

**Myeloid derived suppressor cells bei zwei
pathogenetisch unterschiedlichen inflammatorischen
Krankheitsbildern: Zystische Fibrose und Muckle-
Wells-Syndrom**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Brand, Alina Charlotte

2015

Dekan: Professor Dr. I.-B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Hartl
2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Wolz

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	9
1.1	Das angeborene Immunsystem	9
1.1.1	Allgemein	9
1.1.2	Mustererkennungsrezeptoren (PRR, <i>pattern-recognition receptors</i>)	11
1.2	Das erworbene Immunsystem	12
1.2.1	Allgemein	12
1.2.2	T-Lymphozyten.....	13
1.3	Myeloid derived suppressor cells (MDSC)	15
1.3.1	Allgemein	15
1.3.2	Charakterisierung der MDSC in Mäusen.....	15
1.3.3	Expansion und Aktivierung der MDSC	16
1.3.4	Funktionen der MDSC.....	16
1.3.5	MDSC beim Menschen	17
1.4	Zystische Fibrose (CF, <i>Cystic fibrosis</i>).....	18
1.4.1	Allgemein	18
1.4.2	Infektion der Atemwege.....	19
1.4.3	Die Rolle Neutrophiler Granulozyten bei der Inflammation.....	20
1.4.4	Inflammation und die Rolle der adaptiven Immunantwort.....	21
1.5	Muckle-Wells Syndrom (MWS)	22
1.5.1	Das Inflammasom	23
1.5.2	Interleukin (IL) -1 β	26
1.6	Fragestellung der Arbeit.....	27
2	Material.....	28
2.1	Geräte.....	28
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	29
2.3	Medien und Reagenzien	29
2.4	Stammlösungen	30
2.5	FACS Antikörper.....	30
2.6	MicroBeads.....	31
2.7	Blutproben	31

3 Methoden	31
3.1 Zellisolation.....	31
3.2 Isolation CD66b positiver Zellen mittels <i>magnetic cell sorting</i> (MACS)...	32
3.2.1 Prinzip	32
3.2.2 Färbung und Markierung der Zellen	32
3.2.3 Antikörper positive Zell Selektion	33
3.3 FACS	34
3.3.1 Prinzip	34
3.3.2 Färbung, Messung und Auswertung.....	37
3.4 CFSE Proliferationsassay	41
3.4.1 Färbung der PBMC mit CFSE und Stimulation	42
3.4.2 FACS-Färbung, Messung und Auswertung.....	43
3.5 Zytokin Analyse mittels Bio-Plex.....	45
3.6 Statistische Analyse.....	46
4 Ergebnisse	46
4.1 Messung der MDSC.....	46
4.2 Charakterisierung der MDSC.....	47
4.3 Akkumulation der MDSC bei CF Patienten	49
4.3.1 Korrelation der MDSC mit Parametern der Lungenfunktion	57
4.3.2 Korrelation der MDSC mit der Progression der Erkrankung.....	61
4.4 Akkumulation der MDSC bei MWS Patienten	62
4.4.1 Korrelation der MDSC mit klinischen Parametern bei MWS.....	63
4.5 Suppression der T-Zell Proliferation durch MDSC	66
4.6 Modulation der IL-17 Produktion durch MDSC	67
5 Diskussion.....	67
6 Zusammenfassung.....	77
7 Literaturverzeichnis	81
8 Anhang.....	96
8.1 Abbildungsverzeichnis	96
8.2 Tabellenverzeichnis	97
9 Danksagung	98

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-Triphosphat
ASC	<i>apoptosis associated speck-like protein containing a CARD</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSG	Blut Senkungs Geschwindigkeit
BIR	<i>baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat</i>
CARD	<i>caspase-recruitment domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CRP	C-reaktives Protein
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
FEV1	Einsekundenkapazität (<i>forced expiratory volume</i>)
FVC	forcierte expiratorische Vitalkapazität (<i>forced vital capacity</i>)
GM-CSF	Granulozyten-, Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor (<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
Cox2	Cyclooxygenase 2
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA-DR	humane Leukozyten Antigene (menschlicher Haupthistokompatibilitätskomplex) mit dem Genlokus DR (<i>human leucocyte antigene</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase

JAK	Januskinase
LRR	Leucin-reiche Sequenzwiederholung <i>(leucin-rich repeat)</i>
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
M-CSF	Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor <i>(Monocyte colony-stimulating factor)</i>
MEF	<i>(Maximum expiratory volume)</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex <i>(major histocompatibility complex)</i>
min	Minute
ml	Milliliter
NACHT	<i>nucleotide-binding domain</i>
NALP	<i>NACHT domain, leucin-rich-repeat domain and pyrin domain containing protein</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NLRP	<i>NLR family, pyrin-domain containing</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster <i>(pathogen-associated molecular patterns)</i>
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes <i>(peripheral blood mononuclear cells)</i>
PEG ₂	Prostaglandin E2
PMN	Polymorphnukleäre Leukozyten <i>(polymorphonuclear leukocytes)</i>
PRR	Mustererkennungsrezeptoren <i>(pattern-recognition receptors)</i>
PYD	<i>pyrin domain</i>
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies <i>(reactive oxygen species)</i>
SAA	Serum Amyloid A
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>

TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>toll-like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
U	<i>Units</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

1 Einleitung

Der Schutz vor Infektionen durch verschiedene Pathogene, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten und die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremd ist für jeden Organismus lebenswichtig. Diese Aufgabe in unserem Körper übernimmt ein System aus verschiedenen Zellen, Botenstoffen und Geweben, das Immunsystem genannt wird. Es wird in das unspezifische, angeborene und das spezifische, erworbene System unterteilt [1].

1.1 Das angeborene Immunsystem

1.1.1 Allgemein

Das angeborene Immunsystem ist von Geburt an funktionstüchtig und wird auch als unspezifisch bezeichnet, da zunächst angenommen wurde, dass unabhängig vom Pathogen immer die gleichen Mechanismen zur Abwehr eingesetzt werden. Außerdem wird es beim Erkennen dieses Pathogens sofort aktiv und gilt als das entwicklungsgeschichtlich Ältere der beiden Systeme. Zu ihm gehören die ganz allgemeinen Barrieren, die das Eindringen des Keims verhindern, wie zum Beispiel der Säuremantel der Haut, die physikalischen Barrieren wie Epidermis und Schleimhäute, antimikrobielle Enzymsysteme, sowie der zelluläre Teil der unspezifischen Immunität: Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, Dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen. Der humorale Teil besteht aus dem Komplementsystem und verschiedenen Zytokinen.

Alle Zellen des Blutes stammen von der hämatopoetischen Stammzelle aus dem Knochenmark ab. Sie bildet auch die Vorläufer-Zellen für die myeloische und lymphatische Reihe. Aus der Vorläuferzelle der myeloischen Reihe, dem myeloiden Progenitor, gehen alle Zellen des angeborenen Systems bis auf die Natürliche Killerzelle hervor, die aus der lymphatischen Reihe stammt [1].

Die Funktion des angeborenen Systems ist es, zu versuchen, eine Infektion zu verhindern und diese Infektion sonst sofort nach Erkennen anzugreifen und das erworbene System zu aktivieren, das einige Zeit braucht um seine volle Funktion ausüben zu können [1].

Die erste Barriere zur Verhinderung einer Infektion stellen die Oberflächenepithelien des Körpers dar. Sie bilden eine mechanische, chemische und mikrobiologische Abwehr. Von Bedeutung für die mechanische Abwehr sind die tight junctions, mit denen die Epithelzellen verbunden sind, und die Bewegung von Luft, Flüssigkeit oder Schleim zum Beispiel durch Zilien in der Lunge. Zu den chemischen Substanzen zählen die antimikrobiellen Enzyme Lysozym und Phospholipase A, die Bestandteile der Tränenflüssigkeit und des Speichels sind. Zu den antimikrobiellen Peptiden gehören die α -Defensine, die von den Paneth Zellen des Dünndarms gebildet werden und die β -Defensine, die von vielen anderen Epithelien produziert werden. Die kommensalen Bakterien, die als normale Flora aus nichtpathogenen Bakterien bestehend mit fast allen Epithelien assoziiert sind, stellen die mikrobielle Abwehr dar. Durch Konkurrenz um Nährstoffe und Anheftungsstellen und durch Produktion antimikrobieller Substanzen trägt sie zur Verhinderung einer Infektion bei [1].

Für das sofortige Erkennen einer Infektion spielen die Makrophagen eine große Rolle. Sie halten sich in fast allen Geweben auf und töten Pathogene, aber auch tote Zellen oder Zellbestandteile und phagozytieren sie. Dann schütten sie Zytokine aus, die weitere Immunzellen aktivieren und durch Chemotaxis an den Ort der Infektion rekrutieren. Monozyten sind die Vorläufer der Makrophagen und halten sich vorwiegend in der Blutbahn auf. Sobald sie in das Gewebe emigrieren differenzieren sie zu Makrophagen. Monozyten und Makrophagen zusammen bilden einen der drei Typen phagozytischer Zellen: die anderen sind die Granulozyten, die kurzlebig sind und die dendritischen Zellen. Außer der Phagozytose, Aktivierung und Rekrutierung weiterer Immunzellen induzieren die Makrophagen auch eine Inflammation durch die Ausschüttung

ihrer proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α , was die Infektionsbekämpfung durch das Immunsystem aktiviert und beschleunigt [1].

Es wird angenommen, dass die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten außer der Phagozytose noch eine weitere interessante Abwehr-Funktion haben: durch Sezernierung von Chromatin und granulären Proteinen wird eine fibrilläre extrazelluläre Matrix gebildet, die als NET (neutrophil extracellular trap) bezeichnet wird [2, 3]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass dadurch Bakterien, Pilze und Parasiten gelangen und eventuell getötet werden können [2, 4-6].

1.1.2 Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern-recognition receptors*)

Die Erkennung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem beruht auf Rezeptoren, die häufig vorkommende Merkmale von Pathogenen erkennen. Diese werden als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP, *pathogen-associated molecular patterns*) bezeichnet und ihre zugehörigen Rezeptoren als Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern-recognition receptors*). Einige dieser Rezeptoren kommen auf allen Phagozyten vor, einige nur auf Makrophagen. Die Funktionen der Mustererkennungsrezeptoren sind unterschiedlich: Als Rezeptoren auf Phagozyten stimulieren sie die Aufnahme des Pathogens, das sie erkannt haben. Andere Rezeptoren wirken chemotaktisch und lenken die Zellen zu Infektionsherden und wieder andere induzieren die Erzeugung von Effektormolekülen [1].

Zu den Mustererkennungsrezeptoren gehören: das lösliche Mannose-bindende Lektin, das den Lektinweg der Komplementaktivierung auslöst, so zur Opsonierung und schlussendlich zur Phagozytose des betreffenden Pathogens führt. In dieselbe Proteinfamilie der Kollektine gehören die Surfactant-Proteine A und D, die in der Lunge vorkommen. Oberflächliche PRRs sind der Makrophagenmannoserezeptor und Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR), die zu einem evolutionär alten Erkennungs- und Signalgebungssystem gehören, das bei der Reaktion auf Infektionen bei vielen Lebewesen von Bedeutung ist. Nach

Aktivierung des TLR durch ein PAMP wird über den NF- κ B Signalweg der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert. Eine Gruppe weiterer PRR, die den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, ist die Familie der NLR. Sie kommen im Zytosol der Zellen vor und erkennen Bestandteile von Bakterien. Außerdem werden sie durch ATP, Harnsäure-kristalle, bakterielle RNA und niedrige intrazelluläre Kalium Spiegel aktiviert [7]. Durch Aktivierung der NLRs schließen diese sich mit weiteren Proteinen zu einem Multiproteinkomplex, dem so genannten Inflammasom zusammen, wodurch Caspasen, aktiviert werden, was zu einer Sekretion der proinflammatorischen Moleküle IL-1 β und IL-18 führt [8, 9].

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt zur Produktion von wichtigen Mediatoren der angeborenen Immunität wie Cytokinen und Chemokinen und hilft bei der Aktivierung des erworbenen Immunsystems durch Expression costimulierender Moleküle auf der Zelloberfläche der Makrophagen und dendritischen Zellen (antigenpräsentierende Zellen). Diese Moleküle aktivieren, wenn sie zusammen mit Antigenpeptiden, die auf MHC-Klasse-II-Proteinen präsentiert werden, die naiven CD4- T-Zellen [1].

Das angeborene Immunsystem hat, wie oben bereits erwähnt, die Aufgabe das erworbene Immunsystem zu aktivieren. Diese Funktion übernehmen in erster Linie die Dendritischen Zellen (DC). Als unreife Zellen liegen sie im gesamten Körper in der Peripherie vor. Über die oben beschriebenen Rezeptoren können sie Antigene erkennen und werden durch Kontakt aktiviert. Das führt dazu, dass die Dendritische Zelle Zytokine ausschüttet, ausreift und zu einem Lymphknoten wandert, wo sie das Antigen einer T-Zelle präsentieren kann [1].

1.2 Das erworbene Immunsystem

1.2.1 Allgemein

Die zellulären Bestandteile des erworbenen Immunsystems sind die T- und B-Lymphozyten, die beide aus der lymphatischen Vorläuferzelle hervorgehen. Der

humorale Teil besteht aus den Immunglobulinen, die von den B-Zellen gebildet werden.

Der Unterschied des erworbenen Immunsystems zum Angeborenen ist, dass es bei Erstkontakt mit einem Pathogen aktiviert werden muss und dadurch eine gewisse Zeit benötigt bis es aktiv werden kann. Außerdem zeichnet es sich durch die hohe Variabilität und Spezifität der Rezeptoren auf den verschiedenen Lymphozyten aus. Jeder Lymphozyt trägt eine spezifische Variante eines Antigenrezeptors, so dass durch die gesamte Population von Lymphozyten ein riesiges Repertoire von Rezeptoren exprimiert wird. Das erworbene Immunsystem ist in der Lage ein Gedächtnis zu entwickeln, so dass eine Zweitinfektion auch durch das erworbene System schnell und effektiv bekämpft werden kann [1].

Wie oben erwähnt müssen Lymphozyten erst aktiviert werden, bevor sie ihre funktionelle Aktivität aufnehmen können. Nicht aktivierte Lymphozyten bezeichnet man als naive (ungeprägte) Lymphozyten. Werden sie durch Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen aktiviert, differenzieren sie vollständig aus. B-Lymphozyten (B-Zellen) differenzieren zu Plasmazellen. Diese sind in der Lage Antikörper zu produzieren, die dieselbe Antigenspezifität besitzen wie der B-Zell-Rezeptor. Das aktivierende Antigen wird also zum Ziel der gebildeten Antikörper. Antikörper werden auch als Immunglobuline bezeichnet und je nach Stimulation bilden die Plasmazellen unterschiedliche Klassen von Antigenen, die aber immer dieselbe Spezifität besitzen. Ändert eine Plasmazelle die Klasse ihres gebildeten Immunglobulins, wird dies als Klassenwechsel bezeichnet [1].

1.2.2 T-Lymphozyten

Es gibt zwei Hauptklassen von naiven T-Lymphozyten, die anhand ihrer Zelloberflächenproteine unterschieden werden. Sie werden mit der Abkürzung CD (*cluster of differentiation*) und einer entsprechenden Zahl bezeichnet. Die eine Klasse trägt das Protein CD4, die anderen das Protein CD8. Sie sind nicht nur für die Unterscheidung der beiden Klassen, sondern auch für die Funktion

von Bedeutung. Aktivierte T-Zellen differenzieren in einen von mehreren Typen der T-Effektorlymphozyten. Die CD8-T-Zellen werden zu Zytotoxischen T-Zellen. Die CD4-T-Zellen differenzieren zu T-Helferzelle oder zu regulatorischen T-Zellen.

Zytotoxische T-Zellen sind bei der Abwehr von intrazellulären Pathogenen von Bedeutung, vor allem von Viren. CD8-Zytotoxische T-Zellen erkennen ausschließlich pathogene Peptide, die auf MHC-I-Komplexen präsentiert werden. Wenn so eine infizierte Zelle erkannt wird, wird sie getötet [1].

Die T-Helferzellen (T_H -Zellen) kann man in weitere Subpopulationen einteilen, die aufgrund der unterschiedlichen Zytokine, die sie freisetzen, definiert werden. Die bekanntesten sind die T_H1 -, T_H2 -, T_H17 und T_{reg} -Zellen. Während der Aktivierung der CD4-T-Zellen entscheiden die zusätzlich ausgeschütteten Zytokine, welche Art der T-Zelle sich differenziert. Die T_H1 -Zellen entstehen unter dem Einfluss von IFN- γ und IL-12. Sie selbst produzieren die Zytokine IFN- γ und IL-2 und können Makrophagen dazu aktivieren intrazelluläre Erreger abzutöten, wenn diese damit infiziert sind. Und sie stimulieren die Antikörperproduktion antigenaktivierter B-Zellen, sowie den Klassenwechsel. Eine IL-4 Produktion durch Antigenpräsentierende Zellen führt zur Entstehung von T_H2 -Zellen. Sie sezernieren selbst auch IL-4 und führen einen Klassenwechsel der produzierten Immunglobuline herbei. Sie sind vor allem für den Wechsel zu IgE-Antikörpern von Bedeutung. Die Entwicklung der erst kürzlich beschriebenen T_H17 -Zellen findet unter IL-6 und TGF- β Einfluss aus naiven T-Zellen statt [10]. Sie sind an der Abwehr von Pathogenen beteiligt, die nicht adäquat durch T_H1 -, T_H2 -Zellen inaktiviert werden können und tragen zur Induktion der Inflammation bei [10-16].

Die regulatorischen T-Zellen tragen als einzige der CD4-T-Zellen nicht zur Aktivierung ihrer Zielzellen bei. Sie können unter anderem die T-Zell Antworten regulieren und sie durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine wie IL-10 und TGF- β unterdrücken [17, 18].

B- und T-Zellen können Gedächtniszellen bilden. Das bedeutet, dass sich immer einige der durch Antigenkontakt aktivierten B- und T- Zellen statt zu

Effektorzellen zu Gedächtniszellen differenzieren. Diese sind für die langanhaltende Immunität nach Erstkontakt mit einem Pathogen oder nach einer Impfung verantwortlich. Sie sind in der Lage sich bei einem zweiten Kontakt schnell in Effektorzellen zu differenzieren [1].

1.3 Myeloid derived suppressor cells (MDSC)

1.3.1 Allgemein

Als MDSC wird eine heterogene Zellpopulation myeloischer Herkunft bezeichnet. Sie wurde vor über 20 Jahren in Tumorpatienten erstmals beschrieben [19]. Die gemeinsamen Eigenschaften der MDSC sind ihre Fähigkeit T-Zell Immunantworten zu unterdrücken [20], die Zytokinproduktion von Makrophagen zu modulieren [21] und die Tumorangiogenese und Metastasierung zu fördern [22]. Die Anzahl der MDSC steigt unter bestimmten pathologischen Bedingungen wie Krebs, Infektionen, Sepsis, Trauma und Autoimmunkrankheiten [20]. Unter diesen Bedingungen differenzieren die unreifen myeloischen Zellen nicht zu reifen Makrophagen, Dendritischen Zellen oder Granulozyten sondern entwickeln vielmehr immunsuppressive Funktionen unter anderem Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) und NO (*nitric oxide*), die Expression von Arginase 1 und induzierbarer NO Synthase [20].

Im Mausmodell sind die MDSC schon sehr gut untersucht [23-25], wohingegen es nur wenige Studien zu MDSC beim Menschen gibt [26].

1.3.2 Charakterisierung der MDSC in Mäusen

MDSC besitzen nicht die Oberflächenantigene der ausgereiften myeloischen Zellen, sehen morphologisch aber aus wie Granulozyten oder Monozyten [27]. In Mäusen sind MDSC durch die Koexpression von GR1, CD11b [28] und CD 31 charakterisiert [29]. Es wurden zwei Subpopulationen identifiziert, wobei die

granulozytären MDSC (PMN-MDSC) den Phänotyp $CD11b^+LY6G^+Ly6C^{low}$ zeigen und die monozytären MDSC (MO-MDSC) den Phänotyp $CD11b^+LY6G^-Ly6C^{high}$ zeigen [30]. CD80, CD115 und CD124 (IL-4 α) konnten als weitere, allerdings nicht als konstant beschriebene Oberflächenmarker für MDSC identifiziert werden [31-33]. Einige Autoren beschreiben, dass die PMN-MDSC hauptsächlich im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen auftreten und ihre suppressive Funktion über ROS-Produktion ausüben, während die MO-MDSC eher bei Inflammation auftreten und dadurch charakterisiert sind, dass sie viel NO produzieren und wenig ROS [27, 30].

1.3.3 Expansion und Aktivierung der MDSC

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Faktoren an der Expansion und Aktivierung von MDSC beteiligt sind. Die Faktoren zur Expansion der MDSC stimulieren die Myelopoese und inhibieren die Ausdifferenzierung der myeloischen Zellen. In Untersuchungen werden Zytokine und Faktoren genannt, wie die Cyclooxygenase 2 und Prostaglandine [34-36] VEGF [37], M-CSF [38], GM-CSF [39] IL-6 [40] und PPAR γ [41]. Die meisten dieser Faktoren wirken über den intrazellulären JAK-STAT-Signalweg und führen zu einer Aktivierung des Transkriptionsaktivators STAT3. Von einigen Autoren wird auch beschrieben, dass die STAT3 abhängige Hochregulation von S100A8 und S100A9 eine Expansion der MDSC bewirkt [42]. So zeigte eine andere Studie, dass pathologische oder persistierende Aktivierung von STAT3 in myeloiden Progenitor Zellen deren Ausdifferenzierung verhindert und so die MDSC Vermehrung fördert [20].

1.3.4 Funktionen der MDSC

Für die suppressiven Funktionen der MDSC ist nicht nur ihre Vermehrung sondern vermutlich auch ihre Aktivierung von Bedeutung. Es wurden verschiedene Faktoren beschrieben, die zur Aktivierung beitragen können.

Dazu gehören IFN- γ [30, 43], Liganden der TLR [44], IL-4 [45], IL-13 [46] und TGF- β [47]. Sie führen unter anderem über den IL-4 α Rezeptor zur Aktivierung von Signalwegen, an denen STAT6 [48], STAT1 und NF κ B beteiligt sind [33, 45, 49]. Über diese Signalwege werden auch die Arginase 1 und iNOS hochreguliert [33, 50], sodass über die immunsuppressiven Mechanismen die Aktivität der MDSC gesteuert wird.

Die Hauptmechanismen zur Immunsuppression der MDSC sind wie oben bereits beschrieben die Produktion von NO und ROS und die Aktivität der Arginase. Weitere Mechanismen sind die Sekretion von TGF- β [51, 52], die Induktion von regulatorischen T-Zellen [32, 53, 54], der Abbau von Cystein [55] und die Hochregulation der Cox2 und Prostaglandin E2 [56].

1.3.5 MDSC beim Menschen

Die Charakterisierung der MDSC beim Menschen stellt sich als schwierig dar und ist daher noch unvollständig, da unter anderem beim Menschen das Antigen GR1 nicht vorhanden ist und es ebenfalls keinen eindeutigen Marker für MDSCs gibt. In verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Marker zur Identifizierung der MDSC beschrieben [57]. Allgemein dienen die gewöhnlichen Zellmarker für myeloide Zellen CD11b und CD33 zur Beschreibung der MDSC. Für die Monozytären MDSC gelten die Faktoren HLA-DR^{neg} und CD14⁺ als charakteristisch [58-65]. Zur Charakterisierung der Granulozytären MDSC gilt CD15 als gesichert. Außerdem werden sie als Granulozyten beschrieben, die sich nach der Dichtegradienten Separation in der PBMC Fraktion befinden [57]. Weitere Antigene zur Beschreibung der Granulozytären MDSC variieren je nach Autor: CD66b [66, 67], CD14^{neg}, VEGFR1, CD34, IL4R α und CD16 [68-75].

