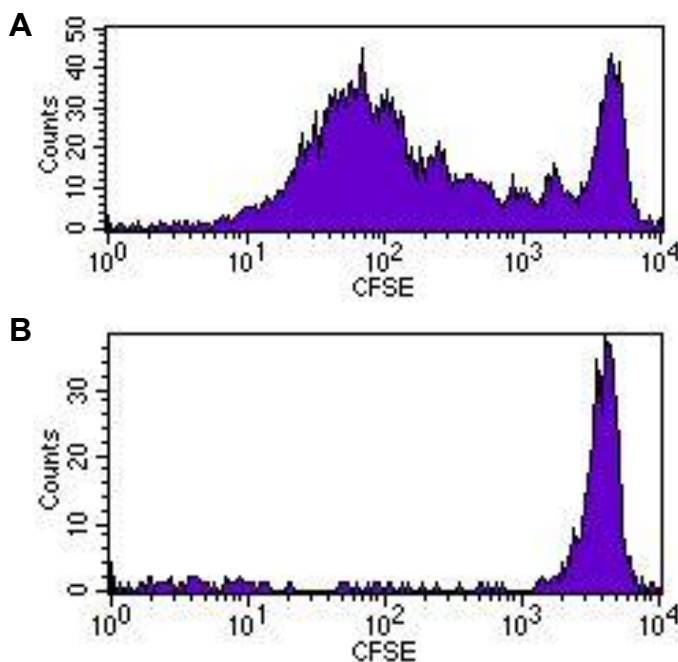


Abb. 11: Beispiel Hemmung der T-Zell-Proliferation durch CD33⁺ Zellen

Es wurden zu 60.000 CFSE gefärbten PBMCs eines gesunden Probanden jeweils Medium als Negativkontrolle (**A**) oder 30.000 MACS-sortierte CD33⁺ Zellen (Verhältnis 1:2 - **B**) - aus einer 6-7 Tage mit IL-1 β 0,1 μ g/ml stimulierten Zellkultur von PBMCs aus Buffy Coats - gegeben, mit OKT3 und IL-2 stimuliert und 4 Tage kultiviert. Anschließende FACS Analyse der Proliferationsaktivität von den hier abgebildeten CD4⁺ Zellen.

Zu sehen ist die Anzahl (Y-Achse) der unterschiedlich stark fluoreszierenden CD4⁺ Zellen. Je niedriger deren Fluoreszenz-Intensität (X-Achse) desto häufiger haben sich die Zellen geteilt.

A: CD4⁺ Zellen im Negativkontroll-Ansatz ohne Zugabe von Zellen

B: CD4⁺ Zellen im Ansatz mit 30.000 CD33⁺ Zellen nach IL-1 β stimulierter Kultur

Ergebnisse

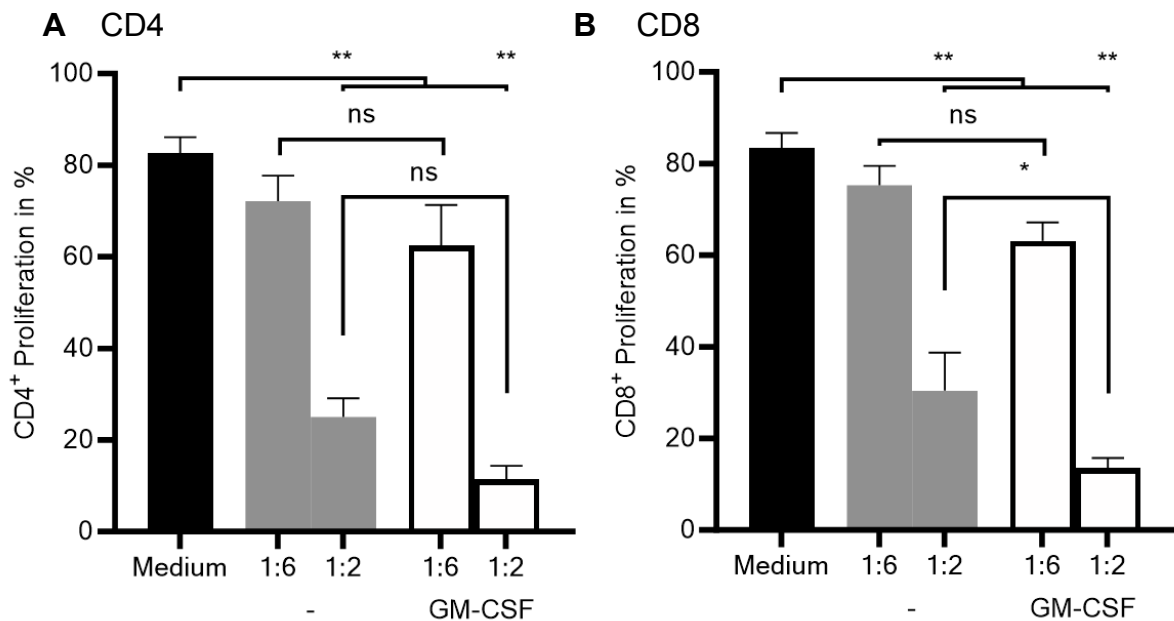


Abb. 12: Hemmung der T-Zell-Proliferation durch CD33⁺ Zellen

Es wurden zu 60.000 CFSE gefärbten PBMCs gesunder Probanden entweder Medium als Negativkontrolle (-) (n = 8) oder 10.000 bzw. 30.000 (Verhältnis 1:6 und 1:2) MACS-sortierte CD33⁺ kultivierte Buffy Coat PBMCs gegeben, welche zuvor entweder ohne (n = 5) oder mit 0,01 µg/ml GM-CSF (n = 4) Stimulation für 6-7 Tage kultiviert worden waren. Nach 4 tägiger Kultur mit Stimulation durch IL-2 und OKT3 erfolgte die Untersuchung der Proliferationsaktivität von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen mittels FACS.

A: Proliferation in % der CD4⁺ Zellen

B: Proliferation in % der CD8⁺ Zellen

Angaben als Mittelwerte sowie ± SEM. Mann-Whitney-Test: * zeigt p < 0,05; ** zeigt p < 0,01; ns zeigt p > 0,05.

Es zeigt sich im T-Zell CFSE-Proliferationsassay eine dosisabhängige Hemmung der Proliferationsaktivität der CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen durch Zugabe von MACS sortierten CD33⁺ Zellen aus einem Stimulationsansatz von PBMCs aus Buffy Coat mit GM-CSF (Abb. 12). Ebenso erfolgte eine schwächere, ebenfalls dosisabhängige, Hemmung durch unstimulierte Buffy Coat PBMC im Vergleich zur Negativkontrolle mit Zugabe von Zellkulturmedium.

3.4 Nachweis einer Induktion von CD33⁺CD14⁻ MDSCs in Co-Kultur mit PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom

Um den Einfluss von Mediatoren aus mononukleären Zellen der Patienten mit Muckle-Wells Syndrom auf MDSCs zu untersuchen, wurde eine Co-Kultur angewandt, wobei die untersuchten „Target-Zellen“ im unteren Kompartiment der Co-Kultur (*Well* der Versuchsplatte), aus PBMCs von gesunden Probanden bestanden. In das obere Kompartiment, ein eingehängtes *Transwell* mit basal zeldichter Membran, wurde entweder Medium als Negativ-Kontrolle, PBMCs von gesunden Probanden als Vergleichskontrolle sowie PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom in einer Konzentration von 500.000 oder 2 Millionen Zellen pro ml gegeben. Als Positivkontrollen für eine MDSC-Stimulation wurden GM-CSF und IL-1 β verwendet.

Für diese Versuche wurden PBMCs von 8 verschiedenen Patienten mit Muckle-Wells Syndrom verwendet.

Im Vergleich zur Probe mit PBMCs von gesunden Probanden zeigte sich in Co-Kultur mit PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom eine leichte (statistisch nicht signifikante) Induktion von PMN-MDSCs (Abb. 13A) ohne Induktion der CD33⁺ myeloischen Gesamtpopulation (Abb. 13B). Der Anteil der PMN-MDSCs an den CD33⁺ myeloischen Zellen (Abb. 13C) steigt wie bei den den Positivkontrollen mit GM-CSF und IL-1 β an. Bei Zugabe von 2 Millionen PBMCs pro Milliliter von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom im *Transwell* ist dies statistisch relevant.

Auch die CD33 Expression der CD33⁺ Zellpopulation sinkt bei der hohen Anzahl von PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom wie auch bei den Positivkontrollen im Vergleich zur Negativkontrolle ab (Abb. 13D).

Ergebnisse

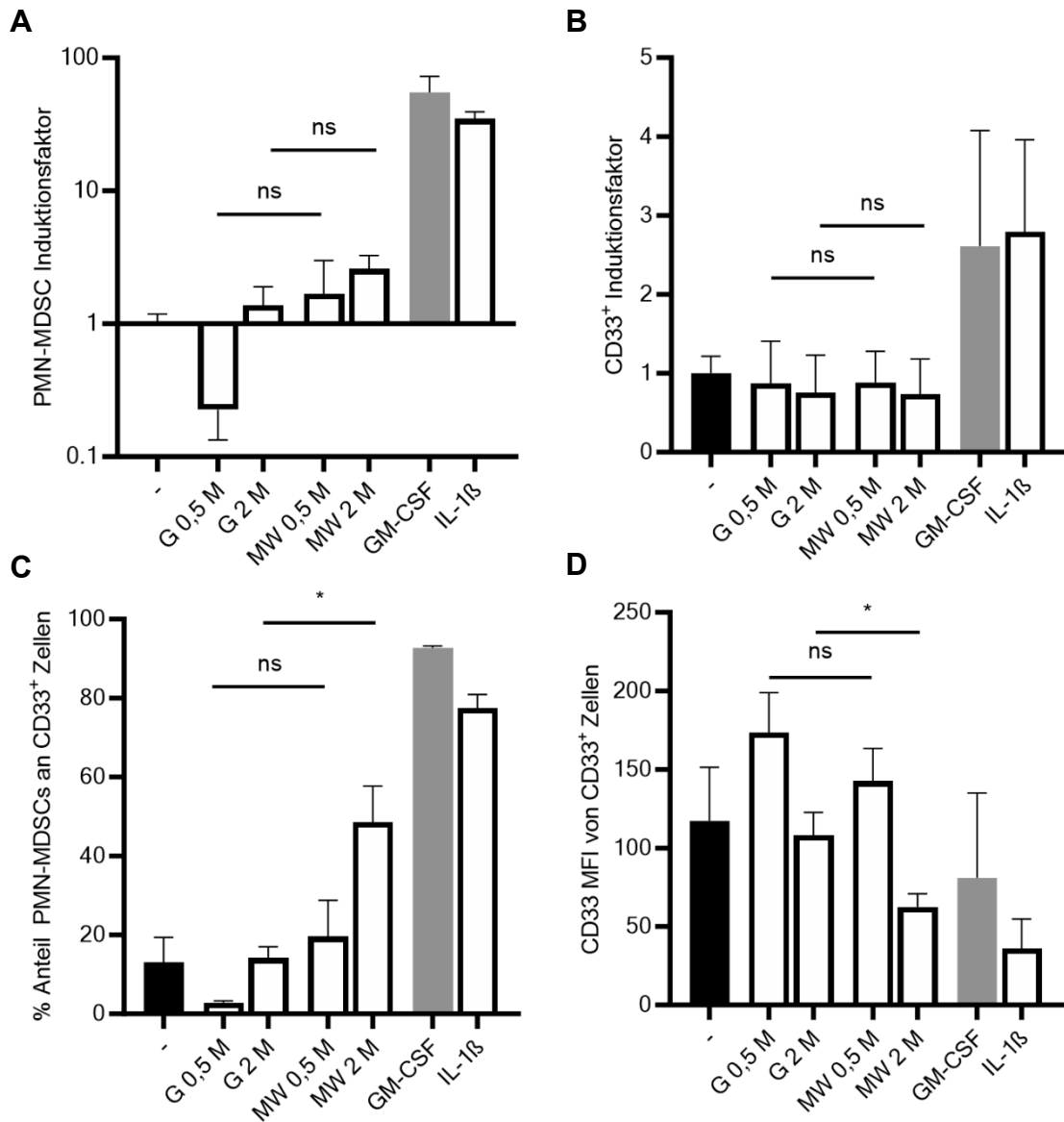


Abb. 13: PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom induzieren PMN-MDSCs in Co-Kultur

Es wurde entweder Medium als Negativkontrolle (-) (n = 8), Zellen von gesunden Probanden (G) bzw. Patienten mit Muckle-Wells Syndrom (MW) in unterschiedlicher Konzentration (0,5 & 2 Millionen pro ml, angegeben als 0,5 M und 2 M) (G 0,5 M n = 6; G 2 M n = 11; MW 0,5 M n = 8; MW 2 M n = 14), oder GM-CSF in 0,01 µg/ml (n = 2) beziehungsweise IL-1β 0,1 µg/ml (n = 2) (bezogen auf das gesamte Volumen des oberen und unteren Kompartiments) in das obere Kompartiment gegeben. Im unteren Kompartiment (getrennt durch eine Zell-undurchlässige Membran) befanden sich PBMCs eines gesunden Spenders, welche nach Ende der 6-tägigen Kultur per FACS untersucht wurden.

A: Induktion der PMN-MDSC Zellenpopulation. Darstellung in logarithmischer Skala (log₁₀)

B: Induktion der CD33⁺ Zellpopulation.

C: Anteil der PMN-MDSCs an der CD33⁺ Zellpopulation in %.

D: Durchschnittliche CD33 Fluoreszenzintensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation.

Angaben als Mittelwerte sowie ± SEM. Mann-Whitney-Test: * zeigt p < 0,05; ns zeigt p > 0,05.

3.5 IL-1 β Sekretion *in vitro* durch PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom

Um die Ausprägung der erhöhten IL-1 β Sekretion von PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom zu untersuchen wurden mittels ELISA die IL-1 β Konzentration von Zellkulturüberstände, nach 3 oder 4 Tagen Zellkultur, bestimmt. Als Stimulanzen wurden GM-CSF sowie LPS verwendet. GM-CSF führt vorrangig zu einer Zell-Proliferation, LPS zu einem zellulären Priming mit Steigerung der Translation inflammatorischer Proteine inklusives des beim Muckle-Wells Syndrom basal überaktiven NLRP3 Inflammasoms und pro-IL-1 β dem Vorläufer von IL-1 β . Beim Wildtyp wird zusätzlich zum Priming ein weiterer aktivierender Faktor für die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und damit der Freisetzung von IL-1 β aus pro-IL-1 β benötigt.

Es wurden die Überstände von zwei gesunden Probanden und 3 Patienten mit Muckle-Wells Syndrom untersucht.

Bei PBMCs von gesunden Probanden waren basal sowie durch GM-CSF Stimulation keine IL-1 β Sekretion nachweisbar (Abb. 14), erst durch LPS Inkubation erfolgte die IL-1 β Ausschüttung. Bei einem Patienten mit Muckle-Wells zeigte sich bereits eine Ausschüttung im Kontrollansatz, nach Stimulation mit GM-CSF bei zwei Patienten. Nach Inkubation mit LPS erfolgte eine Sekretion des Vielfachen im Vergleich zu den Proben bei gesunden Probanden, welche jedoch auf Grund der geringen Datenpunkte nicht statistisch signifikant war.

Ergebnisse

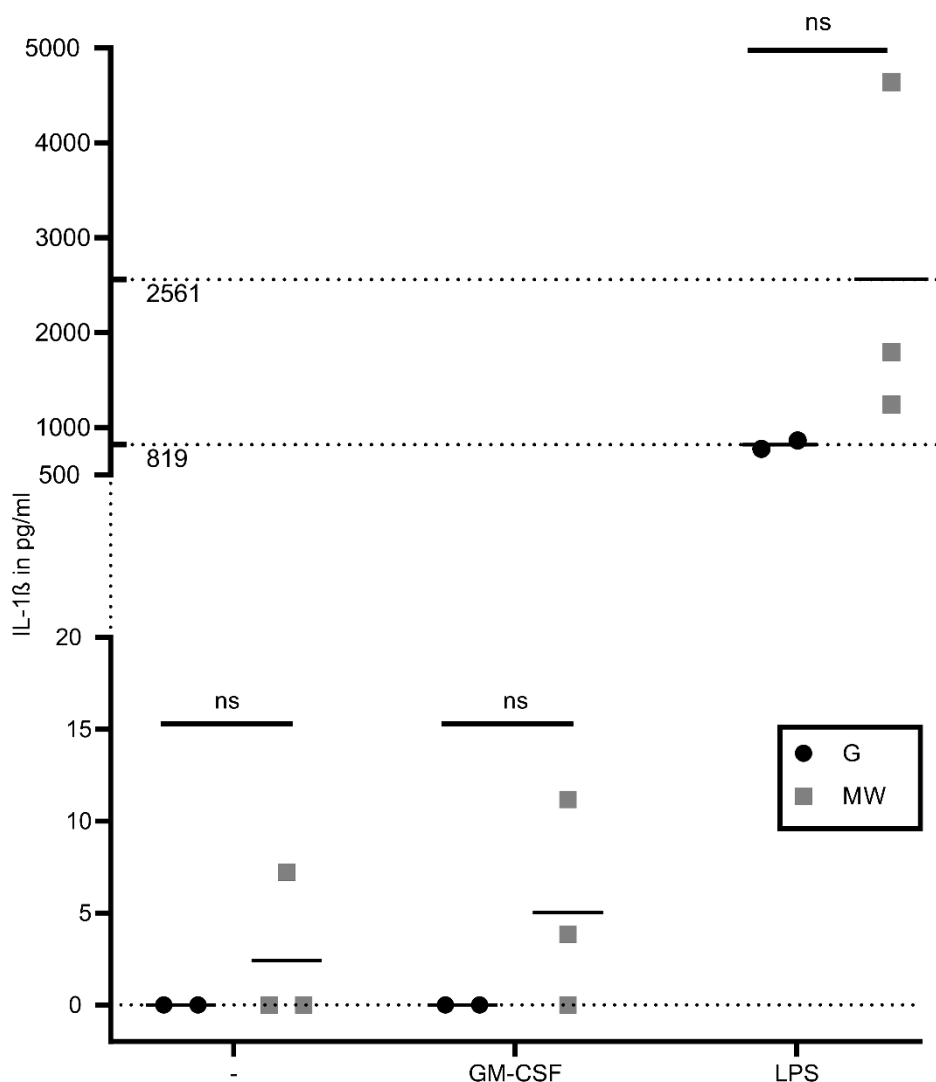


Abb. 14: PBMCs von Muckle Wells-Patienten zeigen in Kultur eine erhöhte Ausschüttung von IL-1 β im Vergleich zu PBMCs von gesunden Probanden

Hierfür wurden die Konzentration von IL-1 β in den Überständen beim Mediumwechsel nach 4 Tagen Inkubation mittels ELISA bestimmt.

Die Proben stammten von PBMCs von gesunden Probanden (G, n = 2) und Patienten mit Muckle-Wells Syndrom (MW, n = 3) welche mit 0,01 μ g/ml GM-CSF und 0,5 ng/ml LPS stimuliert worden waren.

Darstellung ab 500 pg/ml in anderer Skalierung und Angabe der Mittelwerte zur besseren Anschaulichkeit. Angaben als Mittelwerte. Mann-Whitney-Test: ns zeigt $p > 0,05$.

3.6 Induktion von PMN-MDSCs durch Interleukine der IL-1 Familie

Mit den folgenden Experimenten soll die *in vitro* Induktion von PMN-MDSCs auf Stimulation durch die gängigsten Interleukine der IL-1 Familie untersucht werden. Dafür wurden PBMCs von gesunden Probanden isoliert und für 6-7 Tage kultiviert und mit den Interleukinen der IL-1 Familie in unterschiedlichen Dosierungen stimuliert. Zur Mitte der Kulturdauer erfolgte ein Mediumwechsel. Anschließend erfolgte die Analyse mittels FACS wie in 3.1 und 3.2 beschrieben.

Die ungeradzahligen Darstellungen (Abb. 15 - Abb. 23) zeigen jeweils die Induktion von CD33⁺CD14⁻ PMN-MDSCs (A) und CD33⁺ myeloischen Zellen (B) durch die einzelnen Interleukine der IL-1 Familie in aufsteigender Konzentration. Außerdem wird in Abbildung C jeweils der Anteil der PMN-MDSCs an den CD33⁺ myeloischen Zellen dargestellt. In Abbildung D wird die durchschnittliche CD33 Fluoreszenzintensität (MFI) von CD33⁺ myeloischen Zellen gezeigt.

Die geradzahligen Darstellungen (Abb. 16 - Abb. 24) zeigen jeweils die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) von HLA-DR (A) und CXCR4 (B) von CD33⁺ myeloischen Zellen. In Abbildung C wird der Induktionsfaktor, in Abbildung D der prozentuale Anteil der HLA-DR⁻ Subpopulationen jeweils in der PMN-MDSC und monozytären CD33⁺CD14⁺ Zellpopulation dargestellt.

3.6.1 IL-1 α

IL-1 α induziert (im Rahmen der verwendeten Konzentrationen) konzentrationsabhängig PMN-MDSCs (Abb. 15A) und CD33⁺ myeloische Zellen (Abb. 15B). Der Anteil von PMN-MDSCs an den CD33⁺ myeloischen Zellen entspricht etwa dem der Positivkontrolle mit GM-CSF (Abb. 15C).

Im Vergleich zu GM-CSF kommt es sogar zu einer stärkeren Induktion von HLA-DR⁻ PMN-MDSCs (Abb. 16C), zudem steigt deren Anteil an den Gesamt-PMN-MDSCs konzentrationsabhängig an (Abb. 16D). Dagegen führt IL-1 α zu einer massiven Abnahme der M-MDSCs (CD33⁺CD14⁺ HLA-DR⁻ monozytäre Zellen) (Abb. 16D).

