

**Toll-like Rezeptor - vermittelte Induktion von
Myeloid derived suppressor cells
und deren Rolle bei *S. aureus* - Infektionen**

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

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

vorgelegt von

Ost, Michael Maximilian

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Hartl

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Peschel

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	7
1.1	Myeloid derived suppressor cells (MDSCs)	7
1.1.1	Charakterisierung der MDSCs	7
1.1.2	Aktivierung und Funktion der MDSCs	8
1.1.3	MDSCs als therapeutisches Target	10
1.2	Toll-like Rezeptoren (TLR)	11
1.2.1	Vorkommen der TLR	11
1.2.2	Aktivierung der TLR	12
1.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.3.1	Verbreitung und Resistenzen	13
1.3.2	Pathogenitätsmerkmale von <i>S. aureus</i>	14
1.3.3	Klinische Zeichen einer <i>S. aureus</i> - Infektion	15
1.4	Ziel der Dissertation	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Geräte	18
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3	Medien und Reagenzien	19
2.1.4	FACS-Antikörper und MACS-Beads	21
2.1.5	Bakterien-Kulturüberstände / Pathogen-Bestandteile	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Isolation von PBMCs und PMNs	23
2.2.2	Kultivierung der Zellen	24
2.2.3	Durchflusszytometrie nach Kultur	25
2.2.4	Magnetic activated cell sorting (MACS)	27
2.2.5	CFSE-Proliferationsassay	28
2.2.6	Statistische Auswertung	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Phänotypisierung und Funktionsnachweis der MDSC-Population	30

3.1.1	Charakterisierung der MDSCs in der Durchflusszytometrie	30
3.1.2	Nachweis der immunsuppressiven Funktion der MDSCs.....	34
3.2	Phänotypisierung der MDSC-Population nach GM-CSF-Stimulation.....	35
3.3	Beeinflussung der MDSC-Induktion durch TLR-Liganden.....	38
3.3.1	Beeinflussung durch bakterielle TLR-Liganden	38
3.3.2	Beeinflussung durch virale TLR-Liganden.....	39
3.3.3	Vergleich der MDSCs nach GM-CSF- und Flagellin-Stimulation.....	40
3.4	Einfluss von <i>S. aureus</i> auf die Induktion von MDSCs	43
3.4.1	Effekt von Methicillin-sensitivem <i>S. aureus</i> auf die MDSC-Induktion	43
3.4.2	Effekt von Methicillin-resistentem <i>S. aureus</i> auf die MDSC-Induktion...	44
4	Diskussion	52
4.1	MDSC-Populationen von Kontrollen und bei GM-CSF-Stimulation.....	52
4.2	TLR-Liganden induzieren MDSCs.....	54
4.3	Einfluss von <i>S. aureus</i> auf die MDSC-Entstehung	55
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis.....	62

Abkürzungsverzeichnis:

agr	accessory gene regulator
ca-MRSA	community-acquired Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CD	cluster of differentiation
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc	fragment crystallizable region
FCS	fetal calf serum
FSC	forward scatter channel
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
ha-MRSA	hospital-acquired Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
HLA-DR	human leukocyte antigen DR
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRF	Interferon-regulatory factor
JAK	Januskinase
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	lipoteichoic acid
MACS	magnetic-activated cell sorting
MDSCs	myeloid derived suppressor cells
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
MyD	myeloid differentiation primary response gene

NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PI	Propidiumiodid
PMNs	polymorphonuclear neutrophils / leukocytes
PRR	pattern recognition receptor
PSM	Phenol-soluble Modulin
PVL	Panton-Valentine Leukozidin
ROS	reactive oxygen species
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SSC	side scatter channel
STAT	signal transducers and activators of transcription
TGF	transforming growth factor
TIR	Toll-IL-1 receptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TSST1	toxic shock syndrom toxin 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
WTA	wall teichoic acid
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Myeloid derived suppressor cells (MDSCs)

MDSCs sind Zellen myeloischen Ursprungs, die erstmals im Zusammenhang mit Lungen-Karzinomen beschrieben wurden¹.

Sie stellen eine heterogene Zellpopulation aus myeloischen Vorläuferzellen sowie unreifen und reifen, aktivierten myeloischen Zellen dar². Ihnen gemeinsam ist die Funktion, in aktiviertem Zustand T-Zell-Antworten unterdrücken zu können². Zudem können sie die Zytokin-Produktion von Makrophagen modulieren³. MDSCs beeinflussen dadurch sowohl Antworten des angeborenen, wie auch des adaptiven Immunsystems.

Im Vergleich zu Gesunden besitzen Tumorpatienten eine deutlich vergrößerte MDSC-Population^{4,5}. Später wurde das Vorkommen von MDSCs auch bei weiteren Krankheitsbildern erkannt, wie zum Beispiel bei Entzündungen, Autoimmunerkrankungen oder polymikrobieller Sepsis⁶⁻⁸.

1.1.1 Charakterisierung der MDSCs

MDSCs lassen sich in erster Linie anhand ihrer immunsuppressiven Funktion charakterisieren. Bezüglich ihrer Morphologie und ihres Immunphänotyps sind bislang fast keine spezifischen Merkmale bekannt; sie gehören allerdings zu der „low-density“-Fraktion nach Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll.

Mikroskopisch ähneln sie Granulozyten oder Monozyten. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass MDSCs so in zwei Untergruppen aufgeteilt werden können und diese sich auch in ihrer Funktionalität unterscheiden^{9,10}.

Aufgrund der Heterogenität der MDSCs wird für eine Charakterisierung auf eine Kombination aus verschiedenen Oberflächenmarkern zurückgegriffen.

Beim Menschen werden MDSCs zumeist als CD33⁺, CD11b⁺ und CD14⁻ beschrieben^{4,5}. Jedoch werden auch bestimmte CD14⁺-Zellen aufgrund ihrer Funktion als MDSCs klassifiziert¹¹.

Im Gegensatz zu den ausdifferenzierten myeloischen oder lymphatischen Zellen fehlen manchen MDSCs deren spezifische Oberflächenmarker. Zudem ist der Rezeptor HLA-DR, ein MHC-Klasse II-Molekül, bei bestimmten MDSC-Populationen ebenfalls nicht oder nur schwach exprimiert⁵.

1.1.2 Aktivierung und Funktion der MDSCs

Es gibt viele verschiedene Faktoren, die eine Vermehrung der MDSCs hervorrufen können. Hierzu zählen unter anderem GM-CSF, Prostaglandine, IL-6 und VEGF¹²⁻¹⁴. Die meisten dieser Faktoren führen zu einer Aktivierung von JAK und STAT3; über diese Moleküle wird das Überleben, die Teilung und Differenzierung der Zellen gesteuert¹⁵.

Vermehrte Aktivierung von STAT3 verhindert die Differenzierung der unreifen myeloischen Zellen, wodurch sich die MDSC-Population vergrößert. Wird die Expression von STAT3 gehemmt, können keine MDSCs mehr induziert werden¹⁶.

Nach Aktivierung von STAT3 werden auch die Proteine S100A8 und S100A9 vermehrt gebildet, die auf der Zelloberfläche von MDSCs lokalisiert sind; sie fördern die Induktion von MDSCs^{17,18}. Da diese Calcium-bindenden Proteine eine wichtige Rolle bei Entzündungen spielen¹⁷, stellen sie eine Verbindung zwischen der Induktion von MDSCs und Entzündungsprozessen dar.

Neben Faktoren, die eine Differenzierung zu MDSCs begünstigen, gibt es auch Faktoren, die zu einer Aktivierung dieser Zellen führen.

Diese werden vor allem von Tumorgewebezellen und T-Zellen produziert.

Nach Aktivierung werden verschiedene immunsuppressiv wirkende Signalwege über Arginase-1, iNOS, Stickstoffmonoxid und ROS eingeleitet^{9,19-21}.

Zytokine wie TGF β , GM-CSF, IL-6 und IL-10, die unter anderem von Tumorzellen ausgeschüttet werden, können die Produktion von ROS induzieren²².

Darüber hinaus bilden Tumorgewebezellen und T-Zellen IL-4 und IL-13, die zu der Expression von Arginase 1 und iNOS führen^{19,23}. Diese beiden Enzyme werden auch nach Aktivierung durch IFN γ und IL-1 β gebildet²⁴. IFN γ nimmt bei der MDSC-vermittelten T-Zell-Suppression eine wichtige Rolle ein^{10,25}.

Im Mausmodell ist bekannt, dass LPS, ein bakterielles Pathogen-Bestandteil, MDSCs über den Toll-like Rezeptor 4 aktivieren kann⁸.

Man weiß auch, dass bei Infektionen mit bestimmten Pathogenen vermehrt MDSCs auftreten. Dies ist in der Maus beispielsweise für *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* oder auch *Trypanosoma cruzi* bereits beschrieben^{2,26,27}.

Sowohl Arginase 1 als auch iNOS verwenden L-Arginin als Substrat. Diese Aminosäure wird bei vermehrter Enzymaktivität so sehr verstoffwechselt, dass sie in der Umgebung der MDSCs fehlt. Da L-Arginin jedoch für die Proliferation von T-Zellen notwendig ist, können sie sich nun an dieser Stelle nicht mehr teilen^{4,28}.