Zur weiteren Untersuchung der MDSC ist es von Vorteil, wenn die Möglichkeit besteht, sie *ex vivo* zu generieren. In verschiedenen Studien werden dazu unterschiedliche Möglichkeiten beschrieben. Die MDSC sind dabei als myeloische Zellen definiert, die die T-Zell Aktivität inhibieren. Aus hämatopoetischen Stammzellen können MDSC mithilfe verschiedener Zytokine generiert werden [76]. Die Gewinnung von MDSC aus PBMC gesunder

Spender ist für uns von noch größerem Interesse, da diese einfacher zu gewinnen sind. Mit GM-CSF + IL-6, PGE₂, TNF- α oder VEGF können CD33+ Zellen mit T-Zell supprimierender Funktion generiert werden, wobei die besten Ergebnisse für GM-CSF+IL6 beschrieben werden [67].

Zusammenfassend sind MDSC eine Zellgruppe, deren Relevanz für viele Krankheitsbilder erst in den letzten Jahren deutlich geworden ist. Bei Mäusen sind sie sehr gut charakterisiert, wohingegen die genaue Beschreibung der MDSC beim Menschen noch unvollständig ist. Da sie eine große Rolle in der Modulation des Immunsystems spielen, ist die genauere Untersuchung ihrer Aktivität und Funktion auch für alle Arten von Krankheiten von großem Interesse, die mit Infektion oder Inflammation einhergehen.

1.4 Zystische Fibrose (CF, *Cystic fibrosis*)

1.4.1 Allgemein

Die Zystische Fibrose, auch Mukoviszidose genannt, ist eine syndromale Erkrankung der exokrinen Drüsen mit häufig schwerwiegenden Problemen im Bereich der Verdauung und der Atmung. Sie ist die häufigste autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung. Der Gendefekt liegt im CFTR-Gen auf Chromosom 7, das für das zystische Fibrose-Transmembran-Regulations-Protein kodiert. Es ist für die Regulation des transmembranösen Chloridionenflusses verantwortlich. Dieser Chloridkanal befindet sich an der apikalen Zelloberfläche exokriner Drüsen. Unter physiologischen Bedingungen ist er dafür zuständig, dass Chlorid in das Lumen sezerniert wird, dem Wasser durch osmotische Wechselwirkung über zelluläre und parazelluläre Wege folgt. So bleiben die sezernierten Sekrete der exokrinen Drüsen flüssig und können abfließen. Ist die Regulation des Chloridflusses aufgrund des defekten Kanals jedoch gestört, entsteht eine Störung der Wasser- und Elektrolytströme durch die Zellmembran. Chlorid kann nicht mehr sezerniert werden, was zu einer Akkumulation von Chlorid in der Zelle und sekundär zu einem Einstrom von

Natrium und Wasser führt, um das elektrochemische Gleichgewicht in der Zelle aufrecht zu erhalten. Für die exkretorischen Organe und Epithelien bedeutet dies, dass das produzierte Sekret hochviskös und zäh wird, so dass es nicht mehr richtig abfließen kann, was im Laufe der Jahre über verschiedene Mechanismen zu Organschäden führt.

Klinisch manifest wird der Gendefekt an den Schleimhäuten der Nase, des Darms und der Lunge, der Bauchspeicheldrüse, den Gallengängen und dadurch an der Leber, den Schweißdrüsen und den Keimdrüsen des Mannes.

Die Morbidität der CF Patienten wird in der Regel von ihrer chronischen Lungenerkrankung bestimmt [77, 78]. Diese ist typischerweise charakterisiert durch die Entwicklung bronchialer Inflammation, Bronchiektasien und durch den progressiven Verlust der Lungenfunktion, der schlussendlich zum Tod führt [79]. Die Gründe für den progressiven Verlust der Lungenfunktion sind in den letzten Jahren immer wieder Gegenstand der Forschung, doch die genauen Mechanismen der primären bakteriellen Kolonisation und der daraufhin folgenden inflammatorischen Immunantwort sind bis heute nicht vollständig geklärt [79].

1.4.2 Infektion der Atemwege

Bezüglich der Lungenerkrankung bei Zystischer Fibrose haben verschiedene Autoren gezeigt, dass der CFTR Defekt dazu führt, dass das Volumen des Flüssigkeitsfilms des Atemwegsepithels verringert ist [80-82]. Dadurch können sich die Zilien nicht mehr richtig bewegen und so kommt es zu einer reduzierten mukoziliären Clearance. Diese führt zu einer Obstruktion der Atemwege mit Mukus und zu einer reduzierten Antigen Clearance, was die Infektion und Kolonisation der Atemwege mit Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* begünstigt. Außerdem trägt die verringerte Clearance zur Chronifizierung dieser Infektionen bei Patienten mit Zystischer Fibrose bei [79]. Weitere Studien haben gezeigt, dass der Flüssigkeitsfilm nicht nur verringert ist, sondern auch nicht isoton ist, wodurch eine Umgebung mit hoher Salzkonzentration entsteht, die die Funktion natürlich vorkommender

antimikrobieller Peptide neutralisiert [83, 84]. Andere Autoren haben das CFTR-Molekül an sich als Rezeptor für *P. aeruginosa* diskutiert [85].

1.4.3 Die Rolle Neutrophiler Granulozyten bei der Inflammation

Durch die bakteriellen Infektionen und Kolonisationen werden Zellwandbestandteile, Lipopolysaccharide, Flagellen und DNA der Bakterien als PAMPS frei und führen zu einer proinflammatorischen Immunantwort [86], die von Neutrophilen Granulozyten dominiert wird [87]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sich in der Lunge bei Patienten mit Zystischer Fibrose mehr Neutrophile Granulozyten und erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 sowie erniedrigte Spiegel anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 befinden [88, 89]. Es wird angenommen, dass die Zellen des respiratorischen Epithels unter anderem für die Freisetzung einiger proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 verantwortlich sind [90], welches als Chemokin für Neutrophile Granulozyten fungiert [91]. In der Lunge angekommen werden die Neutrophilen Granulozyten aktiviert, so dass sie Proteasen, Oxidantien, DNA und kationische Proteine freisetzen, um Bakterien zu beseitigen [92]. Wenn diese Moleküle in hohen Mengen freigesetzt werden, können sie das respiratorische Epithel der Lunge weiter schädigen, woraufhin noch mehr proinflammatorische Zytokine freigesetzt werden [93, 94]. Dies führt zur Rekrutierung von noch mehr Neutrophilen Granulozyten, wodurch ein Zyklus entsteht, der zu immer mehr Inflammation der Lunge führt [90, 95]. Die Aufgabe der Neutrophilen Granulozyten am Ort der Infektion, die effektive Phagozytose von Bakterien, wird ihnen durch verschiedene Mechanismen zusätzlich erschwert. Das saure Milieu der CF-Lunge aufgrund des defekten CFTR Proteins führt z.B. dazu, dass die Neutrophilen Granulozyten nach der Phagozytose von Bakterien eher in Nekrose statt in Apoptose gehen, wodurch die Lunge zusätzlich geschädigt wird [96]. Außerdem ist die Funktion der Neutrophilen Granulozyten CXCR1 abhängig. Dieser Chemokinrezeptor ist für die Aktivierung der Neutrophilen Granulozyten durch IL-8 zuständig [97].

Es gibt, wie oben ausgeführt, viele Untersuchungen und Theorien zur Funktion der Neutrophilen Granulozyten bei CF und deren Mechanismen zur Schädigung der Lunge. Wenig ist bisher jedoch über die in der Mukosawand dominierenden Lymphozyten und deren Verbindung zu den Aktivitäten der Neutrophilen Granulozyten bekannt.

1.4.4 Inflammation und die Rolle der adaptiven Immunantwort

Verschiedene Untersuchungen haben bisher die Theorie unterstützt, dass die Inflammation bei CF eine von T_H2 -Zellen dominierte Erkrankung ist [79]. Eine Studie mit *P. aeruginosa* infizierten Patienten zeigte, dass mehr T-Zellen aus der Bronchoalveoläre Lavage (BAL) CCR4 exprimieren – ein Chemokin Rezeptor, der vor allem auf T_H2 -Zellen exprimiert wird. Außerdem wurden erhöhte IL-4 und IL-13 Spiegel in der BAL gemessen [98]. Da die IL-4 und IL-13 Spiegel aber in der BAL gemessen wurden, bleibt die zelluläre Quelle unklar und obwohl auch andere Belege existieren, wie erhöhte Atopie bei CF, die die Überlegung einer T_H2 -Zell dominierten Erkrankung unterstützen, erklärt dies nicht die von Neutrophilen Granulozyten dominierte Inflammation der Lunge bei Zystischer Fibrose [79].

Neuere Untersuchungen fokussieren auf die Rolle der T_H17 -Zellen im Inflammationsgeschehen bei Zystischer Fibrose.

IL-17 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das von $CD4^+$ T-Zellen sezerniert wird und auf viele unterschiedliche Zelltypen wirkt [99]. Es induziert die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine wie $TNF-\alpha$, IL- 1β , IL-6, GM-CSF und G-CSF [100-102]. So reguliert es unter anderem die Rekrutierung, Aktivierung und Migration der Neutrophilen auch in der Lunge [103, 104] und die Granulopoese [12].

Zwei Studien konnten zeigen, dass aus naiven T-Zellen unter IL-6 und $TGF-\beta$ Einfluss oder in Co-Kultur mit regulatorischen T-Zellen T_H17 -Zellen entstehen können [105, 106]. Diese Ergebnisse deuten auch daraufhin, dass IL-23 eher für die Expansion dieser Zellen verantwortlich ist [79].

Unter Berücksichtigung der Funktionen von T_H17-Zellen und IL-17 könnten diese Zellen maßgeblich am Zusammenspiel des adaptiven Immunsystems mit der Rolle der Neutrophilen Granulozyten im Inflammationsgeschehen bei Zystischer Fibrose beteiligt sein [79, 99, 107-111].

Es konnten bis jetzt erhöhte IL-17 Spiegel [99, 109, 111], IL-17 Immunreaktionen im Gewebe [110] sowie T_H17-Zellen [99] bei Patienten mit Zystischer Fibrose nachgewiesen werden.

Im Zusammenhang mit den von uns untersuchten MDSC könnten die T_H17-Zellen über die Induktion der Expression pro-inflammatorischer Zytokine interessant sein, da sie so auch zu einer Induktion der MDSC beitragen könnten.

1.5 Muckle-Wells Syndrom (MWS)

Das Muckle-Wells Syndrom gehört zu den Kryopyrinopathien (CAPS: *Cryopyrin-associated periodic syndroms*), die eine Untergruppe der vererblichen periodischen Fiebersyndrome darstellen. Zu CAPS gehören drei verschiedene Krankheitsvarianten unterschiedlichen Schweregrades, wobei die leichteste Form die familiäre Kälteurtikaria, die mittelschwer verlaufenden Form das Muckle-Wells Syndrom und die am schwersten verlaufende Form das NOMID/CIN CA-Syndrom (*Neonatal onset of multisystemic inflammatory disease/chronic infantile neurological, cutaneous and articular syndrome*) darstellt [112]. Bei den CAP-Syndromen handelt es sich um eine Gruppe seltener Erkrankung mit nur wenigen weltweit bekannten Fällen, so dass eindeutige Angaben zur Prävalenz nicht getroffen werden können [113]. Die Mutationen, die zu CAPS führen liegen auf Chromosom 1 im NLRP3 Gen, das für Kryopyrin/NALP3 kodiert. Letzteres stellt eine Schlüsselkomponente des Inflammasoms dar und führt durch Mutation zu einer erhöhten Inflammasomaktivität, die eine unkontrollierte IL-1 β -Sekretion zur Folge hat, was in Autoinflammation resultiert [114, 115].

Das Muckle-Wells Syndrom wird autosomal dominant vererbt und wurde erstmals von Muckle und Wells 1962 anhand von 9 betroffenen

Familienmitgliedern einer 5-Generationenfamilie beschrieben [116]. Zu den Symptomen des MWS zählen wiederkehrende Fieberschübe, urtikarielle Exantheme, muskuloskelettale Schmerzen, Kopfschmerzen, Arthralgien und Arthritiden der großen Gelenke, ophthalmologische Symptome wie Konjunktivitis, seltener Episkleritis oder Iridozyklitis sowie eine progressive sensorische Taubheit [117-120]. Als Komplikation tritt in 10-50% eine systemische Amyloidose vom Typ AA auf [117]. Diese kann zu einer irreversiblen Nierenschädigung bis hin zur Dialyse- bzw. Transplantationspflichtigkeit führen, was die Prognose der Patienten entscheidend beeinflusst [119].

Laborchemisch lassen sich vor allem während akuter Phasen der Erkrankung eine Leukozytose, sowie erhöhte Plasma Spiegel von Akute Phase Proteinen, wie CRP (C-reaktives Protein) und Serum Amyloid A (SAA) nachweisen [121]. SAA ist ein Protein, das in Form von polymeren Fibrillen extrazellulär abgelagert wird und so zur systemischen Amyloidose führt [122].

Die Erstmanifestation des MWS ist meist schon im Kindesalter, wobei es sich in Einzelfällen auch erst im Erwachsenenalter manifestiert [119, 123].

Die Therapie des Muckle-Wells Syndroms besteht in der Gabe von Anti-IL-1 β Antikörper. Dafür ist Canakinumab als humaner Anti-IL-1 β Antikörper zugelassen, der selektiv IL-1 β blockiert und keine Kreuzreaktionen mit anderen Interleukinen der Interleukin-1 Familie zeigt [124]. Er weist eine Halbwertszeit von 3-4 Wochen auf und reduziert so die erforderlichen Injektionen im Vergleich zu den bisher existierenden Anti-IL-1 Therapeutika Anakinra und Rilonacept [124]. Die meisten Patienten sprechen innerhalb von weniger als 24 Stunden nach der ersten subkutanen Gabe von Canakinumab mit einer Verbesserung der klinischen Symptome und der laborchemischen Entzündungsparameter an [125].

1.5.1 Das Inflammasom

Inflammasome sind zytoplasmatische Multiprotein Komplexe, die die Aktivierung von inflammatorischen Caspasen vermitteln [126] und so zur Caspase abhängigen proteolytischen Reifung und Sekretion von IL-1 β führen

[127]. Bisher wurden 4 verschiedene Inflammasomtypen beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer Bestandteile voneinander unterscheiden und nach ihren Sensorproteinen benannt sind. Drei der Sensorproteine gehören zur Familie der NLR: das NLRP1, das NLRP3 und das NLRC4 [127].

Die Familie der NLR umfasst beim Menschen 22 Mitglieder, die das Pendant zu den extrazellulären TLR darstellen, wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben. Die NLR werden durch verschiedenste intrazelluläre Stimuli und Signale aktiviert [7]. Sie weisen alle dieselbe Domäneorganisation auf, die eine N-terminale Pyrin Domäne (PYD, *pyrin domain*), Caspase rekrutierende Domäne (CARD, *caspase-recruitment domain*) oder eine BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*) [128], eine Leucin-reiche Sequenzwiederholung (LRR, *leucine-rich repeat*) am Carboxyterminus und eine dazwischen geschaltete Nukleotid bindende Domäne (NACHT, *nucleotide-binding domain*) aufweist [7].

Neben dem NLR Kryopyrin besteht das NALP3 Inflammasom aus drei weiteren Komponenten: einem Adaptorprotein ASC (apoptosis associated speck-like protein containing a CARD), CARDINAL und einer Caspase-1 [129].

Das in unserem Fall interessante NALP3 Inflammasom wird von verschiedenen physikalischen und chemischen Stimuli aktiviert, dazu zählen unter anderem endogene Stress Signale, wie extrazelluläres ATP oder Harnsäurekristalle, exogene Partikel wie Aluminiumsalze und Titaniumdioxid sowie verschiedene Pathogene und Poren bildende Toxine [127].

Einen weiteren Mechanismus zur Regulation der Inflammasom Aktivität stellt das sogenannte Priming dar. Kryopyrin liegt im Zytoplasma nicht im Überfluss vor, während ASC und Caspase-1 immer zur Verfügung stehen [130]. Die NLRP3-Expression kann aber durch verschiedene inflammatorische Stimuli induziert werden [131, 132], so dass die NLRP3 Konzentration signifikant ansteigt, was die Schwelle der Inflammasomaktivierung herabsetzt.

1.5.2 Interleukin (IL) -1 β

Zum Verständnis der Pathogenese des Muckle-Wells Syndroms ist die genauere Betrachtung der Funktionen von IL-1 β hilfreich, denn durch die Mutation im NLRP3 Gen kommt es vermutlich zur Autoaktivierung des Inflammasoms in Abwesenheit exogener Stimuli [133], was zu einer verstärkten IL-1 β Produktion führt [7, 134].

IL-1 β gehört der IL-1 Familie an, zu der noch 10 weitere Mitglieder gehören; unter anderem IL-1 α und IL-18 [135].

Die pyrogene Funktion ist eine der Hauptfunktionen von IL-1 β , wobei es außerdem unter physiologischen Umständen unter anderem als Antwort auf Infektion, Verletzung und immunologischen Stress ausgeschüttet wird [7, 129]. Außerdem machen es die potenten proinflammatorischen und pyrogenetischen Aktivitäten von IL-1 β notwendig, dass seine Freisetzung streng kontrolliert wird [127]. Dies geschieht einerseits über die Regulation der Aktivierung des Inflammasoms selbst, wie in Kapitel 1.5.1 beschrieben, andererseits unterliegt auch Pro IL-1 β einem Priming. So wird Pro IL-1 β nicht dauerhaft in Myeloiden Zellen exprimiert, sondern durch inflammatorische Stimuli wie LPS und viele andere NF- κ B Aktivatoren (TNF, IL-1 α und β , etc.) induziert [131, 136].

Seine proinflammatorischen Funktionen übt IL-1 β unter anderem über Genexpression von Cyclooxygenase-2 (Cox-2), Phospholipase A2 und iNOS aus, so dass mehr Prostaglandin E2 (PGE2), Thrombozyten aktivierender Faktor und NO produziert werden [135]. Daraus resultiert unter anderem Fieber und Vasodilatation. Außerdem steigert IL-1 β die Expression von Adhäsionsmolekülen auf mesenchymalen und endothelialen Zellen [135]. Es gibt Hinweise darauf, dass IL-1 β als angiogenetischer Faktor in der Tumormetastasierung eine Rolle spielt. IL-1 β wirkt auch auf Knochenmark Stammzellen, in dem es die Differenzierung der myeloiden Progenitorzellen anregt. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Menschen auf die Gabe von IL-1 β Fieber entwickeln und außerdem unter anderem erhöhte Spiegel Neutrophiler Granulozyten, NO, akute-Phase Proteine und verschiedener Chemokine und Zytokine aufweisen. Insbesondere ist die IL-6 Produktion sensitiv auf IL-1 β [135, 137, 138].

Zu der Rolle von IL-1 β im Kontext mit T-Zell Immunantworten konnte bisher festgestellt werden, dass IL-1 β eine T_H2 Immunantwort fördert [139]. Die Antikörperproduktion von B-Zellen scheint auch IL-1 β abhängig zu sein. Dieses Ergebnis könnte aber auch daher kommen, dass die B-Zell Proliferation IL-6 abhängig ist und somit von IL-1 β beeinflusst wird [140]. Verschiedenen Studien konnten unterschiedliche Aspekte zur Generation von T_H17-Zellen und Sekretion von IL-17 zeigen. In einer war die IL-17 Produktion IL-1 abhängig [141], in einer anderen war sie IL-23 abhängig, wobei die IL-23 Produktion in Monozyten IL-1 β abhängig war [142]. Einige Studien an Mäusen konnten zeigen, dass zur T_H17 Differenzierung IL-6 und TGF- β vorhanden sein müssen, wobei IL-1 β keinen Effekt zeigte [143]. Es könnte aber trotzdem eine Kaskade existieren, bei der die Th17 Induktion über IL-1 β abhängiges IL-6 und IL-23 IL-1 β abhängig ist [135]. Eine andere Studie in menschlichen Zellen zeigte, dass IL-1 β die T_H17-Zellen Polarisation induzierte, was durch IL-6 verstärkt und durch TGF- β supprimiert werden konnte [144]. Auch andere Autoren berichten von einer Antagonisierung IL-1 β induzierter T_H17-Zellen durch TGF- β [145]. Die Daten zusammen genommen, könnte man davon ausgehen, dass IL-1 mit der IL-17 Produktion zusammenhängt. Verschiedene Studien zeigen auch, dass IL-1 und IL-17 synergistisch bei der Induktion von NO, PGE und Knorpelzerstörung wirken. [135]

Über den möglichen Zusammenhang zwischen IL-1 β und IL-17 könnte IL-1 β auch für die MDSC Induktion eine Rolle spielen.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Die CF Lungenerkrankung ist durch ein komplexes Zusammenspiel aus Infektion und Inflammation gekennzeichnet [146-148], bei der die Immunreaktionen des angeborenen und des erworbenen Systems eine entscheidende Rolle spielen [79, 148, 149]. Basierend auf diesen Charakteristika der Erkrankung wollten wir untersuchen, ob sich bei CF-Patienten erhöhte Myeloid derived suppressor cells (MDSC) Spiegel zur

Beeinflussung der Interaktion der beiden Systeme finden und diese eventuell entscheidend für den Verlauf der Erkrankung sind.

Das Muckle-Wells Syndrom (MWS) gehört, wie in Kapitel 1.5 ausgeführt, zu den Autoinflammatorischen Erkrankungen, bei denen eine genetische Mutation zu einer verstärkten IL-1 β Produktion führt. IL-1 β weist viele verschiedene Funktionen auf und wirkt über die Induktion von Neutrophilen Granulozyten als auch diverser proinflammatorischer Zytokine und akuter Phase Proteine auf das angeborene Immunsystem, aber zum Beispiel über Induktion von T_H-17 Zellen auch auf das erworbene Immunsystem [150]. So scheinen auch beim MWS beide Systeme eine entscheidende Rolle zu spielen, aufgrund dessen wir auch hier die Anzahl und Funktion von MDSC untersuchen wollten, die den Verlauf der Erkrankung durch Regulierung der Inflammation unter Umständen entscheidend beeinflussen könnten.

2 Material

2.1 Geräte

Produkt	Hersteller
Lichtmikroskop Olympus IX50	Olympus
Brutschrank Heracell	Heraeus/Thermo scientific
Sterile Werkbank <i>Hera safe</i>	Heraeus
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch
Zentrifuge Varifuge 3.2RS	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 16R	Heraeus
FACSCalibur	BD Bioscience
Beheizbares Wasserbad	memmert
Neubauer Zählkammer	Hausser

Vortex Mixer	neoLab
Pipettierhilfe <i>Pipettboy</i> „swiftpet“	ABIMED
Verstellbare Pipetten 10, 20, 100, 1000 µl	Eppendorf
Auto MACS	Miltenyi Biotec
SuperMACS Separator	Miltenyi Biotec
Zellzählgerät	ABX

2.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
14 ml-Röhrchen	Greiner
50 ml Röhrchen	Greiner
96-Well Platte – Rundboden	Greiner
MS Columns	Miltenyi Biotec
Pipettenspitzen (klein)	Greiner
Pipettenspitzen (groß)	Greiner
Abdichtfolie	Bemis
FACS Röhrchen	Becton Dickinson
Sterile Transferpipetten	ratiolab

2.3 Medien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Biocoll Separation Solution, Ficoll	Biochrom
Bovine Serum Albumin (BSA)	SIGMA
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
IL-2	R&D Systems
L-Glutamin	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Phosphat Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH
RPMI	Biochrom

FACSFlow	Becton Dickinson
Trypanblau	SIGMA
Steriles destilliertes Wasser, Ampuwa	Fresenius
CFSE	Invitrogen
Propidiumiodid	Sigma
Okt-3	Janssen Cilag
Heparin-Natrium-25 000	ratiopharm
EDTA	GE Healthcare

2.4 Stammlösungen

MACS-Puffer: 99,5% PBS
 0,5% BSA

Lysing Buffer in 1000ml: 8,29g Ammoniumchlorid
 1,00g Kaliumhydrogencarbonat
 0,0372g di-Natrium-EDTA-dihydrat

2.5 FACS Antikörper

Produkt	Hersteller
CD66b-FITC	Becton-Dickinson
CXCR2-APC	Becton-Dickinson
HLA-DR-PerCP	Becton-Dickinson
CD14-FITC	Becton-Dickinson
CD33-PE	Miltenyi Biotec
CXCR4-APC	eBioscience
IL-4R α -PE	Becton-Dickinson
CD14-APC	Becton-Dickinson
CCR3-PE	Becton-Dickinson
CD4	Becton-Dickinson
CD8	Becton-Dickinson

2.6 MicroBeads

Produkt	Hersteller
Anti-FITC MicroBeads	Miltenyi Biotec
CD 33 MicroBeads	Miltenyi Biotec

2.7 Blutproben

Für die Gewinnung von Blutzellen wurde Blut von gesunden Probanden, von Patienten mit Zystischer Fibrose und von Muckle- Wells Patienten verwendet.