Die CD33 Expression der CD33⁺ myeloischen Zellen liegt unterhalb der Negativ- und der Positivkontrolle von GM-CSF (Abb. 15D). Die Expression von HLA-DR und CXCR4 liegen in etwa auf Niveau der Positivkontrolle (Abb. 16A).

Ergebnisse

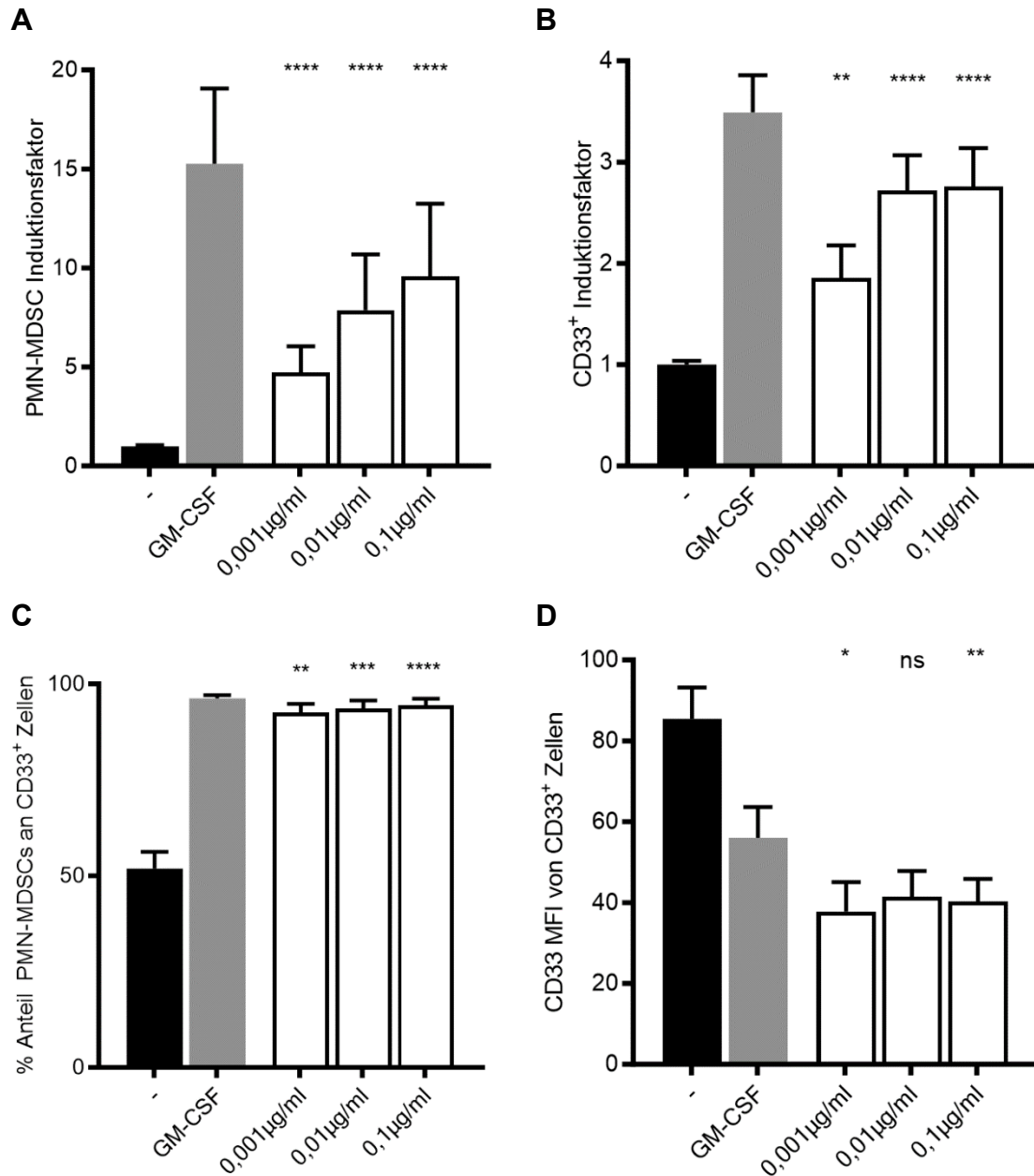


Abb. 15: IL-1 α induziert dosisabhängig PMN-MDSCs

PBMCs aus peripherem Blut von gesunden Probanden wurden für 6-7 Tage jeweils unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61), GM-CSF 0,01 μ g/ml (n = 24) als Positivkontrolle, IL-1 α in aufsteigender Dosis (n = 6 / 6 / 8) kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Induktion der PMN-MDSCs als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der Negativkontrollen.

B: Induktion der CD33⁺ Zellen als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der Negativkontrollen.

C: Anteil der PMN-MDSCs an den CD33⁺ Zellen

D: Durchschnittliche HLA-DR Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

Angaben als Mittelwerte \pm SEM. Mann-Whitney-Test jeweils bezogen auf Negativkontrolle: * zeigt p < 0,05; ** zeigt p < 0,01; *** zeigt p < 0,001; **** zeigt p < 0,0001; ns zeigt p > 0,05.

Abbildung **A** nach Ballbach, Hall et al. 2016 ⁹

Ergebnisse

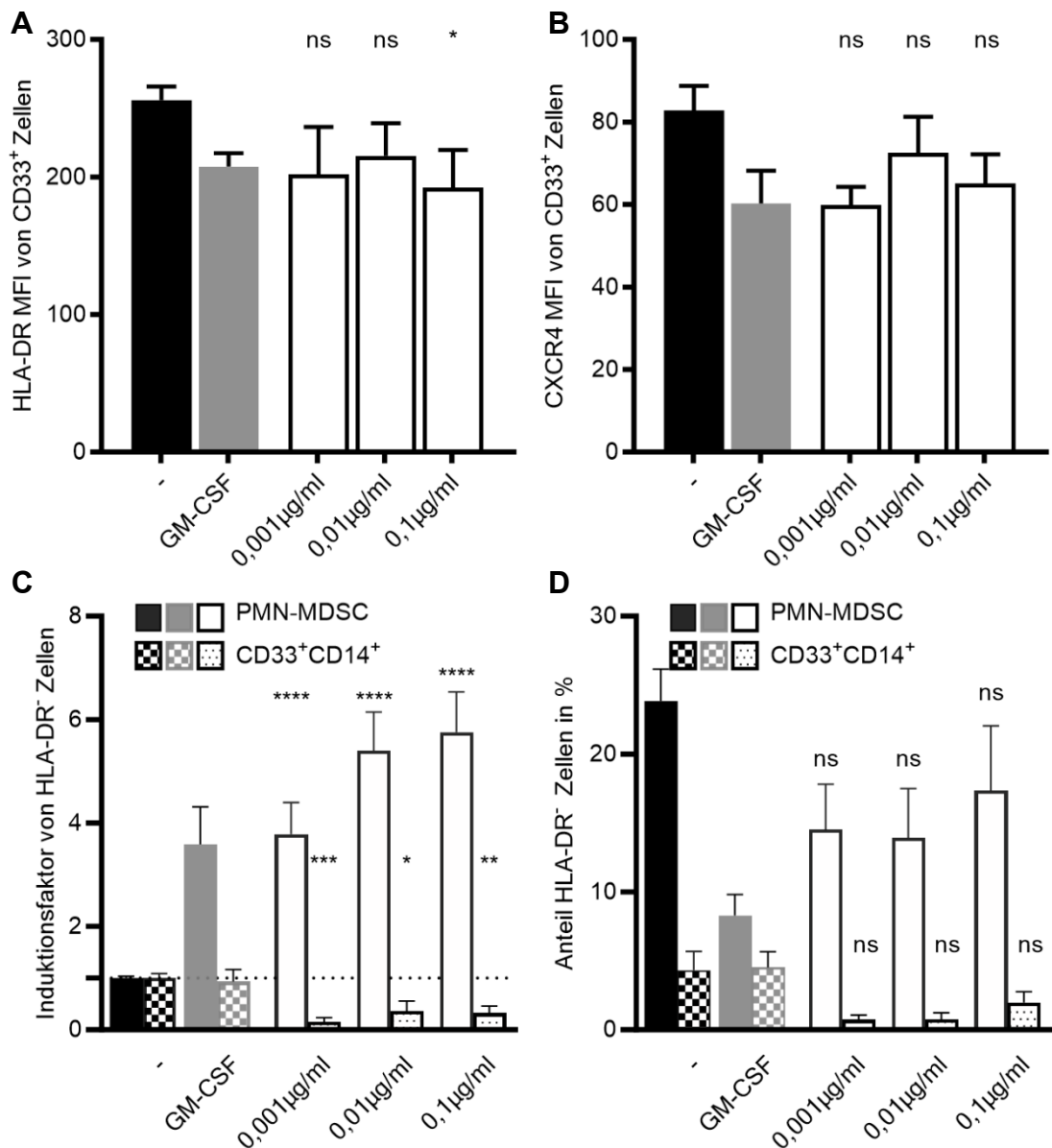


Abb. 16: IL-1 α induziert dosisabhängig HLA-DR⁻ PMN-MDSCs

PBMCs aus peripherem Blut von gesunden Probanden wurden für 6-7 Tage jeweils unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61), GM-CSF 0,01 μ g/ml (n = 24) als Positivkontrolle, IL-1 α in aufsteigender Dosis (n = 6 / 6 / 8) kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Durchschnittliche HLA-DR Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

B: Durchschnittliche CXCR4 Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

C: Induktion der CD33⁺HLA-DR⁻ Zellen aufgeschlüsselt nach CD33⁺CD14⁻HLA-DR⁻ PMN-MDSC und CD33⁺CD14⁺HLA-DR⁻ M-MDSC Subpopulationen, jeweils als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der entsprechenden Negativkontrollen.

D: Prozentualer Anteil der HLA-DR⁻ Zellen an der jeweiligen CD33⁺CD14⁻ PMN-MDSC und CD33⁺CD14⁺ monozytären Zellpopulation

Angaben als Mittelwerte \pm SEM. Mann-Whitney-Test jeweils bezogen auf Negativkontrolle: * zeigt p < 0,05; ** zeigt p < 0,01; *** zeigt p < 0,001; **** zeigt p < 0,0001; ns zeigt p > 0,05.

3.6.2 IL-1 β

Im Rahmen der verwendeten Konzentrationen scheint die Induktion von PMN-MDSCs linear konzentrationsabhängig (Abb. 17A), ebenso die Induktion der CD33⁺ myeloischen Zellen (Abb. 17B). Der PMN-MDSC Anteil an den CD33⁺ myeloischen Zellen liegt durchgehend bei nahezu 100% (Abb. 17C).

Die Induktion von HLA-DR⁺ PMN-MDSCs zeigt sich ebenfalls linear und in der Konzentration 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ähnlich stark wie bei GM-CSF (Abb. 18C), ihr Anteil an den PMN-MDSC sank jedoch mit zunehmender IL-1 β Konzentration (Abb. 18D). Bei M-MDSCs kommt es bei 0,001 $\mu\text{g/ml}$ zu einer leichten Induktion, bei höheren Dosierungen zu einer schwachen Reduktion (Abb. 18C).

Die CD33 Expression der CD33⁺ myeloischen Zellen lag durchgehend unter der Positivkontrolle mit GM-CSF (Abb. 17D). Eine statistisch relevante Abnahme der durchschnittlichen HLA-DR Fluoreszenzintensität trat lediglich bei der höchsten Konzentration auf (Abb. 18A), die Werte der niedrigen und mittleren Konzentration entsprechen in etwa denen der Negativkontrollen. Die CXCR4 Expression zeigte keine Veränderungen zur Negativkontrolle (Abb. 18B).

Ergebnisse

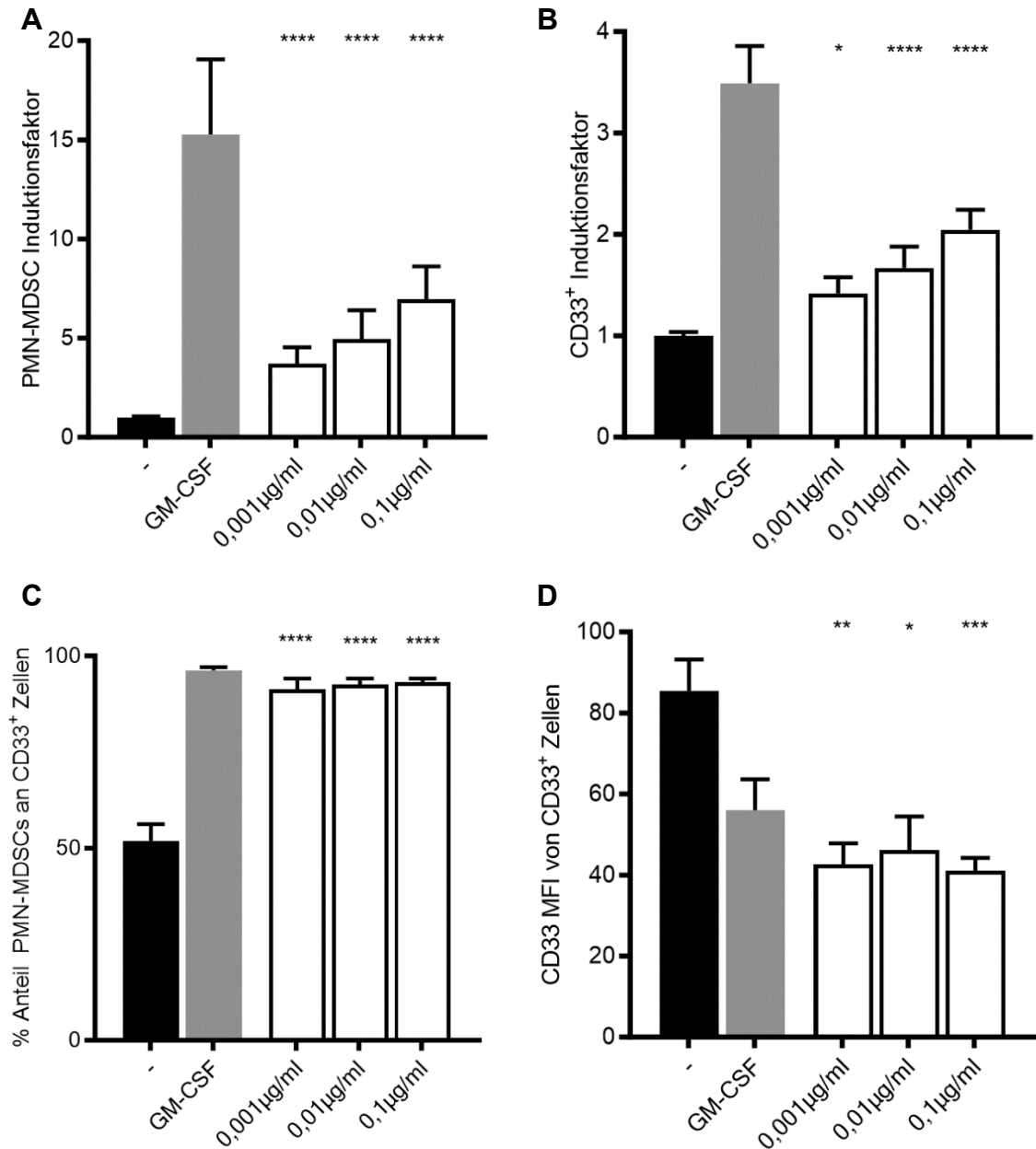


Abb. 17: IL-1 β induziert dosisabhängig PMN-MDSCs

PBMCs aus peripherem Blut von gesunden Probanden wurden für 6-7 Tage jeweils unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61), GM-CSF 0,01 μ g/ml (n = 24) als Positivkontrolle, IL-1 β in aufsteigender Dosis (n = 13 / 13 / 22) kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Induktion der PMN-MDSCs als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der Negativkontrollen.

B: Induktion der CD33⁺ Zellen als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der Negativkontrollen.

C: Anteil der PMN-MDSCs an den CD33⁺ Zellen

D: Durchschnittliche CD33 Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

Angaben als Mittelwerte \pm SEM. Mann-Whitney-Test jeweils bezogen auf Negativkontrolle: * zeigt p < 0,05; ** zeigt p < 0,01; *** zeigt p < 0,001; **** zeigt p < 0,0001.

Abbildung **A** nach Ballbach, Hall et al. 2016 ⁹

Ergebnisse

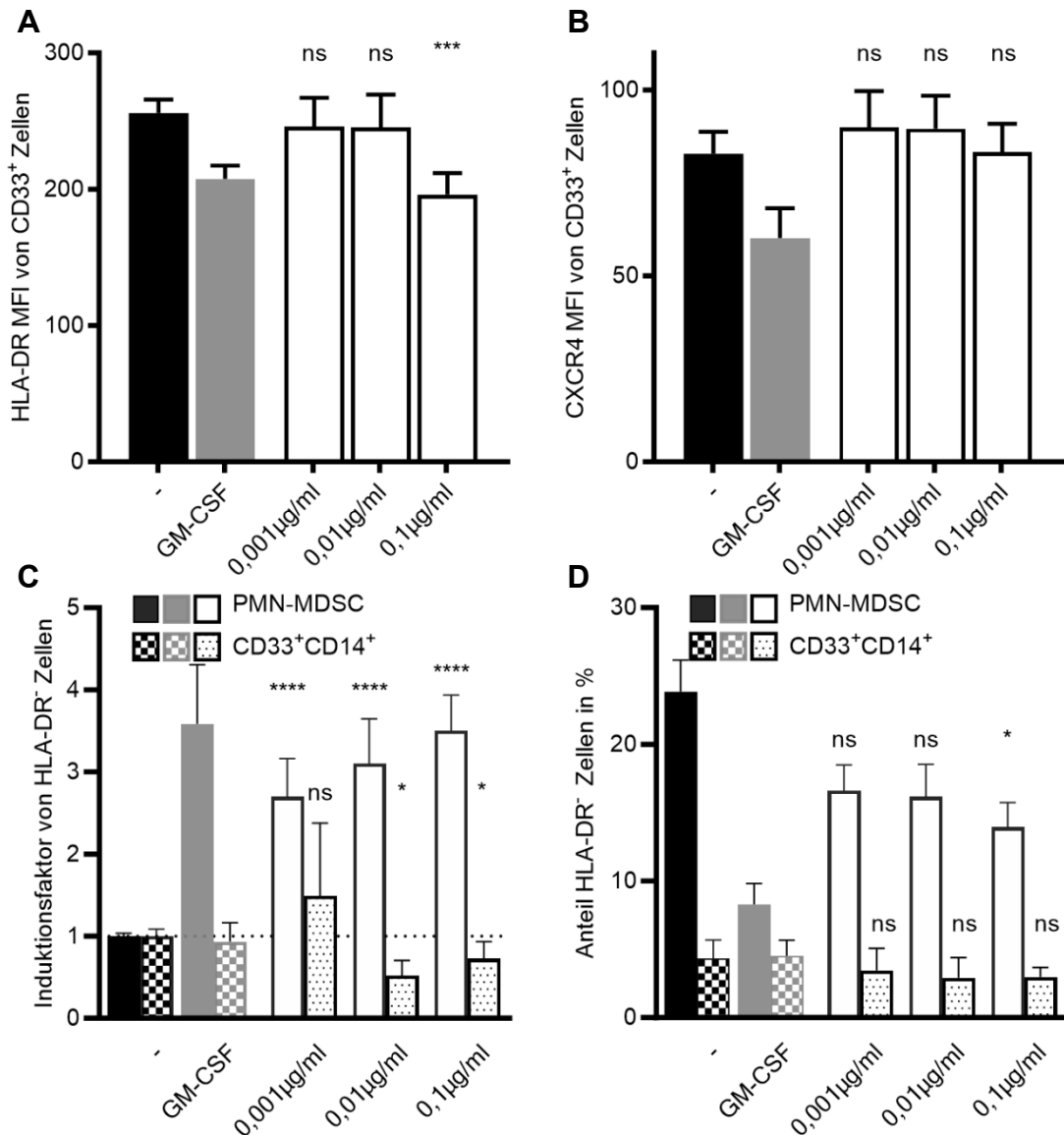


Abb. 18: IL-1 β induziert dosisabhängig HLA-DR⁻ PMN-MDSCs

PBMCs aus peripherem Blut von gesunden Probanden wurden für 6-7 Tage jeweils unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61), GM-CSF 0,01 μ g/ml (n = 24) als Positivkontrolle, IL-1 β in aufsteigender Dosis (n = 13 / 13 / 22) kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Durchschnittliche HLA-DR Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

B: Durchschnittliche CXCR4 Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

C: Induktion der CD33⁺HLA-DR⁻ Zellen aufgeschlüsselt nach CD33⁺CD14⁻HLA-DR⁻ PMN-MDSC und CD33⁺CD14⁺HLA-DR⁻ M-MDSC Subpopulationen, jeweils als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der entsprechenden Negativkontrollen.

D: Prozentualer Anteil der HLA-DR⁻ Zellen an der jeweiligen CD33⁺CD14⁻ PMN-MDSC und CD33⁺CD14⁺ monozytären Zellpopulation

Angaben als Mittelwerte \pm SEM. Mann-Whitney-Test jeweils bezogen auf Negativkontrolle: * zeigt p < 0,05; ** zeigt p < 0,01; *** zeigt p < 0,001; **** zeigt p < 0,0001; ns zeigt p > 0,05.