Stickstoffmonoxid ist über verschiedene Mechanismen in der Lage, die Funktion von T-Zellen zu unterdrücken und Apoptose von T-Zellen zu induzieren²⁹⁻³¹. Durch Reaktion von Stickstoffmonoxid mit ROS entstehen Peroxynitrite. Sie induzieren die Nitrierung des T-Zell-Rezeptors und von CD8-Molekülen, wodurch Antigen-spezifische sowie Antigen-unspezifische Stimulation verhindert wird³².

Neben diesen direkten immunsuppressiven Mechanismen können MDSCs auch regulatorische T-Zellen induzieren^{33,34}. Diese wirken immunsuppressiv, indem sie die Zell-vermittelte Immunantwort herunter regulieren. So kann zum Beispiel eine Toleranz für Tumor-Antigene entstehen. Für die Induktion der regulatorischen T-Zellen ist die Produktion von Arginase durch die MDSCs notwendig. Sobald der Funktionsmechanismus der MDSCs gehemmt wird, bleibt auch die Proliferation der regulatorischen T-Zellen aus³⁵.

1.1.3 MDSCs als therapeutisches Target

Durch die Fortschritte im Verständnis der Funktion und Mechanismen der MDSCs haben sich erste Möglichkeiten für therapeutische Anwendungen ergeben. Unter pathologischen Bedingungen kann sowohl die Verhinderung der Immunsuppression zum therapeutischen Ziel werden, wie auch eine Stimulation der MDSC-Aktivität bei überschießenden Immunreaktionen. Aus der Tumorforschung gibt es bereits mehrere Methoden, um die Funktion der MDSCs zu unterdrücken.

Vitamin A-Metabolite können die Differenzierung der myeloischen Progenitorzellen fördern und so ein Auftreten der MDSCs einschränken^{36,37}.

Die Hemmung der MDSC-Funktion kann durch Blockierung der Cyclooxygenase 2 erreicht werden; dadurch wird die Expression von Arginase 1 vermindert und die immunsuppressive Aktivität der MDSCs gesenkt^{38,39}.

Durch Chemotherapeutika wie Gemcitabin können MDSCs eliminiert werden, was eine deutlich verbesserte Immunantwort nach sich zieht^{40,41}.

Sunitinib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor und hemmt eine Reihe verschiedener Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Dadurch wird insbesondere die Angiogenese unterdrückt, weshalb es auch in der Tumor-Therapie eingesetzt wird⁴².

Es konnte gezeigt werden, dass Sunitinib darüber hinaus auch auf die MDSC-Population Einfluss nimmt. Durch Einsatz von Sunitinib wird sowohl die Anzahl an MDSCs, wie auch an regulatorischen T-Zellen verringert⁴³. Somit wirkt Sunitinib direkt auf den Tumor und schränkt dessen Blutversorgung ein, wie auch indirekt durch eine Verbesserung der Immunreaktion gegen den Tumor.

1.2 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören zu den so genannten Pattern recognition receptors (PRR); diese sind in der Lage verschiedene Pathogene zu erkennen und eine entsprechende Immunantwort einzuleiten. Die erkannten Pathogen-Muster werden als Pathogen associated molecular pattern (PAMP) bezeichnet⁴⁴; dies können für die Pathogene typische Zellwand-Bestandteile, Zuckermoleküle oder auch Nukleinsäuren sein⁴⁵.

TLR gehören zu den Typ I-Transmembranproteinen, bei denen das N-terminale Ende extrazellulär liegt. Hier liegen typische Leucin-reiche Sequenzen, welche die Erkennung der PAMP vermitteln. Trotz dieser konservierten Abschnitte können die verschiedenen TLR jedoch Liganden unterschiedlicher Struktur erkennen⁴⁶.

Die TLR und die IL-1-Rezeptoren besitzen eine intrazellulär liegende, identische Domäne (TIR), weshalb sie auch in einer Rezeptorfamilie zusammengefasst werden⁴⁷. Diese Domäne mit etwa 200 Aminosäuren ist überaus wichtig für die Signalweiterleitung⁴⁸.

1.2.1 Vorkommen der TLR

TLR sind weit verbreitet für die Erkennung von Pathogenen. Sie kommen nicht nur bei Tieren vor; molekulare Abschnitte der TLR können auch bei Bakterien und in Pflanzen wiedergefunden werden.

Beim Menschen sind 10 TLR bekannt. Bei Mäusen existieren darüber hinaus noch TLR 11-13, die beim Menschen kein Äquivalent besitzen⁴⁵.

TLR befinden sich nicht nur auf vielen Zellen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr, sondern auch auf Zellen des Epi- und Endothels, sowie des Nervensystems⁴⁹⁻⁵². Gehäuft kommen sie jedoch auf Antigen-präsentierenden Zellen, wie Dendritischen Zellen und Makrophagen vor. Interessanterweise werden TLR auch von regulatorischen T-Zellen exprimiert, die Immunantworten unterdrücken können⁵³.

Als membrangebundene Rezeptoren finden sie sich sowohl auf der Zelloberfläche, als auch auf intrazellulären Membranen von Endosomen, Lysosomen und des Endoplasmatischen Retikulums⁴⁵. TLR 1, TLR 2, TLR 4, TLR 5, TLR 6 und TLR 10 sind dabei auf der Zelloberfläche exprimiert und erkennen hauptsächlich bakterielle Peptide und Lipide⁵⁴. Dagegen befinden sich TLR 3, TLR 7, TLR 8 und TLR 9 auf intrazellulären Vesikeln und dienen der Erkennung von mikrobiellen Nukleinsäuren⁵⁵⁻⁵⁷; daher können hier in erster Linie virale Pathogene erkannt werden.

1.2.2 Aktivierung der TLR

Während die meisten TLR Homodimere bilden, liegt TLR 2 als Heterodimer mit TLR 1 oder TLR 6 vor. Je nach Bindungspartner sind hier auch die Liganden unterschiedlich. Das TLR 2-TLR 1-Heterodimer ist in der Lage, dreifach acylierte Lipopeptide zu erkennen. Da TLR 6 im Gegensatz zu TLR 1 keine hydrophobe Region besitzt, können an das TLR 2-TLR 6-Heterodimer nur zweifach acylierte Lipopeptide binden^{58,59}. Dies bedeutet, dass Lipopeptide von gramnegativen Bakterien über TLR 2-TLR 1 erkannt werden; Lipopeptide von grampositiven Bakterien binden dagegen an TLR 2-TLR 6.

TLR 10 kann sowohl Homodimere, als auch Heterodimere mit TLR 1 und TLR 2 bilden; ein spezifischer Ligand ist jedoch noch nicht bekannt⁶⁰.

Zusätzlich zu der Reaktion auf PAMPs können TLR auch durch endogene Liganden aktiviert werden. Dies sind zumeist Moleküle, die durch Schädigung von Gewebe oder Zelltod freigesetzt werden, wie Hitzeschock-Proteine oder degradierte Bestandteile der extrazellulären Matrix^{54,61}.

Nach Bindung des jeweiligen Liganden an den TLR werden Moleküle aktiviert, die an die TIR-Domäne angelagert sind.

In Folge unterscheidet man einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen Signalweg.

MyD88 ist ein Adaptermolekül der TIR-Domäne, das bei allen TLR in die Signaltransduktion eingebunden ist. Über eine Vielzahl von verschiedenen Kinasen werden sowohl Transkriptionsfaktoren der NFκB-Familie, als auch MAP-Kinasen aktiviert. In Folge werden viele inflammatorische Zytokine ausgeschüttet, sowie die Expression weiterer Gene induziert⁵⁴.

TLR 4 nutzt zusätzlich auch den MyD88-unabhängigen Signalweg; TLR 3 nutzt diese Signaltransduktion fast ausschließlich.

Dabei wird IFN-regulatory factor 3 (IRF 3) aktiviert, der als Transkriptionsfaktor die Expression von Typ I-Interferonen fördert⁵⁴. Dies sind Interferone, die an den IFN-Rezeptor α binden können⁶². Neben der Wirkung auf andere Zellen führen diese Interferone auch zu der Transkription von IFN-induzierbaren Genen. Darüber hinaus werden hier ebenfalls NFκB-Proteine aktiviert.

Über beide Signalwege werden also inflammatorische Reaktionen ausgelöst und eine Immunantwort eingeleitet.

1.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist ein grampositives Kugelbakterium, das zu den häufigsten pathogenen Bakterien zählt. Bei Wundinfektionen ist es der am Häufigsten anzutreffende Erreger⁶³.

1.3.1 Verbreitung und Resistenzen

S. aureus besiedelt vor allem die Haut und Schleimhaut; insbesondere in der Schleimhaut des vorderen Nasenabschnitts ist der Keim anzutreffen. 20% der Bevölkerung weisen in nasalen Abstrichen eine chronische Besiedlung mit *S. aureus* auf, 30% eine intermittierende Kolonisation⁶⁴.

Besonders verbreitet ist er bei Krankenhauspatienten und Mitarbeitern des Gesundheitswesens (bis 80%), da *S. aureus* vor allem als Schmierinfektion übertragen wird und sich in diesen Einrichtungen gut verbreiten kann⁶⁵. Eine nasale Besiedlung bedeutet ein erhöhtes Infektionsrisiko⁶⁶.