3 Methoden

3.1 Zellisolation

Für die Isolation der PBMC wurde das Blut 1:1 mit PBS verdünnt und gut gemischt. Auf 4ml der Biocoll Separating Solution wurde in einem 15ml Falcon 10ml des Blut/PBS – Gemisches geschichtet und anschließend bei 20°C mit 400g und ausgeschalteter Beschleunigung und Bremse für 30 Min. abzentrifugiert. Der mononukleäre Ring wurde mit einer Pipette abgesaugt und in ein anderes 15ml Falcon überführt. Es folgten zwei Waschschrte, wobei die Zellsuspension bis 14ml mit RPMI aufgefüllt und invertiert wurde und anschließend bei 20°C mit 400g für 10 Min. abzentrifugiert wurde. Nach abkippen des Überstandes und Resuspendierung des Zellpellets in einem kleinen Volumen wurde der Waschschrte wiederholt. Zum Schluss wurde die Zellzahl mit Cobas Micros bestimmt.

Für die Isolation der PMN wurde das Blut wie oben beschrieben über eine Biocoll-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Da sich die PMN nach der Zentrifugation im Pellet befinden wurde das Plasma, die Interphase mit mononukleären Zellen und der Ficoll abgesaugt und verworfen. Es folgte ein Waschschrte, wobei das Pellet bis 14ml mit PBS aufgefüllt, resuspendiert und

bei 20°C mit 400g für 10 Min. abzentrifugiert wurde. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet für die Erylyse bis 14ml mit Lysing Buffer aufgefüllt, resuspendiert und für 30 Min. im Kühlschrank inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 20°C mit 400g für 10 Min. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in RPMI aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

3.2 Isolation CD66b positiver Zellen mittels *magnetic cell sorting* (MACS)

3.2.1 Prinzip

Um Experimente mit Zellen zu machen, die nur bestimmte Oberflächenantigene exprimieren, kann man diese mittels *magnetic cell sorting* isolieren. Dazu werden die Zellen mit einem bestimmten Antikörper gefärbt, der gegen ein Oberflächenantigen gerichtet ist. An diesen Antikörper sind kleine Eisenkügelchen gekoppelt. Lässt man diese Suspension in einem Magnetfeld über eine Säule laufen, die mit Metallkügelchen gefüllt ist, so bleiben die Zellen in der Säule, an die der Antikörper gebunden hat.

Soll eine positive Selektion erreicht werden, kann die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die Zellen eluiert werden.

Für eine negative Selektion kann die Säule verworfen und der Durchfluss ohne markierte Zellen verwendet werden.

3.2.2 Färbung und Markierung der Zellen

Für die Isolation der CD66b positiven Zellen aus den PBMC, wurden diese zuerst mit dem FITC-konjugierten Antikörper gefärbt, dann mit Anti-FITC MicroBeads magnetisch markiert und zum Schluss mit Hilfe des AutoMacs isoliert.

Nach der PBMC Isolation befinden sich die Zellen in RPMI. Da sie für die Färbung in PBS gelöst vorliegen sollten wurde das Falcon bis 14 ml mit PBS aufgefüllt und bei 20°C für 10 Min bei 300g abzentrifugiert. Nach abkippen des Überstandes wurde das Pellet pro 1×10^7 Zellen in 100 μ l PBS aufgenommen, 20 μ l CD66b-FITC AK zugegeben und für 10 Min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Um die gefärbten Zellen mit Anti-FITC MicroBeads zu labeln wurde nach Herstellerangaben verfahren. Zuerst wurden die Zellen gewaschen, um den restlichen ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Dafür wurde 1,5ml MACS-Puffer zugegeben und bei 20°C für 10 Min bei 300g abzentrifugiert. Nach Abkippen und Abnehmen des gesamten Überstandes wurde das Pellet pro 10^7 Zellen in 90 μ l Macs-Puffer aufgenommen, 10 μ l der Anti-FITC MicroBeads zugegeben und für 15 Min auf Eis inkubiert. Zum Schluss folgte ein Waschschrift, wofür 1,5 ml Macs Puffer pro 10^7 Zellen zugegeben wurde und bei 4°C für 10 Min bei 300g abzentrifugiert wurde. Nach Abnehmen des gesamten Überstandes wurde das Pellet in 500 μ l Macs-Puffer aufgenommen.

3.2.3 Antikörper positive Zell Selektion

Für die positive Selektion wurde der AutoMACS von Miltenyi Biotec verwendet, der nach dem unter 3.2.1 erklärten Prinzip arbeitet und die Zellen zweimal über eine Säule laufen lassen, um die Reinheit zu erhöhen.

War der AutoMACS nicht verfügbar wurde die Positiven Selektion von Hand durchgeführt. Dazu wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die MS Säule wurde in das Magnetische Feld des SuperMACS Separators platziert und mit 500 μ l Macs-Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und danach wieder mit 3 Mal 500 μ l Macs-Puffer gespült. Nach dem letzten Spülvorgang wurde die Säule aus dem MACS Separator genommen, 1ml Macs-Puffer darauf gegeben und die magnetisch gelabelte Fraktion durch Durchdrücken des mitgelieferten Stempels aus der Säule gespült.

3.3 FACS

Zur Charakterisierung von Oberflächenmolekülen und zur Quantifizierung der Zellen haben wir mit der Durchflusszytometrie gearbeitet. Ein Durchflusszytometer, in unserem Fall der FACSCalibur von Becton Dickinson, ist in der Lage Zellen auf Einzelzellebene anhand emittierten Fluoreszenzlichtes auf ihre verschiedenen Eigenschaften (Größe, Granularität, gebundene Antikörper) zu untersuchen.

Fluoreszenz bezeichnet man als die Eigenschaft, Licht höherer Wellenlänge bei Absorption Licht niedrigerer Wellenlänge zu emittieren. Dabei absorbieren Elektronen fluoreszierender Moleküle Photonen, gelangen dadurch auf ein höheres Energieniveau und beim Zurückfallen auf ihr ursprüngliches Energieniveau wird diese Energie in Form von Fluoreszenzlicht wieder frei. Solche fluoreszierenden Moleküle bezeichnet man auch als Fluorochrome.

Um also Fluoreszenzlicht detektieren zu können, müssen Fluorochrome als „Farbstoffe“ vorhanden sein. Dazu werden die Zellen mit Antikörpern gefärbt, die an Fluorochrome gekoppelt sind. Die Quantität des jeweiligen Antikörpers kann dann anhand der Fluoreszenz, die von dem an den Antikörper gebundene Fluorochrom emittiert wird, bestimmt werden. So lassen sich in kurzer Zeit für viele Zellen gleichzeitig mehrere Parameter untersuchen.

3.3.1 Prinzip

Für die Messung der Zellen mit dem Durchflusszytometer werden diese durch eine „Nadel“ von dem Gerät aufgesaugt und durch einen Hüllstrom verdünnt, so dass sie sich perlschnurartig in einem Flüssigkeitsstrom befinden. In dieser Form werden sie einzeln an einem Laser im 90° Winkel vorbeigeführt.

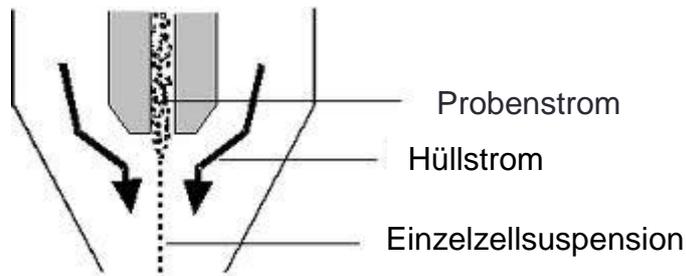


Abb. 2 Prinzip der Hydrodynamischen Fokussierung

[151] Prinzip der Hydrodynamischen Fokussierung: Der Hüllstrom fließt schneller als der Probenstrom und verjüngt so den Probenstrom zu einer Einzelzellsuspension, wobei sich Hüllstrom und Probenstrom nicht vermischen

Dabei wird die Lichtstreuung der jeweiligen Zelle als ihre physikalischen Messgrößen detektiert. Man unterscheidet das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) vom Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC). Das FSC wird in einem engen Winkel zum Laser-Licht, also in der Achse des einfallenden Lichts detektiert und ist ein Maß für die Zellgröße. Das SSC wird in einem Winkel von 90° gemessen und kommt durch die Lichtbrechung und Reflexion zustande, die von der Anzahl der Membranschichten abhängig ist, auf die der Laserstrahl trifft. Daher ist der SSC ein Maß für die Komplexität und Granularität der Zelle. Außer des Streulichtes wird auch das Fluoreszenzlicht detektiert. Dieses wird auch im 90° Winkel zur Laser-Quelle gemessen und da die Emissionsspektren jedes Farbstoffs sich in charakteristischer Weise unterscheiden kann man mehrere Farbstoffe durch einen Laser anregen. Für die optische Trennung der Emissionsspektren werden Farberteilerspiegel und Bandpassfilter verwendet, so dass das spektral getrennte Fluoreszenzlicht dann von Photomultipliern detektiert und in elektrische Signale umgewandelt werden kann. Dies geschieht für jeden Fluoreszenzbereich in einem extra Kanal. In dem von uns verwendeten Analysegerät FACSCalibur stehen über den ersten Argon-Laser mit 488nm drei Sensoren für 530nm (Fluoreszenzkanal1, FL1), 585nm (FL2) und >650nm (FL3) zur Verfügung und über einen zweiten Dioden-Laser mit 635nm wird ein weiterer Fluoreszenzkanal für 670nm (FL4) bereitgestellt [151].

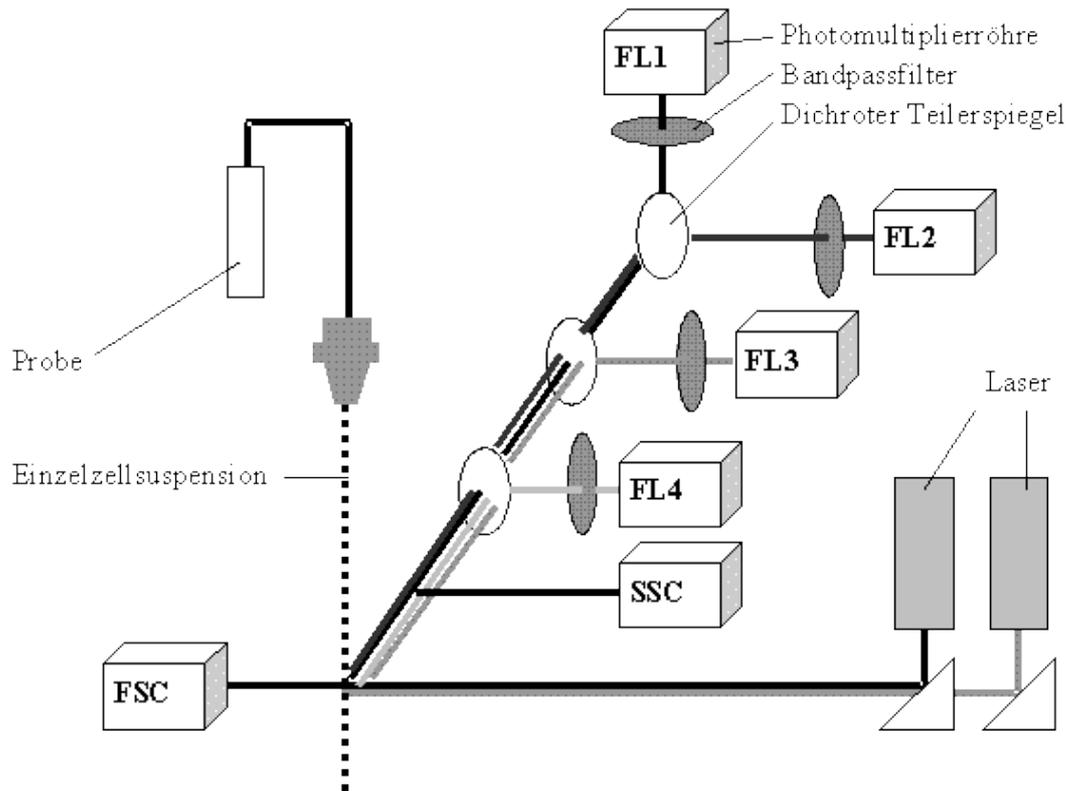


Abb. 3 [151] Aufbau eines FACS Gerätes und Darstellung der Strahlengänge

Tabelle 1 Charakteristika der vier zur Verfügung stehenden Fluoreszenzkanäle des FACSCalibur

Floureszenzkanal	Anregung durch	Absorptions-Maximum (nm)	Emissions-Maximum (nm)	Eingesetzte Fluorochrome
FL1	Laser 1: Argonlaser	488	530	FITC
FL2	Laser 1: Argonlaser	488	575	PE
FL3	Laser 1: Argonlaser	488	650	PerCP PI
FL4	Laser2: Diodenlaser	635	670	APC

3.3.2 Färbung, Messung und Auswertung

Färbung

Für die Messung am FACSCalibur wurden die Zellen zuerst mit Antikörpern, die an Fluorochrome gekoppelt sind gefärbt. Wir haben mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle bzw. Chemokinrezeptoren gearbeitet. Alle bekannten Oberflächenmoleküle, bzw. – antigene sind in dem CD-System (Cluster of Differentiation) katalogisiert und nummeriert und jeder Antikörper trägt die selbe CD Nummer wie das zugehörige Oberflächenantigen. Die Chemokinrezeptoren sind in einem anderen System eingeteilt. Dabei besteht der Name aus dem Rezeptor, an den sie binden, und einer Zahl zur Nummerierung.

Zur Untersuchung unserer Proben wurden folgende Antikörper verwendet:

CD66b-FITC

CXCR4-APC

CCR3PE

IL4-R α PE

Für die Färbung der PBMC oder PMN wurden 200.000 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit PBS für den ersten Waschschrift aufgefüllt. Nach der Zentrifugation mit 300 oder 400 g bei 20°C für 10 Min und abkippen des Überstandes wurden die Antikörper dazugegeben. Die Antikörper-Mengen wurden titriert. Im Einzelnen wurden pro 200.000 Zellen eingesetzt:

CD66b-FITC	5 μ l	
CXCR1-PE	2 μ l	
CD16-PerCP	2 μ l	
CXCR2-APC	10 μ l	für PMN: 20 μ l
CD14-FITC	5 μ l	
CD33-PE	2 μ l	
HLA-DR-PerCP	5 μ l	
CXCR4-APC	2 μ l	
IL4-R α -PE	5 μ l	
CCR3-PE	10 μ l	

Außerdem wurden pro 200.000 Zellen immer 0,4 µl Rabbit Serum zugegeben um unspezifische Bindungen zu verringern. Es folgte eine Inkubation für 10 Min bei Raumtemperatur im Dunkeln und anschließend ein letzter Waschschrift mit 3 ml PBS und Zentrifugation (300/400 g, 10 min, 20°C). Nach Dekantieren der Röhren waren die Proben messbereit. Sollte die Messung nicht innerhalb einer Stunde begonnen werden, wurden die Proben durch Zugabe von 80 µl 10% iger PFA Lösung in jedes Röhren fixiert und so bald wie möglich gemessen.

Messung

Anhand fluoreszierender Standardkalibrierungskügelchen (CaliBRITE Beads) wurden die Grundeinstellungen des Zytometers regelmäßig überprüft und justiert. Diesen Vorgang nennt man Kalibrierung.

Obwohl die vier parallel eingesetzten Fluorochrome (FITC, PE, PerCP und APC) so unterschiedliche Emissionsspektren haben, dass sie mittels des FACSCalibur einzeln gemessen werden können, überschneiden sich die Spektren doch so, dass es zu einer Überlappung der Spektren einzelner Fluorochrome kommt. Dies führt zu einer Verfälschung der einzelnen Parameter, da ein Detektor nicht nur das Signal eines Farbstoffs misst, sondern zu geringen Teilen auch das anderer Farbstoffe. Die Kompensation wird dazu genutzt, diese Messfehler auszugleichen. Zur Kompensation wurden Einzelfärbungen verwendet um die Intensität im Farbstoff-spezifischen Detektor sowie im Fremd Detektor genau zu ermitteln. Kompensation bedeutet, dass die Intensität im Fremd Detektor im Vergleich zum Farbstoff-spezifischen Detektor ermittelt und in Prozent angegeben wird und dieser Prozentanteil dann im Fremd-Detektor zur Korrektur abgezogen werden muss.

Zur Vorbereitung auf die Untersuchung der Zellen mittels der Durchflusszytometrie wurde das FACSCalibur Gerät 30 Min vor Messbeginn eingeschaltet und die für die Analyse notwendigen Einstellungen über das Computerprogramm CellQuest der Firma BD Biosciences vorgenommen.

Detectors/Amps:

Param	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	1.16	Lin
P2	SSC	406	1.00	Lin
P3	FL1	500	1.00	Log
P4	FL2	600	1.00	Log
P5	FL3	783	1.00	Log
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL4	920		Log

Compensation:

FL1 – 0,4% FL2

FL2 – 76,0% FL1

FL2 – 0,0% FL3

FL3 – 6,3% FL2

FL3 – 2,0% FL4

FL4 – 12,0% FL3

Abb. 4 Einstellungen des FACSCalibur zur Messung der MDSC

Zu Beginn der Untersuchung jeder einzelnen Probe wurde die Messung kurz gestartet, so dass in der FSC-SSC-Punktwolkendarstellung (Dotplot) die einzelnen Zellpopulationen voneinander abgegrenzt werden konnten. Dann wurde das Analysefenster (*Gate*) um die zu analysierenden Zellen, in unserem Fall die MDSC, gelegt und die Messung gestoppt. Die nun fokussierte Messung der MDSC wurde wieder gestartet bis innerhalb des Gates 10.000 Zellen (Total Events) gemessen wurden. Der Datensatz wurde für die spätere Auswertung der Ergebnisse gespeichert.

Nach der Messung wurde ein Reinigungsvorgang zur Beseitigung von Verunreinigungen durch die Proben durchgeführt. Dazu wurde der Durchflusszytometer erst mit FACS Safe desinfiziert, dann mit FACS Rinse gereinigt und anschließend mit destilliertem Wasser durchgespült.

Auswertung

Die Auswertung der bei der Messung akquirierten Daten erfolgte mit dem Programm CellQuest-Pro von BD Bioscience.

Um die MDSC genauer zu analysieren wurde zunächst ein FSC-SSC Dotplot erstellt, wobei die MDSC als Zellpopulation in einer Punktwolke erkennbar waren. Um die MDSC wurde ein Gate gelegt, das die Region 1 (R1) definierte. Dieses Gate wurde bei jeder Auswertung identisch gelegt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

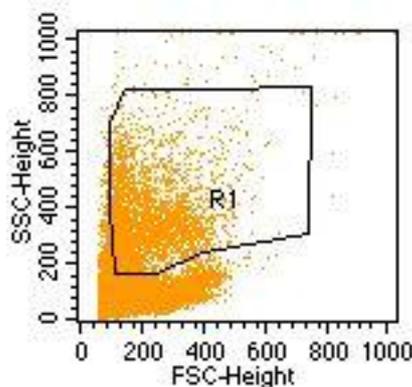


Abb. 5 Dotplot zur Auswertung der MDSC (*Myeloid derived suppressor cells*)

FSC-SSC Dotplot mit Gate um die MDSC, das die Region 1 definiert

Anschließend wurden die MDSC aus R1 in einem Dotplot, bei dem FL-1 gegen FL-4 aufgetragen wurden, ausgewertet. Dies erfolgte durch eine Quadrantenanalyse, bei der ein Fadenkreuz im Dotplot platziert wurde, das diesen in vier Quadranten unterteilte: den oberen linken (upper left, UL), den oberen rechten (upper right, UR), den unteren rechten (lower right, LR) und den unteren linken (lower left, LL). Die für nur FL-1 positiven Zellen kamen im UL, die für nur FL-4 positiven Zellen im LR, die für FL-1 und FL-4 positiven Zellen kamen im UR und die für keine der aufgetragenen Fluoreszenzen positiven Zellen kamen im LL zur Darstellung. Aus der Quadrantenstatistik konnten dann die Ergebnisse entnommen werden. Den Prozentanteil CD66b positiver Zellen (FL-1 positiv) aus der Gesamtzellzahl, also die als MDSC definierten Zellen, konnten als UR % Total + UL % Total abgelesen werden.

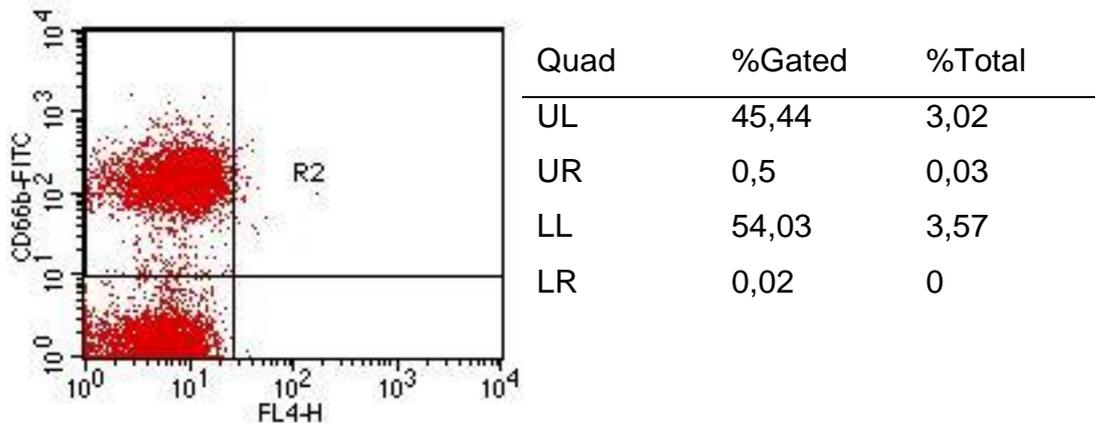


Abb. 6 Quadrantenanalyse mit Fadenkreuz, vier Quadranten und Quadrantenstatistik

Um den oberen rechten und den oberen linken Quadranten wurde erneut ein Gate gelegt, das die Region R2 definierte und nur noch CD66b positive Zellen erfasste. Die Zellen aus R2 wurden wieder in Quadrantenanalysen dargestellt, bei denen FL-2 oder FL-3 oder FL-4 gegen FL-1 aufgetragen wurde. Der Prozentanteil für FL-2 oder FL-3 oder FL-4 positiven Zellen an allen DC66b positiven Zellen wurde aus den Werten % Gated abgelesen und über folgende Formel ermittelt: $(UL+UR) / (UL+UR+LL+LR)$.