3.6.3 IL-18

Analog zu IL-1 α und IL-1 β induziert IL-18 konzentrationsabhängig PMN-MDSCs (Abb. 19A). Bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ kommt es auch zur Induktion von HLA-DR⁺ PMN-MDSCs (Abb. 20C), der Anteil letzterer steigt wie bei IL-1 α und im Gegensatz zu IL-1 β mit steigender IL-18 Konzentration. Die CD33, HLA-DR und CXCR4 Expressionscharakteristik ähnelt deren von IL-1 β stimulierten Zellen (Abb. 19D, Abb. 20A&B). Eine Reduktion von M-MDSCs tritt erst bei 0,1 $\mu\text{g/ml}$ kaum auf (Abb. 20C).

Ergebnisse

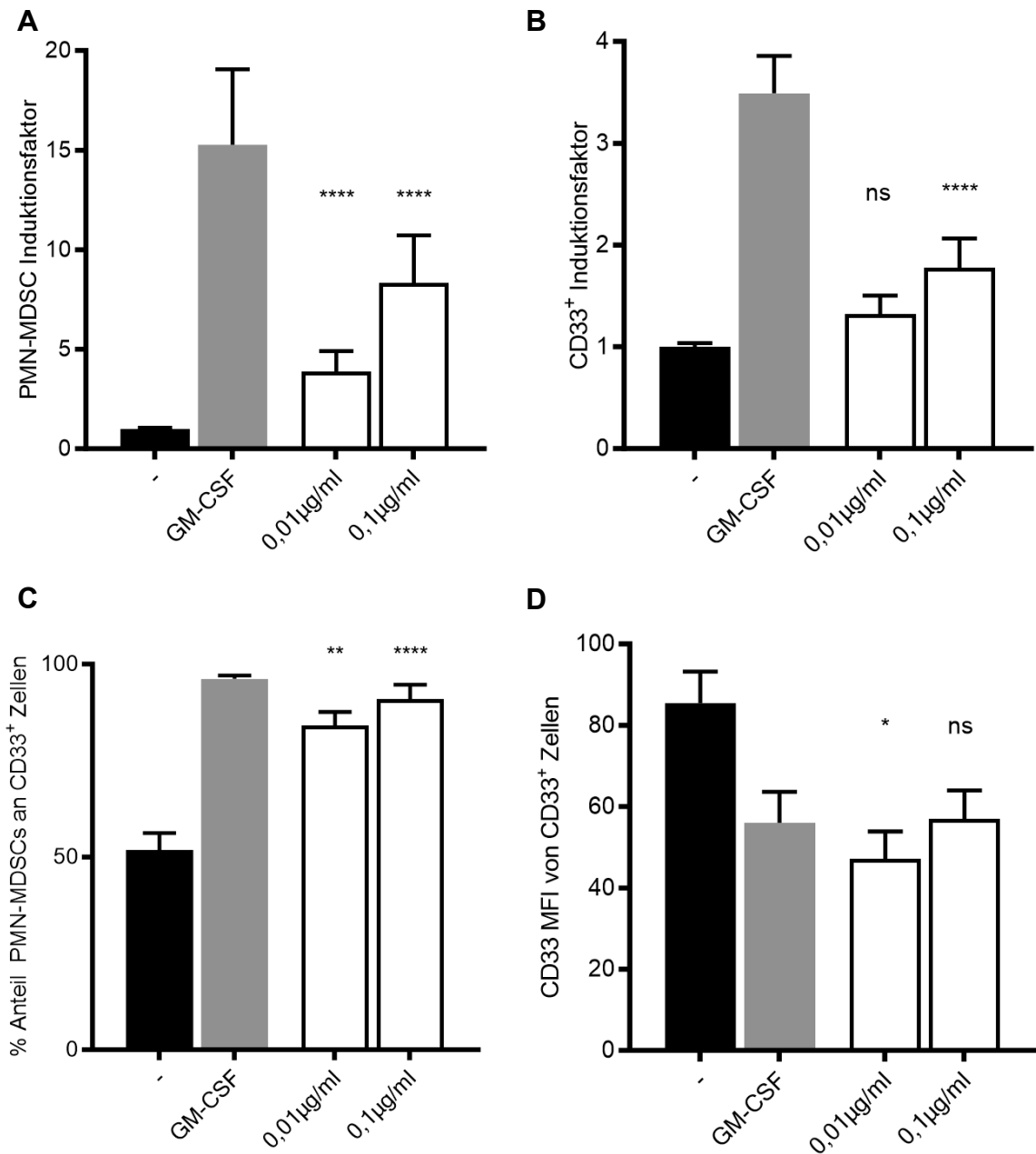


Abb. 19: IL-18 induziert dosisabhängig PMN-MDSCs

PBMCs aus peripherem Blut von gesunden Probanden wurden für 6-7 Tage jeweils unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61), GM-CSF 0,01 µg/ml (n = 24) als Positivkontrolle, IL-18 in aufsteigender Dosis (n = 13 / 18) kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Induktion der PMN-MDSCs als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der Negativkontrollen.

B: Induktion der CD33⁺ Zellen als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der Negativkontrollen.

C: Anteil der PMN-MDSCs an den CD33⁺ Zellen

D: Durchschnittliche CD33 Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

Angaben als Mittelwerte ± SEM. Mann-Whitney-Test jeweils bezogen auf Negativkontrolle: * zeigt p < 0,05; ** zeigt p < 0,01; **** zeigt p < 0,0001; ns zeigt p > 0,05.

Abbildung A nach Ballbach, Hall et al. 2016⁹

Ergebnisse

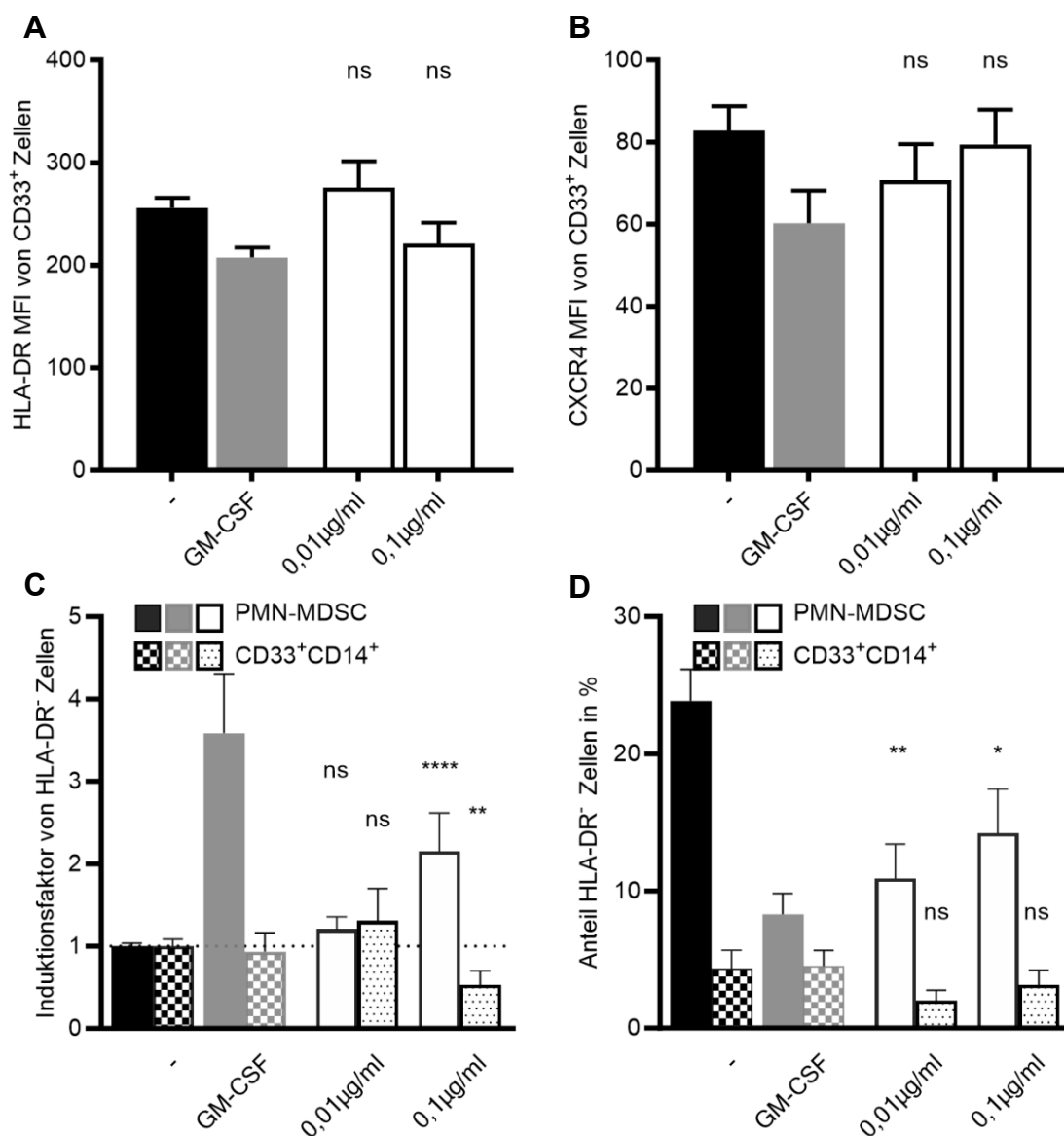


Abb. 20: IL-18 induziert dosisabhängig schwach HLA-DR⁻ PMN-MDSCs

PBMCs aus peripherem Blut von gesunden Probanden wurden für 6-7 Tage jeweils unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61), GM-CSF 0,01 µg/ml (n = 24) als Positivkontrolle, IL-18 in aufsteigender Dosis (n = 13 / 18) kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Durchschnittliche HLA-DR Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

B: Durchschnittliche CXCR4 Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

C: Induktion der CD33⁺HLA-DR⁻ Zellen aufgeschlüsselt nach CD33⁺CD14⁻HLA-DR⁻ PMN-MDSC und CD33⁺CD14⁺HLA-DR⁻ M-MDSC Subpopulationen, jeweils als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der entsprechenden Negativkontrollen.

D: Prozentualer Anteil der HLA-DR⁻ Zellen an der jeweiligen CD33⁺CD14⁻ PMN-MDSC und CD33⁺CD14⁺ monozytären Zellpopulation

Angaben als Mittelwerte ± SEM. Mann-Whitney-Test jeweils bezogen auf Negativkontrolle: * zeigt p < 0,05; ** zeigt p < 0,01; **** zeigt p < 0,0001; ns zeigt p > 0,05.

3.6.4 IL-33

IL-33 zeigt für alle Konzentrationen nur geringfügige Induktionen der PMN-MDSCs (Abb. 21A), am höchsten fällt diese bei der niedrigsten Konzentration aus. Bei Betrachtung der Induktion von myeloischen CD33⁺ Zellen (Abb. 21B) kommt es ebenfalls zu einer Induktion welche mit weniger als dem 1,5-Fachen gering ausfällt.

Der Anteil der PMN-MDSCs bleibt bei allen Konzentrationen nur leicht über dem der Negativkontrollen (Abb. 21C). Eine Induktion von HLA-DR⁻ PMN-MDSCs bleibt aus (Abb. 22C).

Die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten von HLA-DR und CXCR4 entsprechen denen der Negativkontrolle (Abb. 22A&B), bei CD33 ist eine leichte konzentrationsabhängige lineare Abnahme der Expression zu beobachten (Abb. 21D).

Ergebnisse

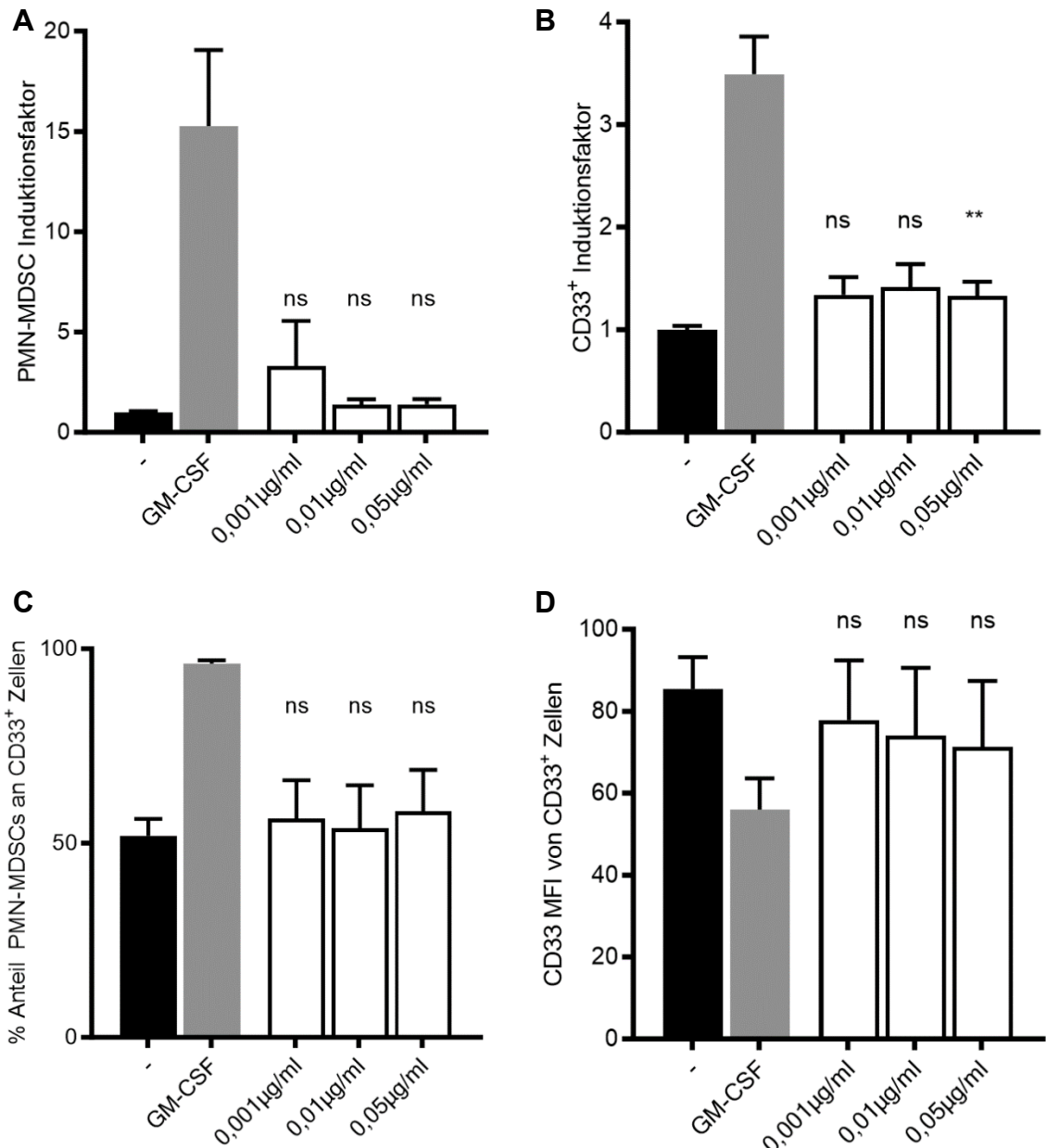


Abb. 21: IL-33 zeigt kaum Effekt auf PMN-MDSCs oder CD33⁺ Zellpopulationen

PBMCs aus peripherem Blut von gesunden Probanden wurden für 6-7 Tage jeweils unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61), GM-CSF 0,01 µg/ml (n = 24) als Positivkontrolle, IL-1β in aufsteigender Dosis (n = 13 / 12 / 12) kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Induktion der PMN-MDSCs als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der Negativkontrollen.

B: Induktion der CD33⁺ Zellen als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der Negativkontrollen.

C: Anteil der PMN-MDSCs an den CD33⁺ Zellen

D: Durchschnittliche CD33 Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

Angaben als Mittelwerte ± SEM. Mann-Whitney-Test jeweils bezogen auf Negativkontrolle: ** zeigt p < 0,01; ns zeigt p > 0,05.

Abbildung **A** nach Ballbach, Hall et al. 2016⁹

Ergebnisse

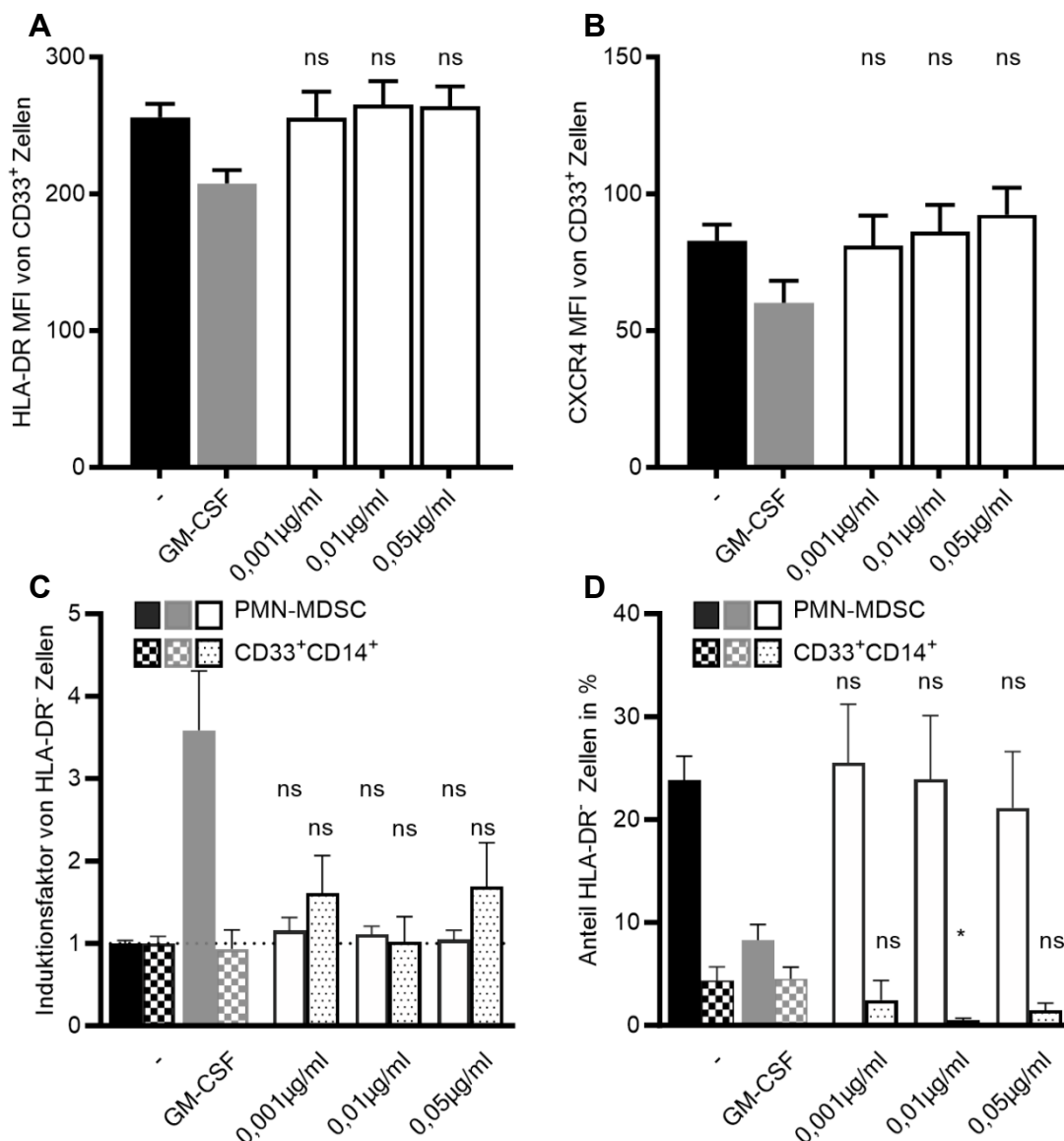


Abb. 22: IL-33 zeigt keinen Effekt auf HLA-DR⁺ PMN-MDSCs

PBMCs aus peripherem Blut von gesunden Probanden wurden für 6-7 Tage jeweils unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61), GM-CSF 0,01 µg/ml (n = 24) als Positivkontrolle, IL-1β in aufsteigender Dosis (n = 13 / 12 / 12) kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Durchschnittliche HLA-DR Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

B: Durchschnittliche CXCR4 Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

C: Induktion der CD33⁺HLA-DR⁻ Zellen aufgeschlüsselt nach CD33⁺CD14⁻HLA-DR⁻ PMN-MDSC und CD33⁺CD14⁺HLA-DR⁻ M-MDSC Subpopulationen, jeweils als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der entsprechenden Negativkontrollen.

D: Prozentualer Anteil der HLA-DR⁻ Zellen an der jeweiligen CD33⁺CD14⁻ PMN-MDSC und CD33⁺CD14⁺ monozytären Zellpopulation

Angaben als Mittelwerte ± SEM. Mann-Whitney-Test jeweils bezogen auf Negativkontrolle: * zeigt p < 0,05; ns zeigt p > 0,05.

3.6.5 Interleukine der IL-1 Familie im Vergleich

Bei Vergleich der einzelnen Interleukine der IL-1 Familie zeigt sich bei höchster Konzentration der Interleukine (IL-1 α /1 β /18 mit 0,1 μ g/ml, IL-33 mit 0,05 μ g/ml) die stärkste Induktion von PMN-MDSCs durch IL-1 α (> IL-18 > IL-1 β >> IL-33) (Abb. 23A). Diese liegt jedoch deutlich unterhalb derer der Positivkontrolle mit GM-CSF. Die Induktion der gesamten CD33⁺ myeloischen Zellen war ebenfalls am stärksten bei IL-1 α (> IL-1 β > IL-18 > IL-33) (Abb. 23B).

Der höchste Anteil an PMN-MDSCs an den CD33⁺ myeloischen Zellen wurde bei IL-1 α (> IL-1 β > IL-18 >> IL-33) gemessen (Abb. 23C).