S. aureus weist heute in großem Maße Resistenzen gegen Antibiotika auf. Über 80% der Stämme sind Penicillin-resistent⁶⁷. 1963 ist erstmals eine Methicillin-Resistenz beschrieben worden⁶⁸. In den letzten Jahrzehnten haben die Infektionen mit Methicillin-resistentem *S. aureus* (*MRSA*) stark zugenommen. Unter anderem stellen Dialyse, Gefäßprothesen, höheres Alter und chirurgische Eingriffe Risikofaktoren dafür dar^{69,70}. *MRSA* weist im Vergleich zu Methicillinsensitivem *S. aureus* (*MSSA*) eine erhöhte Virulenz auf; bei Kolonisation mit *MRSA* besteht ein vierfach erhöhtes Infektionsrisiko⁷¹.

Bei *MRSA* differenziert man den so genannten community-acquired *MRSA* (*ca-MRSA*) von hospital-acquired *MRSA* (*ha-MRSA*). Beide Untergruppen unterscheiden sich sowohl in mikrobiologischen Aspekten, wie auch im klinischen Verlauf und im Durchschnittsalter der Infizierten. Besonders junge Patienten sind häufig von *ca-MRSA* infiziert und weisen vermehrt Haut- und Weichteilinfektionen auf⁷².

Mittlerweile sind bei einigen *S. aureus*-Stämmen auch Vancomycin-Resistenzen bekannt, was die Therapie erheblich erschwert⁷³.

1.3.2 Pathogenitätsmerkmale von *S. aureus*

S. aureus ist fakultativ anaerob und kommt als unbeweglicher Keim in traubenförmigen Ansammlungen vor⁶⁵. Staphylokokken besitzen eine dicke Peptidoglykanschicht, an welche Teichonsäuren und Polysaccharide gebunden sind⁶⁷. Zu den Teichonsäuren an der Zellwand und Zellmembran gehören die Wall teichoic acid (WTA) sowie die Lipoteichoic acid (LTA). Diese wirken auch als pathogene Bestandteile und sind als TLR 2-Ligand bekannt⁷⁴. Eine Kapsel schützt einige der Bakterienstämme vor Phagozytose⁷⁵.

S. aureus zählt zu den Koagulase-positiven Staphylokokken; dieses Enzym bildet mit Prothrombin einen proteolytischen Komplex, der Fibrinogen zu Fibrin umwandelt. Dadurch sind durch *S. aureus* verursachte Läsionen, wie Abszesse, häufig von einer Fibrinkapsel umgeben⁶⁷.

Ein so genannter Clumping Factor vermittelt die Adhärenz an das Gewebe oder Fremdkörper wie Katheter oder Gefäßprothesen⁶⁵.

Das von dem Erreger produzierte Protein A kann an die Fc-Region von IgG binden und dadurch die Opsonierung durch Antikörper verhindern; dies erschwert die Phagozytose von *S. aureus* durch das Immunsystem^{65,76}.

Das α -Toxin von *S. aureus* perforiert Zellmembranen und hat so einen hämolytischen Effekt. Es kommt zusätzlich zu Schäden im ZNS und zu Nekrosen der Haut. Auch Exfoliatine und Enterotoxine haben eine toxische Wirkung.

Zu den Toxinen zählen auch die Phenol-soluble Modulins (PSM). Diese Gruppe von Proteinen ist in Phenol löslich und wird von *MRSA*-Stämmen ausgeschüttet. Sie gelten als wichtiger Virulenzfaktor und sind in der Lage, humane Neutrophile zu lysieren⁷⁷.

Ein Teil der *S. aureus*-Stämme produziert Pantone-Valentine Leukozidin; vor allem bei *ca-MRSA*-Stämme wie USA 300 ist dies der Fall⁷². Dieses ist ebenfalls ein porenbildendes Toxin, das die Virulenz des Erregers steigert. PVL-bildender *S. aureus* führt in erhöhtem Maße zu Pneumonien, sowie Haut- und Weichteil-Infektionen⁶⁷. Vor allem Kinder und junge Erwachsene sind davon betroffen und weisen eine erhöhte Letalität auf⁷⁸.

1.3.3 Klinische Zeichen einer *S. aureus* - Infektion

Klinische Zeichen einer *S. aureus*-Infektion sind zum Beispiel Pneumonie, Sinusitis, Otitis media, Haut- und Weichteilinfektionen, Sepsis oder Endokarditis⁷⁹. Auch eine Epidermolyse (Staphylococcal-Scalded-Skin-Syndrom) oder das toxische Schock-Syndrom können bei fulminanter Infektion auftreten.

Das Scalded-Skin-Syndrom tritt vor allem bei Kindern auf. Hierbei lösen sich die oberen Epidermis-Schichten von den unteren Hautschichten ab, was zu einem verbrennungsähnlichen Erscheinungsbild führt. Bei Kindern ist die Mortalität bei adäquater Behandlung allerdings gering⁸⁰.

Das Toxic shock-Syndrom wird durch ein spezifisches Toxin vermittelt, das über eine T-Zell-Expansion die Zytokin-Produktion sehr stark erhöht, wodurch es zum Schock kommt⁸⁰. Auch hier kann eine Ablösung der Haut auftreten.

Unbehandelt beträgt die Mortalität etwa 70%; diese lässt sich jedoch durch Behandlung auf nur 1-3% reduzieren⁸¹.

Gerade bei einer systemischen Ausbreitung wird eine Infektion mit *S. aureus* sehr gefährlich. Etwa 30% der Patienten mit dieser Diagnose versterben im Verlauf⁸¹. Insbesondere sehr alte, wie auch sehr junge Patienten sind davon betroffen. Auch Personen mit bereits geschwächtem Immunsystem, wie chronische Kranke oder HIV-infizierte Patienten haben hierfür ein erhöhtes Risiko.

Abhängig von *S. aureus*-Stamm, Allgemeinzustand des Patienten und Verlauf der Infektion kann also eine hohe Letalität eintreten.

1.4 Ziel der Dissertation

Die Erforschung der humanen MDSCs im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten hat zuletzt stark an Bedeutung gewonnen. Vieles ist im Verständnis humaner MDSCs noch ungeklärt. Zugleich stellen Infektionskrankheiten weltweit eine der größten medizinischen Herausforderungen dar. MDSCs eröffnen dabei mit ihrem Einfluss auf das Immunsystem die Aussicht auf neue Therapieansätze.

Infektionen mit *S. aureus* spielen im medizinischen Alltag eine wichtige Rolle. Insbesondere die Antibiotika-resistenten Erreger, wie *MRSA*, weisen eine gesteigerte Virulenz auf und stellen so vor allem für Patienten mit bereits geschwächter Immunabwehr eine bedeutende Gefahr dar. Daher wollte ich untersuchen, inwiefern MDSCs auch bei *S. aureus*-Infektionen präsent sind und das Krankheitsgeschehen dadurch beeinflussen.

Pathogene werden maßgeblich über Toll-like Rezeptoren erkannt. Auch viele der Virulenzfaktoren von *MRSA* sind als TLR-Liganden bekannt. Erste Studien im Mausmodell haben darauf hingewiesen, dass MDSCs auch über die Aktivierung der TLR induziert werden können. Daher sollte zunächst geprüft werden, ob MDSCs durch Stimulation der humanen TLR 1-9 hervorgerufen werden kann.

Anschließend sollten Versuche mit Pathogen-Bestandteilen von *S. aureus* in vitro durchgeführt werden. Die Fragestellung hierbei war, ob sich MDSCs als Reaktion auf diese Exposition induzieren lassen. Daraus ließe sich dann ableiten, ob das Entzündungsgeschehen durch die MDSCs mit ihrer immunsuppressiven Aktivität beeinflusst werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Hera safe (Bench)	Heraeus
Varifuge 3.2-RS	Heraeus
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Rotixa 50 RS (Zentrifuge)	Hettich
Centrifuge 5414C	Eppendorf
Hera Cell (Brutschrank)	Heraeus
Vortex Mixer 7-2020	Neolab
Reax top (Vortex Mixer)	Heidolph
Wasserbad	Memmert
Kühlschrank-Gefrier-Kombination	Liebherr
Kühlschrank	Liebherr
Gefrierschrank -20°C	Kirsch
Gefrierschrank -86°C	Forma Scientific
Mikroskop IX 50	Olympus
Neubauerkammer	Assistent
FACS Calibur	BD
Pipetten	Gilson
Pipetten	Eppendorf
Zellzählgerät	ABX
Thermomixer 4536	Eppendorf
AutoMACS ProSeparator	Miltenyi Biotech
MACS Separator	Miltenyi Biotech

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Safety-Multifly-Set (Blutentnahme)	Sarstedt
Membran-Adapter für S-Monovette	Sarstedt
Microlance 3	BD
Injekt 20 ml	Braun
Parafilm	Bemis
Costar 12-well-Platte	Corning
96-well-Platte U-Form	Greiner bio-one
Stripette	Corning
Pasteur-Pipetten 2,5ml	Ratiolab
Pipettenspitzen	Sarstedt
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotech
15/50 ml Falcons	Greiner bio-one
FACS-Röhrchen	BD
Eppendorf Cups 1,5ml	Eppendorf