3.4 CFSE Proliferationsassay

Zur Untersuchung der Funktion der MDSC wurde der Carboxyfluoresceindiazetatsuccinimidylester (CFSE) -Proliferationsassay eingesetzt. Diese Methode beruht darauf, dass Carboxyfluoresceindiazetatester in die Zellen diffundiert und dort die Azetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen abgespaltet werden. So entsteht durch den verbleibenden Carboxyfluoresceinester ein intrazellulärer, membranundurchlässiger Fluoreszenzfarbstoff, dessen Intensität sich nach jeder Zellteilung halbiert. So kann man mittels der Durchflusszytometrie ungeteilte von geteilten Zellen unterscheiden.

3.4.1 Färbung der PBMC mit CFSE und Stimulation

Für die Färbung der PBMC mit CFSE wurden 10-20 Mio PBMC in ein 15 ml Falcon überführt und bei 400g für 10 Min ab zentrifugiert um die Zellen anschließend mit einmal 5 ml PBS für 6 Min bei 1300rpm zu waschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und resuspendiert. Für die Färbelösung wurde 1 µl CFSE – Färbereagenz in 5,625 ml PBS aufgenommen und gut gemischt. Von der Färbelösung wurde 1 ml zur Zellsuspension gegeben und alles mit einer Transferpipette gemischt. Anschließend wurde das Falcon mit den Zellen und der Färbelösung zum Start der Reaktion für 10 Min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml FCS wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen nach weiteren 2 Min mit 6 ml RPMI bei 350g für 5 Min abzentrifugiert und dekantiert. Das Pellet aus fertig gefärbten Zellen wurde in 1 ml RPMI – Vollmedium aufgenommen, das aus RPMI + 10% humanem Serum + 1 % L-Glutamin + 1%Penicillin/Streptomycin bestand. Anschließend wurde die Zellzahl mit der Neubauerkammer bestimmt.

Zur Stimulation der CFSE gefärbten Zellen wurden diese auf eine Konzentration von 500.000 Zellen / ml mit RPMI-Vollmedium eingestellt. Dafür wurden 2 Mio der CFSE gefärbten Zellen auf 4 ml mit RPMI-Vollmedium aufgefüllt. Die Endkonzentration der Stimulantien IL-2 und Okt3 sollte für IL-2 100 U/ml und für OKT3 1 µg/ml betragen. Um diese Endkonzentration zu erreichen wurde die Stocklösung von IL-2, die eine Konzentration von 2 Mio U/ml hatte, 1:100 verdünnt und aus dieser Verdünnung 30 µl zu den 2 Mio CFSE gefärbten Zellen gegeben. Für das OKT3 wurden 6 µl aus der Stocklösung, die eine Konzentration von 1mg/ml hatte, zu den Zellen gegeben. Diese stimulierten Zellen wurden nun in eine 96-well-Gewebekulturplatte (round bottom) pipettiert. In jedes Well wurde 120 µl, also 60.000 Zellen der stimulierten Zellen pipettiert. Für die Kontrollen ohne Suppressorzellen (MDSC) wurde das Well mit 60 µl RPMI-Vollmedium aufgefüllt. Für die Ansätze mit den MDSC wurden die CD66b+Zellen zunächst abzentrifugiert, ausgezählt und mit RPMI-Vollmedium auf eine Konzentration von 500.000 Zellen/ml eingestellt und dann je nach gewünschtem Verhältnis von PBMC zu MDSC in die Wells

pipettiert. Für eine Konzentration der PBMC zu den MDSC von 1:2 wurden 60 µl der MDSC also 30.000 Zellen zugegeben. Für eine Konzentration von 1:6 wurden 20 µl also 10.000 MDSC zugegeben. Mit allen anderen Zellen, die zu den PBMC dazu gegeben wurden wie z.B. die PMN wurde genauso verfahren wie mit den MDSC. Zum Schluss wurden alle wells mit RPMI-Vollmedium immer auf 180 µl aufgefüllt um überall die gleiche Endkonzentration der Stimulantien zu gewährleisten. Die 96-well-Platten wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO2 für 3-5 Tage inkubiert.

3.4.2 FACS-Färbung, Messung und Auswertung

Nach der Inkubation wurden die Zellen eines wells in ein FACS Röhrchen überführt und bei 450g für 3 Min abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Röhrchens wurde das Pellet durch Anschneiden in Lösung gebracht und einmal mit 3 ml PBS aufgefüllt, mit Parafilm abgedeckt und invertiert und bei 450g für 3 Min abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgekippt und nach Zugabe der Antikörper (2 µl CD8a-APC und CD4-PE pro Röhrchen) wurden alle Röhrchen 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein letzter Waschschrift mit 3 ml PBS, Zentrifugation bei 300 g für 10 Min und anschließendem Abkippen des Überstandes.

In jedes Röhrchen wurde kurz vor der Messung noch 1 µl Propidium Iodid (PI) zur Differenzierung toter und lebendiger Zellen zugegeben und 2 Min inkubiert, danach waren die Proben messbereit.

Die Proben wurden wie oben beschrieben am FACSCalibur mit folgenden Einstellungen gemessen:

Detectors/Amps:

Param	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	1.07	Lin
P2	SSC	447	1.00	Lin

P3	FL1	611	1.00	Log
P4	FL2	637	1.00	Log
P5	FL3	785	1.00	Log
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL4	843		Log

Compensation:

FL1 – 1,1% FL2

FL2 – 38,0% FL1

FL2 – 0,0% FL3

FL3 – 9,4% FL2

FL3 – 0,6% FL4

FL4 – 5,1% FL3

Abb. 7 Einstellungen des FACSCalibur zur Messung der Carboxyfluoresceindiazetatsuccinimidylester (CFSE)-gefärbten Zellen

Im FSC-SSC Dotplot wurde ein Gate zur Definition von R1 um die Lymphozyten und Monozyten gelegt. Alle Zellen aus R1 wurden mittels einer Quadrantenanalyse dargestellt, bei der FL-3 (PI) gegen FL-2 (CD4-PE) aufgetragen war. Anhand dieser Quadrantenanalyse wurde ein weiteres Gate für die Region R2 um alle PI negativen, also lebenden Zellen gelegt. Es wurden immer 10.000 Zellen in R1+R2 gemessen.

Die Auswertung der bei der Messung akquirierten Daten erfolgte wieder mit dem Programm CellQuest-Pro von BD Bioscience.

Bei dieser Auswertung ging es darum festzustellen, wie viel Prozent der lebenden Zellen sich über die 3-5 Tage geteilt hatten. Dafür wurde zunächst ein FSC-SSC Dotplot erstellt, in dem ein Gate für R1 um die Lymphozyten und Monozyten gelegt wurde. Um die lebenden von den toten Zellen zu differenzieren wurde ein weiterer Dotplot erstellt, bei dem PI gegen CD-4 PE aufgetragen war und ein Gate für R2 um die PI negativen Zellen gelegt wurde. Zur Unterscheidung der CD4 + Lymphozyten von den CD8 + Lymphozyten wurden zwei weitere Dotplots erstellt, wobei bei dem einen CD4-PE gegen

CFSE und bei dem anderen CD8-APC gegen CFSE aufgetragen war. Die CD4-positiven Zellen wurden in R3 „gegatet“ und die CD8-positiven Zellen in R5. Damit hatten wir in R1 alle Lymphozyten und Monozyten, in R2 alle lebenden Lymphozyten und Monozyten, in R3 alle CD4-positiven Lymphozyten und in R5 alle CD8-positiven Lymphozyten. Um fest zu stellen wie viel Prozent der Lymphozyten sich in jeder Probe geteilt hatten wurden nun jeweils zwei Histogramme erstellt, bei denen Counts gegen CFSE dargestellt waren. In einem wurden alle Zellen aus R1+R2+R3, also alle CD4-positiven, lebenden Lymphozyten und in dem anderen alle Zellen aus R1+R2+R5, also alle CD8-positiven, lebenden Lymphozyten dargestellt. In beiden Abbildungen wurde der Marker M1 nach dem ersten *Peak* gesetzt (Abb.), der alle Zellen beinhaltet, die sich nicht geteilt hatten. Demnach waren in M1 nur Zellen enthalten, die sich geteilt hatten. So konnte aus der Statistik zur Abbildung bei M1 aus %Gated der Prozentanteil aller Zellen, die sich in R1+R2+R3 bzw. in R1+R2+R5 geteilt hatten, abgelesen werden.

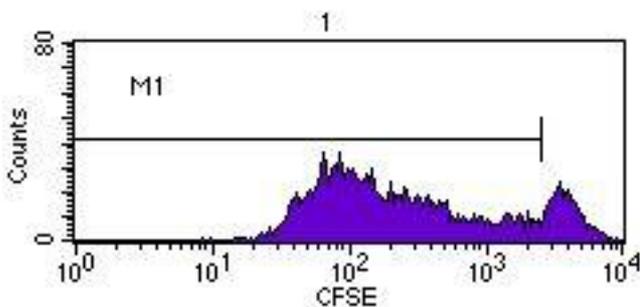


Abb. 8 Auswertung der CFSE gefärbten Zellen

Histogramm zur Feststellung wie viele lebende Lymphozyten sich geteilt hatten. Entweder mit R1+R2+R3 (alle CD4-positiven, lebenden Lymphozyten) oder mit R1+R2+R5 (alle CD8-positiven, lebenden Lymphozyten). M1 Bereich, innerhalb der sich alle geteilten Zellen befinden

3.5 Zytokin Analyse mittels Bio-Plex

Zur Analyse der IL-17 Produktion durch die T-Zellen des CFSE-Proliferationsassays haben wir die Überstände aus den CFSE Versuchen im Bio-Plex Protein Multiarray System (Bio-Plex Pro Human Cytokine Array, Bio-

Rad) untersucht. Für unser Experiment haben wir einen humanen 27-plex Assay verwendet und sind dabei nach Herstellerangaben vorgegangen.

3.6 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden nach Ausgabe durch das Laborgerät (FACSCalibur) oder nach Akten-Recherche (Klinische Daten) in ein Tabellenkalkulationsprogramm (EXCEL, Microsoft Cooperation) eingegeben.

Für die Statistische Analyse und Graphische Darstellung der Daten haben wir das Programm GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software) verwendet. Dabei haben wir den Students t test zur Feststellung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Gruppen angewendet und einen p-Wert $< 0,05$ als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Messung der MDSC

Wir haben die MDSC in peripherem Blut von CF-Patienten, MWS-Patienten und gesunden Kontrollen anhand von bereits beschriebenen Methoden gemessen [66, 152]. Wir haben PBMC isoliert und mit dem Durchflusszytometer auf Zellen mit hoher Granularität gegatet. Als MDSC haben wir dann die Zellen des Gates bezeichnet, die gleichzeitig CD66b^{high}CD33^{high}IL-4R^{int}HLA-DR^{dim} waren.

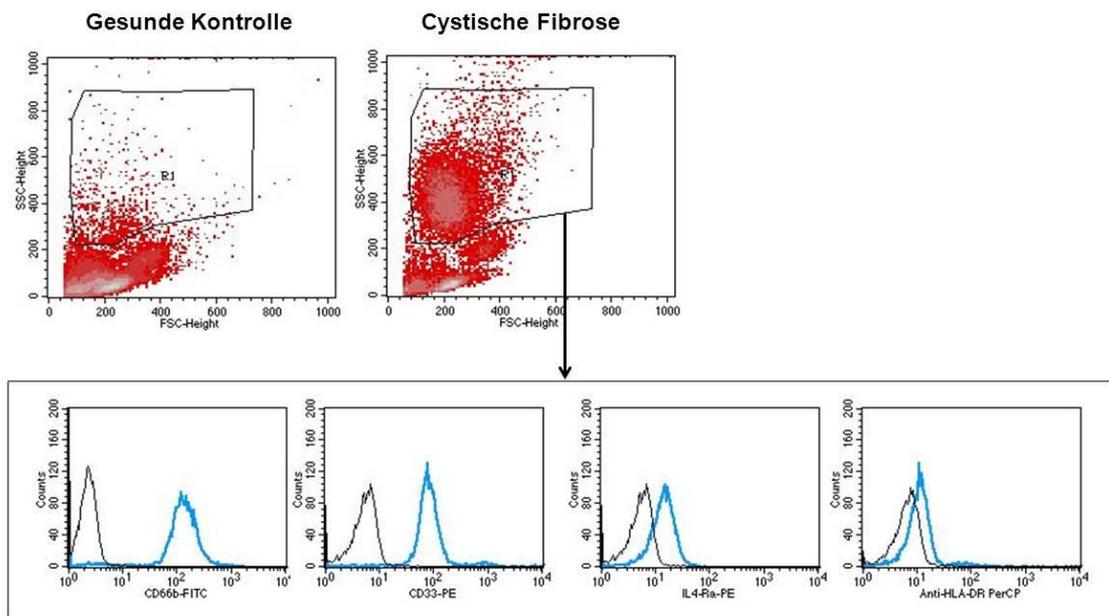


Abb. 9 Messung der MDSC

FSC-SSC Dotplot einer gesunden Kontrolle und eines Patienten mit Zystischer Fibrose und deutlich erkennbarer Population der MDSC mit den zugehörigen Histogrammen für die Oberflächenmarker. Die MDSC haben wir anhand von bereits beschriebenen Methoden gemessen [66, 152]. Wir haben PBMC isoliert und mit dem Durchflusszytometer auf Zellen mit hoher Granularität gegatet. Als MDSC haben wir dann die Zellen des Gates bezeichnet, die gleichzeitig CD66b^{high}CD33^{high}IL-4R^{inter}HLA-DR^{dim} waren.

4.2 Charakterisierung der MDSC

Die Charakterisierung der MDSC beim Menschen stellt sich als schwierig dar und ist daher noch unvollständig, da es beim Menschen keinen eindeutigen Marker für MDSCs gibt. In verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Marker zur Identifizierung der MDSC beschrieben [57] und auch wir haben unsere Zellen auf verschiedene Oberflächenmarker untersucht. Eine aktuell vielfach anerkannte Methode ist das Konzept der „low-density neutrophils“, das auch wir für unsere Studien angewandt haben [66, 152].

Auf der Suche nach diskriminierenden Oberflächenmarkern zwischen MDSC und PMN haben wir die Oberflächenmarker der MDSC mit denen normaler PMN verglichen und festgestellt, dass sowohl CXCR4, wie IL-4R α als auch

CCR3 auf MDSC signifikant häufiger (für CXCR4: n=121; mean 92,1+/-8,29% SD; median 94,69%; für IL-4R α : n=101; mean 55,4+/-21,66% SD; median 55,72%; für CCR3: n=70; mean 80,24+/-12,34% SD; median 82,69%) als auf PMN (für CXCR4: n=17; mean 40,34+/-14,89% SD; median 38,15%; für IL-4R α : n=17; mean 9,8+/-8,6% SD; median 6,95%; für CCR3: n=16; mean 48,29+/-22,85% SD; median 53,27%) exprimiert werden.

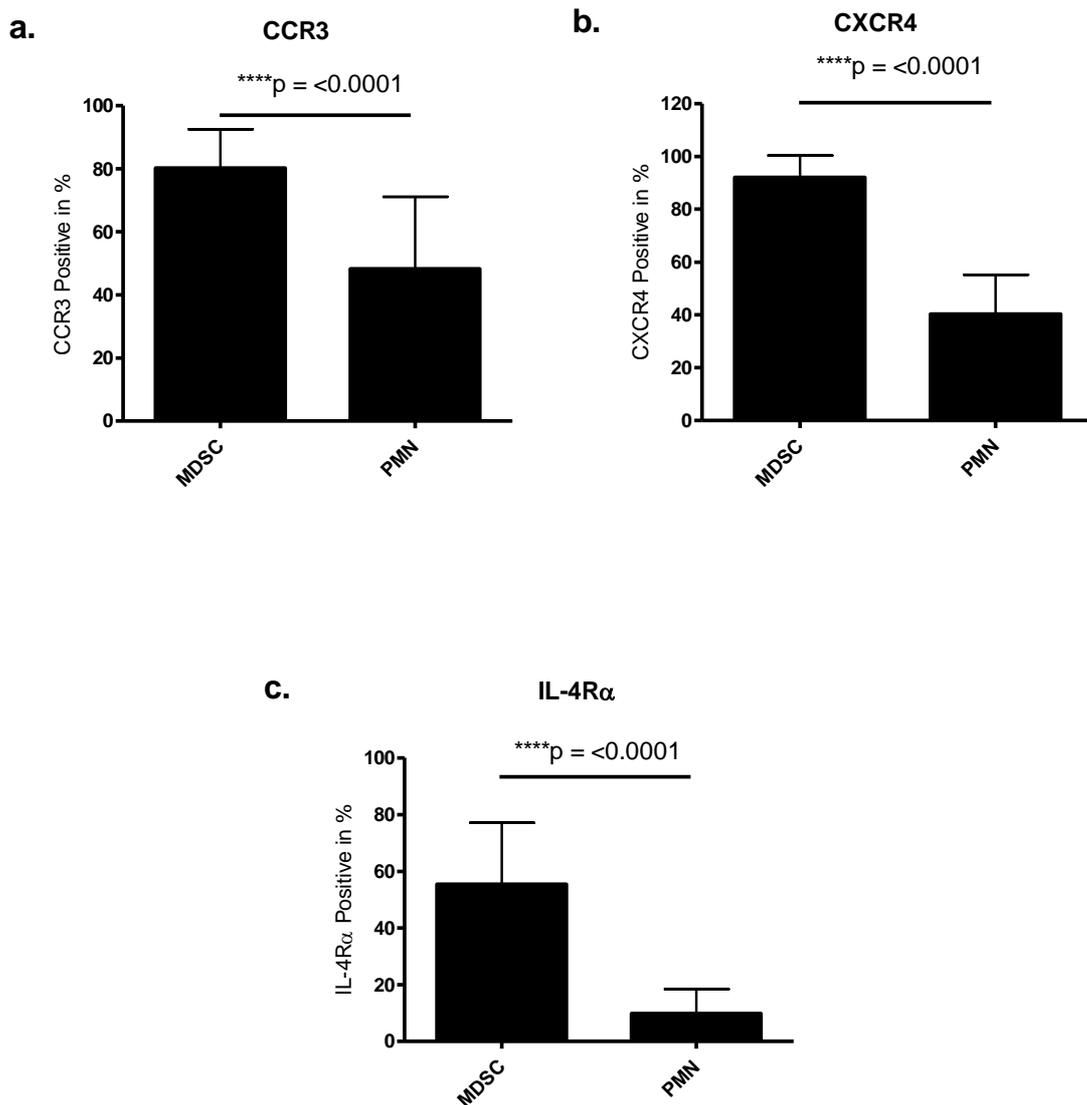


Abb. 10 Charakterisierung der MDSC

Vergleich der Oberflächenmarker der MDSC mit denen normaler PMN. In a. ist das Ergebnis für CCR3 dargestellt, wobei n=70 betrug, in b. ist das Ergebnis für CXCR4 dargestellt, wobei n=121 betrug, in c. ist das Ergebnis für IL-4R α dargestellt, wobei n=101 betrug.

4.3 Akkumulation der MDSC bei CF Patienten

In unserer Studie mit vielen CF Patienten (n=75) zeigte sich, dass der prozentuale Anteil der MDSC im Vergleich zu einer altersentsprechenden Kontrollgruppe signifikant erhöht war (CF Patienten: n= 75; mean 3,56 +/- 4,56% SD; median 1,98; Kontrolle: n=36; mean 0,75 +/- 0,68% SD; median 0,55) (Abb. 11).

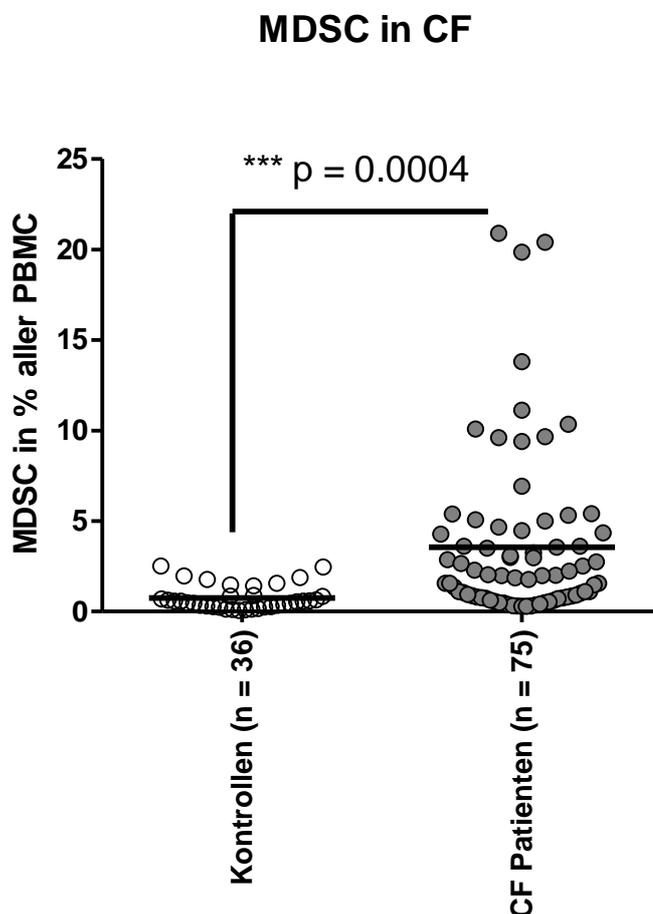


Abb. 11 MDSC in CF-Patienten

In der Abbildung sind die prozentualen Angaben der MDSC bei gesunden Kontrollen (weiße Kreise) und bei CF Patienten (graue Kreise) dargestellt.

Obwohl die MDSC bei den CF Patienten signifikant erhöht waren fällt auf, dass innerhalb der CF Patienten eine sehr große Variabilität des prozentualen

Anteils der MDSC herrscht, die von Werten wie bei den Kontrollen (<1% der PBMC) bis 20% MDSC reichen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Krankheits-assoziierte Faktoren die Generation der MDSC beeinflussen oder regulieren.

Zur Verifizierung dieser Vermutung haben wir viele Klinische Parameter der CF Patienten erhoben (Tabelle 2,3,4), wobei sich bei genauerer Betrachtung und Auswertung die Fokussierung auf den Faktor *Pseudomonas aeruginosa* Infektion ergeben hat.