Die deutlich stärkste Induktion von HLA-DR⁺ PMN-MDSCs ergab sich bei IL-1 α (> IL-1 β > IL-18), IL-33 zeigte hier keinen Effekt (Abb. 24C). Der Anteil der HLA-DR⁺ Zellen an den PMN-MDSCs lag bei allen Interleukinen der IL-1 Familie deutlich oberhalb der GM-CSF Positivkontrolle (Abb. 24D). Parallel kam es vor allem bei IL-1 α (> IL-18 > IL-1 β) zu einer deutlichen Reduktion der M-MDSC Zellpopulation (Abb. 24C).

Die durchschnittliche CD33 Fluoreszenzintensität (MFI) wurde durch alle Interleukine im Vergleich zur Negativkontrolle zumindest leicht reduziert (Abb. 23D). Die niedrigste CD33 MFI wurde für IL-1 α (< IL-1 β < IL-18 < IL-33) gemessen. IL-1 α und IL-1 β lagen dabei unter der Positivkontrolle, IL-18 entsprach dieser in etwa.

Die durchschnittliche HLA-DR Fluoreszenzintensität (MFI) wurde durch alle Interleukine bis auf IL-33 im Vergleich zur Negativkontrolle reduziert (Abb. 24A). Die niedrigste HLA-DR MFI wurde für IL-1 α (<= IL-1 β < IL-18) gemessen. Einzig IL-1 α führte zu einer Reduktion der CXCR4 Expression in etwa auf das Niveau der Positivkontrolle (Abb. 24B).

Ergebnisse

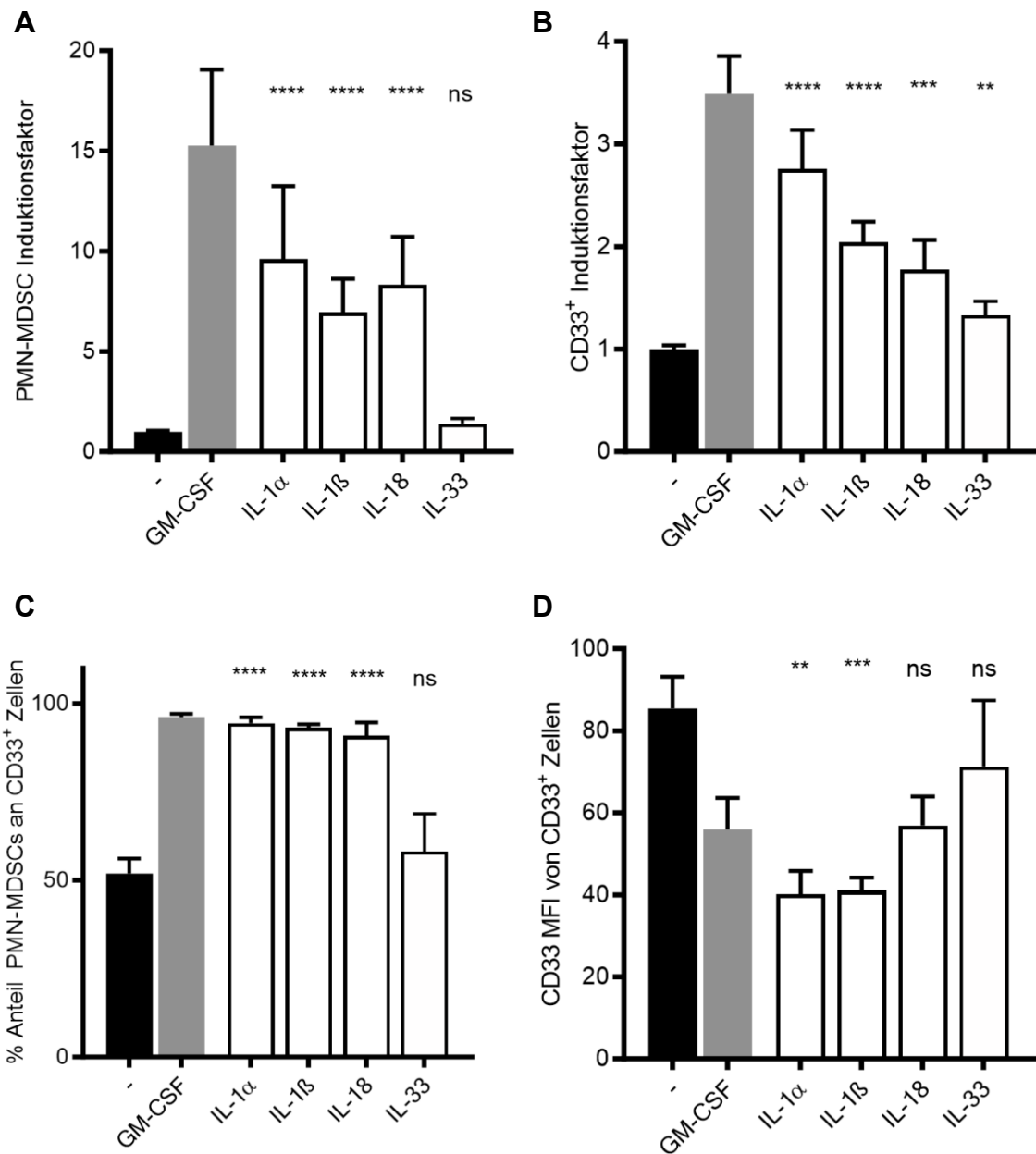


Abb. 23: Vergleich des Einflusses der Interleukine der IL-1 Familie auf PMN-MDSCs

PBMCs aus peripherem Blut von gesunden Probanden wurden für 6-7 Tage jeweils unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61), GM-CSF 0,01 $\mu\text{g/ml}$ (n = 24) als Positivkontrolle oder jeweils 0,1 $\mu\text{g/ml}$ von IL-1 α (n = 8), IL-1 β (n = 22), IL-18 (n = 18) oder 0,05 $\mu\text{g/ml}$ IL-33 (n = 12) kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Induktion der PMN-MDSCs als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der Negativkontrollen.

B: Induktion der CD33⁺ Zellen als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der Negativkontrollen.

C: Anteil der PMN-MDSCs an den CD33⁺ Zellen

D: Durchschnittliche CD33 Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

Angaben als Mittelwerte \pm SEM. Mann-Whitney-Test jeweils bezogen auf Negativkontrolle: ** zeigt p < 0,01; **** zeigt p < 0,0001; ns zeigt p > 0,05.

Abbildung A nach Ballbach, Hall et al. 2016⁹

Ergebnisse

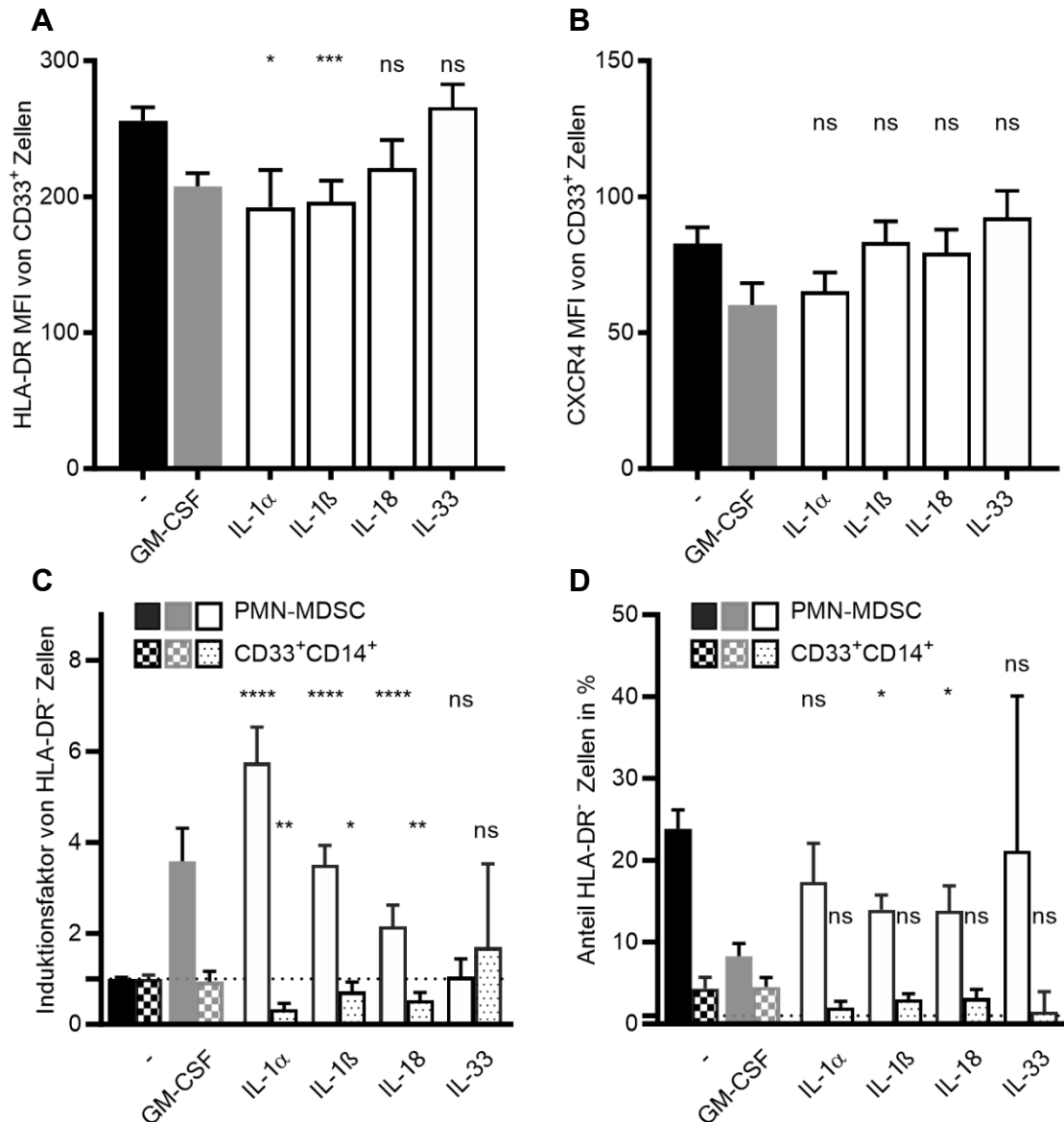


Abb. 24: Vergleich des Einflusses der Interleukine der IL-1 Familie auf HLA-DR⁻ PMN-MDSCs

PBMCs aus peripherem Blut von gesunden Probanden wurden für 6-7 Tage jeweils unter Zugabe von Medium als Negativkontrolle (-) (n = 61), GM-CSF 0,01 μ g/ml (n = 24) als Positivkontrolle oder jeweils 0,1 μ g/ml von IL-1 α (n = 8), IL-1 β (n = 22), IL-18 (n = 18) oder 0,05 μ g/ml IL-33 (n = 12) kultiviert und deren Zusammensetzung anschließend mittels FACS analysiert.

A: Durchschnittliche HLA-DR Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

B: Durchschnittliche CXCR4 Fluoreszenz-Intensität (MFI) der CD33⁺ Zellpopulation

C: Induktion der CD33⁺HLA-DR⁻ Zellen aufgeschlüsselt nach CD33⁺CD14⁻HLA-DR⁻ PMN-MDSC und CD33⁺CD14⁺HLA-DR⁻ M-MDSC Subpopulationen, jeweils als Faktor auf den normalisierten Mittelwert der entsprechenden Negativkontrollen.

D: Prozentualer Anteil der HLA-DR⁻ Zellen an der jeweiligen CD33⁺CD14⁻ PMN-MDSC und CD33⁺CD14⁺ monozytären Zellpopulation

Angaben als Mittelwerte \pm SEM. Mann-Whitney-Test jeweils bezogen auf Negativkontrolle: * zeigt p < 0,05; ** zeigt p < 0,01; *** zeigt p < 0,001; **** zeigt p < 0,0001; ns zeigt p > 0,05.

3.7 Immunsuppression durch von Interleukinen der IL-1 Familie induzierten PMN-MDSCs

Zur Demonstration der immunsuppressiven Wirkung der durch Interleukine der IL-1 Familie induzierten PMN-MDSCs wurde ein CFSE Proliferationsassay durchgeführt (vgl. 3.3).

Es zeigen sich ähnlich ausgeprägte, immunsuppressive Eigenschaften bei den durch Interleukine der IL-1 Familie (IL-1 α , IL-1 β , IL-18) induzierten MACS-sortierten CD33⁺ Zellen (Abb. 25). Die Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen ist im Vergleich zu, Kontrollansatz ohne zugesetzte Zellen stark vermindert. Die antiproliferative Wirkung ist dosisabhängig und etwas stärker im Vergleich zur Positivkontrolle mit GM-CSF. Die stärkste T-Zell suppressive Wirkung ist bei IL-18 und IL-1 α zu beobachten.

Auf Grund der geringen Anzahl an Datenpunkten erreichen IL-1 β und GM-CSF bei den CD4⁺ Zellen im Mann-Whitney-Test - bei Vergleich der T-Zellsuppression durch 1:2 CD33⁺ Zellen aus stimulierten und unstimulierten Proben - keine statistische Signifikanz.

Auf eine Untersuchung der suppressiven Wirkung von durch IL-33 induzierten CD33⁺ Zellen wurde verzichtet. Auf Grund der geringen Induktion von PMN-MDSCs durch IL-33 waren nur wenige CD33⁺ zu isolieren. Bei einem zudem geringen Anteil der PMN-MDSCs an den CD33⁺ myeloischen Zellen in den IL-33 Stimulationsansätzen würden die MACS sortierten CD33⁺ Zellen zudem nur einen geringen Anteil gesicherter (PMN-)MDSCs enthalten.

Ergebnisse

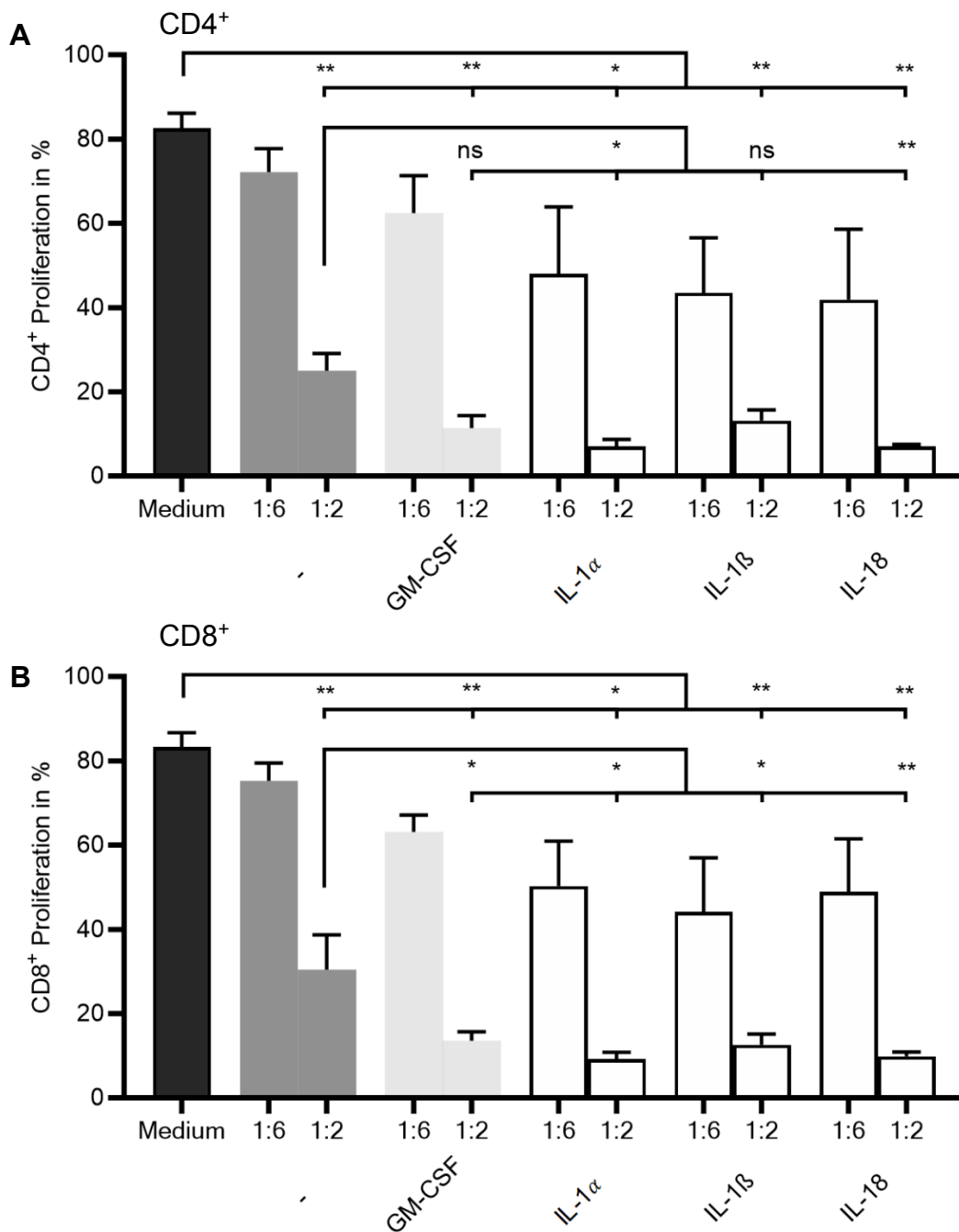


Abb. 25: T-Zell-Hemmung durch, von Interleukinen der IL-1 Familie induzierten, PMN-MDSCs

Dargestellt ist die Proliferationsrate von CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten nach Stimulation von 60.000 Target-PBMCs von gesunden Probanden mit IL-2 und OKT3. Die Target-PBMCs wurden entweder mit Medium (Basis, n = 8) oder 10.000 (Verhältnis 1:6) beziehungsweise 30.000 (Verhältnis 1:2) MACS sortierten CD33⁺ Zellen aus Stimulationsansätzen von Buffy Coat PBMCs für 96 Stunden kultiviert. Diese waren entweder ohne Stimulans als Negativkontrolle (n = 5) oder mit GM-CSF 0,01 μ g/ml (n = 4), IL-1 α 0,1 μ g/ml (n = 3), IL-1 β 0,1 oder 0,01 μ g/ml (n = 4), IL-18 0,1 μ g/ml (n = 4) für 6-7 Tage kultiviert worden.

A: Proliferationsrate der CD4⁺ T-Lymphozyten

B: Proliferationsrate der CD8⁺ T-Lymphozyten

Angaben als Mittelwerte \pm SEM. Mann-Whitney-Test: * zeigt p < 0,05; ** zeigt p < 0,01; ns zeigt p > 0,05.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Ursache für das vermehrte Auftreten von PMN-MDSCs in peripheren Blut von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom²¹⁴ nachgegangen. Es konnte gezeigt werden, dass Interleukine der IL-1 Familie, welche eine zentrale Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung einnehmen, starke Induktoren der PMN-MDSCs sind. Außerdem zeigte sich *in vitro* eine Induktion von PMN-MDSCs bei Co-Kultur mit PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom.

4.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung von *in vitro* kultivierten MDSCs in der Negativ- und Positivkontrolle

4.1.1 Negativkontrollen durch unstimulierte PBMCs von gesunden Probanden

Bei den Negativkontrollen (ohne Stimulanz für 6-7 Tage kultivierte PBMCs) zeigte sich ein inhomogenes Verhalten Zellpopulationen CD33⁺ myeloischer Zellen mit großer Streubreite bezüglich der Größe der Zellpopulation sowie der Expression von CD33 und CD14. Dabei kam es bei gleichen Spendern, zu unterschiedlichen Zeitpunkten, insbesondere bei der CD14 Expression zu Schwankungen. Entsprechend sind die Zellpopulationen meist dominant den PMN-MDSCs (CD33⁺CD14⁻) und monozytärer Zellen (CD33⁺CD14⁺) zuzurechnen. Letztere beinhalten auch M-MDSCs (CD33⁺CD14⁺HLA-DR⁻) deren Anteil mit unter 10% aber meist gering ausfällt. Zudem fällt eine interindividuelle Varianz auf. Die Beobachtung der Entstehung von CD33⁺CD14⁺ Zellen in unstimuliert kultivierten PBMCs wurde bereits in der Arbeit von Lechner *et al.*³⁷ und durch Michael Ost¹⁵ beschrieben. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse einer Studie von Grützner *et al.*²²⁸ zur Frequenz von G- (veraltete Bezeichnung für PMN-MDSCs) und M-MDSCs in isolierten PBMCs in Abhängigkeit der Dauer nach Blutentnahme und Isolierung der PBMCs. Hier zeigte sich eine rasche Abnahme der M-MDSC Frequenz nach wenigen Stunden während die G-/PMN-MDSC Frequenz über Nacht stabil blieb. Bei vergleichbarer Isolierung der PBMCs wurden die Proben

hier jedoch nicht von Gesunden, sondern von HIV-Erkrankten oder Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren gewonnen. Die initial bestimmte MDSC-Frequenz ist daher vermutlich auf Grund Stimulation im Rahmen inflammatorischer Prozesse im Vergleich zu Gesunden erhöht und die isolierten PBMCs könnten aktiviert sein und auch *in vitro* zusätzlich pro-inflammatorische Mediatoren freisetzen welche G-/PMN-MDSCs induzieren.