2.1.3 Medien und Reagenzien

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm
Biocoll Separating Solution	Biochrom
Dulbecco's PBS	PAA
RPMI 1640 Medium	Biochrom
Detachin	Genlantis
Lysing Buffer	Universitätsapotheke
Trypanblau	
Proteinase K Solution	Ambion
Leukine sargramostim (GM-CSF)	Genzyme
Human TLR agonist kit	Invivogen

Zellkulturmedium:

- 88% RPMI
- 10% fetales Kälberserum (FCS)
- 1% Penicillin-Streptomycin
- 1% L-Glutamin

CFSE-Medium:

- 88% RPMI
- 10% humanes Serum des jeweiligen Spenders
- 1% Penicillin-Streptomycin
- 1% L-Glutamin

verwendete Konzentrationen:

- Proteinase K solution: 200 µg/ml
- Leukine (GM-CSF): 0,01 µg/ml
- Human TLR-Agonist kit:
 - o Pam3CSK4: 0,5 µg/ml
 - o HKLM: 6 Mio/ml
 - o Poly (I:C): 1 µg/ml
 - o Poly (I:C) HMW: 1 µg/ml
 - o LPS-EK: 1 µg/ml
 - o Flagellin-ST: 0,1 µg/ml
 - o FSL1: 0,1 µg/ml
 - o Imiquimod: 1 µg/ml
 - o ssRNA40: 1 µg/ml
 - o ODN2006: 5 µg/ml

2.1.4 FACS-Antikörper und MACS-Beads

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
CD33-PE	Miltenyi Biotech
CD33-APC	BD
CD14-FITC	BD
Anti-HLA-DR-PerCP	BD
CXCR4-APC	eBioscience
Propidiumiodid Staining Solution	BD
CD-PE	BD
CD8-APC	BD
Rabbit Serum	
MACS CD33-Beads human	Miltenyi Biotech

2.1.5 Bakterien-Kulturüberstände / Pathogen-Bestandteile

MRSA-Überstände:

Es wurden Kulturüberstände des *MRSA*-Stammes USA 300 verwendet. Dies ist ein community-acquired *MRSA*-Stamm. Von diesem Stamm wurde auch eine Mutante verwendet, bei welcher der accessory gene regulator ausgeschaltet war. Das Medium der Überstände war IMDM.

MSSA-Überstände:

Es wurden Kulturüberstände des *MSSA*-Stammes RN 6390 verwendet. Das Medium des Überstandes war IMDM.

PSM:

Es wurden α -PSM des *MRSA*-Stammes USA 300 isoliert. Diese wurden bei den Zellkultur-Ansätzen in den Konzentrationen 0,1 μ M und 1 μ M verwendet.

Die Bakterien-Kulturüberstände und das aufgereinigte PSM wurde mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Peschel des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Tübingen) überlassen. Eine Auftrennung des Bakterien-Kulturüberstandes erfolgte dank der Unterstützung von PD Dr. Wolfgang Bernhard (Abt. Neonatologie, Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen).

WTA:

Die aufgereinigten WTA stammten von dem *S. aureus*-Laborstamm Sa113. Bei den Zellkultur-Ansätzen wurden sie in der Konzentration 20 μ g/ml eingesetzt.

Die WTA wurden mir freundlicherweise von Dr. Christopher Weidenmaier des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Tübingen) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von PBMCs und PMNs

Für alle Versuche erfolgte die Isolation der benötigten Zellen aus dem Blut gesunder Probanden. Dafür wurde diesen entweder direkt heparinisiertes Vollblut abgenommen oder aus einer Vollblutspende der sog. „buffy coat“ gewonnen.

Dieser fällt als Trennschicht bei der Auftrennung der Vollblutspende in Erythrozytenkonzentrat und Plasma an und enthält Leukozyten, sowie Thrombozyten⁸². Die Herstellung der „buffy coats“ erfolgte unter sterilen Bedingungen in dem zentralen Labor der DRK-Blutspende in Ulm. Dabei betrug die Zeitspanne zwischen Blutspende und Weiterverwendung der Zellen maximal 24 Stunden.

Das heparinisierte Vollblut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt; bei Verwendung von „buffy coats“ erfolgte dies aufgrund der höheren Konzentration an Zellen im Verhältnis 1:2 mit PBS.

Anschließend wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Bei dieser wird eine Trennlösung (Ficoll) verwendet, auf welche die verdünnte Blutprobe aufgeschichtet wird. Dann wird eine Zentrifugation bei 400g für 30 Minuten mit geringster Beschleunigung und ausgeschalteter Bremse durchgeführt. So erreicht man eine besonders schonende und saubere Trennung der Blutproben.

Durch die Zentrifugation erhält man verschiedene dichtespezifische Phasen⁸³. Das Plasma sammelt sich oberhalb der Trennlösung, da die Dichte des Plasmas geringer als die der Trennlösung ist. Die PBMCs haben ebenfalls eine geringere Dichte als der Ficoll, sind jedoch schwerer als das Plasma. Sie bilden eine ringförmige Ansammlung an der Grenze zwischen Plasma und Trennlösung⁸³. Blutzellen wie Granulozyten oder Erythrozyten, die eine höhere Dichte als der Ficoll besitzen, setzen sich am Boden des Falcons ab⁸⁴.

Isolation von PBMCs

Zur Gewinnung von PBMCs wurde nach der Dichtegradientenzentrifugation zunächst das Plasma abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die PBMCs, die sich ringförmig der Trennlösung aufgelagert hatten, für die Aufreinigung in ein weiteres Falcon überführt und mit RPMI-Medium zwei Mal gewaschen⁸⁵. Dabei erfolgte die Zentrifugation bei 400g für 10 Minuten. Im Anschluss daran wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen je nach Versuch entsprechend weiterverwendet.

Isolation von PMNs

Um PMNs zu erhalten wurde darüber hinaus noch die Trennlösung abpipettiert; die abzentrifugierten Erythrozyten und Granulozyten wurden nun mit PBS gewaschen (400g, 10 Minuten). Da viele Versuche durch das Hämoglobin der Erythrozyten beeinflusst werden können, wurde anschließend eine Erythrozytenlyse mit Lyse-Puffer durchgeführt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C wurde die Suspension zentrifugiert (400g, 10 Minuten, 4°C). Nach Abnehmen des Überstands und Resuspension in RPMI-Medium wurde die Zellzahl der PMNs bestimmt und die Zellen weiterverwendet.

2.2.2 Kultivierung der Zellen

Für einen Ansatz der PBMCs in einer Zellkultur wurden die isolierten Zellen im Zellkulturmedium auf eine Konzentration von 500.000 Zellen pro ml eingestellt. Das Medium bestand aus RPMI-Medium und 10% fetalem Kälberserum (FCS)⁸⁶, zu dem 1% Penicillin-Streptomycin (PIS) und 1% L-Glutamin (L-GLU) gegeben wurde. Die so eingestellten Zellen wurden in Zellkulturplatten, sowie in Zellkulturflaschen angesetzt und im Brutschrank für 6 Tage inkubiert (37°C, 5% CO₂). Nach 3 bzw. 4 Tagen erfolgte ein Wechsel des Mediums. Hierfür wurde der Überstand der Zellsuspension nach Zentrifugation abgenommen und die entsprechende Menge neues Zellkulturmedium hinzugegeben.

Auch die jeweils verwendeten Stimulantien/Inhibitoren wurden neu hinzugegeben, sofern es sich nicht um solide Pathogenbestandteile handelte, die sich nach der Zentrifugation noch im Ansatz befanden.

2.2.3 Durchflusszytometrie nach Kultur

Nach 6 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellkulturansätze in FACS-Röhrchen überführt; eventuell vorliegende adhärente Zellen wurden mit Detachin abgelöst. Im Anschluss an eine Zentrifugation (300g, 10 Minuten) wurden die Zellen in 1ml PBS aufgenommen und die Zahl der lebenden Zellen mithilfe von Trypanblau und einer Neubauerkammer bestimmt.

Nun wurde die benötigte Anzahl an Zellen ausgerechnet und entnommen, wobei 200.000 Zellen pro Färbung eingesetzt wurden. Sofern weniger Zellen vorhanden waren, wurden alle vorhandenen Zellen des Ansatzes eingesetzt. Nach einem Waschgang mit PBS (300g, 10 Minuten) wurden die Zellen resuspendiert und das Volumen gleichmäßig zwischen den FACS-Röhrchen für den jeweiligen Ansatz verteilt. Nun wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper zugegeben.

Für die Färbung der MDSCs verwendete ich zumeist CD14-FITC, CD33-PE, CXCR4-APC und Anti-HLA-DR-PerCP. Je nach Versuchsziel kamen auch weitere Antikörper zum Einsatz (siehe verwendete Materialien). Nach 10 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Die so gefärbten Zellen wurden nun in der Durchflusszytometrie analysiert.

Mithilfe dieser können Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle charakterisiert und quantifiziert werden. Zunächst werden die Zellen von dem Durchflusszytometer aus dem FACS-Röhrchen aufgenommen und verdünnt. Dies geschieht durch einen so genannten Hüllstrom, der die aufgesaugte Probe mit einer höheren Geschwindigkeit umfließt. Dadurch lassen sich die Zellen hintereinander aufreihen, um einzeln analysiert werden zu können.