Tabelle 2 1. Teil Klinische Daten der CF Patienten

Nummer	MDSC in %	Sex	Alter	Mutation	508 Homozygot	508 Heterozygot	Keime	FVC
1	3,5	w	5	F508 Del/N1 303K		x	0	
2	0,47	w	12	DF508/D1152H			(SA)	92
3	3,6	m	9	N1303K/L206W			0	109
4	1,57	w	20	DF508	x		SA	81
5	4,28	w	5	DF 508 L732x		x	(SA)	
6	1,05	w	10	DF508/W1282X		x	(SA)	103
7	1,98	w	3	DF 508 P.S341P		x	SA	
8	2	m	11	Heterozygotie für 17 17-1 G>A/dele 2.3			0	100
9	0,36	m	17	DF508/N1303K		x	SA	132
10	20,4	w	17	DF508	x		PSA/BC/SA	93
11	2,99	m	18	DG508/4373+1G>T		x	SA	52
12	0,88	m	6	DF508	x		(SA)	104
13	1,11	w	17	DF508/3536insTCCA		x	(PSA)	83
14	0,49	m	16	DF508/G542X		x	SA	108
15	3,24	m	3	DF 508	x		0	
16	0,85	w	7	DF508	x		SA	100
17	2,28	w	7	DF508 N130-3K		x	0	111
18	1,99	w	15	F508		x	PSA	98
19	0,8	w	7	DF508	x		0	105
20	5,39	m	14	DF508/Q552X		x	PSA	117
21	5,41	m	22	DF508	x		SA	80
22	9,66	w	14	DF508		x	SA	99
23	0,3	m	23	DF508	x		(SA)	94
24	0,61	m	20	E60X/G542X		x	PSA/SA	88
25	0,3	w	11	DF508	x		(SA/EC)	78

Nummer	MDSC in %	Sex	Alter	Mutation	508 Homozygot	508 Heterozygot	Keime	FVC
26	0,75	m	8	Heterozygot: R117H und IVS8-2A>C			SA	105
27	4,66	w	39	keine Daten			PSA	
28	1,86	w	12	keine Daten			PSA	26
29	1,01	w	13	DF508	x		PSA/SA	109
30	2,87	w	14	DF208	x		PSA/SA	93
31	0,38	w	26	L723X			PSA/SA	
32	0,73	w	13	G542X/E379X			SA	111
33	6,92	m	21	DF508/G542X		x	SA	104
34	5	w	17	DF508 Homozygotie			SA	114
35	0,32	m	11	N1303K			(SA)	113
36	10,09	m	18			x	SA	126
37	11,13	m	15	DF508	x		PSA/SA	123
38	0,76	m	3	DF208/IVS8-2A>C		x	SA	
39	1,35	w	3	DF 508	x		0	
40	9,6	m	11	DF508	x		SA	104
41	1,48	m	14	DF508/3.05INST		x	MRSA/PSA	85
42	3,55	w	15	DF508/3905 insT		x	BG/SM	58
43	20,9	w	19	DF508/E92X		x	PSA/SA	102
44	4,35	w	17	DF508/E92X		x	PSA/SA	110
45	0,8	w	13	DF508/c.2389insC; p.Q799SfsX804		x	(SA)	89
46	19,86	m	56	DF508	x		PSA/SA/SM	100
47	0,56	m	18	DF508	x		(PSA)SM	105
48	0,29	m	17	DF508/Q552X		x	SA	115
49	5,32	m	21	3659del/R758X			0	103
50	2,97	w	20	DF508/Q39X/A349V			0	92
51	10,35	m	30	DF508	x		PSA	107
52	9,4	w	40	DF508	x		(PSA)	115
53	2,03	w	6	DF508	x		0	
54	1,77	m	32	DF508/1717-1Ga			PSA/SA	
55	0,49	w	12	DF508	x		SA	108
56	0,72	m	5	dF508/R106C		x	SA	100
57	13,81	m	18	DF508/del Exon 22		x	PSA/SA	103
58	0,29	w	28	DF508/R347P		x	PSA	98
59	1,56	w	8	DF508	x		PSA	98

Nummer	MDSC in %	Sex	Alter	Mutation	508 Homozygot	508 Heterozygot	Keime	FVC
60	5,07	w	23	DF508	x		PSA/SA	88
61	0,62	m	31	DF508/R1066C		x	SA	130
62	0,91	m	10	DF508	x		SA	109
63	3,08	m	31	DF508/Q552X		x	PSA	86
64	0,53	m	7	n.b. (ED15.03.11)			0	104
65	1,11	w	24	DF508	x		SA/PSA	100
66	3,6	m	37	DF508	x		PSA	53
67	2,52	m	16	DF508		x	SA	88
68	0,41	w	13	306INSA/3659delC			(SA)	96
69	2,65	m	7	DF508/E822X		x	(SA)	
70	0,95	m	5	DF508/c.3528delC		x	PSA	
71	1,1	m	6	DF508/G542X		x	0	
72	4,48	m	12	DF508	x		SA/(PSA)	85
73	1,57	w	4	DF208	x		(SA)	
74	2,75	m	32	DF508	x		SA	96
75	2,23	w	9	DF508	x		SA	110

Tabelle 3 2. Teil Klinische Daten der CF Patienten

Nummer	FEV1	MEF25	CRP (mg/dl)	BSG (mm/h)	Leukozyten	PSA -AK	SA-AK
1			0,13		7270		
2	101	104	0,01	5	6870	negativ	negativ
3	108	78	0,53	8	7310	negativ	negativ
4	70	32	0,13	12	8040		positiv
5			0,01		9520		
6	94	45	0,03	2	7380	negativ	negativ
7			0,01		12650	negativ	
8	75		0,01	4	4470		negativ
9	111	46	1	19	6870	negativ	negativ
10	93	75	0,03	18	8500	grenzwertig	negativ
11	29	8	0,6	17	12170	negativ	positiv
12	103	67	0,01		12330	negativ	negativ
13	72	24			13060		
14	111	96			5600		
15			0,01		12430		
16	99	58	0,01	5	7210	negativ	negativ
17	110	54	0,01		8260		negativ
18	80	37			7800	grenzwertig	negativ
19	102	65	0,34		10510		positiv

Nummer	FEV1	MEF25	CRP (mg/dl)	BSG (mm/h)	Leukozyten	PSA -AK	SA-AK
20	101	40	0,1	5	5580	negativ	negativ
21	72	33	1,77		12145		negativ
22	92	105	0,02	5	8320		
23	103	120	0,18	4	6130	negativ	negativ
24	52	18	0,23	23	6580	positiv	negativ
25	86	77	0,09	7	6480	negativ	negativ
26	83	36	0,01	4	5460		
27	44	12	1,85		8170		
28	26	12	3,33	69	8950		
29	89	33			15900	negativ	positiv
30	96	68	0,08	8	7720	negativ	negativ
31	42		0,16		8890	positiv	negativ
32	102	53	0,01	7	4990	negativ	negativ
33	100	64	0,42	13	7330		positiv
34	111	64	0,01	2	6860		
35	103	47	0,01	6	8210	negativ	negativ
36	122	89	0,01	5	6870	negativ	positiv
37	126	117			9340	grenzwertig	
38	n.b.		0,01		6190		positiv
39	n.b.		0,01		6990		
40	107	74	0,01	7	6900		negativ
41	88	66	0,02	4	6830		positiv
42	58	41	0,9		12040	negativ	negativ
43	97	67	1,63	17	8580	positiv	negativ
44	110		0,65	36	7440		negativ
45	80	36	0,02	21	8720	negativ	positiv
46	97	62	0,04	6	6590		negativ
47	100	69	0,01	4	6200	negativ	negativ
48	118	116	0,79	6	2320	negativ	positiv
49	100	80	0,22	5	5610	negativ	negativ
50	94	79	0,06		4670	negativ	negativ
51	97	49	0,06	4	5490		negativ
52	97	31	0,2	16	13050		negativ
53	n.b.		0,19		12020		
54	40	8			n.b.		
55	100	45	0,02	6	5640		negativ
56	104	137	0,01		8650		

Nummer	FEV1	MEF25	CRP (mg/dl)	BSG (mm/h)	Leukozyten	PSA -AK	SA-AK
57	83	41			n.b.		
58	72	26	1,51		8060	grenzwertig	
59	94	52			6640		
60	73	23			10470		negativ
61	99	35	2,74	18	6560	negativ	negativ
62	103	60	0,01	4	7410	negativ	negativ
63	82	62	3,17	38	12440	grenzwertig	negativ
64	101	61	0,01		6300		
65	86	48	0,32	13	6820	negativ	negativ
66	41	12	2		8010	negativ	negativ
67	84	29	0,01	4	5770		
68	105	91	0,01	4	8670	negativ	negativ
69	n.b.		0,01	4	8160	negativ	negativ
70	n.b.		0,01	4	8390		
71	109	120	0,52		9620		
72	78	42	0,33	4	6940	negativ	negativ
73	n.b.		0,01		7730		negativ
74	72	39	0,26	5	8370		positiv
75	114	90	0,01		8400		

Tabelle 4 3. Teil Klinische Daten der CF Patienten

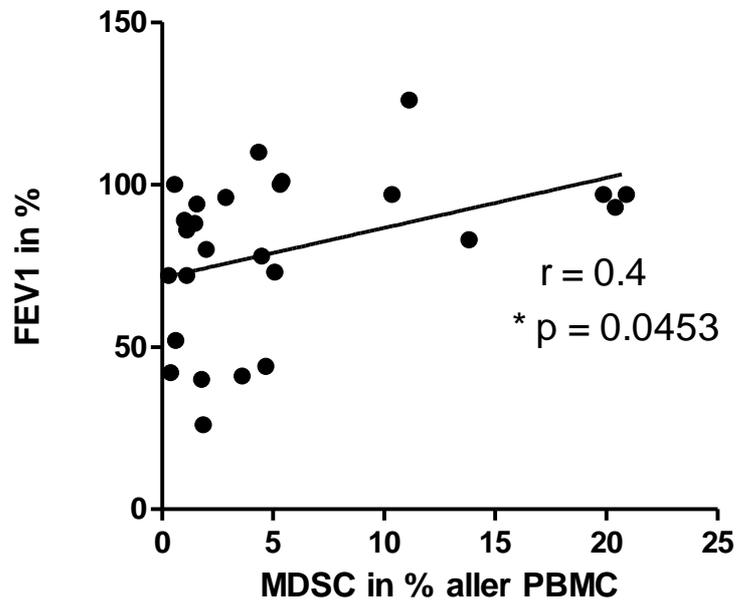
Nummer	Amitriptylin	Inhalative Steroide	Pulmozyme	Systemische Antibiotika	Zithromax	Inhalative Antibiotika
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	Viani	-	-	-	Tobramycin
5	-	Pulmicort	-	-	-	-
6	-	-	x	-	-	-
7						
8	-	Viani	-	Cotrim K	-	Tobramycin
9	-	Pulmicort	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	Colistin
11	-	Pulmicort	x	-	x	Tobramycin
12	-	-	-	-	-	-
13	x	Viani	-	-	x	-
14	-	-	-	Ceftazidim+ Tobra Cell	-	Tobramycin
15	-	-	-	-	-	-

Nummer	Amitriptylin	Inhalative Steroide	Pulmozyme	Systemische Antibiotika	Zithromax	Inhalative Antibiotika
16	-	Pulmicort	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	Tobramycin
19	-	-	x	Cefuroxim	-	-
20	-	-	-	-	-	Colistin
21	-	-	x	Cetirizin	-	-
22						
23	-	-	x	-	-	-
24	-	Pulmicort	x	-	-	Colistin
25	-	-	x	x	-	-
26	-	-	-	-	-	
27	x					
28	-	-	x	Ceftazidim+ Tobra Cell	x	
29	-	-	x	-	-	Tobramycin
30	-	-	x	-	-	Tobramycin/Colistin
31	-	-	-	-	-	Tobramycin
32	-	Pulmicort b.B.	x	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-
34						
35	-	-	-	-	-	Colistin
36	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	Tobra Cell + Meronem	-	Promixin
38	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-
41	-	-	x	-	-	Tobramycin
42	-	-	x	Clindamycin	-	-
43	-	-	-	-	-	Colistin
44	-	-	-	Ciprofloxacin	-	Colistin
45	-	-	x	-	-	Colistin
46	-	-	-	-	-	Colistin
47	-	-	-	-	-	Tobramycin
48	-	Pulmicort	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	Gernebcin
50	-	-	-	-	-	Gernebcin
51	-	-	-	-	-	Tobramycin
52	-	-	x	Cotrim	-	Colistin

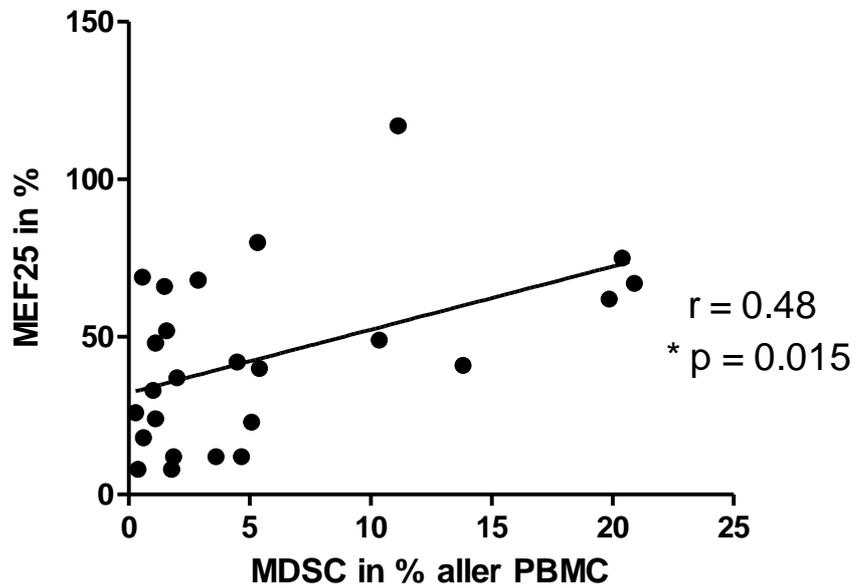
Nummer	Amitriptylin	Inhalative Steroide	Pulmozyme	Systemische Antibiotika	Zithromax	Inhalative Antibiotika
53	-	-	-	-	-	-
54						
55	-	-	x	-	-	-
56						
57	-	-	x	-	-	Gernebcin
58	-	-	x	-	-	Tobramycin
59	-	-	x	-	-	Colistin
60	x	-	-	-	-	Tobramycin
61	x	Budenosid	-	Citromax	x	Tobramycin
62	-	-	-	-	-	Tobramycin
63		-		TMP forte		Colistin
64	-	-	x	Cefuroxim	-	-
65	-	-	x	-	-	-
66	-	-	-	-	-	Colistin
67	-	-	x	-	-	Gernebcin
68	-	-	x	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	Tobramycin
71	-	Pulmicort	-	-	-	Tobramycin
72	x	-	x	-	-	Gernebcin
73	-	-	-	-	-	-
74	-	Pulmicort	-	Cetirizin	-	-
75	-	-	-	-	-	-

Wie oben erwähnt sind viele CF Patienten chronisch mit *Pseudomonas aeruginosa* infiziert. Bei diesen mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Patienten ist der prozentuale Anteil der MDSC signifikant erhöht (mean 5,5 +/- 6,2% SD; median 3) im Vergleich zu nicht mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Patienten (mean 2,3 +/- 2,5% SD; median 1,5).

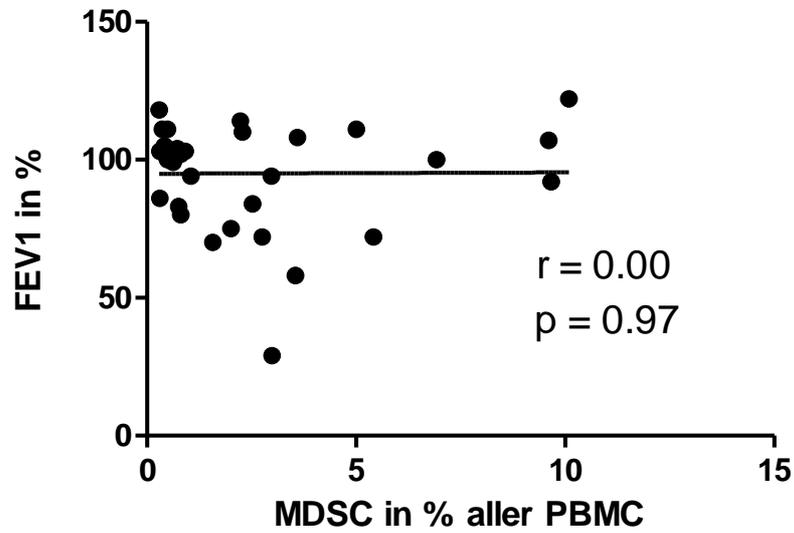
a. **PSA+ CF Patienten: Korrelation MDSC mit FEV1**



b. **PSA+ CF Patienten: Korrelation MDSC mit MEF25**



c. **PSA - CF Patienten: Korrelation MDSC mit FEV1**



d. **PSA- CF Patienten: Korrelation MDSC mit MEF25**

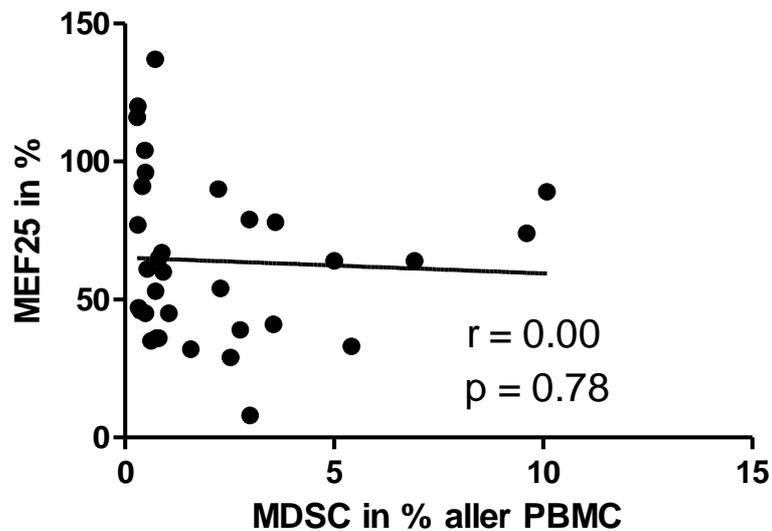
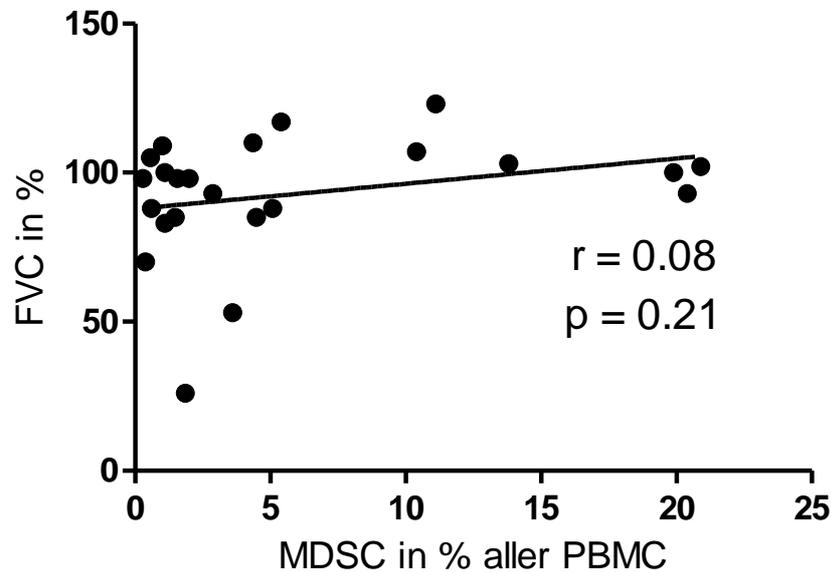


Abb. 13 Korrelation der MDSC bei CF-Patienten mit Parametern der Lungenfunktion

In a. und b. Korrelation der MDSC mit FEV1 und MEF25 bei CF Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa* Infektion. In c. und d. Korrelation der MDSC mit FEV1 und MEF25 bei CF Patienten ohne *Pseudomonas aeruginosa* Infektion

Weder bei *Pseudomonas aeruginosa* infizierten noch bei nicht infizierten Patienten konnte eine Korrelation mit der Vitalkapazität gezeigt werden.

a. PSA+ CF Patienten: Korrelation MDSC mit FVC



b. PSA- Patienten: Korrelation MDSC mit FVC

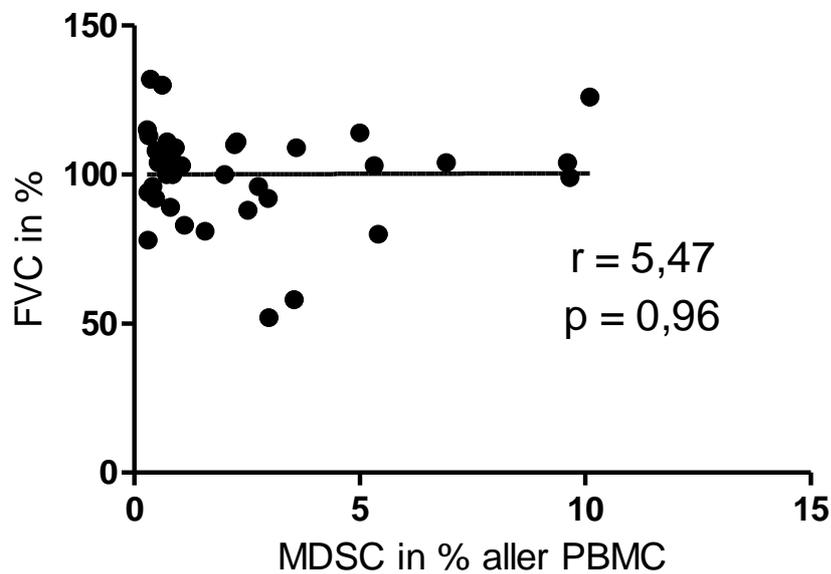


Abb. 14 Korrelation der MDSC bei CF-Patienten mit FVC

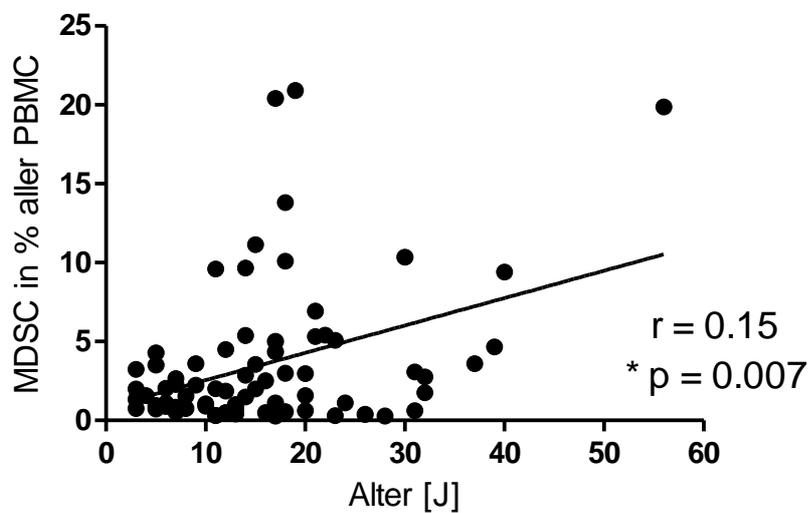
In a. Korrelation der MDSC mit FVC bei CF Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa* Infektion.

In b. Korrelation der MDSC mit FCV bei CF Patienten ohne *Pseudomonas aeruginosa* Infektion.

4.3.2 Korrelation der MDSC mit der Progression der Erkrankung

Zwischen dem Alter der CF Patienten und damit vermutlich der Progression der Erkrankung und dem Anteil der MDSC konnte eine positive Korrelation gezeigt werden (Abb. 15a), während keine Korrelation zwischen Alter und MDSC bei der gesunden Kontrollgruppe gefunden wurde (Abb. 15b).

a. Korrelation MDSC mit Alter (CF)



b. Korrelation MDSC mit Alter (Kontrollen)

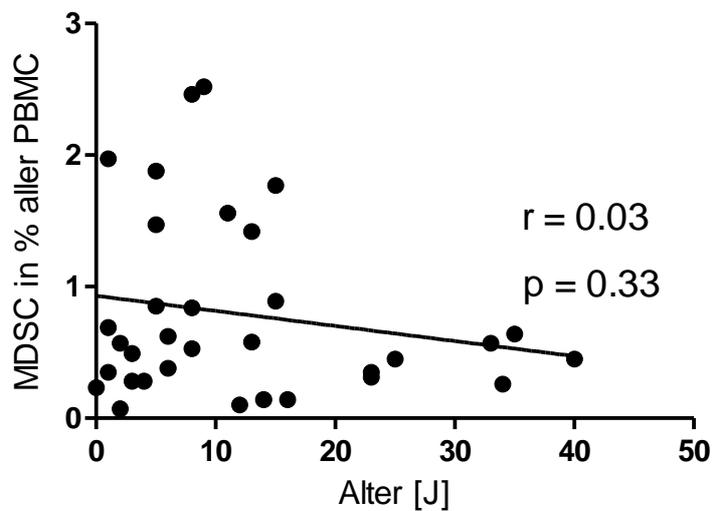


Abb. 15 Korrelation MDSC mit dem Alter

Abgebildet ist die Korrelation zwischen dem Prozentualen Anteil der MDSC und dem Alter bzw. vermutlich der Progression der Erkrankung in a. bei CF Patienten, in b. bei der gesunden Kontrollgruppe.