Die PMN-MDSC Zellpopulationen zeigten sowohl in Negativ- als auch Positivkontrolle beziehungsweise Stimulationsexperimenten eine geringere CD33 Expression als monozytären Zellpopulationen. Die Population der PMN-MDSCs wurde daher häufig durch die horizontale Trennlinie der CD33 Expression des Quadranten-Gatings geteilt, weshalb die Gates näher um den Autofluoreszenzstreifen angepasst werden mussten (vgl. 3.1.2). Diese Beobachtung entspricht der heute geläufigen Definition von PMN-MDSCs mit grenzwertiger CD33 Expression - auch CD33^{dim} genannt - und den M-MDSCs als CD33⁺ ²²⁴.

4.1.2 Positivkontrollen der Induktion von PMN-MDSCs mittels *in vitro* GM-CSF Stimulation

Als Referenz und Positivkontrolle für die folgenden Untersuchungen erfolgte eine Stimulation der PBMCs durch GM-CSF mit 0,01 µg/ml. Die Stimulation von MDSCs durch GM-CSF ist wissenschaftlich bereits gut belegt^{15,37,229}. Somit konnte die angepasste Auswertungsmethode verifiziert (vgl. 3.1.2) werden.

Durch GM-CSF Stimulation zeigte sich eine deutliche Induktion der CD33⁺ myeloischen Zellen um das durchschnittlich 3,4-Fache im Vergleich zu den unstimulierten Proben.

Bereits im Dot-Blot des FACS fiel bei GM-CSF Stimulation auf, dass fast nur noch Zellen in einer stark ausgeprägten Zellpopulation der PMN-MDSCs zu finden waren. Wird die Induktion der PMN-MDSCs und monozytären Zellen einzeln bewertet, kommt es bei den PMN-MDSCs zu einer circa 15-fachen Induktion während die monozytären Zellen eine negative Induktion erfahren. Dieser Effekt

lässt sich durch Betrachtung des Anteils der PMN-MDSC Fraktion an den myeloischen CD33⁺ Zellen unterstreichen. Nach GM-CSF Stimulation beträgt die PMN-MDSC Fraktion nahezu 100% während sie bei den Negativkontrollen im Mittel 50% ausmacht.

Dies steht im Kontrast zu der Beobachtung von CD14⁺HLA-DR^{low} M-MDSCs in GM-CSF reichem peripheren Blut von Patienten mit hochgradigen Gliomen²³⁰ oder nach GM-CSF haltiger Tumorstimulation (tumorspezifische HSP basiert) bei Melanom Patienten²³¹. Letztere Beobachtung könnte jedoch auf INF- α als weiteren Inhaltsstoff der Vakzinierung zurückzuführen sein. Bei Melanom Patienten wurde eine reduzierte Granulozyten- sowie MDSC-Fraktion nach Therapie mit INF- α nachgewiesen²³².

Durch Stimulation mit GM-CSF kam es auch zu einer Abnahme der Expression von HLA-DR sowie CXCR4 bei den myeloischen CD33⁺ Zellen.

Die CXCR4 Expression wurde auf Grund von Studien zum Einfluss des CXCR4 Rezeptors, wie beispielsweise der CXCL12-CXCR4 abhängigen Akkumulation von MDSCs bei Ovarialkarzinomen³⁴, bestimmt. In der vorliegenden Arbeit konnten keine statistisch relevanten Abweichungen in den Stimulationsversuchen nachgewiesen werden, weshalb dieser Marker im Folgenden nicht weiter diskutiert wird.

4.1.3 T-Zell suppressive Funktion von durch GM-CSF *in vitro* stimulierten MDSCs

Im CFSE-Proliferationsassay zeigten die MACS sortierten CD33⁺ myeloischen Zellen aus mit GM-CSF stimulierten Buffy Coat PBMCs eine im Vergleich zur Negativkontrolle ausgeprägtere sowie zur Dosis proportional zunehmende Hemmung der Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. Hiermit konnte gezeigt werden, dass es sich bei den MACS-isolierten beziehungsweise im FACS nachgewiesenen CD33⁺ Zellen um MDSCs handelt.

Zu bemerken ist jedoch auch die Hemmung der T-Lymphozyten durch CD33⁺ Zellen aus unstimulierten Proben. Die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit

entsprechen denen von Michael Ost¹⁵. Obwohl die Kultivierung, Isolierung der CD33⁺ Zellen und der Proliferationsassay vergleichbar zu der Studie von Lechner *et al.*³⁷ durchgeführt wurde, konnte von Lechner *et al.* keine Inhibition der T-Zellen durch CD33⁺ Zellen aus unstimulierten PBMCs nachgewiesen werden. Ein Grund für die Abweichung könnte die Verwendung von Buffy-Coat in der vorliegenden Arbeit (und Michael Ost's Arbeit¹⁵) anstatt frisch entnommenem venösen Blut bei Lechner *et al.*³⁷ sein. Durch eine abweichende Isolation und vor allem deutlich längere Dauer zwischen venöser Blutabnahme und Verarbeitung in Zellkulturmedium könnten inflammatorische und MDSC stimulierende Prozesse bedingen.

Eine zusätzliche Limitation der Methode kann aus der Zugabe der numerisch gleichen Anzahl isolierter CD33⁺ Zellen aus den jeweiligen Ansätzen resultieren. Die relative Induktion von CD33⁺ Zellen wird dabei nicht berücksichtigt. Michael Ost diskutiert auch den Einfluss der Zytokine des im Kulturmedium befindlichen fetalen Kälberserums auf die MDSCs¹⁵.

Die im Vergleich zur unstimulierten Probe stärker ausgeprägte Hemmung durch die GM-CSF stimulierten MDSCs konnte ebenso durch Lechner *et al.*³⁷ beobachtet werden. Sie ist vermutlich durch eine aktivierende Wirkung von GM-CSF in MDSCs begründet auf welche in 4.3.1 genauer eingegangen wird.

4.2 MDSCs bei CAPS Patienten

Wie oben beschrieben hat unsere Arbeitsgruppe eine erhöhte Frequenz von MDSCs im peripheren Blut von Patienten mit MWS nachweisen können⁹.

4.2.1 IL-1 β Konzentration in Zellkulturüberständen von Proben von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom

Zur Überprüfung der tatsächlich durch PBMCs von Patienten mit MWS ausgeschütteten IL-1 β Menge in einer *in vitro* Kultivierung, wurden die Überstände der Zellkulturen auf deren IL-1 β Konzentration untersucht.

Bereits in der unstimulierten Negativkontrolle eines Patienten mit MWS zeigte sich eine nachweisbare Menge IL-1 β . In den GmCSF stimulierten Proben von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom konnten bereits bei zwei der drei Patienten IL-1 β nachgewiesen werden, während bei gesunden Probanden in beiden Fällen kein IL-1 β nachweisbar war.

Durch Zugabe von LPS als Induktor der Expression des Inflammasomes¹²¹ kam es bei den Proben von Patienten mit MWS sowie gesunden Probanden zu einem deutlichen Anstieg der Sekretion von IL-1 β . Dabei lag die Konzentration in den Proben von Patienten mit MWS mit circa 2500 pg/ml mehr als dreifach höher als in den Proben von gesunden Probanden. Diese Beobachtungen bestätigen die zu erwartende erhöhte spontane Aktivität des Inflammasoms in PBMCs von Patienten mit MWS im stimulierten sowie unstimulierten Zustand.

Lachmann *et al.*²¹³ ermittelten für Patienten mit MWS eine circa 5-fach höhere IL-1 β Produktion im Vergleich zu gesunden Probanden.

4.2.2 Induktion von PMN-MDSCs in Co-Kultur mit PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die erhöhten PMN-MDSC Frequenzen im Blut von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom (MWS) durch den Pathomechanismus des MWS bedingt ist, wurde eine Co-Zellkultur mit PBMCs von gesunden Probanden und separierten Patienten mit MWS durchgeführt.

In der Versuchsreihe zeigte sich eine Induktion von PMN-MDSCs durch Co-Kultur mit PBMCs von Patienten mit MWS. Diese erreichte zwar keine statistische Signifikanz, der Anteil der PMN-MDSCs an den myeloischen Zellen hingegen verdoppelte sich bei der höchsten Anzahl an PMBCs von Patienten mit MWS und war mit einem $p < 0,05$ im Mann-Whitney-Test statistisch signifikant.

Lechner *et al.* konnten für eine große Zahl von soliden Tumorzelllinien eine Induktion von CD33⁺ MDSCs in Co-Kultur mit PBMCs von gesunden Spendern nachweisen²³³. Dabei entsprach die Versuchs-Methodik derjenigen der vorliegenden Arbeit bis auf die direkte Mischung der Tumorzelllinie mit den

PBMCs, statt der Verwendung Zell-dichter *Transwells* in unserem Versuchsaufbau welcher direkten Zellkontakt unterbindet.

Die Limitation dieses Versuchsansatzes liegt in der vermutlich geringen Menge an sezernierten inflammatorischen Mediatoren in der Kulturumgebung. Die höchste im ELISA gemessene IL-1 β Konzentration nach LPS-Stimulation von PBMCs von Patienten mit MWS lag mit ca. 0,0025 $\mu\text{g/ml}$ vielfach niedriger als die der Positivkontrolle (IL-1 β 0,1 $\mu\text{g/ml}$) in den Co-Kultur Experimenten. Somit ist davon auszugehen, dass die effektive IL-1 β Konzentration in den Co-Kulturversuchen (ohne LPS-Stimulation der PBMCs) nochmals deutlich geringer ausgefallen ist.

Auf eine Stimulation mittels LPS im *Transwell*-Versuch wurde verzichtet, da das LPS auch die Zielzellen beeinflusst und damit den isolierten Einfluss sezernierter Faktoren verfälscht hätte.

Die geringe statistische Signifikanz ist durch die begrenzte Verfügbarkeit ausreichender Mengen peripheren Blutes im pädiatrischen Patientenkollektiv mit konsekutiv geringer Versuchsanzahl bedingt.

4.3 Interleukine der IL-1 Familie als MDSC Induktoren

Nach unserem Wissen wurden bis zum Zeitpunkt unserer Publikation (Ballbach, Hall *et al.*, 2016)⁹ sowie dieser Arbeit keine Ergebnisse zur *in vitro* Induktion von humanen MDSCs durch die verschiedenen Interleukine der IL-1 Familie publiziert. Im humanen Umfeld wird meist über Korrelationen von Zytokin-Konzentrationen und der Frequenz von MDSCs im Rahmen von Tumorerkrankungen berichtet. Viele Erkenntnisse werden jedoch zu murinen MDSCs veröffentlicht, welche mittels Knockout-Modellen oder gezielten pharmakologischen Blockaden der Signalwege untersucht werden (nähere Betrachtung im Weiteren).

Diese Arbeit ergänzt die durch Ballbach, Hall *et al.* 2016⁹ publizierten Daten zur Induktion von PMN-MDSCs aus peripher-venös gewonnenen PBMCs durch Stimulation mit IL-1 α , IL-1 β , IL-18 und IL-33 um weitere Aspekte. Sie bestätigt

Diskussion

die in der Fragestellung formulierte Hypothese, dass die vermehrten MDSCs im peripheren Blut von Patienten mit MWS durch Interleukine der IL-1 Familie bedingt sein können. Bei den Patienten kommt es, auf Grund einer Mutation im NLRP3 Inflammasom mit vermehrter Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie insbesondere IL-1 β ²¹³, zu einer Autoinflammation.

Die insgesamt stärkste Induktion von PMN-MDSCs wurde bei IL-1 α beobachtet. Während IL-1 α und IL-1 β in den verwendeten Konzentrationen bis 0,1 $\mu\text{g/ml}$ durchgehend eine konzentrationsabhängige Zunahme der Induktion von PMN-MDSCs zeigten, konnte für IL-18 bei einer Dosis von 1 $\mu\text{g/ml}$ (ergänzende Versuchsreihe siehe Ballbach, Hall *et al.* 2016⁹) eine Abnahme der Induktionsstärke im Vergleich zum Versuch mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt werden. Die Dosis von 1 $\mu\text{g/ml}$ wurde für IL-1 α und IL-1 β nicht untersucht.

Bei IL-33 hingegen fand sich lediglich eine geringfügige Induktion von PMN-MDSCs welche in der niedrigsten untersuchten Konzentration mit 0,001 $\mu\text{g/ml}$ noch am höchsten ausfiel.

Unterschiede der relativen Induktion von MDSCs durch die verschiedenen Interleukine der IL-1 Familie könnten unter anderem auch durch die Instabilität der Proteine im Zellkulturmedium bedingt sein. Cohen *et al.* konnten vor allem für IL-33 eine sehr rasche Oxidation (an 4 freien Cystein-Stellen) in eine inaktive Form nachweisen, wobei innerhalb von 4 Stunden >90% des in Zellkulturmedium gegebenen IL-33 inaktiv waren²³⁴. Dies könnte den geringen Effekt in dem hier verwendeten Versuchsaufbau erklären. Auch eine oxidative Umwandlung von IL-1 β (2 freie Cysteine) und IL-18 (4 freie Cysteine) wurde nachgewiesen²³⁴. IL-1 α (1 freies Cystein) sei davon praktisch nicht betroffen²³⁴. Funktionelle Analysen zu der Aktivität von oxidiertem IL-1 β und IL-18 wurden allerdings nicht durchgeführt²³⁴, weitere Studien zu diesem Thema konnten nicht gefunden werden.

Bei der Stimulation von PBMCs durch die Interleukine der IL-1 Familie fällt die praktisch ausschließliche Induktion von PMN-MDSCs auf. Dies war selbst bei Zellkulturansätzen mit Nachweis einer reinen M-MDSC Population in der

Diskussion

Negativkontrolle zu beobachten. Dieses Verhalten deckt sich nicht nur mit der Induktion von PMN-MDSCs durch Stimulation mit GM-CSF, es unterstreicht auch die These von einer möglichen Änderung des Phänotyps von M-MDSCs hin zu PMN-MDSCs²³⁵.

PMN-MDSCs zeigten im Rahmen von HNO- und urologischen Tumoren eine ausgeprägtere immunsuppressive Wirkung als M-MDSCs. Ihnen wurde daher von Lang et. al. eine höhere klinische Relevanz zugesprochen²³⁶. Zu einer gegensätzlichen Aussage kam eine Studie im Rahmen von Ovarialkarzinomen, welche eine Assoziation von niedriger Anzahl von M-MDSCs im peripheren Blut mit einem verlängerten Überleben darstellt und ihnen daher die höhere klinische Relevanz zuspricht²³⁷. Einflüsse aus dem jeweiligen Tumormilieu könnten diese unterschiedlichen Beobachtungen bedingen (bspw. die bereits bei 4.1.2 diskutierte INF- α assoziierte Reduktion von Granulozyten- sowie MDSC-Fraktionen nach Therapie mit INF- α ²³²).

Es liegen viele Untersuchungen zum Einfluss der Interleukine der IL-1 Familie auf die Induktion und Aktivierung von MDSCs vor, welche häufig variierende, teils konträre Aussagen beinhalten. Auf die einzelnen Interleukine soll in 4.3.2-4.3.5 eingegangen.

Die Erkenntnisse zur Induktion beziehungsweise Frequenz verschiedener MDSC-Populationen in unterschiedlichen pathologischen Umgebungen sind bislang nur schwer vergleichbar. Es werden murine und humane MDSCs jeweils *in vitro/vivo* beobachtet, häufig bei Krebspatienten dargestellt, wobei die Bestimmung der Interleukine und MDSCs aus sehr unterschiedlichen Proben (wie Tumorbett/-umfeld, peripherem Blut, Aszites, Knochenmark) erfolgt.

Besonders hervorzuheben sei hier die Diskrepanz der in dieser Arbeit dargelegten robusten Daten zur *in vitro* Stimulation von PMN-MDSCs aus venösen PBMCs durch die Interleukine IL-1 α , IL-1 β , IL-18 zu der Beobachtung einer ausschließlichen Induktion von M-MDSCs und Abfall des PMN-MDSC Anteils durch GM-CSF und IL-18 Stimulation von murinen Knochenmarkszellen²³⁸ (siehe 4.3.4).

Vor diesem Hintergrund scheint die Induktion der unterschiedlichen MDSC-Populationen multivariant determiniert. Weitere Untersuchungen mit möglichst vergleichbarem Studiendesign und Bestimmung der MDSC-Frequenzen beziehungsweise Interleukin-Konzentrationen aus den verschiedenen Kompartimenten könnten hier für Klarheit sorgen.

Ein entsprechendes Protokoll zur Gewinnung, Isolation und durchflusszytometrischen Phänotypsierung wurde 2020 durch Cassetta *et al.*²³⁹ veröffentlicht. Hier wurden in der multizentrischen Studie Mye-EUNITER Vergleiche der Frequenz der unterschiedlichen MDSCs Subgruppen zwischen gesunden Probanden sowie Patienten mit Tumorerkrankungen (HNO Plattenepithelkarzinome, Mamma-, Colon- Ovarialkarzinome und Melanome) und inflammatorischen Zuständen (Psoriasis, inflammatorische Herz-Kreislauf Erkrankungen, Infektionen durch HIV, HIB, Z.n. Impfungen) untersucht. Neben der Beobachtung stark variierender MDSC-Frequenzen bei gesunden Probanden wird über eine deutlich erhöhte Frequenz von PMN-MDSC bei soliden Tumoren bei geringer Zunahme im Rahmen der untersuchten inflammatorischen Erkrankungen berichtet²³⁹.

Außerdem wurden verschiedene Protokolle zur Isolation der PBMCs auf den Einfluss der Verwendung der Antikoagulantien und Zellseparationsmedien auf den Anteil der nachgewiesenen MDSCs untersucht. Hier zeigte die, in dieser Arbeit verwendete, Kombination aus Heparin und Ficoll den höchsten Anteil nachgewiesener PMN-MDSCs²³⁹.

4.3.1 Immunsuppressive Funktion von durch Interleukine der IL-1 Familie induzierten MDSCs

Im CFSE-Proliferationsassay zeigten aus PBMCs isolierte CD33⁺ MDSCs nach Stimulation mit IL-1 α , IL-1 β und IL-18 eine robuste Suppression der T-Zell Proliferation. Die Suppression fiel im Gegensatz zur Induktion etwas stärker aus als bei durch GM-CSF stimulierten PBMCs, was auf eine Aktivierung der MDSCs durch die erwähnten Interleukine hindeutet.

Condamine und Gabrilovich postulierten 2011 das Zwei-Stufen-Modell für die Akkumulation und anschließende Aktivierung von MDSCs⁴⁶. Dabei wurde GM-CSF als führendes Zytokin für die erste Stufe gesehen. Proinflammatorischen Zytokinen wie dem IL-1 β wurde hauptsächlich eine Rolle in der zweiten Stufe zugeschrieben, wobei auch ein möglicher Einfluss auf die Expansion in einer Publikation von Condamine im Jahr 2015⁶ angesprochen wird (siehe unten).

In unserer Arbeit von Ballbach, Hall *et al.* 2016⁹ konnten wir erstmals sowohl über eine Expansion als auch eine Aktivierung von humanen PMN-MDSCs nach *in vitro* Stimulation mit IL-1 α , IL-1 β und IL-18 berichten.

Die schwächere T-Zell Suppression durch GM-CSF im Vergleich zu den Interleukinen der IL-1 Familie könnte darauf zurückzuführen sein, dass GM-CSF mittels STAT3 vorwiegend proliferativ wirkt^{6,46}. Hierfür soll der Transkriptionsfaktor *CCAAT-enhancer-binding protein beta* (C/EBP) essenziell sein³⁹.

Die Interleukine der IL-1 Familie hingegen vermitteln über die intrazelluläre Rezeptordomäne TIR Signale vor allem über MyD88 und NF- κ B. Diese haben zwar vornehmlich pro-inflammatorisch transkriptionelle Effekte, Nachweise über eine direkte Induktion von MDSCs durch IL-1 β finden sich jedoch auch im Mausmodell^{36,38,62,240}. In Makrophagen konnte eine Induktion von C/EBP auch durch IL-1 β nachgewiesen werden^{241,242}, sodass dieser Weg für den beobachteten proliferativen Effekt der Interleukine der IL-1 Familie verantwortlich sein könnte.

4.3.2 IL-1 α

Für den Einfluss von IL-1 α auf MDSCs lagen bis zum Zeitpunkt der Publikation von Ballbach, Hall *et al.* 2016⁹ keine vergleichbaren wissenschaftlichen Daten vor.

IL-1 α zeigt in den hier dargestellten Untersuchungen den stärksten Effekt auf die Induktion von PMN-MDSCs.

Die nachgewiesene *in vitro* Induktion von PMN-MDSCs durch IL-1 α zeigt eine potenzielle Ursache für die Akkumulation von MDSCs bei Patienten mit Muckle-Wells Syndrom, trotz IL-1 β Blockade mit Canakinumab, auf²¹⁴.

Der pathophysiologische Mechanismus des Muckle-Wells Syndroms lässt zwar primär an erhöhte, direkt von der Aktivität der Caspase-1 abhängige Zytokine wie IL-1 β und IL-18 denken. Für eine Aktivierung von IL-1 α im Rahmen des Muckle-Wells Syndroms könnte jedoch Calpain, welches durch die überaktive Caspase-1 aktiviert wird, verantwortlich sein^{140,243}. Außerdem benötigt IL-1 α im Vergleich zu IL-1 β kein Priming, beispielsweise durch LPS, um in größeren Mengen wirksam zu sein.

Inwieweit IL-1 α , mit seiner lokalen Wirkung, für die erhöhten MDSC-Frequenzen im peripheren Blut ursächlich ist, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht ausreichend beurteilt werden. Zudem erschwert der komplexe Regulationsmechanismus der intrazellulären Verteilung von IL-1 α eine Abschätzung der Relevanz unter den veränderten Bedingungen der Regulation des Inflammasomes im Rahmen des Muckle-Wells Syndrom.