Als Erstes werden die Zellen von einem Laser bestrahlt und das abgestrahlte Licht gemessen; Licht, das nach vorne gestreut wird, bezeichnet man als „forward scatter“ (FSC) und dient als Maß für die Zellgröße. Zur Seite abgestrahltes Licht wird als „side scatter“ (SSC) bezeichnet; da dieses mit der Anzahl an Membranschichten in der Zelle variiert, ist der SSC ein Maß für die Anzahl an granulären Strukturen in der Zelle^{83,84,87}.

Um die Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle charakterisieren zu können, arbeitet das Durchflusszytometer mit Fluoreszenzlicht. Dafür werden die Zellen vor der Messung mit Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenstrukturen, wie zum Beispiel „cluster of differentiation“ (CD)-Moleküle, markiert. An diese Antikörper sind so genannte Fluorochrome gebunden. Dies sind Moleküle, die Fluoreszenzlicht bei Bestrahlung emittieren können. Wenn nun die markierten Zellen mit einem Laserstrahl bestrahlt werden, emittieren die Zellen Fluoreszenzlicht einer Frequenz, die für jedes Fluorochrom spezifisch ist. So kann das Fluoreszenzlicht dem jeweiligen Fluorochrom und dadurch dem Oberflächenmolekül zugeordnet werden^{87,88}. Die Intensität des Fluoreszenzlichtes erlaubt Rückschlüsse über die Anzahl an Oberflächenmolekülen, an die der Antikörper mit seinem Fluorochrom gebunden hat.

Dem Durchflusszytometer, an dem die Messungen durchgeführt wurden, standen 2 Laser mit insgesamt 4 Sensoren für Fluoreszenzlicht verschiedener Wellenlängen zur Verfügung. Dadurch konnten parallel 4 verschiedene Fluorochrome gekoppelt an unterschiedliche Antikörper verwendet werden.

Tabelle 1: Fluoreszenzkanäle des FACS-Calibur

Fluoreszenz-Sensor	Zugeordneter Laser	Absorptions-Maximum (nm)	Emissions-Maximum (nm)	Verwendete Fluorochrome
FL 1	Laser 1	488	530	FITC
FL 2	Laser 1	488	575	PE
FL 3	Laser 1	488	650	PerCP / PI
FL 4	Laser 2	635	670	APC

2.2.4 Magnetic activated cell sorting (MACS)

Um bestimmte Zellpopulationen voneinander zu trennen, lassen sich Oberflächenmoleküle als Unterscheidungsmerkmal verwenden. Hierfür werden Zellen mit einem Antikörper, der gegen ein bestimmtes Oberflächenmolekül gerichtet ist, gefärbt. An diesen Antikörper sind kleine Eisenpartikel gebunden. Werden nun die Zellen in eine Säule gegeben, in der ein Magnetfeld wirkt, werden die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, während nicht-markierte Zellen hindurch gespült werden. So erhält man getrennt Zellen, die das jeweilige Oberflächenmolekül besitzen, sowie Zellen, die es nicht tragen^{84,86}. Beide Zellgruppen können nun für weitere Versuche verwendet werden.

Bei einer Isolation von CD66b-positiven Zellen verwendete ich eine Kombination aus CD66b-FITC-Antikörper und Anti-FITC-Beads; hier wurde zunächst der Antikörper zugegeben und erst nach einem zusätzlichen Waschschrift die magnetischen Beads, die an den Antikörper binden konnten. Bei der CD33- und CD14-Isolation wurden die Zellen direkt mit CD33- bzw. CD14-Beads markiert; hier ist der Antikörper schon mit den magnetisch wirksamen Teilchen verknüpft.

Die Zellen wurden zunächst gewaschen (300g, 10 Minuten), bevor sie mit den Beads gefärbt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert wurden. Anschließend wurden sie mit MACS-Puffer erneut gewaschen (300g, 10 Minuten, 4°C), bevor die Zell-Separation stattfand.

Zumeist stand der AutoMACS zur Verfügung, in dem die Zellen automatisch über zwei hintereinander geschaltete Säulen laufen, sodass eine hohe Reinheit der Separation gewährleistet wird.

Alternativ wurde auch ein MACS Separator eingesetzt, bei dem die Zellsuspension von Hand auf eine Säule gegeben und mit PBS gespült wurde. Auch hier wurde die Selektion der Zellen über 2 Säulen durchgeführt.

2.2.5 CFSE-Proliferationsassay

Der CFSE-Proliferationsassay ist ein Verfahren, um die Zellteilung markierter Zellen darstellen zu können⁸⁹. Hierfür werden Zellen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff CFSE markiert, der sich in den Zellen anreichert. Bei jeder anschließenden Zellteilung wird die Menge des Farbstoffs in der entsprechenden Zelle halbiert. Bei einer Messung in der Durchflusszytometrie können nun je nach Anzahl der Zellteilungen unterschiedliche Niveaus an CFSE-Fluoreszenzintensität gemessen werden. Durch Zugabe von bestimmten Effektorzellen kann deren Wirkung auf die Zellteilung dargestellt werden. Für einen CFSE-Proliferationsassay wurden PBMCs als Zielzellen verwendet; die Menge der eingesetzten Reagenzien war in der Folge abhängig von der Anzahl an Zielzellen.

Zunächst wurde zu den Zellen nach einem Waschschrift das CFSE-Färbereagenz hinzugegeben und die Suspension im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von FCS die Färbung gestoppt und die Zellen gewaschen, um überschüssiges Färbereagenz zu entfernen. Nach Auszählen der Zellen wurde die Zellzahl auf eine Konzentration von 500.000 Zellen pro ml eingestellt und mit IL-2 und OKT-3 stimuliert. Die markierten Zellen wurden nun in Zellkulturplatten überführt und gegebenenfalls mit Effektorzellen oder Stimulantien/Inhibitoren vermischt. Nach einer Inkubation über 4 Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit PBS gewaschen (450g, 3 Minuten). Die Zellen wurden anschließend mit CD8-APC und CD4-PE gefärbt, sofern gezielt die Teilung von CD4- bzw. CD8-positiven Zellen überprüft werden sollte. Nach Inkubation für 10 Minuten im Dunkeln und einem weiteren Waschen (300g, 10 Minuten) wurde den Zellen 2 Minuten vor der Messung Propidiumiodid (PI) zugegeben; dieses Molekül kann bei toten Zellen die perforierte Membran durchdringen und sich in diesen Zellen einlagern⁸⁶. Bei lebendigen Zellen ist die Zellmembran jedoch noch intakt, sodass das Propidiumiodid diese Zellen nicht markieren kann. So lässt sich der Anteil an toten Zellen quantifizieren. Die Analyse der Zellen erfolgte im Anschluss an diese Färbung am Durchflusszytometer.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Durchflusszytometrie wurde mit dem Programm CellQuest Pro 4.0.1 (BD) durchgeführt.

Die Erstellung der Graphen sowie die statistische Auswertung erfolgte mit dem dem Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc).

Die in den Graphen angegebenen Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD).

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypisierung und Funktionsnachweis der MDSC-Population

Insgesamt wurden Versuche mit 38 Blutspenden von 12 verschiedenen gesunden Spendern durchgeführt; davon erhielten wir Blut von 2 Spendern bereits als buffy coat aufgereinigt.

Aus diesem peripheren Blut gesunder Spender wurden wie in 2.2.1 beschrieben die mononukleären Zellen (PBMCs) isoliert. Anschließend wurden sie in Zellkultur gegeben (vgl. 2.2.2). PBMCs in reinem Zellkulturmedium dienten zum Vergleich von Ansätzen, bei denen Stimulantien oder andere Substanzen zugegeben wurden. Bei 33 von 38 Versuchen konnte die Kontrolle zu einer Verbesserung der Genauigkeit doppelt angesetzt werden. Hier wurden gemessene Werte der beiden Kontrollen für die Charakterisierung der entstandenen Zellen gemittelt.

3.1.1 Charakterisierung der MDSCs in der Durchflusszytometrie

Nach 6 Tagen in Zellkultur wurden die Zellen abgelöst, gefärbt und in der Durchflusszytometrie gemessen. Diese Arbeitsschritte erfolgten wie in 2.2.4 beschrieben.

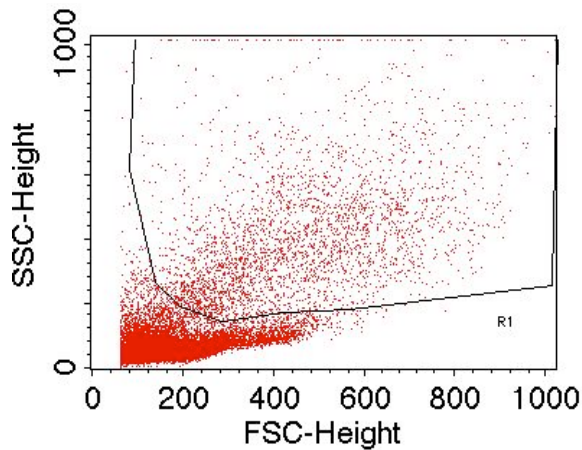


Abbildung 1: FSC-SSC Graph der Zellen eines Kontrollansatzes. Das Gate umfasst die Region, in der eventuell vorhandene MDSCs erwartet werden.