4.4 Akkumulation der MDSC bei MWS Patienten

In einer Studie mit MWS Patienten unter Anti-IL-1 Therapie (n=28) zeigte sich, dass der prozentuale Anteil der MDSC im Vergleich zu einer altersentsprechenden Kontrollgruppe signifikant erhöht war (MWS Patienten: n=28; mean 2,05 +/- 1,63% SD; median 1,8; Kontrolle: n=36; mean 0,0,75 +/- 0,68% SD; median 0,55) (Abb. 16).

Obwohl die MDSC bei den MWS Patienten signifikant erhöht waren, fällt auch hier auf, dass innerhalb der MWS Patienten eine sehr große Variabilität des prozentualen Anteils der MDSC herrscht, die von Werten wie bei den Kontrollen (<1% der PBMC) bis 7% MDSC reichen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass auch hier Krankheits- oder Therapie-assoziierte Faktoren die Generation der MDSC beeinflussen oder regulieren.

MDSC bei MWS Patienten

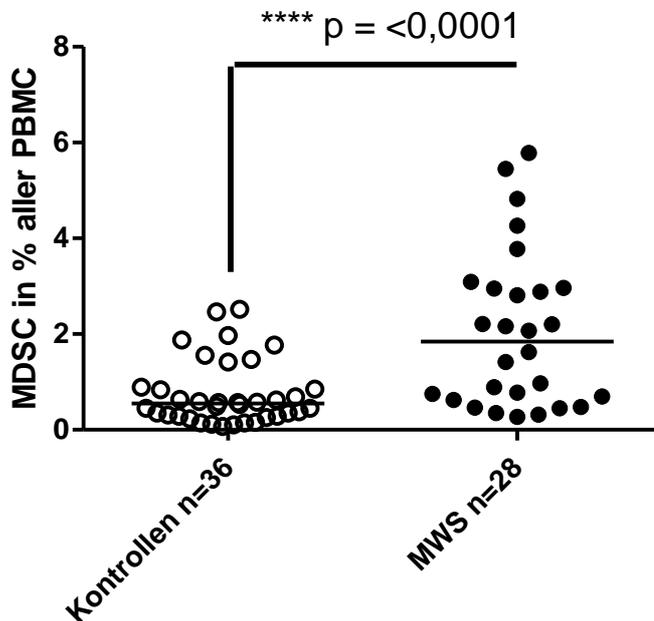


Abb. 16 MDSC bei MWS Patienten

In der Abbildung sind die prozentualen Angaben der MDSC bei gesunden Kontrollen (weiße Kreise) und bei MWS Patienten (schwarze Punkte) dargestellt.

Obwohl die MDSC bei den MWS Patienten signifikant erhöht waren, fällt auf, dass innerhalb der MWS Patienten eine sehr große Variabilität des prozentualen Anteils der MDSC herrscht, die von Werten wie bei den Kontrollen (<1% der PBMC) bis 7% MDSC reichen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Krankheits-assoziierte Faktoren die Generation der MDSC beeinflussen oder regulieren.

4.4.1 Korrelation der MDSC mit klinischen Parametern bei MWS

Auch bei den MWS Patienten haben wir verschiedene klinische Parameter erhoben (Tabelle 5), es konnte aber keine Korrelation zwischen den Prozentangaben der MDSC und klinischen Parametern wie Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), C-reaktives Protein (CRP), Serum-

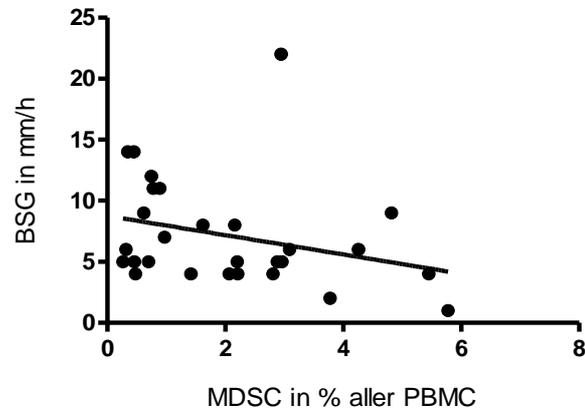
Amyloid A (SAA) oder der klinischen Aktivitätseinschätzung von Patient und Arzt festgestellt werden. Die fehlenden Laborparameter wurden nicht erhoben.

Tabelle 5 Klinische Daten Muckle-Wells Syndrom (MWS) Patienten

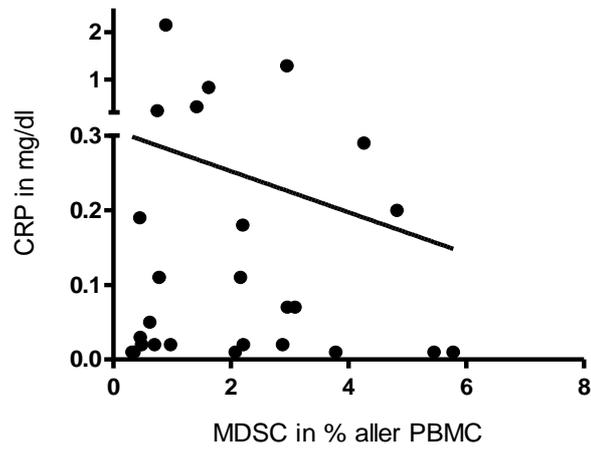
Mit den Daten Visuelle Analog-Skala (VAS) Patient und Arzt, Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), C-reaktives Protein (CRP), Serum-Amyloid A (SAA)

Nummer	VAS Patient	VAS Arzt	BSG	CRP	SAA
1	0	1	5	0,03	4,50
2	4	1	9	0,05	3,50
3	2	1	6	0,01	1,50
4	5	2	14	0,01	1,70
5	4	3	5	0,18	
6	0	0	22	1,29	6,80
7	0	1	9	0,20	2,30
8	2	1	5	<0,01	0,7
9	4	2	11	2,15	
10	2	2	14	0,19	5,06
11	4	3	11	0,11	
12	0	1	8	0,83	4,80
13	0	3	4	0,01	1,90
14	5	3	4	0,02	1,80
15		1	1	0,01	4,70
16	3	1	5	0,02	7,40
17	0	2	8	0,11	
18	0	0	4	0,01	1,10
19	8	6	4	0,02	0,98
20	0	1	6	0,29	
21	0	2	4	0,42	33
22	4	1	2	0,01	2,80
23	5	4	4		
24	2	2	7	0,02	1,83
25	2	3	5	0,07	4,4
26		4	12	0,34	6,40
27	9	5	5	0,02	
28	3	2	6	0,07	9,50

a. Korrelation MDSC mit BSG (MWS)



b. Korrelation MDSC mit CRP (MWS)



c. Korrelation MDSC mit SAA (MWS)

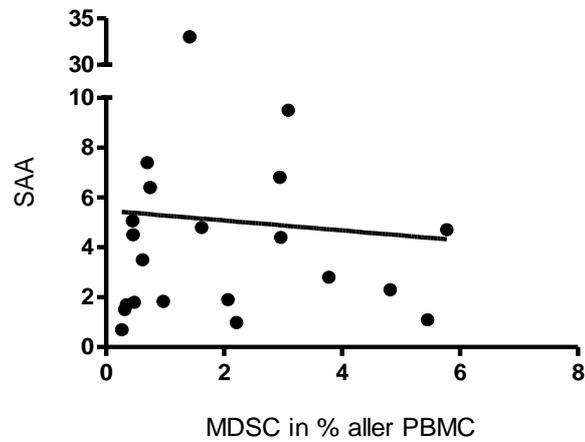


Abb. 17 Korrelation MDSC mit Klinischen Parametern bei MWS Patienten

Abgebildet ist die Korrelation der MDSC bei MWS Patienten in a. mit der BSG, in b. mit CRP, in c. mit SAA.

4.5 Suppression der T-Zell Proliferation durch MDSC

Zur Untersuchung der Funktion der MDSC bei Zystischer Fibrose und Muckle-Wells-Syndrom wurden die MDSC wie oben beschrieben isoliert. Anhand von CFSE gefärbten T-Zellen wurde die Interaktion dieser beiden Zelltypen *ex vivo* bzw. *in vitro* beobachtet. Diese Studien zeigen, dass die polyklonale T-Zell Proliferation der CD4+ und CD8+ T-Zellen dosisabhängig durch die MDSC supprimiert wird. Als Kontrollen wurde die Proliferation der T-Zellen allein und die Proliferation der T-Zellen bei Zugabe konventioneller PMN verwendet.

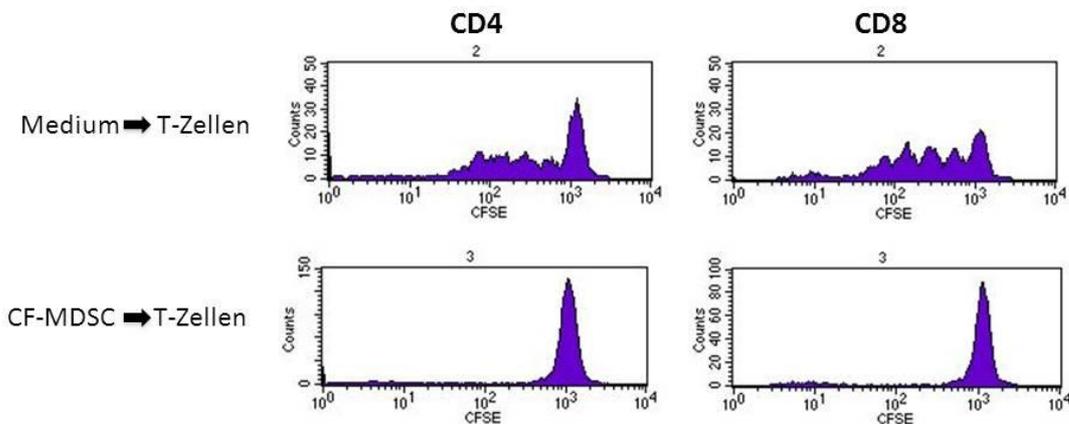


Abb. 18 Suppression der T-Zell Proliferation durch MDSC

Die Abbildung zeigt die Kontrolle und die Koinkubation von MDSC und CD4+ sowie CD8+ T-Zellen. Die T-Zell Proliferation wird durch die MDSC supprimiert.

4.6 Modulation der IL-17 Produktion durch MDSC

Andere Autoren haben bereits beschrieben, dass die IL-17 Produktion durch T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der chronischen Lungenerkrankung bei Zystischer Fibrose spielt. Wir haben untersucht, ob die MDSC, die wir aus dem Blut der CF-Patienten isoliert haben Einfluss auf die IL-17 Produktion der T-Zellen haben. Unsere Ergebnisse zeigen, dass MDSC von *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Patienten die IL-17 Produktion reduzieren können (64% Reduktion von IL-17)(Abb. 19).

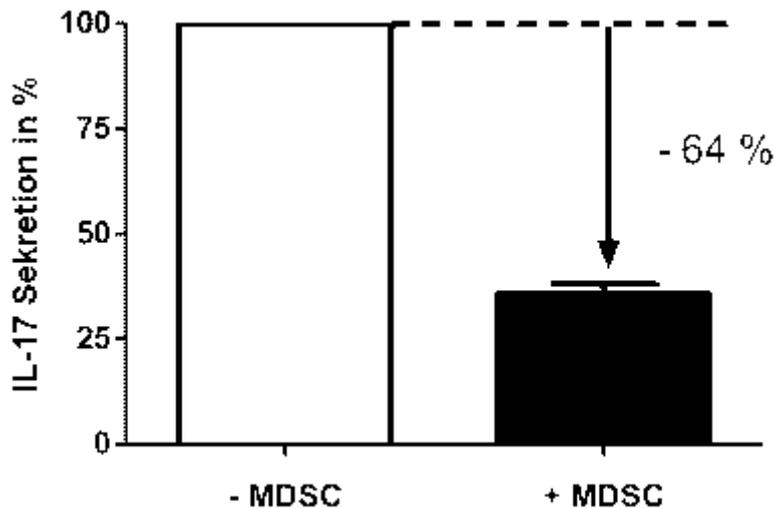


Abb. 19 IL-17 Sekretion durch T-Zellen

In der Abbildung ist die Reduktion der IL-17 Sekretion der T-Zellen bei Zugabe von MDSC (schwarzer Balken) in % angegeben.

5 Diskussion

Die MDSC sind, wie oben dargestellt, eine kürzlich beschriebene Zellpopulation, die eine entscheidende Rolle bei der Regulation und in der Interaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems spielen. Beschrieben wurden sie erstmals in Tumorpatienten [19], inzwischen aber auch

bei bakterieller [20], viraler [153] und parasitärer [154] Infektion, während traumatischen Stresses [155], Sepsis [44], akuter Inflammation [23], Immuntoleranz [156], graft versus host disease [157] und bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen [68, 158-160].

Da die MDSC regulierend in das Immunsystem eingreifen, hat uns die Rolle dieser Zellen bei Erkrankungen mit starker inflammatorischer Komponente, wie es bei der Zystischen Fibrose und dem Muckle-Wells Syndrom der Fall ist, interessiert. Außerdem haben wir versucht, die MDSC und ihre Effektormechanismen noch genauer zu charakterisieren.

Die Charakterisierung der MDSC ist, wie oben beschrieben, schwierig und daher noch unvollständig. Wir haben Granulozyten untersucht, die sich nach der Dichtegradienten-Separation in der PBMC Fraktion befanden (*low density neutrophils*). Dabei stellten wir fest, dass auf einer signifikant größeren Anzahl Zellen die Oberflächenantigene CXCR4, CCR3 und IL4-R α exprimiert werden, als auf konventionellen PMN.

Für granulozytäre MDSC in der PBMC Fraktion stellte sich bei unseren Studien CD66b als spezifischer Marker heraus. Dafür haben wir die CD66b+ Zellen aus der PBMC Fraktion nach der Dichtegradienten Separation isoliert und es zeigte sich, dass diese im CFSE-Proliferations-Assay suppressive Funktion hatten. CD66b wurde bereits als Marker der granulozytären MDSC beschrieben [152]. Der IL4-R α Rezeptor wurde ebenfalls bereits als Rezeptor der MDSC beschrieben [75], somit konnten wir dies mit unseren Studien bestätigen.

Die Rolle des CCR3 Rezeptors auf granulozytären MDSC wurde bisher noch nicht untersucht, wohingegen der CXCR4 Rezeptor schon im Zusammenhang mit MDSC beschrieben wurde. Eine Studie beschreibt, dass der CXCR4 Rezeptor auf MDSC verstärkt im Vergleich zu konventionellen PMN exprimiert wird [152]. Andere Autoren haben die Rolle des CXCR4 Rezeptors auf MDSC im Zusammenhang mit Tumoren untersucht und festgestellt, dass PGE2 für die Induktion von CXCR4 auf Tumor induzierten MDSC verantwortlich ist und dass der Schlüsselsignalweg zur Rekrutierung der MDSC in die Tumorumgebung über die CXCR4-CXCL12 Achse vermittelt wird [161].

Welche Bedeutung könnte der CXCR4 Rezeptor aber für MDSC bei CF und MWS Patienten haben?

Im Zusammenhang mit MWS könnte das durch IL-1 β induzierte PGE2 [135] über den CXCR4 Rezeptor für die Rekrutierung der MDSC aus der Milz eine Rolle spielen, was eine Erklärung für die erhöhten MDSC Werte bei MWS Patienten sein könnte. Zur Bestätigung dieser Theorie könnte der Zusammenhang zwischen PGE2-, MDSC Werten und CXCR4 Expression bei MWS Patienten untersucht werden. Gegen diese Theorie spricht, dass die MDSC Werte bei den MWS Patienten nicht von der Canakinumab-Gabe abhängig waren wie die IL-1 β Funktion [162, 163]. Bei Patienten unter Canakinumab Therapie mit hohen MDSC Werten müsste dann ein IL-1 β unabhängiger Mechanismus für die Bildung und Rekrutierung der MDSC verantwortlich sein.

Die Rolle des CXCR4 Rezeptors auf MDSC bei CF Patienten könnte am ehesten im Zusammenhang mit der Freisetzung der MDSC aus der Milz stehen. Die Expression und Funktion des CXCR4 Rezeptors scheint bei der Regulation der Freisetzung von Neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark eine entscheidende Rolle zu spielen, wobei die Freisetzung der Neutrophilen Granulozyten mit Herunterregulation des CXCR4 Rezeptors verbunden ist [164]. Die Regulation der Freisetzung spielt sich dabei auf der Ebene der myeloiden Vorläuferzellen ab, welche auch die Vorläuferzellen der MDSC sind. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die CXCR4 Expression auf MDSC mit der Rekrutierung der MDSC aus dem Knochenmark zusammenhängt.

Auch welche Rolle der Rezeptor dabei für die MDSC selber spielt bleibt ungeklärt.

MDSC akkumulieren bei CF Patienten.

Die enge Balance zwischen Infektion und Inflammation bestimmt die Pathogenese der Lungenerkrankung bei Zystischer Fibrose [78, 146, 165]. Die zugrunde liegenden immunologischen Faktoren, die dieses Zusammenspiel

bestimmen, sind nach wie vor wenig verstanden [166]. In unseren Studien haben wir die MDSC bei Zystischer Fibrose untersucht, die die Interaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems beeinflussen [20, 167].

Unsere Studien zeigen, dass MDSC bei Patienten mit Zystischer Fibrose in Abhängigkeit des Alters und einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* akkumulieren, während sie bei gesunden Kontrollen nur in sehr geringem Ausmaß nachweisbar sind. Dieses Ergebnis hat auch funktionelle Relevanz, da die MDSC die T-Zell Proliferation *in vitro* supprimieren, sowie klinische Relevanz, da die Akkumulation der MDSC mit einer besseren Lungenfunktion der betroffenen Patienten einhergeht. Als ein Bindeglied zwischen adaptivem und erworbenem Immunsystem könnten sie ein neues therapeutisches Ziel zur Therapie der Lungenerkrankung bei CF darstellen.

Durch die Beobachtung, dass MDSC bei CF Patienten mit chronischer Infektion der Lunge akkumulieren, stellt sich die Frage, welche CF-assoziierten genetischen, therapeutischen und/oder umweltbedingten Faktoren die Generierung der MDSC in diesem Krankheitszustand bedingen. Basierend auf der komplexen Pathologie der Lungenerkrankung bei CF und früheren Studien auf diesem Gebiet [148, 168], könnten folgende Faktoren zur Generierung der MDSC *in vivo* beitragen:

1. Genetisch/intrinsisch: Da das CFTR Protein in PBMC und Granulozyten exprimiert wird [169], könnte der CFTR Defekt an sich an der Generierung der MDSC beteiligt sein. Vorläufige Ergebnisse unseres Labors mit *small-molecule* CFTR Inhibitoren deuten jedoch darauf hin, dass der CFTR Defekt selbst nur einen geringen Einfluss auf die Generierung der MDSC hat [170].
2. Extrinsisch/umweltbedingt: Die Induktion von MDSC wurde sowohl für proinflammatorische Zytokine, vor allem GM-CSF und IL-6 [171], als auch für Pathogene oder PAMPs [23] bereits beschrieben. Da die Lungenerkrankung bei CF Patienten durch erhöhte IL-6 und GM-CSF Spiegel charakterisiert ist und eine Korrelation zwischen IL-6/GM-CSF und dem Krankheitsverlauf besteht [98, 172, 173], ist davon

auszugehen, dass diese Mediatoren die Generierung der MDSC *in vivo* bedingen und dadurch die Lungenerkrankung beeinflussen.

Die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch *Pseudomonas aeruginosa* Infektion wurde bereits gezeigt [98, 174, 175]. Auf unserer Beobachtung basierend, dass bei CF Patienten mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion prozentual mehr MDSC nachweisbar sind als bei CF Patienten ohne *Pseudomonas aeruginosa* Infektion, nehmen wir an, dass dieses Pathogen eine Kaskade proinflammatorischer Zytokine auslöst, die zu einer IL-6 und GM-CSF Produktion führt und dadurch die Generation der MDSC in Gang gesetzt wird. Diese Theorie ist jedoch nicht in der Lage zu erklären, warum keine Assoziation zwischen den anderen CF-relevanten Pathogenen *Staphylococcus aureus* und *Aspergillus fumigatus* besteht. Diese Beobachtung müsste in weiteren Studien untersucht werden.

3. PAMPs: Da unsere Studien zeigen konnten, dass bei CF Patienten mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion prozentual mehr MDSC nachweisbar sind als bei CF Patienten ohne *Pseudomonas aeruginosa* Infektion, könnten auch PAMPs von *Pseudomonas aeruginosa* selbst wie z. B. Flagellin als TLR5 Ligand für die Induktion von MDSC verantwortlich sein. Diese Theorie konnte inzwischen von unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden [170]. Die Signifikanz der Flagellin-TLR5 Achse für die *Pseudomonas aeruginosa*-Pathogenität wurde bereits in diversen früheren Studien beschrieben. Unter anderem in Studien mit experimentellen Infektions-Modellen mit epithelialen Zellen [176-181], Makrophagen [182], Neutrophilen Granulozyten [183] oder *in vivo* bei Infektionen [184-186]. Diese Überlegung und auch die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bestätigen und erweitern die Theorie, dass Flagellin als ein entscheidender Faktor die Antwort des angeborenen und erworbenen Immunsystems bezüglich *Pseudomonas aeruginosa* bei der CF Lungenerkrankung maßgeblich beeinflusst.
4. Therapeutika: Antibiotische oder Anti-inflammatorische Therapien könnten theoretisch auch einen Effekt auf die Akkumulation der MDSC

bei CF Patienten haben. Bei der Untersuchung unserer CF Kohorte konnten wir jedoch keine signifikante Assoziation zwischen Anti-inflammatorischer oder anderer (z.B. rekombinante DNase) Therapie und dem prozentualen Anteil der MDSC finden.

Basierend auf unseren Untersuchungen gehen wir davon aus, dass die MDSC Akkumulation bei CF Patienten mit chronischer *Pseudomonas aeruginosa* Infektion funktionelle immunologische Relevanz hat, da diese MDSC die Proliferation der CD4- und CD8-T-Zellen signifikant supprimiert und die T_H17-Zell Antworten dämpft, die eine wichtige Rolle bei der CF Lungenerkrankung spielen [79, 109]. Deshalb könnten MDSC als Schlüssel zur Interaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems ein neues therapeutisches Ziel bei der Behandlung der Zystischen Fibrose und anderen *Pseudomonas aeruginosa* assoziierten Lungenerkrankungen darstellen. Außer für die Lungenerkrankungen und Wundinfektionen, bei denen *Pseudomonas aeruginosa* eine wichtige Rolle spielt, könnten unsere Ergebnisse auch eine noch weitere immunologische Phänomene von *Pseudomonas aeruginosa* ein Erklärungsmodell liefern, denn eine *Pseudomonas aeruginosa* Infektion ist auch in der Lage die T-Zell- und weitere Immunantworten auf andere Bakterien zu supprimieren [187, 188]. Obwohl bei diesem Szenario wohl auch direkte, durch *Pseudomonas aeruginosa* Toxine vermittelte Effekte auf die T-Zellen eine Rolle spielen [187], könnten durch *Pseudomonas aeruginosa* induzierte MDSC auch daran beteiligt sein. Diese Theorie wird durch unsere Ergebnisse unterstützt, die zeigen, dass die MDSC von *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Patienten *ex vivo* ohne die Unterstützung von *Pseudomonas aeruginosa* Kontakt selbst, eine T-Zell Suppression vermitteln.