Aufbauend auf dieser Arbeit könnten vergleichende Untersuchungen zwischen Patienten mit Muckle-Wells Syndrom unter Therapie mit Anakinra (IL-1R1 Antagonist welcher hierdurch die Effekte von IL-1 β und IL-1 α hemmt) gegenüber der Therapie mit Canakinumab (spezifischer IL-1 β Antikörper) Aufschluss über diese Frage geben. Des Weiteren könnte eine Untersuchung der Sekretion beziehungsweise membrangebundenen Expression von IL-1 α bei Patienten mit Muckle-Wells Syndrom erfolgen.

4.3.3 IL-1 β

In Mäusen mit IL-1 β sezernierendem Brustkrebs wurden erhöhte Frequenzen von Gr1⁺CD11b⁺ MS(D)Cs³⁶ und eine starke Akkumulation von (PMN-)MDSCs nach subkutaner Applikation IL-1 β bildender Tumorzellen^{36,38} nachgewiesen.

Bei Blutproben von Nierenzellkarzinom-Patienten konnte eine Korrelation von IL-1 β mit der PMN-MDSCs Frequenz im Tumorgewebe dargestellt werden, während eine IL-1 β Hemmung im Mausmodell deren Auftreten reduzierte²⁴⁴. Auch bei COVID-19 Patienten fand sich eine positive Korrelation²⁴⁵.

Bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen wurde hingegen eine Korrelation zwischen der M-MDSC Frequenz im Aszites und im peripheren Blut mit der IL-1 β Konzentration sowie mit dem Tumorstadium und dem Metastasierungsgrad beobachtet²⁴⁶ (Interpretation siehe auch 4.3).

4.3.4 IL-18

Im Kontrast zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde für IL-18 im Mausmodell eine *in vitro* Induktion von M-MDSCs aus Knochenmark-Stammzellen und eine deutlich stärkere suppressive Wirkung auf T-Zellen als bei PMN-MDSCs beschrieben²³⁸. Auch bei intraperitonealer Administration von IL-18 wurden erhöhte M-MDSC Frequenzen im Tumor und Milz bei gleichbleibender PMN-MDSC Frequenz im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen²³⁸.

Im multiplen Myelom Mausmodell wiederum wurde eine, mit der IL-18 Konzentration im Knochenmark positiv korrelierende, PMN-MDSC Induktion und PMN-MDSC Genaktivität im Knochenmark mit daraus folgender Immunsuppression und Krankheitsprogress beobachtet¹⁸³.

4.3.5 IL-33

In unseren *in vitro* Stimulations-Experimenten zeigte sich lediglich eine geringfügige Induktion von PMN-MDSCs durch IL-33. Dies steht im Kontrast zu der Beobachtung einer Induktion und vor allem Aktivierung von PMN-MDSCs im murinen *in vivo* Hauttransplantations Modell²⁴⁷. Im Mausmodell kam es bei ausgeprägter IL-33 Ausschüttung zu einem raschen Tod der Mäuse durch Hyperinflammation¹⁹⁶. In einer Proteom-Analyse von murinen Endothelzellen wurde für extrazelluläres „aktiviertes“ IL-33 eine starke Induktion des NF- κ B Pathways gezeigt welche über den ST2 Rezeptor vermittelt wurde¹⁹⁰. Bezüglich dieser intrazellulären Signalvermittlung wäre ein Effekt auf die MDSCs vergleichbar dem der anderen Interleukine der IL-1 Familie zu erwarten gewesen. Diese Diskrepanz könnte auf die Instabilität von IL-33 (vgl. 4.3) im Zellkulturmedium zurückzuführen sein.

Außerdem könnte der MDSC stimulierende Effekt von IL-33 (welcher von autokriner GM-CSF-Ausschüttung abhängig beschrieben wurde²⁰²) nicht zum Tragen kommen, da die resultierende GM-CSF Konzentration im Kulturmedium zu gering ist.

Die Beteiligung von IL-33 an der erhöhten MDSC Frequenz im peripheren Blut von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom scheint vor dem Hintergrund der Inaktivierung von IL-33 durch die aktivierte Caspase-1 unwahrscheinlich¹⁸⁶.

4.4 Aussichten auf therapeutische Anwendung von MDSCs in Bezug auf das Inflammasom und Eingriffe in die IL-1 Signalwege Achse

Im Rahmen des CAPS kann postuliert werden, dass MDSCs die Rolle einer negativen Rückkopplung der pathologisch erhöhten Inflammationsreaktion darstellen. Möglicherweise bedingen Rückkopplungsmechanismen unter Beteiligung der MDSCs die periodisch auftretende Hyperinflammation bei diesen Erkrankungen und könnten durch (zeitlich) gezielt eingesetzte Immunsuppression gedämpft werden. Da der induzierende Effekt inflammatorischer Zytokine, in diesem Fall Interleukine der IL-1 Familie, auf MDSC vermutlich verzögert auftritt und sich kumulativ auswirkt, könnte die Messung der Frequenz von PMN-MDSCs im peripheren Blut Rückschlüsse auf eine subklinische Krankheitsaktivität geben (ähnlich der HbA1c Bestimmung beim Diabetes mellitus). Hieraus ließen sich Erkenntnisse für eine Anpassung der Immunsuppression ableiten. Abgesehen von der individuellen Bestimmung als Verlaufsparemeter könnten weitere Studien die Auswirkungen verschiedener Medikamente mit Einfluss auf die IL-1 Achse untersuchen.

Interessanterweise werden heutzutage einigen Inhaltsstoffen traditioneller pflanzlicher Therapeutika, Auswirkungen auf die MDSCs zugeschrieben²⁴⁸. Für Curcumin ist eine Hemmung der STAT3 und NF- κ B Transkriptionswege (welche Signale der Interleukin-1 Rezeptoren vermitteln), eine verminderte Akkumulation bei verstärkter Ausdifferenzierung von MDSCs zu reifen myeloischen Zellen beschrieben²⁴⁹.

Diskussion

Für zahlreiche in Anwendung befindliche Zytostatika wurden immunmodulatorische Effekte durch die Hemmung von MDSCs beschrieben (vgl. 1.1.6). Im murinem Nierenzellkarzinommodell konnte durch anti-IL-1 β Antikörper sowohl eine Reduktion von MDSCs als auch ein vermindertes Tumorwachstum erreicht werden²⁴⁴. Die CANTOS Studie zur präventiven Anwendung von Canakinumab bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung konnte nicht nur ein deutlich vermindertes Auftreten von akuten thrombembolischen Ischämien²⁵⁰, sondern auch eine reduzierte Inzidenz und Mortalität des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) nachweisen²⁵¹. Während für zahlreiche Tumore ein tumorigenes Potential von NLRP3-Inflammasom und IL-1 Stoffwechsel gezeigt wurde²⁵², konnte bei Colitis assoziierten Colon-Karzinomen eine protektive Wirkung des NLRP3-Inflammasoms beobachtet werden²⁵³. Trotzdem stellt ein hemmender Eingriff in die Regulation des NLRP3-Inflammasom und der Zytokine der IL-1 Familie mit konsekutiv verminderter MDSC-Induktion/-Expansion eine aussichtsreiche Therapieoption zur Reduktion der Immunsuppression im Tumorumfeld dar.

Einen Hinweis auf einen möglichen therapeutischen Anwendungsbereich der IL-1 β Wirkung auf MDSCs könnte eine Studie von Koehn *et al.* geben. Hier wurde im murinen GvHD-Modell dem IL-1 β sowie den hierdurch aktivierten MDSCs eine wichtige Rolle für das Überleben zugeschrieben²⁵⁴.

Aktuell wird bei GvHD therapeutisch u.a. bereits eine extrakorporale Photophorese durchgeführt. In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass hierdurch bei einigen Patienten die Frequenz von PMN-MDSCs steigt⁹⁰. Möglicherweise können MDSCs in Zukunft direkt mittels Interleukinen der IL-1 Familie extrakorporal *in vivo* induziert und aktiviert werden, um durch deren immunsuppressive Wirkung die kritische Phase der GvHD abzuschwächen.

Ein therapeutischer Eingriff in die Regulation von MDSCs könnte jedoch weitreichende Folgen haben und sollte gut kontrolliert und zunächst im

Tierversuch untersucht werden. In einer prospektiven Studie wurden bei Patienten nach Nierentransplantationen eine erhöhte Anzahl von M-MDSCs im peripheren Blut 14 Tage nach Transplantation mit einer deutlich erhöhten Rate von Malignomen in den ersten 2 Jahren nach der Transplantation beobachtet. Umgekehrt korrelierte eine niedrige Anzahl von M-MDSCs mit einer stärkeren Abstoßungsreaktion. Dabei war die Frequenz von M-MDSC vor Transplantation mit der von gesunden Probanden vergleichbar gewesen²⁵⁵.

4.5 Ausblick auf weitere Forschungsaspekte

Zusammenfassend konnten unsere Daten zu einem besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen erhöhter NLRP3-Aktivität, damit verbunden erhöhter Sekretion proinflammatorischer Zytokine der IL-1 Familie und dem vermehrten Auftreten von PMN-MDSCs beitragen. Im Weiteren könnten diese Ergebnisse mittels spezifischer Blockade der einzelnen Interleukine in einem ähnlichen Versuchsansatz oder in-vivo näher untersucht werden. Für letztere Untersuchung würde sich ein Vergleich der MDSC-Frequenz im peripheren Blut von CAPS Patienten unter der Therapie mit dem spezifischen IL-1 β blockierenden Canakinumab oder dem IL-1R blockierenden Anakinra eignen.

Um eine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Studien zu ermöglichen sollte die Bestimmung von MDSCs aus peripherem Blut zukünftig bestenfalls auf einer einheitlichen Methodik basieren. Eine derartige standardisierte Methode wurde beispielsweise 2020 von Cassetta *et al.*²³⁹ publiziert (siehe auch 4.3).

5 Zusammenfassung

Vorarbeiten konnten bei Patienten mit Muckle-Wells Syndrom (MWS), einer autoinflammatorischen Erkrankung mit chronischer erhöhter IL-1 Sekretion, trotz wirksamer anti-IL-1 β Therapie erhöhte Frequenzen von PMN-MDSCs nachweisen. Ziel dieser Arbeit war es nun *in vitro* den Einfluss der wichtigsten Interleukine der IL-1 Familie auf Entstehung und Funktion von PMN-MDSCs zu untersuchen.

PBMCs von gesunden Probanden wurden mit GM-CSF bzw. den Interleukinen IL-1 α , IL-1 β , IL-18 und IL-33 stimuliert oder mit PBMCs von Patienten mit MWS co-kultiviert. Die Induktion von PMN-MDSCs und deren suppressive Funktion wurden durchflusszytometrisch bestimmt.

PBMCs von Patienten mit MWS führten in Co-Kultur mit PBMCs von gesunden Probanden zu einer leichten Induktion der PMN-MDSCs.

Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass nicht nur GM-CSF und IL-1 β sondern auch IL-1 α und IL-18 starke Induktoren für die PMN-MDSCs darstellen. IL-1 α stellte sich als Interleukin mit der höchsten Potenz gefolgt von IL-18 und IL-1 β dar. IL-33 hatte in diesem Versuchsaufbau lediglich sehr geringe Auswirkungen auf die MDSC Populationen. Die durch IL-1 α , IL-1 β und IL-18 stimulierten PMN-MDSCs zeigten eine leicht erhöhte suppressive Aktivität im Vergleich zur Stimulation mit GM-CSF.

Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die erhöhte Aktivität des NLRP3 Inflammasomes, mit konsekutiv erhöhter Freisetzung von Interleukinen der IL-1 Familie, ursächlich für erhöhte PMN-MDSC Frequenzen im Blut von Patienten mit MWS sein könnte.

Im Falle des MWS könnte die Etablierung einer standardisierten Bestimmung der PMN-MDSC Frequenz im peripheren Blut Auskunft über eine subklinische Krankheitsaktivität geben. Weiterhin führen diese Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der Zusammenhänge zwischen erhöhten MDSCs und inflammatorischen Erkrankungen und Tumoren und können die Grundlage für neue Therapiekonzepte zur Beeinflussung der MDSCs bilden.

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 2: Reagenzien	27
Tabelle 3: FACS-Antikörper / Färbereagenzien	28
Tabelle 4: MACS Materialien.....	28
Tabelle 5: Zellkulturmedium ³⁷	29
Tabelle 6: CFSE-Medium	29
Tabelle 7: MACS Pufferlösung	29
Tabelle 8: FACS-Antikörper Mix für Zellkultur	29
Tabelle 9: Geräte.....	30
Tabelle 10: Analysegeräte.....	31
Tabelle 11: Messkanäle des FACS-Calibur ²²⁰ und verwendete Antikörper	36
Tabelle 12: Ausschluss Kontrollen oder Proben nach folgenden Kriterien	41

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zweidimensionale Struktur eines NLRP3-Inflammasomes	13
Abb. 2: schematischer Aufbau einer Transwell-Co-Kultur	35
Abb. 3: FSC-SSC Gating einer Negativkontrolle.....	43
Abb. 4: Antikörper Gating einer Negativkontrolle	45
Abb. 5: Anteil CD33+ Zellpopulationen sowie Charakterisierung nach CD33- und CD14-Mean fluorescence intensity (MFI)	46
Abb. 6: GM-CSF induziert PMN-MDSCs	48
Abb. 7: PMN-MDSCs nach GM-CSF Stimulation mit niedriger CD33 und CD14 Expression	49
Abb. 8: CD33 und CD14 Expression der CD33+ Zellpopulationen	51
Abb. 9: GM-CSF senkt Expression von HLA-DR und CXCR4 in CD33+ Zellen und induziert HLA-DR+ PMN-MDSCs. Höherer Anteil an HLA-DR+ Zellen bei PMN-MDSCs.....	52
Abb. 10: Gating der jeweils CD4+ und CD8+ Zellpopulation.....	54
Abb. 11: Beispiel Hemmung der T-Zell-Proliferation durch CD33+ Zellen	55
Abb. 12: Hemmung der T-Zell-Proliferation durch CD33+ Zellen	56
Abb. 13: PBMCs von Patienten mit Muckle-Wells Syndrom induzieren PMN-MDSCs in Co- Kultur.....	58
Abb. 14: PBMCs von Muckle Wells-Patienten zeigen in Kultur eine erhöhte Ausschüttung von IL-1 β im Vergleich zu PBMCs von gesunden Probanden	60
Abb. 15: IL-1 α induziert dosisabhängig PMN-MDSCs	63

Tabellen-, Abbildungs- und Literaturverzeichnis

Abb. 16: IL-1 α induziert dosisabhängig HLA-DR ⁺ PMN-MDSCs.....	64
Abb. 17: IL-1 β induziert dosisabhängig PMN-MDSCs	66
Abb. 18: IL-1 β induziert dosisabhängig HLA-DR ⁺ PMN-MDSCs.....	67
Abb. 19: IL-18 induziert dosisabhängig PMN-MDSCs	69
Abb. 20: IL-18 induziert dosisabhängig schwach HLA-DR ⁺ PMN-MDSCs.....	70
Abb. 21: IL-33 zeigt kaum Effekt auf PMN-MDSCs oder CD33 ⁺ Zellpopulationen.....	72
Abb. 22: IL-33 zeigt keinen Effekt auf HLA-DR ⁺ PMN-MDSCs	73
Abb. 23: Vergleich des Einflusses der Interleukine der IL-1 Familie auf PMN-MDSCs.....	75
Abb. 24: Vergleich des Einflusses der Interleukine der IL-1 Familie auf HLA-DR ⁺ PMN-MDSCs	76
Abb. 25: T-Zell-Hemmung durch, von Interleukinen der IL-1 Familie induzierten, PMN-MDSCs	78

6 Literaturverzeichnis

1. Talmadge JE, Gabrilovich DI. History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat Rev Cancer*. Oct 2013;13(10):739-52. doi:10.1038/nrc3581
2. Young MR, Ellis NK, Young ME, Wepsic HT. Stimulation of hematopoiesis and bone marrow suppressor cells by the subcutaneous injection of linoleic acid. *Cell Immunol*. Jun 1987;107(1):238-48. doi:10.1016/0008-8749(87)90283-8
3. Mielcarek M, Martin PJ, Torok-Storb B. Suppression of alloantigen-induced T-cell proliferation by CD14⁺ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Blood*. Mar 1 1997;89(5):1629-34. doi:10.1182/blood.V89.5.1629
4. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research*. Jan 1 2007;67(1):425; author reply 426. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3037
5. Bronte V, Brandau S, Chen SH, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*. Jul 6 2016;7:12150. doi:10.1038/ncomms12150
6. Condamine T, Mastio J, Gabrilovich DI. Transcriptional regulation of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of leukocyte biology*. December 1, 2015 2015;98(6):913-922. *Journal of Leukocyte Biology*. doi:10.1189/jlb.4RI0515-204R
7. Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : Cll*. Jan 2009;58(1):49-59. doi:10.1007/s00262-008-0523-4

8. Bizymi N, Bjelica S, Kittang AO, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hematologic Diseases: Promising Biomarkers and Treatment Targets. *Hemasphere*. Feb 2019;3(1):e168. doi:10.1097/HS9.000000000000168
9. Ballbach M, Hall T, Brand A, et al. Induction of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes. *J Innate Immun*. 2016;8(5):493-506. doi:10.1159/000446615
10. Rajabinejad M, Salari F, Gorgin Karaji A, Rezaeiemanesh A. The role of myeloid-derived suppressor cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis; anti- or pro-inflammatory cells? *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. Dec 2019;47(1):4149-4158. doi:10.1080/21691401.2019.1687504
11. Cripps JG, Gorham JD. MDSC in autoimmunity. *Int Immunopharmacol*. Jul 2011;11(7):789-93. doi:10.1016/j.intimp.2011.01.026
12. Sander LE, Sackett SD, Dierssen U, et al. Hepatic acute-phase proteins control innate immune responses during infection by promoting myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med*. Jul 5 2010;207(7):1453-64. doi:10.1084/jem.20091474
13. Tebartz C, Horst SA, Sparwasser T, et al. A major role for myeloid-derived suppressor cells and a minor role for regulatory T cells in immunosuppression during *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of immunology*. Feb 1 2015;194(3):1100-11. doi:10.4049/jimmunol.1400196
14. Peñaloza HF, Alvarez D, Muñoz-Durango N, et al. The role of myeloid-derived suppressor cells in chronic infectious diseases and the current methodology available for their study. *Journal of leukocyte biology*. 2019/05/01 2019;105(5):857-872. doi:10.1002/JLB.MR0618-233R
15. Ost M. Toll-like Rezeptor - vermittelte Induktion von Myeloid derived suppressor cells und deren Rolle bei *S. aureus* - Infektionen. *Medizinische Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen*. 2013;doi:10.15496/publikation-8332
16. Husecken Y, Muche S, Kustermann M, et al. MDSCs are induced after experimental blunt chest trauma and subsequently alter antigen-specific T cell responses. *Sci Rep*. Oct 9 2017;7(1):12808. doi:10.1038/s41598-017-13019-6
17. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, et al. A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol Med*. Mar-Apr 2011;17(3-4):281-92. doi:10.2119/molmed.2010.00178
18. Schwarz J, Scheckenbach V, Kugel H, et al. Granulocytic myeloid-derived suppressor cells (GR-MDSC) accumulate in cord blood of preterm infants and remain elevated during the neonatal period. *Clin Exp Immunol*. Mar 2018;191(3):328-337. doi:10.1111/cei.13059
19. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. Mar 2009;9(3):162-74. doi:10.1038/nri2506
20. Ribechini E, Greifenberg V, Sandwick S, Lutz MB. Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Medical microbiology and immunology*. Aug 2010;199(3):273-81. doi:10.1007/s00430-010-0151-4
21. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, et al. Arginase I-Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Are a

- Subpopulation of Activated Granulocytes. *Cancer research*. 2009;69(4):1553. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1921
22. Rieber N, Brand A, Hector A, et al. Flagellin Induces Myeloid-Derived Suppressor Cells: Implications for *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis Lung Disease. *The Journal of Immunology*. February 1, 2013 2013;190(3):1276-1284. doi:10.4049/jimmunol.1202144
 23. Youn J-I, Kumar V, Collazo M, et al. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nature immunology*. 2013;14(3):211-220. doi:10.1038/ni.2526
 24. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in immunology*. Mar 2016;37(3):208-220. doi:10.1016/j.it.2016.01.004
 25. Naeim F, Nagesh Rao P, Song SX, Phan RT. Chapter 2 - Principles of Immunophenotyping. In: Naeim F, Nagesh Rao P, Song SX, Phan RT, eds. *Atlas of Hematopathology (Second Edition)*. Academic Press; 2018:29-56.
 26. Simmons DL, Tan S, Tenen DG, Nicholson-Weller A, Seed B. Monocyte Antigen CD14 Is a Phospholipid Anchored Membrane Protein. *Blood*. 1989/01/01/ 1989;73(1):284-289. doi:https://doi.org/10.1182/blood.V73.1.284.284
 27. Landmann R, Müller B, Zimmerli W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes and Infection*. 2000/03/01/ 2000;2(3):295-304. doi:https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00298-7
 28. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLOS ONE*. 2017;12(4):e0176460. doi:10.1371/journal.pone.0176460
 29. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140(1):22-30. doi:10.1111/imm.12117
 30. Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*. 2011/12/01 2011;11(12):823-836. doi:10.1038/nri3084
 31. Unanue ER, Turk V, Neefjes J. Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. *Annual Review of Immunology*. 2016/05/20 2016;34(1):265-297. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055420
 32. Benedicto A, Romayor I, Arteta B. CXCR4 receptor blockage reduces the contribution of tumor and stromal cells to the metastatic growth in the liver. *Oncol Rep*. 2018/04/01 2018;39(4):2022-2030. doi:10.3892/or.2018.6254
 33. Seubert B, Grünwald B, Kobuch J, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 creates a premetastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice. <https://doi.org/10.1002/hep.27378>. *Hepatology*. 2015/01/01 2015;61(1):238-248. doi:https://doi.org/10.1002/hep.27378
 34. Obermajer N, Muthuswamy R, Odunsi K, Edwards R, Kalinski P. PGE 2-induced CXCL 12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer research*. 12/15 2011;71:7463-70. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2449

35. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest.* May 2007;117(5):1155-66. doi:10.1172/JCI31422
36. Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation Induces Myeloid-Derived Suppressor Cells that Facilitate Tumor Progression. *The Journal of Immunology.* 2006;176(1):284. doi:10.4049/jimmunol.176.1.284
37. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of Cytokine-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells from Normal Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *The Journal of Immunology.* August 15, 2010 2010;185(4):2273-2284. doi:10.4049/jimmunol.1000901
38. Elkabets M, Ribeiro VS, Dinarello CA, et al. IL-1beta regulates a novel myeloid-derived suppressor cell subset that impairs NK cell development and function. *Eur J Immunol.* Dec 2010;40(12):3347-57. doi:10.1002/eji.201041037
39. Marigo I, Bosio E, Solito S, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity.* Jun 25 2010;32(6):790-802. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.010
40. Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology.* Oct 1 2008;181(7):4666-75. doi:10.4049/jimmunol.181.7.4666
41. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest.* Oct 2006;116(10):2777-90. doi:10.1172/JCI28828
42. Huang Y, Chen X, Dikov MM, et al. Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. *Blood.* 2007;110(2):624. doi:10.1182/blood-2007-01-065714
43. Mao Y, Poschke I, Wennerberg E, et al. Melanoma-educated CD14+ cells acquire a myeloid-derived suppressor cell phenotype through COX-2-dependent mechanisms. *Cancer research.* Jul 1 2013;73(13):3877-87. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4115
44. Meyer C, Sevko A, Ramacher M, et al. Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 11 2011;108(41):17111-6. doi:10.1073/pnas.1108121108
45. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research.* May 1 2007;67(9):4507-13. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4174
46. Condamine T, Gabilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends in immunology.* Jan 2011;32(1):19-25. doi:10.1016/j.it.2010.10.002
47. Su YL, Banerjee S, White SV, Kortylewski M. STAT3 in Tumor-Associated Myeloid Cells: Multitasking to Disrupt Immunity. *Int J Mol Sci.* Jun 19 2018;19(6)doi:10.3390/ijms19061803
48. Guha P, Gardell J, Darpolor J, et al. STAT3 inhibition induces Bax-dependent apoptosis in liver tumor myeloid-derived suppressor cells.