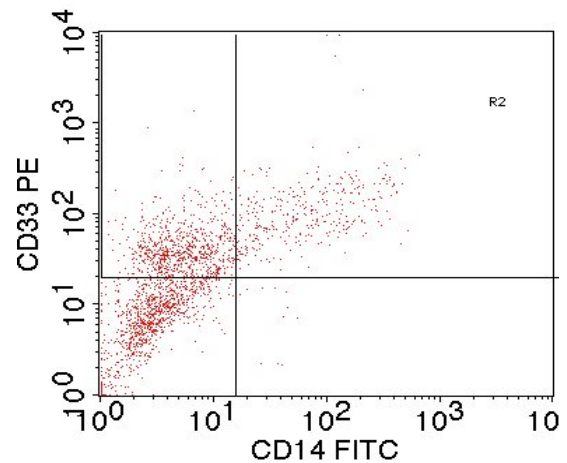


Abbildung 2: CD14-CD33 Graph einer Kontrolle. MDSCs als myeloische Zellen befinden sich im CD33+ Abschnitt.

Das im FSC-SSC-Graphen verwendete Gate schließt tote Zellen, die sich im linken unteren Eck ansammeln, sowie die Lymphozyten-Population aus. Auch normale Monozyten werden aufgrund ihres niedrigeren SSC-Werts nicht im Gate erfasst. Diese Gating-Strategie wurde auch in Folge bei sämtlichen Auswertungen angewendet.

Bei Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen CD14 und CD33 können die gemessenen Zellen eingeteilt werden. Da MDSCs myeloischer Abstammung sind, werden in einem zweiten Gating-Schritt nur CD33-positive Zellen berücksichtigt. Diese Zellpopulation wird auf die Expression weiterer Oberflächenmarker untersucht.

Bereits bei den Kontrollen ist eine kleine Population an CD33-positiven Zellen in der Durchflusszytometrie sichtbar; diese Population wird anhand ihres Anteils an der Gesamtzellzahl quantifiziert („% of total“).

Auffällig bei der Auswertung der Kontrollen ist, dass die erfassten CD33-positiven Zellen teilweise deutliche Unterschiede in der Expression von CD14 aufweisen:

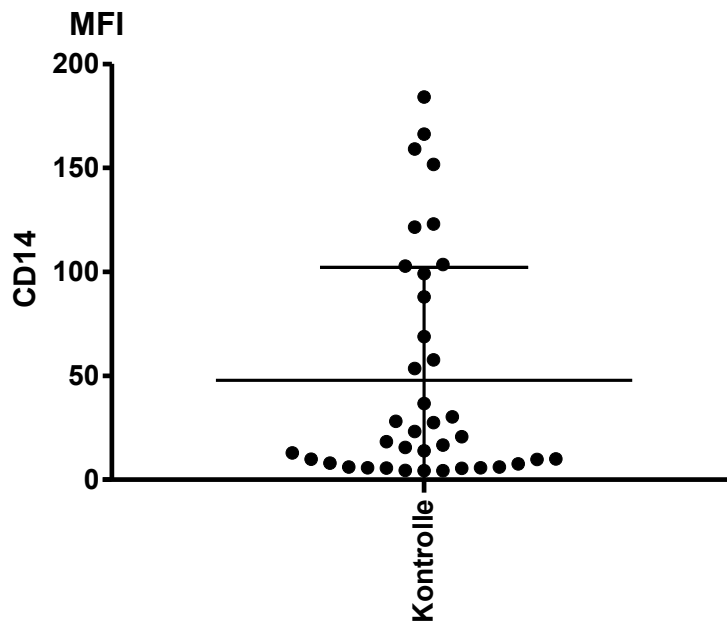


Abbildung 3: CD14-Expression der CD33-positiven Zellen der Kontrollen (n=38)

Während ein Großteil der Zellpopulationen CD14-negativ ist, ist bei anderen CD14 relativ stark exprimiert. In einigen Fällen gibt es bei einem Kontrollansatz auch zwei voneinander getrennte CD33-positive Populationen; die eine ist dabei CD14-positiv, während die andere kein CD14 exprimiert.

Dies ist auch bei Ansätzen mit Zellen desselben Spenders zu verschiedenen Zeitpunkten der Fall.

Die CD33-positiven Zellpopulationen werden mithilfe weiterer Oberflächenmarker charakterisiert:

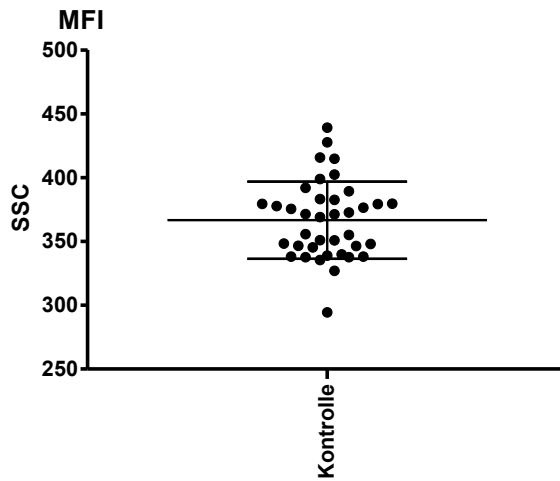


Abbildung 4: SSC-Werte der Kontrollen. Der SSC beschreibt die Granularität der Zellen (n=38)

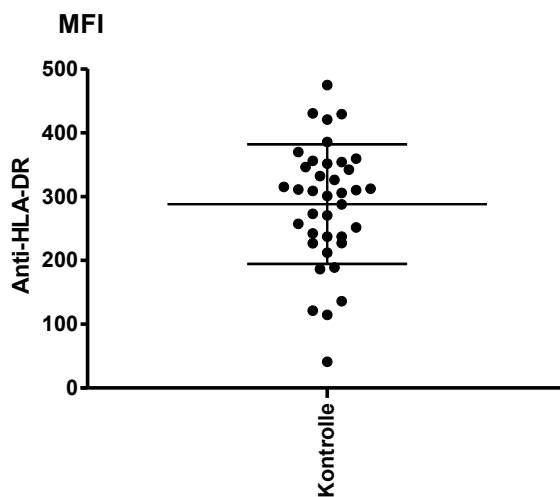


Abbildung 5: HLA-DR Expression der Kontrollen. Dieser Rezeptor wird in erster Linie von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert (n=38)

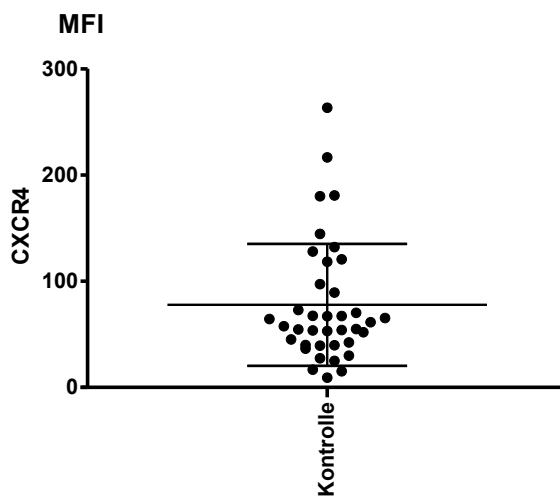


Abbildung 6: CXCR4-Expression der Kontrollen (n=38)

3.1.2 Nachweis der immunsuppressiven Funktion der MDSCs

MDSCs werden in erster Linie über ihre Funktion definiert. Eine spezifische Charakterisierung allein aufgrund von Oberflächenmarkern ist bisher nicht möglich. Daher wurden CFSE-Proliferationsassays mit den isolierten CD33-positiven Zellen von Kontrollen durchgeführt (vgl. 2.2.5).

CD4-positive Lymphozyten wurden zunächst über MACS (vgl. 2.2.4) isoliert und mit CFSE markiert, um ihre Proliferation verfolgen zu können. Diese Zellen dienen als Zielzellen.

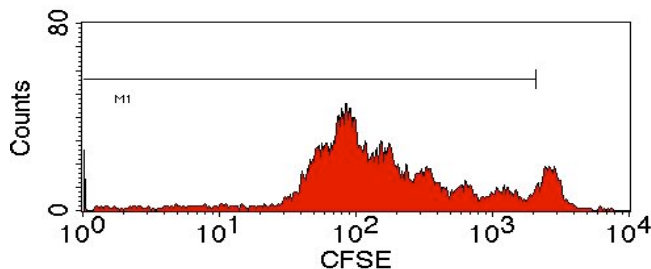


Abbildung 7: CFSE-Proliferationsanalyse von CD4-positiven Zielzellen als Kontrolle.

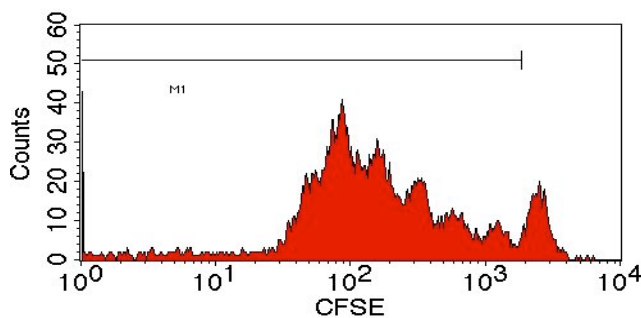


Abbildung 8: CFSE-Proliferationsanalyse von CD4-positiven Zielzellen. Zugabe von PMNs.