Frühere Studien zur Untersuchung der T-Zell Immunantworten bei CF Patienten [98, 99, 107, 109, 189, 190] und in Mäusemodellen mit *Pseudomonas aeruginosa* Infektion [191, 192] konnten zeigen, dass die T-Zell Immunantworten bei CF auf verschiedenen Ebenen beeinflusst und verändert werden. Es wurde festgestellt, dass die T-Zell Immunantworten zu einer T_H2-Zell dominierten Antwort neigen, mit der CFTR Mutation selbst und/oder der

chronischen Infektion durch *Pseudomonas aeruginosa* als mögliche zugrunde liegende Faktoren [148, 193-195]. Wichtige Untersuchungen im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen sind die Studien zur Funktion der T_H17-Zellen bei Zystischer Fibrose. Hier gibt es Hinweise darauf, dass die T_H17-Zellen und die zur IL-17 Achse gehörenden Zytokine IL-22 und IL-23 eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten in die Lunge spielen. Dabei würden sie wesentlich zur Gewebeschädigung der Lunge bei CF Patienten durch Neutrophile Granulozyten beitragen [79, 99, 107, 109-111, 189, 196]. T_H17-Zellen sezernieren IL-17, das wiederum die G-CSF Produktion fördert und so zu einem Anstieg der Neutrophilen-Mobilisation aus dem Knochenmark führt. Im Angesicht dieser aktivierten, antimikrobiellen T_H17 Antwort bleibt ungeklärt wie *Pseudomonas aeruginosa* in der Lage ist, die Lunge von CF Patienten zu kolonisieren und chronisch zu infizieren. Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, dass Mechanismen existieren, die die T_H17 Antwort bei CF modulieren und dämpfen.

Wenn man diese Punkte und unsere Ergebnisse in einem zusammenhängenden Konzept betrachtet, ergibt sich folgende Theorie: 1) *Pseudomonas aeruginosa* induziert die MDSC über einen Flagellin vermittelten Signalweg; 2) Die MDSC dämpfen die T-Zell Proliferation und die T_H17-Zell Antworten und schützen *Pseudomonas aeruginosa* so vor der Abwehr durch T-Zellen; und 3) Die MDSC regulieren die Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten herunter, in dem sie die IL-17 Sekretion verringern und schützen so die Lunge vor Gewebeschädigung durch überschießende Freisetzung von Proteasen und Oxidantien durch Neutrophile Granulozyten [197].

Ein weiterer möglicher Faktor im Zusammenhang der MDSC Induktion bei chronisch mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Patienten könnte auch die Schleimkapsel von *Pseudomonas aeruginosa* sein. Bei der chronischen Lungenerkrankung bei CF entwickelt sich eine Infektion mit mukoidem *Pseudomonas aeruginosa*, so dass der Flagellin-Kontakt verhindert wird [198] Bei unserer CF Patienten Kohorte handelte es sich hauptsächlich um nicht-mukoide *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen, deshalb müsste die Frage, ob

funktioneller Flagellin Kontakt zur Induktion der MDSC benötigt wird, an einer CF Patienten Kohorte mit einem größeren Anteil mukoider *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen untersucht werden.

Zu beachten ist aber auch, dass CF Patienten ohne *Pseudomonas aeruginosa* Infektion verglichen mit gesunden Kontrollen höhere MDSC Werte aufgewiesen haben. Deshalb ist davon auszugehen, dass weitere Faktoren wie z. B. andere pro-inflammatorische Zytokine zur Induktion der MDSC im Zusammenhang mit der CF Lungenerkrankung beitragen.

Auf unserer Beobachtung basierend, dass vermehrte MDSC mit einer besseren Lungenfunktion bei Patienten mit *Pseudomonas aeruginosa* Infektion korrelieren, könnte man annehmen, dass die MDSC über die Abschwächung der T_H17-Zell Antworten die Gewebeschädigung der Lunge durch Neutrophile Granulozyten einschränken. So könnten sie die CF Lungenerkrankung positiv beeinflussen, eine Überlegung, die weiterer Untersuchungen bedarf.

Diese „Anti-inflammatorische“ Funktion der MDSC könnte große Relevanz für fortgeschrittene Stadien der CF Lungenerkrankung haben, wenn DAMPs, Proteasen von Neutrophilen Granulozyten und von Proteasen gespaltene extrazelluläre Produkte wie Prolin-Glycin-Prolin, die Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten und die durch IL-17 bedingte Inflammation weiter aufrecht erhalten [199, 200].

Ob die Präsenz von MDSC für den Verlauf der CF Lungenerkrankung, wie z. B. für Exazerbationen der Erkrankung prädiktiv ist, müsste in repräsentativen longitudinalen Studien untersucht werden.

Im Zusammenhang betrachtet zeigen unsere Ergebnisse, dass die Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* MDSCs induziert und dadurch die T-Zell Immunantworten verringert. Dadurch könnten die MDSC zu einem bis jetzt noch unbeachteten therapeutischen Ziel werden, um die Inflammation und Immunabwehr bei Zystischer Fibrose und anderen, durch *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen charakterisierten Erkrankungen, zu modulieren.

MDSC sind bei MWS Patienten vermehrt.

Bei der Pathogenese des MWS spielen sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem über die permanent vermehrte IL-1 β Sekretion eine Rolle [129, 135, 138, 150]. In unseren Studien haben wir die MDSC beim Muckle-Wells Syndrom untersucht, die die Interaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems beeinflussen [20, 167].

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die MDSC bei Patienten mit Muckle-Wells Syndrom im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht sind. Dieses Ergebnis hat auch funktionelle Relevanz, da die MDSC die T-Zell Proliferation *in vitro* supprimieren.

Bei dieser Beobachtung, dass MDSC bei MWS Patienten akkumulieren, stellt sich die Frage, welche MWS-assoziierten genetischen, therapeutischen und/oder umweltbedingten Faktoren die Generierung der MDSC in diesem Krankheitszustand bedingen. Zur Generierung der MDSC *in vivo* könnten verschiedene Faktoren beitragen:

1. Genetisch/intrinsisch: Da die verschiedenen Mutationen im NLRP3 Gen, die zum MWS führen [133], in allen Zellen vorliegen und NLRP3 in allen Blutzellen exprimiert wird, könnte der Gendefekt an sich an der Generierung der MDSC beteiligt sein. Um dieser Theorie nach zu gehen, müsste man den Zusammenhang zwischen den Mutationen und der MDSC Akkumulation untersuchen. Dies wäre zum Beispiel mit Zellkulturversuchen mit genetisch veränderten Stammzellen möglich.
2. Pro-inflammatorisch: Die Induktion von MDSC wurde für proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 β [201, 202], GM-CSF und IL-6 [171] bereits beschrieben. Da das Muckle-Wells Syndrom durch erhöhte IL-1 β -Spiegel charakterisiert ist, dürfte dies zur Induktion der MDSC beitragen. Außerdem führt IL-1 β zu erhöhten IL-6 Spiegel [129, 135] und in den Seren unserer Patientenkohorte wurden im Vergleich zu den Seren gesunder Kontrollen zusätzlich erhöhte Spiegel einiger Zytokine gemessen, unter anderem VEGF und Gm-CSF (persönliche

Kommunikation mit Dr. Nikolaus Rieber, Universitätsklinik Tübingen). Es wäre also denkbar, dass die erhöhten IL-1 β -Spiegel an sich, sowie die dadurch induzierte IL-6-Produktion und die erhöht gemessenen Gm-CSF- und VEGF-Spiegel zur Akkumulation der MDSC bei MWS Patienten beitragen.

3. Therapeutisch: Die Anti-IL-1 β Therapie könnte theoretisch auch einen Einfluss auf die Generierung der MDSC bei Muckle-Wells Patienten haben. Gerade auf dem Hintergrund einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung zur Wirkung der Fc-Teile von IgG Antikörpern auf das Immunsystem [203]. Um einen ersten Anhaltspunkt für diese Theorie zu erlangen, müsste man die MDSC vor und nach Antikörper-Gabe bei den MWS Patienten messen.
4. Caspase-1 abhängig: Die dauerhafte Überfunktion der Caspase-1 könnte auch mit der MDSC Induktion zusammenhängen. Die Tatsache, dass fast alle unsere Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung unter Anti-IL-1 Therapie standen, lässt vermuten, dass die Akkumulation der MDSC bei diesen Patienten nicht nur auf IL-1 β und dessen Funktionen zurück zu führen ist. Hier stellt sich die Frage, welche Funktionen die Caspase-1 außer der IL-1 β Prozessierung hat und welche Einflüsse sich daraus auf den Organismus ergeben, die zu einer MDSC Akkumulation führen. Diese Frage, ob die MDSC Induktion allein IL-1 β abhängig ist oder unter anderem auch die Caspase-1 Aktivität bei IL-1 β Blockade einen Einfluss darauf hat, wird von unserer Arbeitsgruppe weiter untersucht.

Obwohl wir keine signifikante Assoziation zwischen den von uns untersuchten klinischen und laborchemischen Parametern VAS Arzt und Patient, CRP, BSG und SAA als Marker für die Entzündungsaktivität und den MDSC finden konnten, könnten die MDSC für die Pathogenese und Klinik beim Muckle-Wells Syndrom relevant sein.

Die klinische Relevanz könnte sich in einer Assoziation anderer klinischer Parameter wie z.B. S100 widerspiegeln. Bei unserer Patientenkohorte gab es

zu wenige Fälle bei denen auch S100 untersucht wurde, als dass man den Zusammenhang zwischen erhöhten S100 Werten und MDSC hätte untersuchen können, so dass dies noch zu tun bleibt.

Im Zusammenhang mit unseren Ergebnissen relevante Untersuchungen, betreffen die T_H17-Zell Induktion durch IL-1 β . Hier gibt es Hinweise darauf, dass die T_H17-Zell Differenzierung IL-1 β abhängig ist [141, 204, 205] und somit bei MWS Patienten verstärkt sein könnte. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die von uns isolierten MDSC auch in der Lage waren, die IL-17 Produktion der T-Zellen zu dämpfen (persönliche Kommunikation mit Dr. Nikolaus Rieber, Universitätsklinik Tübingen). Im Kontext der vermehrten IL-1 β Sekretion und der dadurch möglicherweise vermehrten IL-17 Produktion, könnte die Rolle der MDSC bei MWS auch in der Gegenregulation der verstärkten T_H17-Zell Immunantworten bestehen.

Zur Klärung der Rolle und Funktion der MDSC bei MWS Patienten müssten noch weitere Untersuchungen, z. B. knock-out oder knock-in Studien in Mäusen erfolgen. Zudem sollte die Caspase-1 Abhängigkeit der MDSC Induktion oder der Einfluss der IL-1 β Antikörper Therapie auf die MDSC Akkumulation untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Die MDSC sind eine kürzlich beschriebene Zellpopulation, die eine entscheidende Rolle bei der Regulation und in der Interaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems spielen [20, 21]. Deshalb hat uns die Rolle dieser Zellen bei Erkrankungen mit starker inflammatorischer Komponente, wie es bei der Zystischen Fibrose und dem Muckle-Wells Syndrom der Fall ist, interessiert. Außerdem haben wir versucht, die MDSC und ihre Effektormechanismen noch genauer zu charakterisieren.

Die enge Balance zwischen notwendiger Erregerabwehr und überschießender Inflammation bestimmt die Pathogenese der Lungenerkrankung bei Zystischer Fibrose [78, 146, 165]. Die zugrunde liegenden immunologischen Faktoren, die

dieses Zusammenspiel bestimmen, sind nach wie vor wenig verstanden [166]. In unseren Studien haben wir die MDSC bei Zystischer Fibrose untersucht, die die Interaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems beeinflussen [20, 167].

Das Muckle-Wells Syndrom (MWS) gehört zu den autoinflammatorischen Erkrankungen, bei denen eine genetische Mutation zu einer verstärkten IL-1 β Produktion führt. IL-1 β weist viele verschiedene Funktionen auf und wirkt sowohl über eine verstärkte Granulopoese als auch durch Induktion diverser proinflammatorischer Zytokine und akuter Phase Proteine auf das angeborene Immunsystem, aber zum Beispiel über Induktion von T_H-17 Zellen auch auf das erworbene Immunsystem [150]. So scheinen auch beim MWS beide Systeme eine entscheidende Rolle zu spielen, aufgrund dessen wir auch hier die Anzahl und Funktion von MDSC untersucht haben, die den Verlauf der Erkrankung durch Regulierung der Inflammation unter Umständen entscheidend beeinflussen könnten.

Zur Messung der MDSC in peripherem Blut von CF-Patienten, MWS-Patienten und gesunden Kontrollen haben wir bereits beschriebene Methoden [66, 152] angewandt. Wir haben Granulozyten untersucht, die sich nach der Dichtegradienten-Separation in der PBMC Fraktion befanden (*low density neutrophils*).

Zur Untersuchung der MDSC haben wir diese mittels *magnetic cell sorting* (MACS) isoliert und dann mit dem Durchflusszytometer analysiert. Zur Untersuchung der Funktion der MDSC wurde der CFSE -Proliferationsassay eingesetzt. Zur Analyse der IL-17 Produktion durch die T-Zellen des CFSE-Proliferationsassays haben wir die Überstände aus den CFSE Versuchen untersucht.

Auf der Suche nach diskriminierenden Oberflächenmarkern zwischen MDSC und PMN haben wir die Oberflächenmarker der MDSC mit denen normaler PMN verglichen und festgestellt, dass sowohl CXCR4, wie IL-4R α als auch CCR3 auf MDSC signifikant häufiger und stärker als auf PMN exprimiert

werden. Die Bedeutung dieser Rezeptoren für die Funktion von MDSC bei CF und MWS Patienten bleibt aber noch ungeklärt.

In unserer Studie mit MWS Patienten unter Anti-IL-1 Therapie zeigte sich, dass der prozentuale Anteil der MDSC im Vergleich zu einer altersentsprechenden Kontrollgruppe signifikant erhöht war. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen den Prozentangaben der MDSC und klinischen Parametern wie Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), C-reaktives Protein (CRP), Serum-Amyloid A (SAA) oder der klinischen Aktivitätseinschätzung von Patient und Arzt festgestellt werden. Die klinische Relevanz könnte sich jedoch in einer Assoziation anderer klinischer Parameter wie z.B. S100 widerspiegeln, was noch untersucht werden könnte. Die MDSC der MWS Patienten können die IL-17 Produktion der T-Zellen dämpfen. Im Kontext der vermehrten IL-1 β Sekretion und der dadurch möglicherweise vermehrten IL-17 Produktion [141, 204, 205], könnte die Rolle der MDSC bei MWS auch in der Gegenregulation der verstärkten T_H17-Zell Immunantworten bestehen.

Unsere Studien zeigen, dass MDSC bei Patienten mit Zystischer Fibrose in Abhängigkeit des Alters und einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* akkumulieren, während sie bei gesunden Kontrollen nur in sehr geringem Ausmaß nachweisbar sind. Dieses Ergebnis hat auch funktionelle Relevanz, da die MDSC die T-Zell Proliferation *in vitro* supprimieren und die T_H17-Zell Antworten dämpfen, sowie klinische Relevanz, da die Akkumulation der MDSC mit einer besseren Lungenfunktion der betroffenen Patienten verbunden ist. Unsere Ergebnisse in einem zusammenhängenden Konzept betrachtet, führen uns zu folgende Theorie: 1) *Pseudomonas aeruginosa* induziert MDSC; 2) MDSC dämpfen die T-Zell Proliferation und die T_H17-Zell Antworten und schützen *Pseudomonas aeruginosa* bis zu einem bestimmten Grad vor der Abwehr durch T-Zellen; und 3) MDSC regulieren die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten herunter, in dem sie die IL-17 Sekretion verringern und schützen so die Lunge vor Gewebeschädigung durch überschießende Freisetzung von Proteasen und Oxidantien durch neutrophile Granulozyten [197]. Als ein

Bindeglied zwischen adaptivem und erworbenem Immunsystem könnten die MDSC zu einem bis jetzt noch unbeachteten therapeutischen Ziel werden, um die Inflammation und Immunabwehr bei Zystischer Fibrose und anderen, durch *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen charakterisierten Erkrankungen, zu modulieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Murphy KM, Travers P, Walport M, Mahlke K, Seidler L, Haüßer-Siller I. *Immunologie*: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
2. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004,**303**:1532-1535.
3. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in immunology* 2009,**30**:513-521.
4. Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Current biology : CB* 2006,**16**:401-407.
5. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular microbiology* 2006,**8**:668-676.
6. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009,**106**:6748-6753.
7. Church LD, Cook GP, McDermott MF. Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nature clinical practice. Rheumatology* 2008,**4**:34-42.
8. Foeldvari I, Kummerle-Deschner J. [Autoinflammatory diseases in childhood]. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 2009,**68**:726-732.
9. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010,**140**:821-832.
10. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* 2009,**27**:485-517.
11. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *Journal of immunology* 2000,**165**:6107-6115.
12. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, *et al.* Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *The Journal of experimental medicine* 2001,**194**:519-527.
13. Chung DR, Kasper DL, Panzo RJ, Chitnis T, Grusby MJ, Sayegh MH, *et al.* CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *Journal of immunology* 2003,**170**:1958-1963.
14. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, *et al.* IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nature immunology* 2007,**8**:369-377.

15. Rudner XL, Happel KI, Young EA, Shellito JE. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infection and immunity* 2007,**75**:3055-3061.
16. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *The Journal of infectious diseases* 2004,**190**:624-631.
17. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology* 2008,**8**:523-532.
18. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature immunology* 2008,**9**:239-244.
19. Young MR, Newby M, Wepsic HT. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research* 1987,**47**:100-105.
20. Gabilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews. Immunology* 2009,**9**:162-174.
21. 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* 2007,**179**:977-983.
22. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* 2008,**8**:618-631.
23. Greifenberg V, Ribechini E, Rossner S, Lutz MB. Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development. *European journal of immunology* 2009,**39**:2865-2876.
24. Ribechini E, Leenen PJ, Lutz MB. Gr-1 antibody induces STAT signaling, macrophage marker expression and abrogation of myeloid-derived suppressor cell activity in BM cells. *European journal of immunology* 2009,**39**:3538-3551.
25. Ribechini E, Greifenberg V, Sandwick S, Lutz MB. Subsets, expansion and activation of myeloid-derived suppressor cells. *Medical microbiology and immunology* 2010,**199**:273-281.
26. Gabilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, *et al.* The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* 2007,**67**:425; author reply 426.
27. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology* 2008,**181**:5791-5802.
28. Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabilovich DI. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *Journal of immunology* 2004,**172**:989-999.
29. Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, *et al.* Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 2000,**96**:3838-3846.

30. Movahedi K, Williams M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, *et al.* Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 2008,**111**:4233-4244.
31. Yang R, Cai Z, Zhang Y, Yutzy WHt, Roby KF, Roden RB. CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer research* 2006,**66**:6807-6815.
32. Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, *et al.* Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer research* 2006,**66**:1123-1131.
33. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Colombo MP, *et al.* Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation* 2006,**116**:2777-2790.
34. Pan PY, Wang GX, Yin B, Ozao J, Ku T, Divino CM, *et al.* Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* 2008,**111**:219-228.
35. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* 2007,**67**:4507-4513.
36. Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer research* 2004,**64**:6337-6343.
37. Melani C, Chiodoni C, Forni G, Colombo MP. Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity. *Blood* 2003,**102**:2138-2145.
38. Kusmartsev S, Cheng F, Yu B, Nefedova Y, Sotomayor E, Lush R, *et al.* All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer research* 2003,**63**:4441-4449.
39. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, Cabrelle A, Wang M, Hwu P, *et al.* Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *Journal of immunology* 1999,**162**:5728-5737.
40. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer research* 2007,**67**:10019-10026.
41. Wu L, Yan C, Czader M, Foreman O, Blum JS, Kapur R, *et al.* Inhibition of PPARgamma in myeloid-lineage cells induces systemic inflammation, immunosuppression, and tumorigenesis. *Blood* 2012,**119**:115-126.
42. Cheng P, Corzo CA, Luetsteke N, Yu B, Nagaraj S, Bui MM, *et al.* Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-

- derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *The Journal of experimental medicine* 2008,**205**:2235-2249.
43. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *Journal of immunology* 2005,**174**:4880-4891.
 44. Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, *et al.* MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *The Journal of experimental medicine* 2007,**204**:1463-1474.
 45. Bronte V, Serafini P, De Santo C, Marigo I, Tosello V, Mazzone A, *et al.* IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology* 2003,**170**:270-278.
 46. Rutschman R, Lang R, Hesse M, Ihle JN, Wynn TA, Murray PJ. Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *Journal of immunology* 2001,**166**:2173-2177.
 47. Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, *et al.* Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *The Journal of experimental medicine* 2003,**198**:1741-1752.
 48. Munera V, Popovic PJ, Bryk J, Pribis J, Caba D, Matta BM, *et al.* Stat 6-dependent induction of myeloid derived suppressor cells after physical injury regulates nitric oxide response to endotoxin. *Annals of surgery* 2010,**251**:120-126.
 49. Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S. Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer research* 2005,**65**:11743-11751.
 50. Kusmartsev S, Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *Journal of immunology* 2005,**175**:4583-4592.
 51. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *Journal of immunology* 2009,**182**:240-249.
 52. Yang L, Huang J, Ren X, Gorska AE, Chytil A, Aakre M, *et al.* Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer cell* 2008,**13**:23-35.
 53. Pan PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, *et al.* Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer research* 2010,**70**:99-108.
 54. Serafini P, Mgebroff S, Noonan K, Borrello I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer research* 2008,**68**:5439-5449.

55. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer research* 2010,**70**:68-77.
56. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, *et al.* Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *The Journal of experimental medicine* 2005,**202**:931-939.
57. 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**:1155-1167.
58. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, *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* 2007,**25**:2546-2553.
59. Poschke I, Mougiakakos D, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R. Immature immunosuppressive CD14+HLA-DR-/low cells in melanoma patients are Stat3hi and overexpress CD80, CD83, and DC-sign. *Cancer research* 2010,**70**:4335-4345.
60. Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Kruger C, Manns MP, *et al.* A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology* 2008,**135**:234-243.
61. van Crujisen H, van der Veldt AA, Vroliing L, Oosterhoff D, Broxterman HJ, Scheper RJ, *et al.* Sunitinib-induced myeloid lineage redistribution in renal cell cancer patients: CD1c+ dendritic cell frequency predicts progression-free survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008,**14**:5884-5892.
62. Vuk-Pavlovic S, Bulur PA, Lin Y, Qin R, Szumlanski CL, Zhao X, *et al.* Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/- monocytes in prostate cancer. *The Prostate* 2010,**70**:443-455.
63. Brimnes MK, Vangsted AJ, Knudsen LM, Gimsing P, Gang AO, Johnsen HE, *et al.* Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR(-)/low myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Scandinavian journal of immunology* 2010,**72**:540-547.
64. Yuan XK, Zhao XK, Xia YC, Zhu X, Xiao P. Increased circulating immunosuppressive CD14(+)-HLA-DR(-)/low cells correlate with clinical cancer stage and pathological grade in patients with bladder carcinoma. *The Journal of international medical research* 2011,**39**:1381-1391.
65. Mundy-Bosse BL, Young GS, Bauer T, Binkley E, Bloomston M, Bill MA, *et al.* Distinct myeloid suppressor cell subsets correlate with plasma IL-6 and IL-10 and reduced interferon-alpha signaling in CD4(+) T cells from patients with GI malignancy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2011,**60**:1269-1279.

66. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, *et al.* Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer research* 2009,**69**:1553-1560.
67. Lechner MG, Megiel C, Russell SM, Bingham B, Arger N, Woo T, *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. *Journal of translational medicine* 2011,**9**:90.
68. Greten TF, Manns MP, Korangy F. Myeloid derived suppressor cells in human diseases. *International immunopharmacology* 2011,**11**:802-807.
69. Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, *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* 2009,**15**:2148-2157.
70. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, *et al.* Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer research* 2005,**65**:3044-3048.
71. Srivastava MK, Bosch JJ, Thompson JA, Ksander BR, Edelman MJ, Ostrand-Rosenberg S. Lung cancer patients' CD4(+) T cells are activated in vitro by MHC II cell-based vaccines despite the presence of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2008,**57**:1493-1504.
72. Liu CY, Wang YM, Wang CL, Feng PH, Ko HW, Liu YH, *et al.* Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14(-)/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2010,**136**:35-45.
73. Raychaudhuri B, Rayman P, Ireland J, Ko J, Rini B, Borden EC, *et al.* Myeloid-derived suppressor cell accumulation and function in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Neuro-oncology* 2011,**13**:591-599.
74. Sippel TR, White J, Nag K, Tsvankin V, Klaassen M, Kleinschmidt-DeMasters BK, *et al.* Neutrophil degranulation and immunosuppression in patients with GBM: restoration of cellular immune function by targeting arginase I. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011,**17**:6992-7002.
75. Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, Francescato S, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, *et al.* IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *Journal of immunology* 2009,**182**:6562-6568.
76. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends in immunology* 2011,**32**:19-25.
77. Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996,**154**:1229-1256.
78. Ratjen F. Diagnosing and managing infection in CF. *Paediatric respiratory reviews* 2006,**7 Suppl 1**:S151-153.

79. Dubin PJ, McAllister F, Kolls JK. Is cystic fibrosis a TH17 disease? *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 2007,**56**:221-227.
80. Boucher RC. New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2004,**23**:146-158.
81. Zahm JM, Baconnais S, Davidson DJ, Webb S, Dorin J, Bonnet N, *et al.* X-ray microanalysis of airway surface liquid collected in cystic fibrosis mice. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2001,**281**:L309-313.
82. Jayaraman S, Song Y, Vetrivel L, Shankar L, Verkman AS. Noninvasive in vivo fluorescence measurement of airway-surface liquid depth, salt concentration, and pH. *The Journal of clinical investigation* 2001,**107**:317-324.
83. Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 1996,**85**:229-236.
84. Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997,**88**:553-560.
85. Pier GB, Grout M, Zaidi TS. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997,**94**:12088-12093.
86. Cohen TS, Prince A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nature medicine* 2012,**18**:509-519.
87. Karp CL, Flick LM, Park KW, Softic S, Greer TM, Keledjian R, *et al.* Defective lipoxin-mediated anti-inflammatory activity in the cystic fibrosis airway. *Nature immunology* 2004,**5**:388-392.
88. Greally P, Hussein MJ, Cook AJ, Sampson AP, Piper PJ, Price JF. Sputum tumour necrosis factor-alpha and leukotriene concentrations in cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood* 1993,**68**:389-392.
89. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, *et al.* Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995,**152**:2111-2118.
90. Quinn DJ, Weldon S, Taggart CC. Antiproteases as therapeutics to target inflammation in cystic fibrosis. *The open respiratory medicine journal* 2010,**4**:20-31.
91. Strieter RM. Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2002,**283**:L688-689.
92. Birrer P. Consequences of unbalanced protease in the lung: protease involvement in destruction and local defense mechanisms of the lung. *Agents and actions. Supplements* 1993,**40**:3-12.
93. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, Caughey GH. Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. *The Journal of clinical investigation* 1990,**85**:682-689.

94. O'Connor CM, Gaffney K, Keane J, Southey A, Byrne N, O'Mahoney S, *et al.* alpha 1-Proteinase inhibitor, elastase activity, and lung disease severity in cystic fibrosis. *The American review of respiratory disease* 1993,**148**:1665-1670.
95. Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2008,**40**:1703-1715.
96. Coakley RJ, Taggart C, McElvaney NG, O'Neill SJ. Cytosolic pH and the inflammatory microenvironment modulate cell death in human neutrophils after phagocytosis. *Blood* 2002,**100**:3383-3391.
97. Hartl D, Latzin P, Hordijk P, Marcos V, Rudolph C, Woischnik M, *et al.* Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nature medicine* 2007,**13**:1423-1430.
98. Hartl D, Griese M, Kappler M, Zissel G, Reinhardt D, Rebhan C, *et al.* Pulmonary T(H)2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2006,**117**:204-211.
99. Tan HL, Regamey N, Brown S, Bush A, Lloyd CM, Davies JC. The Th17 pathway in cystic fibrosis lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011,**184**:252-258.
100. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology* 2005,**6**:1133-1141.
101. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Current opinion in immunology* 2007,**19**:652-657.
102. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature immunology* 2007,**8**:345-350.
103. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004,**21**:467-476.
104. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 2003,**14**:155-174.
105. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006,**441**:235-238.
106. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006,**24**:179-189.
107. Dubin PJ, Kolls JK. IL-17 in cystic fibrosis: more than just Th17 cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011,**184**:155-157.
108. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, *et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature medicine* 2008,**14**:275-281.
109. McAllister F, Henry A, Kreindler JL, Dubin PJ, Ulrich L, Steele C, *et al.* Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in

- bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *Journal of immunology* 2005,**175**:404-412.
110. Brodlić M, McKean MC, Johnson GE, Anderson AE, Hilkens CM, Fisher AJ, *et al.* Raised interleukin-17 is immunolocalised to neutrophils in cystic fibrosis lung disease. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2011,**37**:1378-1385.
 111. Decraene A, Willems-Widyastuti A, Kasran A, De Boeck K, Bullens DM, Dupont LJ. Elevated expression of both mRNA and protein levels of IL-17A in sputum of stable Cystic Fibrosis patients. *Respiratory research* 2010,**11**:177.
 112. Neudorf U, Lainka E, Kallinich T, Holzinger D, Roth J, Foll D, *et al.* [Genetic fever syndromes : Hereditary recurrent (periodic) fever syndromes.]. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 2013.
 113. Farasat S, Aksentijevich I, Toro JR. Autoinflammatory diseases: clinical and genetic advances. *Archives of dermatology* 2008,**144**:392-402.
 114. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* 2002,**10**:417-426.
 115. Petrilli V, Martinon F. The inflammasome, autoinflammatory diseases, and gout. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 2007,**74**:571-576.
 116. Muckle TJ, Wellsm. Urticaria, deafness, and amyloidosis: a new heredo-familial syndrome. *The Quarterly journal of medicine* 1962,**31**:235-248.
 117. Samuels J, Ozen S. Familial Mediterranean fever and the other autoinflammatory syndromes: evaluation of the patient with recurrent fever. *Current opinion in rheumatology* 2006,**18**:108-117.
 118. Kastner DL. Hereditary periodic fever syndromes. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program* 2005:74-81.
 119. Huemer C, Huemer M. [Periodic fever syndromes]. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 2006,**65**:595-598, 600-593.
 120. Posch C, Kaulfersch W, Rappersberger K. Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome. *Pediatric dermatology* 2012.
 121. Drenth JP, van der Meer JW. Hereditary periodic fever. *The New England journal of medicine* 2001,**345**:1748-1757.
 122. Bolanos L, Mosquera-Reboredo JM, Cao M, Ferreiro T, Veleiro B, Valdes F, *et al.* Thyroid and renal amyloidosis secondary to cryopyrin associated periodic syndrome (Muckle-Wells syndrome) (Mutation NLRP3). *Nefrologia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia* 2013,**33**:266-271.
 123. Hull KM, Shoham N, Chae JJ, Aksentijevich I, Kastner DL. The expanding spectrum of systemic autoinflammatory disorders and their rheumatic manifestations. *Current opinion in rheumatology* 2003,**15**:61-69.
 124. Alten R, Gram H, Joosten LA, van den Berg WB, Sieper J, Wassenberg S, *et al.* The human anti-IL-1 beta monoclonal antibody ACZ885 is effective in joint inflammation models in mice and in a proof-of-concept

- study in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2008,**10**:R67.
125. Lachmann HJ, Kone-Paut I, Kuemmerle-Deschner JB, Leslie KS, Hachulla E, Quartier P, *et al.* Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *The New England journal of medicine* 2009,**360**:2416-2425.
 126. Kotter I, Schedel J, Kummerle-Deschner JB. [Periodic fever syndrome/autoinflammatory syndrome]. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 2009,**68**:137-148; quiz 149.
 127. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunological reviews* 2011,**243**:136-151.
 128. Fritz JH, Girardin SE. How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals. *Journal of endotoxin research* 2005,**11**:390-394.
 129. Dinarello CA. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998,**856**:1-11.
 130. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Forster I, *et al.* Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* 2011,**34**:213-223.
 131. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, *et al.* Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of immunology* 2009,**183**:787-791.
 132. O'Connor W, Jr., Harton JA, Zhu X, Linhoff MW, Ting JP. Cutting edge: CIAS1/cryopyrin/PYPAF1/NALP3/CATERPILLER 1.1 is an inducible inflammatory mediator with NF-kappa B suppressive properties. *Journal of immunology* 2003,**171**:6329-6333.
 133. Neven B, Prieur AM, Quartier dit Maire P. Cryopyrinopathies: update on pathogenesis and treatment. *Nature clinical practice. Rheumatology* 2008,**4**:481-489.
 134. Cuisset L, Jeru I, Dumont B, Fabre A, Cochet E, Le Bozec J, *et al.* Mutations in the autoinflammatory cryopyrin-associated periodic syndrome gene: epidemiological study and lessons from eight years of genetic analysis in France. *Annals of the rheumatic diseases* 2011,**70**:495-499.
 135. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology* 2009,**27**:519-550.
 136. Franchi L, Eigenbrod T, Nunez G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *Journal of immunology* 2009,**183**:792-796.
 137. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996,**87**:2095-2147.
 138. Dinarello CA. Mutations in cryopyrin: bypassing roadblocks in the caspase 1 inflammasome for interleukin-1beta secretion and disease activity. *Arthritis and rheumatism* 2007,**56**:2817-2822.

139. Johnson VJ, Yucesoy B, Luster MI. Prevention of IL-1 signaling attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2005,**116**:851-858.
140. Nakae S, Asano M, Horai R, Iwakura Y. Interleukin-1 beta, but not interleukin-1 alpha, is required for T-cell-dependent antibody production. *Immunology* 2001,**104**:402-409.
141. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 2006,**203**:1685-1691.
142. Harris KM, Fasano A, Mann DL. Cutting edge: IL-1 controls the IL-23 response induced by gliadin, the etiologic agent in celiac disease. *Journal of immunology* 2008,**181**:4457-4460.
143. Kimura A, Naka T, Kishimoto T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007,**104**:12099-12104.
144. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature immunology* 2007,**8**:942-949.
145. Chen Z, O'Shea JJ. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunologic research* 2008,**41**:87-102.
146. Chmiel JF, Berger M, Konstan MW. The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clinical reviews in allergy & immunology* 2002,**23**:5-27.
147. Sagel SD, Dowell EB, Accurso FJ. Bacterial colonization and infection in the CF lung. *Methods in molecular medicine* 2002,**70**:433-446.
148. Moss RB. Infection, inflammation, and the downward spiral of cystic fibrosis lung disease. *The Journal of pediatrics* 2009,**154**:162-163.
149. Banner KH, De Jonge H, Elborn S, Growcott E, Gulbins E, Konstan M, *et al.* Highlights of a workshop to discuss targeting inflammation in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2009,**8**:1-8.
150. Ozkurede VU, Franchi L. Immunology in clinic review series; focus on autoinflammatory diseases: role of inflammasomes in autoinflammatory syndromes. *Clinical and experimental immunology* 2012,**167**:382-390.
151. Holzkecht B. Direkter ex vivo Nachweis Myelin Basic Protein (MBP)-spezifischer T-Helferzellen bei Multiple Sklerose Patienten. In; 2003.
152. Brandau S, Trellakis S, Bruderek K, Schmaltz D, Steller G, Elian M, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of cancer patients contain a subset of immature neutrophils with impaired migratory properties. *Journal of leukocyte biology* 2011,**89**:311-317.
153. Bowen JL, Olson JK. Innate immune CD11b+Gr-1+ cells, suppressor cells, affect the immune response during Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Journal of immunology* 2009,**183**:6971-6980.

154. Van Ginderachter JA, Beschin A, De Baetselier P, Raes G. Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections. *European journal of immunology* 2010,**40**:2976-2985.
155. Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, *et al.* A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Molecular medicine* 2011,**17**:281-292.
156. Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *Journal of immunology* 2008,**180**:7898-7906.
157. Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, Goetz CA, Koehn BH, Veenstra R, *et al.* Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 2010,**116**:5738-5747.
158. Yin B, Ma G, Yen CY, Zhou Z, Wang GX, Divino CM, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models. *Journal of immunology* 2010,**185**:5828-5834.
159. Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, Kuchroo VK, *et al.* CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 2007,**179**:5228-5237.
160. Haile LA, von Wasielowski R, Gamrekashvili J, Kruger C, Bachmann O, Westendorf AM, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology* 2008,**135**:871-881, 881 e871-875.
161. Obermajer N, Muthuswamy R, Odunsi K, Edwards RP, Kalinski P. PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer research* 2011,**71**:7463-7470.
162. Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, Gelabert A, Jones J, Rubin BI, *et al.* Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *The New England journal of medicine* 2006,**355**:581-592.
163. Chakraborty A, Tannenbaum S, Rordorf C, Lowe PJ, Floch D, Gram H, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of canakinumab, a human anti-interleukin-1beta monoclonal antibody. *Clinical pharmacokinetics* 2012,**51**:e1-18.
164. Eash KJ, Means JM, White DW, Link DC. CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* 2009,**113**:4711-4719.
165. Pillarisetti N, Williamson E, Linnane B, Skoric B, Robertson CF, Robinson P, *et al.* Infection, inflammation, and lung function decline in infants with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011,**184**:75-81.
166. Ratjen F. Update in cystic fibrosis 2008. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009,**179**:445-448.
167. Youn JI, Gabrilovich DI. The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *European journal of immunology* 2010,**40**:2969-2975.

168. Hayes E, Pohl K, McElvaney NG, Reeves EP. The cystic fibrosis neutrophil: a specialized yet potentially defective cell. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 2011,**59**:97-112.
169. Painter RG, Valentine VG, Lanson NA, Jr., Leidal K, Zhang Q, Lombard G, *et al.* CFTR Expression in human neutrophils and the phagolysosomal chlorination defect in cystic fibrosis. *Biochemistry* 2006,**45**:10260-10269.
170. Rieber N, Brand A, Hector A, Graepler-Mainka U, Ost M, Schafer I, *et al.* Flagellin induces myeloid-derived suppressor cells: implications for *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease. *Journal of immunology* 2013,**190**:1276-1284.
171. Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of immunology* 2010,**185**:2273-2284.
172. Nixon LS, Yung B, Bell SC, Elborn JS, Shale DJ. Circulating immunoreactive interleukin-6 in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998,**157**:1764-1769.
173. Hartl D, Griesse M, Nicolai T, Zissel G, Prell C, Konstantopoulos N, *et al.* Pulmonary chemokines and their receptors differentiate children with asthma and chronic cough. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2005,**115**:728-736.
174. Moser C, Kjaergaard S, Pressler T, Kharazmi A, Koch C, Hoiby N. The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2000,**108**:329-335.
175. Jensen PO, Givskov M, Bjarnsholt T, Moser C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS immunology and medical microbiology* 2010,**59**:292-305.
176. Zhang Z, Louboutin JP, Weiner DJ, Goldberg JB, Wilson JM. Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. *Infection and immunity* 2005,**73**:7151-7160.
177. Hybiske K, Ichikawa JK, Huang V, Lory SJ, Machen TE. Cystic fibrosis airway epithelial cell polarity and bacterial flagellin determine host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Cellular microbiology* 2004,**6**:49-63.
178. Blohmke CJ, Victor RE, Hirschfeld AF, Elias IM, Hancock DG, Lane CR, *et al.* Innate immunity mediated by TLR5 as a novel antiinflammatory target for cystic fibrosis lung disease. *Journal of immunology* 2008,**180**:7764-7773.
179. Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2004,**30**:627-634.
180. Tseng J, Do J, Widdicombe JH, Machen TE. Innate immune responses of human tracheal epithelium to *Pseudomonas aeruginosa* flagellin, TNF-alpha, and IL-1beta. *American journal of physiology. Cell physiology* 2006,**290**:C678-690.

181. Pena J, Fu Z, Schwarzer C, Machen TE. Pseudomonas aeruginosa Inhibition of Flagellin-activated NF-kappaB and interleukin-8 by human airway epithelial cells. *Infection and immunity* 2009,**77**:2857-2865.
182. Descamps D, Le Gars M, Balloy V, Barbier D, Maschalidi S, Tohme M, *et al.* Toll-like receptor 5 (TLR5), IL-1beta secretion, and asparagine endopeptidase are critical factors for alveolar macrophage phagocytosis and bacterial killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012,**109**:1619-1624.
183. Koller B, Kappler M, Latzin P, Gaggar A, Schreiner M, Takyar S, *et al.* TLR expression on neutrophils at the pulmonary site of infection: TLR1/TLR2-mediated up-regulation of TLR5 expression in cystic fibrosis lung disease. *Journal of immunology* 2008,**181**:2753-2763.
184. Ramphal R, Balloy V, Jyot J, Verma A, Si-Tahar M, Chignard M. Control of Pseudomonas aeruginosa in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *Journal of immunology* 2008,**181**:586-592.
185. Ben Mohamed F, Garcia-Verdugo I, Medina M, Balloy V, Chignard M, Ramphal R, *et al.* A crucial role of Flagellin in the induction of airway mucus production by Pseudomonas aeruginosa. *PloS one* 2012,**7**:e39888.
186. Morris AE, Liggitt HD, Hawn TR, Skerrett SJ. Role of Toll-like receptor 5 in the innate immune response to acute P. aeruginosa pneumonia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2009,**297**:L1112-1119.
187. Sorensen RU, Stern RC, Polmar SH. Lymphocyte responsiveness to Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: Relationship to status of pulmonary disease in sibling pairs. *The Journal of pediatrics* 1978,**93**:201-205.
188. Rubin HR, Sorensen RU, Chase PA, Klinger JD. Suppression of in vitro lymphocyte DNA synthesis by killed Pseudomonas aeruginosa. *Infection and immunity* 1983,**39**:630-637.
189. Brodli M, Lordan J, Ward C. Can cells other than Th17 lymphocytes be important sources of IL-17 in the lungs? *Thorax* 2011,**66**:1096; author reply 1096-1097.
190. Moss RB, Hsu YP, Olds L. Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clinical and experimental immunology* 2000,**120**:518-525.
191. Moser C, Johansen HK, Song Z, Hougen HP, Rygaard J, Hoiby N. Chronic Pseudomonas aeruginosa lung infection is more severe in Th2 responding BALB/c mice compared to Th1 responding C3H/HeN mice. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 1997,**105**:838-842.
192. Dubin PJ, Martz A, Eisenstatt JR, Fox MD, Logar A, Kolls JK. Interleukin-23-mediated inflammation in Pseudomonas aeruginosa pulmonary infection. *Infection and immunity* 2012,**80**:398-409.
193. Moss RB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and Aspergillus infection in cystic fibrosis. *Current opinion in pulmonary medicine* 2010,**16**:598-603.

194. Moss RB. Lymphocytes in cystic fibrosis lung disease: a tale of two immunities. *Clinical and experimental immunology* 2004,**135**:358-360.
195. Hartl D. Immunological mechanisms behind the cystic fibrosis-ABPA link. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 2009,**47 Suppl 1**:S183-191.
196. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Interleukin-17 in pulmonary host defense. *Experimental lung research* 2007,**33**:507-518.
197. Kelly E, Greene CM, McElvaney NG. Targeting neutrophil elastase in cystic fibrosis. *Expert opinion on therapeutic targets* 2008,**12**:145-157.
198. Hoiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. *Future microbiology* 2010,**5**:1663-1674.
199. Gaggar A, Rowe SM, Matthew H, Blalock JE. Proline-Glycine-Proline (PGP) and High Mobility Group Box Protein-1 (HMGB1): Potential Mediators of Cystic Fibrosis Airway Inflammation. *The open respiratory medicine journal* 2010,**4**:32-38.
200. Gaggar A, Li Y, Weathington N, Winkler M, Kong M, Jackson P, *et al.* Matrix metalloprotease-9 dysregulation in lower airway secretions of cystic fibrosis patients. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2007,**293**:L96-L104.
201. Filipazzi P, Huber V, Rivoltini L. Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2012,**61**:255-263.
202. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, *et al.* Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell* 2009,**16**:183-194.
203. Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? *Nature reviews. Immunology* 2013,**13**:176-189.
204. Chizzolini C, Chicheportiche R, Alvarez M, de Rham C, Roux-Lombard P, Ferrari-Lacraz S, *et al.* Prostaglandin E2 synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion. *Blood* 2008,**112**:3696-3703.
205. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011,**117**:3720-3732.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Aufbau und Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms [9]	25
Abb. 2	Prinzip der Hydrodynamischen Fokussierung	35
Abb. 3	Aufbau eines FACS Gerätes und Darstellung der Strahlengänge [151]	36
Abb. 4	Einstellungen des FACSCalibur zur Messung der MDSC	39
Abb. 5	Dotplot zur Auswertung der MDSC (<i>Myeloid derived suppressor cells</i>)	40
Abb. 6	Quadrantenanalyse mit Fadenkreuz, vier Quadranten und Quadrantenstatistik	41
Abb. 7	Einstellungen des FACSCalibur zur Messung der Carboxyfluorescein-diazetatsuccinimidylester (CFSE)-gefärbten Zellen	44
Abb. 8	Auswertung der CFSE gefärbten Zellen	45
Abb. 9	Messung der MDSC	47
Abb. 10	Charakterisierung der MDSC	48
Abb. 11	MDSC in CF (<i>Cystic fibrosis</i>) -Patienten	49
Abb. 12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Infektion und MDSC bei CF Patienten	57
Abb. 13	Korrelation der MDSC bei CF-Patienten mit Parametern der Lungenfunktion	59
Abb. 14	Korrelation der MDSC bei CF-Patienten mit FVC	60
Abb. 15	Korrelation MDSC mit dem Alter	61
Abb. 16	MDSC bei Muckle-Wells Syndrom (MWS) Patienten	63
Abb. 17	Korrelation MDSC mit Klinischen Parametern bei MWS Patienten	65
Abb. 18	Suppression der T-Zell Proliferation durch MDSC	66
Abb. 19	IL-17 Sekretion durch T-Zellen	67

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Charakteristika der vier zur Verfügung stehenden Floureszenzkanäle des FACSCalibur	36
Tabelle 2	1. Teil Klinische Daten der CF (<i>Cystic Fibrosis</i>) Patienten	50
Tabelle 3	2. Teil Klinische Daten der CF Patienten	52
Tabelle 4	3. Teil Klinische Daten der CF Patienten	54
Tabelle 5	Klinische Daten Muckle-Wells Syndrom Patienten	64

9 Danksagung

Mein Dank an dieser Stelle gilt zunächst unserer technischen Assistentin Iris Schäfer für die Einarbeitung, Begleitung und praktische Unterstützung im Labor über den gesamten Zeitraum der Arbeit. Vielen Dank, für die geduldige und freundliche Hilfestellung bei allen Problemlagen und in den vielen Stunden der gemeinsamen Arbeit.

Herzlicher Dank geht an Dr. med. Nikolaus Rieber für die ausgezeichnete Betreuung. Die schnelle Beantwortung aller fachlichen und theoretischen Fragen zu jeder Zeit und die Gewissheit, immer einen Ansprechpartner zu haben, waren mir eine sehr große Hilfe.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Dominik Hartl für die Annahme als Doktorandin und für die Bereitstellung des Themas, die Versuchsplanung und für die Diskussion und Einordnung der Ergebnisse.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen, die mich auf unterschiedlichste Art während der Arbeit unterstützt haben, durch Ratschläge, Motivation oder Hilfe bei der Überwindung technischer Schwierigkeiten.

Ein großer Dank geht an meine Eltern, die mich während meines Studiums so lange unterstützt haben.

Meinem Freund für seine Geduld und das Lesen und Korrigieren der Arbeit und unserer kleinen Tochter, die noch so lange gewartet hat, dass ich die Arbeit in Ruhe beenden konnte.