- Oncogene*. 2019/01/01 2019;38(4):533-548. doi:10.1038/s41388-018-0449-z
49. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. Mar 22 2012;12(4):253-68. doi:10.1038/nri3175
50. Chornoguz O, Grmai L, Sinha P, Artemenko KA, Zubarev RA, Ostrand-Rosenberg S. Proteomic Pathway Analysis Reveals Inflammation Increases Myeloid-Derived Suppressor Cell Resistance to Apoptosis. *Molecular & Cellular Proteomics*. March 1, 2011 2011;10(3)doi:10.1074/mcp.M110.002980
51. Balic JJ, Albargy H, Luu K, et al. STAT3 serine phosphorylation is required for TLR4 metabolic reprogramming and IL-1 β expression. *Nature Communications*. 2020/07/30 2020;11(1):3816. doi:10.1038/s41467-020-17669-5
52. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, et al. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest*. Feb 2010;120(2):457-71. doi:10.1172/JCI40483
53. Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebti SM, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer research*. Oct 15 2005;65(20):9525-35. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0529
54. Welte T, Zhang SS, Wang T, et al. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 18 2003;100(4):1879-84. doi:10.1073/pnas.0237137100
55. Minegishi Y, Karasuyama H. Defects in Jak-STAT-mediated cytokine signals cause hyper-IgE syndrome: lessons from a primary immunodeficiency. *International Immunology*. 2009;21(2):105-112. doi:10.1093/intimm/dxn134
56. Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, et al. STAT3 Mutations in the Hyper-IgE Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 2007/10/18 2007;357(16):1608-1619. doi:10.1056/NEJMoa073687
57. Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, et al. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *Journal of immunology*. Jan 1 2004;172(1):464-74. doi:10.4049/jimmunol.172.1.464
58. Vrakas CN, O'Sullivan RM, Evans SE, et al. The Measure of DAMPs and a role for S100A8 in recruiting suppressor cells in breast cancer lung metastasis. *Immunol Invest*. 2015;44(2):174-88. doi:10.3109/08820139.2014.952818
59. Xiang X, Liu Y, Zhuang X, et al. TLR2-mediated expansion of MDSCs is dependent on the source of tumor exosomes. *Am J Pathol*. Oct 2010;177(4):1606-10. doi:10.2353/ajpath.2010.100245
60. Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine*. 2007;13(11):460-469. doi:10.1016/j.molmed.2007.09.002

61. Bunt SK, Clements VK, Hanson EM, Sinha P, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *Journal of leukocyte biology*. Jun 2009;85(6):996-1004. doi:10.1189/jlb.0708446
62. Tu S, Bhagat G, Cui G, et al. Overexpression of Interleukin-1 β Induces Gastric Inflammation and Cancer and Mobilizes Myeloid-Derived Suppressor Cells in Mice. *Cancer Cell*. 2008/11/04/ 2008;14(5):408-419. doi:https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.10.011
63. Schrijver IT, Theroude C, Roger T. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Sepsis. *Front Immunol*. 2019;10(1664-3224 (Electronic)):327. doi:10.3389/fimmu.2019.00327
64. Li J, Sun J, Rong R, et al. HMGB1 promotes myeloid-derived suppressor cells and renal cell carcinoma immune escape. *Oncotarget*. Sep 8 2017;8(38):63290-63298. doi:10.18632/oncotarget.18796
65. Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor-associated CD8⁺ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *Journal of immunology*. Oct 1 2005;175(7):4583-92. doi:10.4049/jimmunol.175.7.4583
66. Ito SE, Shirota H, Kasahara Y, Saijo K, Ishioka C. IL-4 blockade alters the tumor microenvironment and augments the response to cancer immunotherapy in a mouse model. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. Nov 2017;66(11):1485-1496. doi:10.1007/s00262-017-2043-6
67. Lee W-C, Hsu P-Y, Hsu H-Y. Stem cell factor produced by tumor cells expands myeloid-derived suppressor cells in mice. *Scientific Reports*. 2020/07/09 2020;10(1):11257. doi:10.1038/s41598-020-68061-8
68. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *Journal of immunology*. Jul 15 2007;179(2):977-83. doi:10.4049/jimmunol.179.2.977
69. Monu NR, Frey AB. Myeloid-derived suppressor cells and anti-tumor T cells: a complex relationship. *Immunol Invest*. 2012;41(6-7):595-613. doi:10.3109/08820139.2012.673191
70. Nagaraj S, Schrum AG, Cho H-I, Celis E, Gabrilovich DI. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184(6):3106-3116. doi:10.4049/jimmunol.0902661
71. Lelis FJN, Jaufmann J, Singh A, et al. Myeloid-derived suppressor cells modulate B-cell responses. *Immunol Lett*. Aug 2017;188(1879-0542 (Electronic)):108-115. doi:10.1016/j.imlet.2017.07.003
72. Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*. Feb 2013;138(2):105-15. doi:10.1111/imm.12036
73. Ohl K, Tenbrock K. Reactive Oxygen Species as Regulators of MDSC-Mediated Immune Suppression. *Front Immunol*. 2018;9(1664-3224 (Electronic)):2499. doi:10.3389/fimmu.2018.02499

74. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology*. Oct 15 2008;181(8):5791-802. doi:10.4049/jimmunol.181.8.5791
75. Movahedi K, Guilliams M, Van den Bossche J, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. Apr 15 2008;111(8):4233-44. doi:10.1182/blood-2007-07-099226
76. Fortin C, Huang X, Yang Y. NK cell response to vaccinia virus is regulated by myeloid-derived suppressor cells. *Journal of immunology*. Aug 15 2012;189(4):1843-9. doi:10.4049/jimmunol.1200584
77. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, et al. Arginase I–Producing Myeloid-Derived Suppressor Cells in Renal Cell Carcinoma Are a Subpopulation of Activated Granulocytes. *Cancer research*. February 15, 2009 2009;69(4):1553-1560. doi:10.1158/0008-5472.can-08-1921
78. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. Jan 15 2007;13(2 Pt 2):721s-726s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2197
79. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, et al. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med*. Oct 3 2005;202(7):931-9. doi:10.1084/jem.20050715
80. Pal S, Nandi M, Dey D, et al. Myeloid-derived suppressor cells induce regulatory T cells in chronically HBV infected patients with high levels of hepatitis B surface antigen and persist after antiviral therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. May 2019;49(10):1346-1359. doi:10.1111/apt.15226
81. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. Mar 2004;20(3):319-25. doi:10.1016/s1074-7613(04)00046-9
82. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Beury DW, Clements VK. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune suppression. *Seminars in cancer biology*. Aug 2012;22(4):275-81. doi:10.1016/j.semcancer.2012.01.011
83. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. Aug 2008;8(8):618-31. doi:10.1038/nrc2444
84. Trovato R, Canè S, Petrova V, Sartoris S, Ugel S, De Sanctis F. The Engagement Between MDSCs and Metastases: Partners in Crime. 10.3389/fonc.2020.00165. *Frontiers in Oncology*. 2020;10:165.
85. Zhang H, Nguyen-Jackson H, Panopoulos AD, Li HS, Murray PJ, Watowich SS. STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood*. Oct 7 2010;116(14):2462-71. doi:10.1182/blood-2009-12-259630
86. Wei J, Zhang M, Zhou J. Myeloid-derived suppressor cells in major depression patients suppress T-cell responses through the production of

- reactive oxygen species. *Psychiatry Res.* Aug 30 2015;228(3):695-701. doi:10.1016/j.psychres.2015.06.002
87. Ochando J, Conde P, Utrero-Rico A, Paz-Artal E. Tolerogenic Role of Myeloid Suppressor Cells in Organ Transplantation. *Front Immunol.* 2019;10(1664-3224 (Electronic)):374. doi:10.3389/fimmu.2019.00374
88. Uhel F, Azzaoui I, Gregoire M, et al. Early Expansion of Circulating Granulocytic Myeloid-derived Suppressor Cells Predicts Development of Nosocomial Infections in Patients with Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* Aug 1 2017;196(3):315-327. doi:10.1164/rccm.201606-1143OC
89. Darcy CJ, Minigo G, Piera KA, et al. Neutrophils with myeloid derived suppressor function deplete arginine and constrain T cell function in septic shock patients. *Crit Care.* Aug 1 2014;18(4):R163. doi:10.1186/cc14003
90. Rieber N, Wecker I, Neri D, et al. Extracorporeal photopheresis increases neutrophilic myeloid-derived suppressor cells in patients with GvHD. *Bone Marrow Transplant.* Apr 2014;49(1476-5365 (Electronic)):545-52. doi:10.1038/bmt.2013.236
91. van der Touw W, Kang K, Luan Y, et al. Glatiramer Acetate Enhances Myeloid-Derived Suppressor Cell Function via Recognition of Paired Ig-like Receptor B. *Journal of immunology.* Sep 15 2018;201(6):1727-1734. doi:10.4049/jimmunol.1701450
92. Law AMK, Valdes-Mora F, Gallego-Ortega D. Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer. *Cells.* Feb 27 2020;9(3)doi:10.3390/cells9030561
93. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer research.* Apr 15 2010;70(8):3052-61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690
94. Ko JS, Zea AH, Rini BI, et al. Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* Mar 15 2009;15(6):2148-57. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1332
95. Qin H, Lerman B, Sakamaki I, et al. Generation of a new therapeutic peptide that depletes myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Nat Med.* Jun 2014;20(6):676-81. doi:10.1038/nm.3560
96. Eruslanov E, Daurkin I, Ortiz J, Vieweg J, Kusmartsev S. Pivotal Advance: Tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE(2) catabolism in myeloid cells. *Journal of leukocyte biology.* Nov 2010;88(5):839-48. doi:10.1189/jlb.1209821
97. Weed DT, Vella JL, Reis IM, et al. Tadalafil reduces myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells and promotes tumor immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* Jan 1 2015;21(1):39-48. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1711
98. Wang YY, Yang YX, Zhe H, He ZX, Zhou SF. Bardoxolone methyl (CDDO-Me) as a therapeutic agent: an update on its pharmacokinetic and

- pharmacodynamic properties. *Drug Des Devel Ther.* 2014;8(1177-8881 (Electronic)):2075-88. doi:10.2147/DDDT.S68872
99. De Santo C, Serafini P, Marigo I, et al. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 15 2005;102(11):4185-90. doi:10.1073/pnas.0409783102
100. Reilley MJ, McCoon P, Cook C, et al. STAT3 antisense oligonucleotide AZD9150 in a subset of patients with heavily pretreated lymphoma: results of a phase 1b trial. *J Immunother Cancer.* Nov 16 2018;6(1):119. doi:10.1186/s40425-018-0436-5
101. Mirza N, Fishman M, Fricke I, et al. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer research.* Sep 15 2006;66(18):9299-307. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1690
102. Steele CW, Karim SA, Leach JDG, et al. CXCR2 Inhibition Profoundly Suppresses Metastases and Augments Immunotherapy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell.* Jun 13 2016;29(6):832-845. doi:10.1016/j.ccell.2016.04.014
103. Christmas BJ, Rafie CI, Hopkins AC, et al. Entinostat Converts Immune-Resistant Breast and Pancreatic Cancers into Checkpoint-Responsive Tumors by Reprogramming Tumor-Infiltrating MDSCs. *Cancer Immunol Res.* Dec 2018;6(12):1561-1577. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0070
104. Pan PY, Chen HM, Chen SH. Myeloid-derived suppressor cells as a Trojan horse: A cellular vehicle for the delivery of oncolytic viruses. *Oncoimmunology.* Aug 1 2013;2(8):e25083. doi:10.4161/onci.25083
105. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology.* 2016/07/01 2016;16(7):407-420. doi:10.1038/nri.2016.58
106. Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol.* Aug 2009;21(4):242-53. doi:10.1016/j.smim.2009.06.005
107. Winsor N, Krustev C, Bruce J, Philpott DJ, Girardin SE. Canonical and noncanonical inflammasomes in intestinal epithelial cells. *Cellular Microbiology.* 2019/11/01 2019;21(11):e13079. doi:10.1111/cmi.13079
108. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology.* 2010/05/01 2010;11(5):373-384. doi:10.1038/ni.1863
109. Malik A, Kanneganti TD. Inflammasome activation and assembly at a glance. *J Cell Sci.* Dec 1 2017;130(23):3955-3963. doi:10.1242/jcs.207365
110. Poyet JL, Srinivasula SM, Tnani M, Razmara M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem.* Jul 27 2001;276(30):28309-13. doi:10.1074/jbc.C100250200
111. Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology.* 2019/08/01 2019;19(8):477-489. doi:10.1038/s41577-019-0165-0

112. Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, et al. The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*. Mar 2008;28(3):285-7. doi:10.1016/j.immuni.2008.02.005
113. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. Mar 19 2010;140(6):821-32. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
114. Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, et al. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 8 2007;104(19):8041-6. doi:10.1073/pnas.0611496104
115. Gros Lambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J Inflamm Res*. 2018;11(1178-7031 (Print)):359-374. doi:10.2147/JIR.S141220
116. Aiyaya. Inflammasome structure. Abbildung. Accessed 18. Dezember, 2020. https://en.wikipedia.org/wiki/Inflammasome#/media/File:Inflammasome_fin al1.png / CC BY-SA 3.0 Lizenz
117. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. Feb 2009;7(2):99-109. doi:10.1038/nrmicro2070
118. Dagenais M, Skeldon A, Saleh M. The inflammasome: in memory of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death Differ*. Jan 2012;19(1):5-12. doi:10.1038/cdd.2011.159
119. He WT, Wan H, Hu L, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell Res*. Dec 2015;25(12):1285-98. doi:10.1038/cr.2015.139
120. Vande Walle L, Lamkanfi M. Pyroptosis. *Current Biology*. 2016/07/11/2016;26(13):R568-R572. doi:https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.019
121. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *The Journal of Immunology*. July 15, 2009 2009;183(2):787-791. doi:10.4049/jimmunol.0901363
122. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci*. Jul 6 2019;20(13)doi:10.3390/ijms20133328
123. Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunological reviews*. May 2015;265(1):6-21. doi:10.1111/imr.12296
124. Kim YM, Talanian RV, Li J, Billiar TR. Nitric oxide prevents IL-1beta and IFN-gamma-inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1beta-converting enzyme). *Journal of immunology*. Oct 15 1998;161(8):4122-8.
125. Dinarello CA, Goldin NP, Wolff SM. Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. *J Exp Med*. Jun 1 1974;139(6):1369-81. doi:10.1084/jem.139.6.1369
126. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunological reviews*. 2008/06/01 2008;223(1):20-38. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00624.x

127. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews*. 2018;281(1):8-27. doi:10.1111/imr.12621
128. Sims JE, Smith DE. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. Feb 2010;10(2):89-102. doi:10.1038/nri2691
129. Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nature immunology*. 2016;17(8):906-913. doi:10.1038/ni.3503
130. Berda-Haddad Y, Robert S, Salers P, et al. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 20 2011;108(51):20684-9. doi:10.1073/pnas.1116848108
131. Afonina Inna S, Tynan Graham A, Logue Susan E, et al. Granzyme B-Dependent Proteolysis Acts as a Switch to Enhance the Proinflammatory Activity of IL-1 α . *Molecular Cell*. 2011/10/21/ 2011;44(2):265-278. doi:https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.037
132. Wiggins KA, Parry AJ, Cassidy LD, et al. IL-1 α cleavage by inflammatory caspases of the noncanonical inflammasome controls the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell*. 2019/06/01 2019;18(3):e12946. doi:10.1111/accel.12946
133. Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, et al. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood*. Dec 15 1994;84(12):4242-8.
134. Werman A, Werman-Venkert R, White R, et al. The precursor form of IL-1 α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 24 2004;101(8):2434-9. doi:10.1073/pnas.0308705101
135. Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J. Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 6 2009;106(40):17031-6. doi:10.1073/pnas.0905299106
136. Zheng Y, Humphry M, Maguire JJ, Bennett MR, Clarke MC. Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1 α , controlling necrosis-induced sterile inflammation. *Immunity*. Feb 21 2013;38(2):285-95. doi:10.1016/j.immuni.2013.01.008
137. Cohen I, Rider P, Carmi Y, et al. Differential release of chromatin-bound IL-1 α discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 9 2010;107(6):2574-9. doi:10.1073/pnas.0915018107
138. Rider P, Carmi Y, Guttman O, et al. IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *Journal of immunology*. Nov 1 2011;187(9):4835-43. doi:10.4049/jimmunol.1102048
139. Rider P, Kaplanov I, Romzova M, et al. The transcription of the alarmin cytokine interleukin-1 α is controlled by hypoxia inducible factors 1 and 2 α in hypoxic cells. *Front Immunol*. 2012;3(1664-3224 (Electronic)):290. doi:10.3389/fimmu.2012.00290
140. Groß O, Yazdi Amir S, Thomas Christina J, et al. Inflammasome Activators Induce Interleukin-1 α Secretion via Distinct Pathways with Differential

- Requirement for the Protease Function of Caspase-1. *Immunity*. 2012/03/23/ 2012;36(3):388-400. doi:https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.018
141. Yazdi AS, Drexler SK. Regulation of interleukin 1alpha secretion by inflammasomes. *Ann Rheum Dis*. Apr 2013;72 Suppl 2(1468-2060 (Electronic)):ii96-9. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202252
142. Horai R, Asano M, Sudo K, et al. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med*. May 4 1998;187(9):1463-75. doi:10.1084/jem.187.9.1463
143. Chen C-J, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature Medicine*. 2007/07/01 2007;13(7):851-856. doi:10.1038/nm1603
144. Lim GB. IL-1 signalling in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. Apr 2019;16(4):200. doi:10.1038/s41569-019-0172-7
145. Kawaguchi Y, McCarthy SA, Watkins SC, Wright TM. Autocrine activation by interleukin 1alpha induces the fibrogenic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts. *J Rheumatol*. Oct 2004;31(10):1946-54.
146. Griffin WS, Stanley LC, Ling C, et al. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 1989;86(19):7611-5. doi:10.1073/pnas.86.19.7611
147. Grimaldi LM, Casadei VM, Ferri C, et al. Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. *Ann Neurol*. Mar 2000;47(3):361-5. doi:10.1002/1531-8249(200003)47:3<361
148. Shirodaria S, Smith J, McKay IJ, Kennett CN, Hughes FJ. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res*. Nov 2000;79(11):1864-9. doi:10.1177/00220345000790110801
149. Di Paolo NC, Shafiani S, Day T, et al. Interdependence between Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Regulates TNF-Dependent Control of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Immunity*. Dec 15 2015;43(6):1125-36. doi:10.1016/j.immuni.2015.11.016
150. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117(14):3720-3732. doi:10.1182/blood-2010-07-273417
151. Dinarello Ca Fau - Ikejima T, Ikejima T Fau - Warner SJ, Warner Sj Fau - Orencole SF, et al. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J Immunol*. 1987;(6):1902.
152. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. *Cytokine & growth factor reviews*. Aug 2011;22(4):189-95. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.10.001
153. Uchiyama R, Yonehara S, Taniguchi S, Ishido S, Ishii KJ, Tsutsui H. Inflammasome and Fas-Mediated IL-1beta Contributes to Th17/Th1 Cell