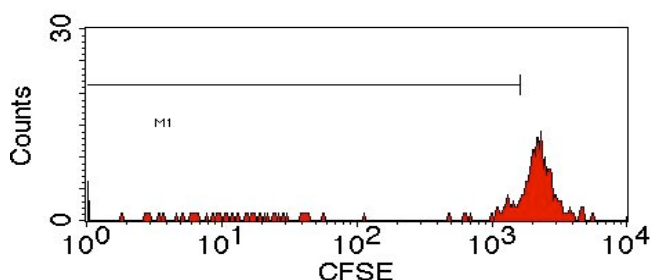


Abbildung 9: CFSE-Proliferationsanalyse von CD4-positiven Zielzellen. Zugabe von CD33-positiven Zellen, die nach Zellkultur isoliert wurden.

In Abbildung 7 zeigt sich, dass sich die CD4-positiven Zellen innerhalb von 4 Tagen regelrecht geteilt haben.

Isolierte PMNs exprimieren teilweise die gleichen Oberflächenmarker wie MDSCs. Bei Zugabe von PMNs zu den Zielzellen erfolgt keine Beeinflussung der Proliferation (s. Abbildung 8).

Separiert man per MACS jedoch die nach Zellkultur entstandenen CD33-positiven Zellen einer Kontrolle und gibt sie in den Proliferationsassay, kommt es zu einer Hemmung der Lymphozyten-Teilung (s. Abbildung 9).

Die Fähigkeit dieser Zellen, die Proliferation von CD4- und CD8-positiven Zellen zu hemmen, ist ein Beleg für ihre immunsuppressive Wirkung.

Die isolierten PBMCs unterscheiden sich in Abhängigkeit von ihrem Spender und seinem derzeitigen Immunität; daher ergibt sich bei den Kontrollen verschiedener Versuchsansätze in der MDSC-Population eine Varianz. Um diesen Effekt möglichst gering zu halten, werden die prozentualen Anteile der CD33-positiven Population immer in das Verhältnis zu der jeweiligen Kontrolle des Ansatzes gesetzt („ratio“).

3.2 Phänotypisierung der MDSC-Population nach GM-CSF-Stimulation

GM-CSF ist in der Literatur als Substanz beschrieben, welche die Bildung von MDSCs deutlich verstärken kann⁹⁰. Daher verwendete ich GM-CSF in meinen Experimenten als Positiv-Kontrolle. Der Vergleich zu den Kontrollen erfolgt immer durch Betrachtung der CD33-positiven Zellpopulation, wie schon von Lechner et al.⁹⁰ beschrieben. In den Experimenten zeigte sich, dass GM-CSF die Induktion der MDSC-Population zuverlässig steigert:

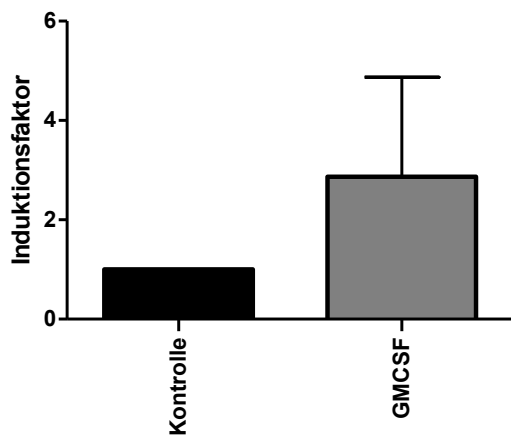


Abbildung 10: Vergleich des Anteils der CD33-positiven Zellen von Kontrolle und GM-CSF-stimulierten Zellen (n=25)

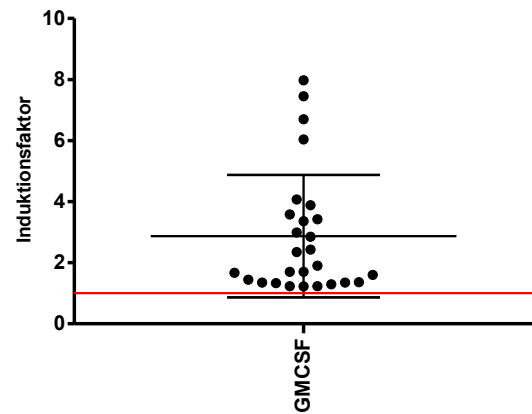


Abbildung 11: Anteil der CD33-positiven Zellen nach GM-CSF-Stimulation im Verhältnis zur jeweiligen Kontrolle (n=25)

Durch GM-CSF-Stimulation ergeben sich im Mittel MDSC-Populationen, die etwa 2-3 Mal so groß sind wie in der jeweiligen Kontrolle. In einigen Fällen war der Effekt des GM-CSF deutlich stärker.

Auch bei den hier entstandenen CD33-positiven Zellen wurde die immunsuppressive Funktionsfähigkeit in einem CFSE-Proliferationsassay nachgewiesen.

Im Vergleich zu den Kontrollen sieht man bei den GM-CSF-stimulierten Zellen ein etwas anderes Expressionsverhalten an Oberflächenmarkern.

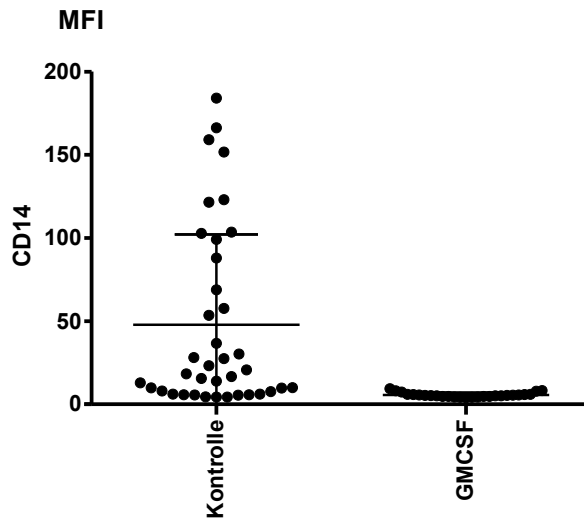


Abbildung 12: Vergleich der CD14-Expression zwischen Kontrollen und GM-CSF-stimulierten Zellen.

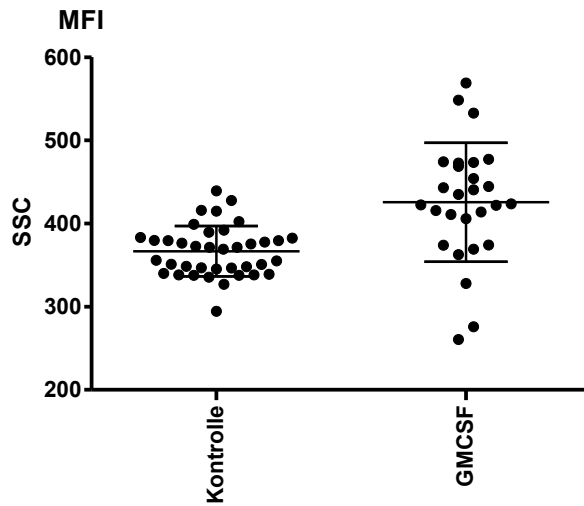


Abbildung 13: Vergleich des SSC-Wertes zwischen Kontrollen und GM-CSF-stimulierten Zellen.

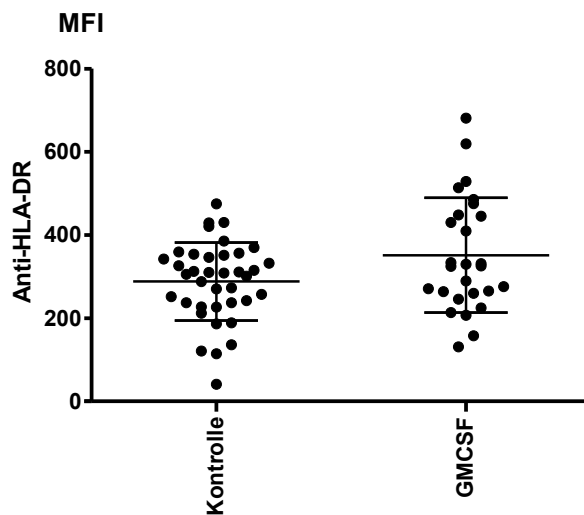


Abbildung 14: Vergleich der HLA-DR-Expression zwischen Kontrollen und GM-CSF stimulierten Zellen.

Während bei den Kontrollen in der CD14-Expression noch deutliche Unterschiede bestehen, sind diese bei Zugabe von GM-CSF in den Zellkulturansatz nicht mehr nachweisbar. Die Zellpopulationen sind nun ausschließlich CD14-negativ. Analog dazu ist der SSC-Wert gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Expression des MHC-Klasse II-Rezeptors ist bei den von GM-CSF induzierten MDSCs etwas stärker ausgeprägt als in den Kontrollen.

3.3 Beeinflussung der MDSC-Induktion durch TLR-Liganden

Toll-like Rezeptoren vermitteln die Erkennung von Pathogenen. Um herauszufinden, ob humane MDSCs über Aktivierung der TLR hervorgerufen werden können, wurden zu den PBMCs in Kultur verschiedene TLR-Liganden gegeben.