- Induction in Pathogenic Bacterial Infection In Vivo. *Journal of immunology*. Aug 1 2017;199(3):1122-1130. doi:10.4049/jimmunol.1601373
154. Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, et al. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 25 1999;96(11):6261-6. doi:10.1073/pnas.96.11.6261
 155. Fantuzzi G, Ku G, Harding MW, et al. Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme- deficient mice. *Journal of immunology*. Feb 15 1997;158(4):1818-24.
 156. Schindler R, Ghezzi P, Dinarello CA. IL-1 induces IL-1. IV. IFN-gamma suppresses IL-1 but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1. *Journal of immunology*. Mar 15 1990;144(6):2216-22.
 157. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. Mar 15 1996;87(6):2095-147.
 158. Netea MG, Kullberg BJ, Van der Meer JW. Circulating cytokines as mediators of fever. *Clin Infect Dis*. Oct 2000;31 Suppl 5(1058-4838 (Print)):S178-84. doi:10.1086/317513
 159. Dinarello CA. Mutations in cryopyrin: bypassing roadblocks in the caspase 1 inflammasome for interleukin-1beta secretion and disease activity. *Arthritis Rheum*. Sep 2007;56(9):2817-22. doi:10.1002/art.22841
 160. Granowitz EV, Porat R, Mier JW, et al. Hematologic and immunomodulatory effects of an interleukin-1 receptor antagonist coinfusion during low-dose endotoxemia in healthy humans. *Blood*. Nov 15 1993;82(10):2985-90.
 161. Henricson BE, Neta R, Vogel SN. An interleukin-1 receptor antagonist blocks lipopolysaccharide-induced colony-stimulating factor production and early endotoxin tolerance. *Infection and immunity*. Mar 1991;59(3):1188-91. doi:10.1128/IAI.59.3.1188-1191.1991
 162. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KHG, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(7):1685-1691. doi:10.1084/jem.20060285
 163. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. Apr 2008;28(4):454-67. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.004
 164. Carmi Y, Dotan S, Rider P, et al. The Role of IL-1 β in the Early Tumor Cell-Induced Angiogenic Response. *The Journal of Immunology*. 2013;190(7):3500. doi:10.4049/jimmunol.1202769
 165. Carmi Y, Voronov E, Dotan S, et al. The Role of Macrophage-Derived IL-1 in Induction and Maintenance of Angiogenesis. *The Journal of Immunology*. 2009;183(7):4705. doi:10.4049/jimmunol.0901511
 166. Mantovani A, Barajon I, Garlanda C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunological reviews*. Jan 2018;281(1):57-61. doi:10.1111/imr.12614
 167. Krelin Y, Voronov E, Dotan S, et al. Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. *Cancer research*. Feb 1 2007;67(3):1062-71. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2956

168. Tulotta C, Ottewell P. The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis. *Endocr Relat Cancer*. Jul 2018;25(7):R421-R434. doi:10.1530/ERC-17-0309
169. Marhaba R, Nazarenko I, Knöfler D, et al. Opposing effects of fibrosarcoma cell-derived IL-1 α and IL-1 β on immune response induction. *International Journal of Cancer*. 2008/07/01 2008;123(1):134-145. doi:10.1002/ijc.23503
170. Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, et al. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol*. Jul 2008;173(1):57-67. doi:10.2353/ajpath.2008.070974
171. van der Meer MJ, Sweep CG, Rijnkels CE, et al. Acute stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by IL-1 beta, TNF alpha and IL-6: a dose response study. *J Endocrinol Invest*. Mar 1996;19(3):175-82. doi:10.1007/BF03349862
172. Lee SW, Tsou AP, Chan H, et al. Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 1988;85(4):1204-8. doi:10.1073/pnas.85.4.1204
173. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. Dec 12 2013;39(6):1003-18. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010
174. Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. Feb 2 2019;20(3)doi:10.3390/ijms20030649
175. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, et al. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science*. Jan 10 1997;275(5297):206-9. doi:10.1126/science.275.5297.206
176. Netea MG, Joosten LA. The NLRP1-IL18 Connection: A Stab in the Back of Obesity-Induced Inflammation. *Cell Metab*. Jan 12 2016;23(1):6-7. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.014
177. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol*. 2001;19(0732-0582 (Print)):423-74. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.423
178. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *Journal of leukocyte biology*. Feb 2003;73(2):213-24. doi:10.1189/jlb.0602313
179. Nowarski R, Jackson R, Gagliani N, et al. Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. *Cell*. Dec 3 2015;163(6):1444-56. doi:10.1016/j.cell.2015.10.072
180. Brydges SD, Broderick L, McGeough MD, Pena CA, Mueller JL, Hoffman HM. Divergence of IL-1, IL-18, and cell death in NLRP3 inflammasomopathies. *The Journal of Clinical Investigation*. 11/01/2013;123(11):4695-4705. doi:10.1172/JCI71543
181. Palma G, Barbieri A, Bimonte S, et al. Interleukin 18: Friend or foe in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2013/12/01/2013;1836(2):296-303. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2013.09.001
182. Guan Y, Zhang R, Peng Z, Dong D, Wei G, Wang Y. Inhibition of IL-18-mediated myeloid derived suppressor cell accumulation enhances anti-PD1 efficacy against osteosarcoma cancer. *J Bone Oncol*. Nov 2017;9(2212-1366 (Print)):59-64. doi:10.1016/j.jbo.2017.10.002

183. Nakamura K, Kassem S, Cleynen A, et al. Dysregulated IL-18 Is a Key Driver of Immunosuppression and a Possible Therapeutic Target in the Multiple Myeloma Microenvironment. *Cancer Cell*. 2018/04/09/2018;33(4):634-648.e5. doi:https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.02.007
184. Wu H, Craft ML, Wang P, et al. IL-18 Contributes to Renal Damage after Ischemia-Reperfusion. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(12):2331. doi:10.1681/ASN.2008020170
185. Takeuchi D, Yoshidome H, Kato A, et al. Interleukin 18 causes hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Hepatology*. Mar 2004;39(3):699-710. doi:10.1002/hep.20117
186. Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 2 2009;106(22):9021-6. doi:10.1073/pnas.0812690106
187. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One*. Oct 6 2008;3(10):e3331. doi:10.1371/journal.pone.0003331
188. Ali S, Mohs A, Thomas M, et al. The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kappaB to dampen NF-kappaB-stimulated gene transcription. *Journal of immunology*. Aug 15 2011;187(4):1609-16. doi:10.4049/jimmunol.1003080
189. Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep*. Oct 2008;9(10):1006-12. doi:10.1038/embor.2008.145
190. Gautier V, Cayrol C, Farache D, et al. Extracellular IL-33 cytokine, but not endogenous nuclear IL-33, regulates protein expression in endothelial cells. *Scientific Reports*. 2016/10/03 2016;6(1):34255. doi:10.1038/srep34255
191. Luthi AU, Cullen SP, McNeela EA, et al. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*. Jul 17 2009;31(1):84-98. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.007
192. Lefrançais E, Roga S, Gautier V, et al. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(5):1673. doi:10.1073/pnas.1115884109
193. Lefrancais E, Duval A, Mirey E, et al. Central domain of IL-33 is cleaved by mast cell proteases for potent activation of group-2 innate lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 28 2014;111(43):15502-7. doi:10.1073/pnas.1410700111
194. Larsen KM, Minaya MK, Vaish V, Pena MMO. The Role of IL-33/ST2 Pathway in Tumorigenesis. *Int J Mol Sci*. Sep 9 2018;19(9)doi:10.3390/ijms19092676
195. Tominaga S-i. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/C-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Letters*. 1989;258(2):301-304. doi:10.1016/0014-5793(89)81679-5
196. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper

- type 2-associated cytokines. *Immunity*. Nov 2005;23(5):479-90. doi:10.1016/j.immuni.2005.09.015
197. Funakoshi-Tago M, Tago K, Hayakawa M, et al. TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway. *Cell Signal*. Sep 2008;20(9):1679-86. doi:10.1016/j.cellsig.2008.05.013
198. Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem*. Sep 7 2007;282(36):26369-80. doi:10.1074/jbc.M704916200
199. Chan BCL, Lam CWK, Tam LS, Wong CK. IL33: Roles in Allergic Inflammation and Therapeutic Perspectives. *Front Immunol*. 2019;10:364. doi:10.3389/fimmu.2019.00364
200. Strangward P, Haley MJ, Albornoz MG, et al. Targeting the IL33–NLRP3 axis improves therapy for experimental cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(28):7404. doi:10.1073/pnas.1801737115
201. Komai-Koma M, Wang E, Kurowska-Stolarska M, Li D, McSharry C, Xu D. Interleukin-33 promoting Th1 lymphocyte differentiation depends on IL-12. *Immunobiology*. Mar 2016;221(3):412-7. doi:10.1016/j.imbio.2015.11.013
202. Xiao P, Wan X, Cui B, et al. Interleukin 33 in tumor microenvironment is crucial for the accumulation and function of myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology*. 2016;5(1):e1063772. doi:10.1080/2162402X.2015.1063772
203. O'Donnell C, Mahmoud A, Keane J, et al. An antitumorigenic role for the IL-33 receptor, ST2L, in colon cancer. *Br J Cancer*. Jan 12 2016;114(1):37-43. doi:10.1038/bjc.2015.433
204. Fournie JJ, Poupot M. The Pro-tumorigenic IL-33 Involved in Antitumor Immunity: A Yin and Yang Cytokine. *Front Immunol*. 2018;9:2506. doi:10.3389/fimmu.2018.02506
205. Lim HX, Choi S, Cho D, Kim TS. IL-33 inhibits the differentiation and immunosuppressive activity of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.72>. *Immunology & Cell Biology*. 2017/01/01 2017;95(1):99-107. doi:<https://doi.org/10.1038/icb.2016.72>
206. Gao K, Li X, Zhang L, et al. Transgenic expression of IL-33 activates CD8(+) T cells and NK cells and inhibits tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Lett*. Jul 28 2013;335(2):463-71. doi:10.1016/j.canlet.2013.03.002
207. Dattagupta A, Immaneni S. ST2: Current status. *Indian Heart J*. Jul 2018;70 Suppl 1(2213-3763 (Electronic)):S96-S101. doi:10.1016/j.ihj.2018.03.001
208. Goldfinger S. The inherited autoinflammatory syndrome: a decade of discovery. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2009;120(0065-7778 (Print)):413-8.
209. Booshehri LM, Hoffman HM. CAPS and NLRP3. *Journal of Clinical Immunology*. 2019/04/01 2019;39(3):277-286. doi:10.1007/s10875-019-00638-z
210. Neven B, Prieur AM, Quartier dit Maire P. Cryopyrinopathies: update on pathogenesis and treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol*. Sep 2008;4(9):481-9. doi:10.1038/ncprheum0874

211. Muckle TJ, Wells M. Urticaria, deafness, and amyloidosis: a new heredo-familial syndrome. *QJM: An International Journal of Medicine*. 1962;31(2):235-248.
212. Kummerle-Deschner JB, Lohse P. [Genetics of cryopyrin-associated periodic syndrome]. Zur Genetik der Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrome. *Z Rheumatol*. May 2017;76(4):313-321. Zur Genetik der Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrome. doi:10.1007/s00393-017-0271-y
213. Lachmann HJ, Lowe P, Felix SD, et al. In vivo regulation of interleukin 1beta in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *J Exp Med*. May 11 2009;206(5):1029-36. doi:10.1084/jem.20082481
214. Rieber N, Brand A, Neri D, et al. PRoS-FINAL-2336: Induction of MDSCS in Muckle-Wells syndrome. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2013;11(Suppl 2):P326-P326. doi:10.1186/1546-0096-11-S2-P326
215. Kümmerle-Deschner JB, Tyrrell PN, Reess F, et al. Risk factors for severe Muckle-Wells syndrome. *Arthritis & Rheumatism*. 2010/12/01 2010;62(12):3783-3791. doi:10.1002/art.27696
216. Vissers MCM, Jester SA, Fantone JC. Rapid purification of human peripheral blood monocytes by centrifugation through Ficoll-Hypaque and Sepracell-MN. *Journal of Immunological Methods*. 1988/06/13 1988;110(2):203-207. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(88)90104-4
217. Fuss IJ, Kanof ME, Smith PD, Zola H. Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord Blood. *Current Protocols in Immunology*. 2001;doi:10.1002/0471142735.im0701s85
218. Corning I. Transwell®, Snapwell™, Netwell®, and Falcon® Permeable Supports. Accessed 01.05.2023, <https://www.corning.com/emea/de/products/life-sciences/products/permeable-supports/transwell-snapwell-netwell-falcon-permeable-supports.html>
219. BD-Biosciences. BD Flow Cytometry - Technical Bulletin. Technical Bulletin. November 2008 2008;
220. BD-Biosciences. BD FACSCalibur Flow Cytometry System - Technical Specifications. 2010;
221. Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990;11(2):231-238. doi:10.1002/cyto.990110203
222. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*. 1994/05/02 1994;171(1):131-137. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(94)90236-4
223. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. 1992;13(8):795-808. doi:10.1002/cyto.990130802
224. Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S, Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2012;61(8):1155-67. doi:10.1007/s00262-012-1294-5
225. Bio-Rad Laboratories I. Flow Cytometry Basics Guide. (Bulletin 6636 Ver B):19.

226. Morales JK, Kmiecik M, Knutson KL, Bear HD, Manjili MH. GM-CSF is one of the main breast tumor-derived soluble factors involved in the differentiation of CD11b-Gr1-bone marrow progenitor cells into myeloid-derived suppressor cells. *Breast cancer research and treatment*. 2010;123(1):39-49.
227. Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, et al. Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *European journal of immunology*. 2010;40(1):22-35.
228. Grütznert E, Stirner R, Arenz L, et al. Kinetics of human myeloid-derived suppressor cells after blood draw. *Journal of Translational Medicine*. 2016;14:2. doi:10.1186/s12967-015-0755-y
229. Roussel M, Bartkowiak T, Irish JM. Picturing Polarized Myeloid Phagocytes and Regulatory Cells by Mass Cytometry. In: McGuire HM, Ashhurst TM, eds. *Mass Cytometry: Methods and Protocols*. Springer New York; 2019:217-226.
230. Ribechini E, Hutchinson JA, Hergovits S, et al. Novel GM-CSF signals via IFN-gammaR/IRF-1 and AKT/mTOR license monocytes for suppressor function. *Blood Adv*. Jun 13 2017;1(14):947-960. doi:10.1182/bloodadvances.2017006858
231. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, et al. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. Jun 20 2007;25(18):2546-53. doi:10.1200/JCO.2006.08.5829
232. Stanojevic I, Gavevic M, Jovic M, et al. Interferon alpha-induced reduction in the values of myeloid-derived suppressor cells in melanoma patients. *Vojnosanit Pregl*. Apr 2015;72(4):342-9. doi:10.2298/vsp1504342s
233. Lechner MG, Megiel C, Russell SM, et al. Functional characterization of human Cd33+ and Cd11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *J Transl Med*. Jun 9 2011;9:90. doi:10.1186/1479-5876-9-90
234. Cohen EA-O, Scott IC, Majithiya JB, et al. Oxidation of the alarmin IL-33 regulates ST2-dependent inflammation. *Nat Commun*. Sep 14 2015;6:8327. doi:10.1038/ncomms9327
235. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(9):3356-3364. doi:10.1172/JCI80005
236. Lang S, Bruderek K, Kaspar C, et al. Clinical Relevance and Suppressive Capacity of Human Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. Oct 1 2018;24(19):4834-4844. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-3726
237. Okla K, Czerwonka A, Wawruszak A, et al. Clinical Relevance and Immunosuppressive Pattern of Circulating and Infiltrating Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) in Epithelial Ovarian Cancer. *Front Immunol*. 2019;10:691. doi:10.3389/fimmu.2019.00691

238. Lim HX, Hong H-J, Cho D, Kim TS. IL-18 Enhances Immunosuppressive Responses by Promoting Differentiation into Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells. *The Journal of Immunology*. 2014;193(11):5453. doi:10.4049/jimmunol.1401282
239. Cassetta L, Bruderek K, Skrzeczynska-Moncznik J, et al. Differential expansion of circulating human MDSC subsets in patients with cancer, infection and inflammation. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2020;8(2):e001223. doi:10.1136/jitc-2020-001223
240. Rieber N, Singh A, Öz H, et al. Pathogenic Fungi Regulate Immunity by Inducing Neutrophilic Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cell Host & Microbe*. 2015/04/08/ 2015;17(4):507-514. doi:https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.02.007
241. Tengku-Muhammad TS, Hughes TR, Ranki H, Cryer A, Ramji DP. DIFFERENTIAL REGULATION OF MACROPHAGE CCAAT-ENHANCER BINDING PROTEIN ISOFORMS BY LIPOPOLYSACCHARIDE AND CYTOKINES. *Cytokine*. 2000/09/01/ 2000;12(9):1430-1436. doi:https://doi.org/10.1006/cyto.2000.0711
242. Huber R, Pietsch D, Panterodt T, Brand K. Regulation of C/EBP β and resulting functions in cells of the monocytic lineage. *Cellular Signalling*. 2012/06/01/ 2012;24(6):1287-1296. doi:https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.02.007
243. Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 1990;87(14):5548-52. doi:10.1073/pnas.87.14.5548
244. Najjar YG, Rayman P, Jia X, et al. Myeloid-Derived Suppressor Cell Subset Accumulation in Renal Cell Carcinoma Parenchyma Is Associated with Intratumoral Expression of IL1beta, IL8, CXCL5, and Mip-1alpha. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. May 1 2017;23(9):2346-2355. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1823
245. Sacchi A, Grassi G, Bordoni V, et al. Early expansion of myeloid-derived suppressor cells inhibits SARS-CoV-2 specific T-cell response and may predict fatal COVID-19 outcome. *Cell Death & Disease*. 2020/10/27 2020;11(10):921. doi:10.1038/s41419-020-03125-1
246. Wang HY, Zhao R, Ren H, Zou MJ, Zhang J, Zhang Y. [The expression and association of CD14(+) HLA-DR(Low/-) myeloid-derived suppressor cell-like cells and interleukin-1beta in ovarian cancer]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. Sep 12 2017;97(34):2663-2669. doi:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2017.34.005
247. Gajardo T, Morales RA, Campos-Mora M, Campos-Acuna J, Pino-Lagos K. Exogenous interleukin-33 targets myeloid-derived suppressor cells and generates periphery-induced Foxp3(+) regulatory T cells in skin-transplanted mice. *Immunology*. Sep 2015;146(1):81-8. doi:10.1111/imm.12483
248. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Phytochemicals inhibit the immunosuppressive functions of myeloid-derived suppressor cells (MDSC): Impact on cancer and age-related chronic inflammatory disorders.

- International Immunopharmacology*. 2018/08/01/ 2018;61:231-240. doi:https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.005
249. Tu SP, Jin H, Shi JD, et al. Curcumin induces the differentiation of myeloid-derived suppressor cells and inhibits their interaction with cancer cells and related tumor growth. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(2):205-215. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0247
250. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine*. 2017/09/21 2017;377(12):1119-1131. doi:10.1056/NEJMoa1707914
251. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, et al. Effect of interleukin-1beta inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. Oct 21 2017;390(10105):1833-1842. doi:10.1016/S0140-6736(17)32247-X
252. Guo B, Fu S, Zhang J, Liu B, Li Z. Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. Article. *Scientific Reports*. 10/27/online 2016;6:36107. doi:10.1038/srep36107
253. Allen IC, TeKippe EM, Woodford R-MT, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(5):1045-1056. doi:10.1084/jem.20100050
254. Koehn BH, Saha A, McDonald-Hyman C, et al. Danger-associated extracellular ATP counters MDSC therapeutic efficacy in acute GVHD. *Blood*. Nov 7 2019;134(19):1670-1682. doi:10.1182/blood.2019001950
255. Rico A, Laguna Goya R, Cano-Romero F, et al. Early Posttransplant Mobilization of M-MDSC Correlates with Increase in Soluble Immunosuppressive Factors and Predicts Cancer in Kidney Recipients. *Transplantation*. 02/01 2020;Publish Ahead of Print:1. doi:10.1097/TP.0000000000003179

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinderheilkunde, Abteilung Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie unter Betreuung von Prof Dr. med. Martin Ebinger und Dr. med. Michael Abele durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Nikolaus Rieber und Prof. Dr. med. Dominik Hartl.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder Dr. med. Michael Abele, Dr. med. Davide Neri und Iris Schäfer von mir eigenständig oder in Einzelfällen in Zusammenarbeit mit den genannten Labormitgliedern durchgeführt. Die Hälfte der CFSE Proliferationsassays wurde durch Dr. rer. nat. Marlene Ballbach durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte, in Absprache mit Prof. Dr. med. Martin Ebinger und Prof. Dr. med. Nikolaus Rieber, durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 09.07.2023

Danksagung

Vielen Dank für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit an alle meine Labormitglieder, es war eine tolle Zeit.

Dabei möchte ich mich vor allem bei Prof. Dr. med. Dominik Hartl und Prof. Dr. med. Nikolaus Rieber für ihre stets freundschaftliche und hilfreiche Zusammenarbeit bei der Konzeption bedanken. Besonderer Dank gilt Iris Schäfer für ihre Einarbeitung und jederzeit fachkundige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Laborexperimente.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Martin Ebinger, Prof. Dr. med. Nikolaus Rieber und Dr. med. Michael Abele für die Betreuung bei der Erstellung der Dissertationsschrift.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. med. David Heinzmann und Dr. med. Julian Schwarz bedanken, welche mit wertvollen Tipps zur Seite standen.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie für ihre Unterstützung bedanken.