Während manche TLR für die Erkennung bakterieller Strukturen zuständig sind, binden andere intrazellulär gelegene TLR virale Pathogen-Bestandteile.

3.3.1 Beeinflussung durch bakterielle TLR-Liganden

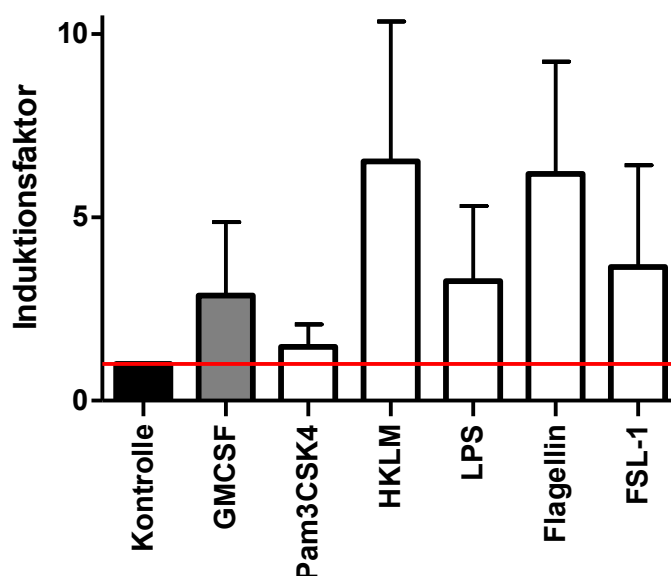


Abbildung 15: Vergleich des Anteils an CD33-positiven Zellen; GM-CSF dient als Positivkontrolle. Zugabe verschiedener bakterieller TLR-Liganden.

(n: Pam3CSK4 = 12, HKLM = 6, LPS = 7, Flagellin = 23, FSL-1 = 8)

Im Vergleich zu den Kontrollen sind alle bakteriellen TLR-Liganden in der Lage, eine größere MDSC-Population zu induzieren. Dies ist unabhängig davon, ob es sich um TLR handelt, die bevorzugt grampositive, gramnegative oder flagellierte Pathogene erkennen.

Auch ist die MDSC-Induktion bei TLR-Aktivierung sowohl über den MyD88-abhängigen, wie auch über den MyD88-unabhängigen Signalweg möglich.

3.3.2 Beeinflussung durch virale TLR-Liganden

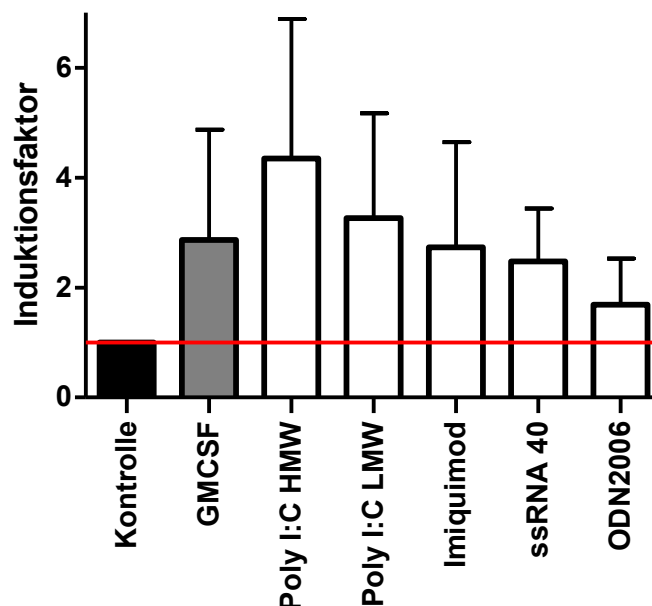


Abbildung 16: Vergleich des Anteils an CD33-positiven Zellen. Zugabe verschiedener viraler TLR-Liganden.

(n: Poly I:C HMW = 6, Poly I:C LMW = 7, Imiquimod = 9, ssRNA40 = 6, ODN2006 = 7)

Auch die Liganden der intrazellulär lokalisierten TLR können durchgehend vermehrt MDSCs hervorrufen.

Somit ist eine Induktion von MDSCs durch Aktivierung jedes der 9 humanen Toll-like Rezeptoren, für die Liganden bekannt sind, möglich.

3.3.3 Vergleich der MDSCs nach GM-CSF- und Flagellin-Stimulation

Im Vergleich zu den MDSCs, deren Bildung durch Zugabe von GM-CSF induziert wurde, gibt es bei den TLR-Liganden teilweise große Unterschiede. Vor allem Flagellin, ein bakterieller TLR 5-Ligand, induziert eine MDSC-Population, die andere Charakteristika aufweist.

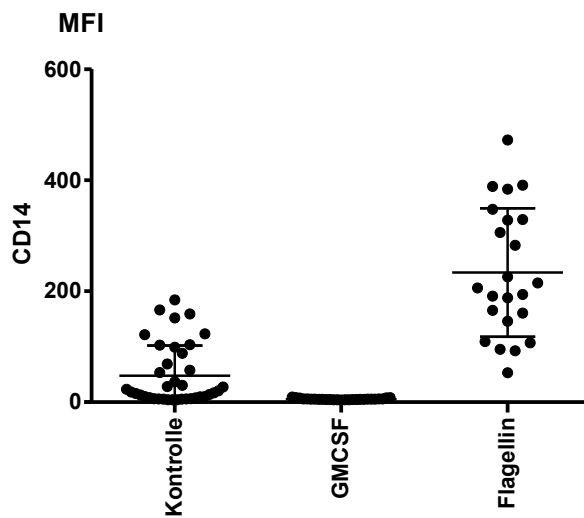


Abbildung 17: Vergleich der CD14-Expression zwischen Kontrollen, GM-CSF- und Flagellin-stimulierten Zellen.

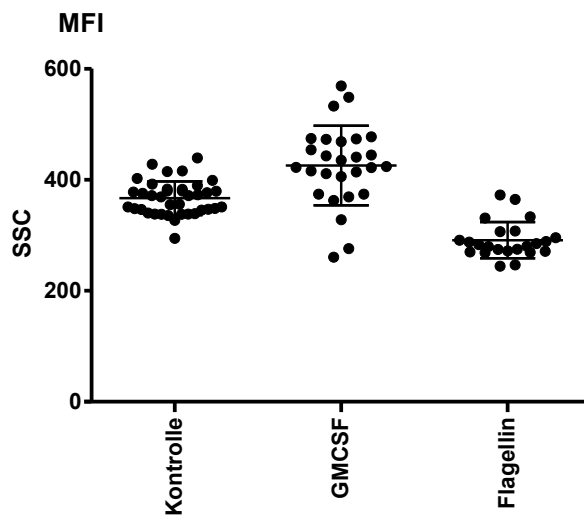


Abbildung 18: SSC-Werte von Kontrollen, GM-CSF- und Flagellin-stimulierten Zellen.

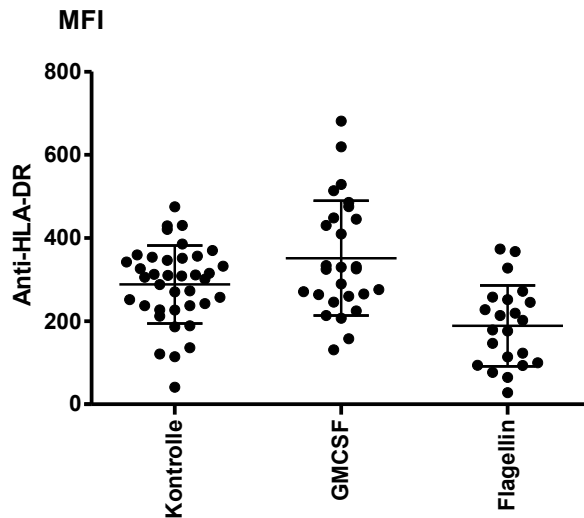


Abbildung 19: Vergleich der HLA-DR-Expression zwischen Kontrollen, GM-CSF- und Flagellin-stimulierten Zellen.

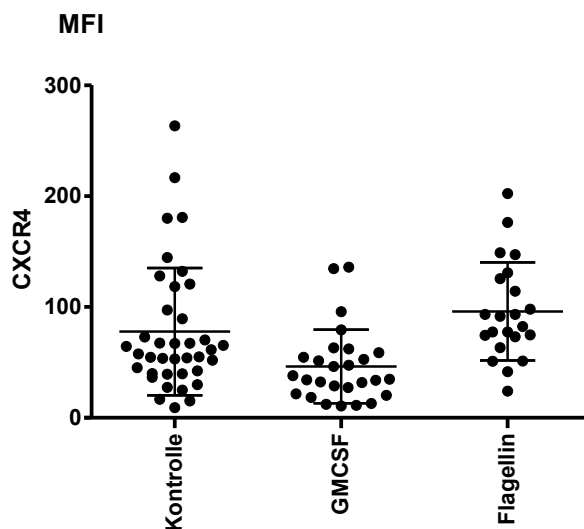


Abbildung 20: Vergleich der CXCR4-Expression zwischen Kontrollen, GM-CSF- und Flagellin-stimulierten Zellen

So ist bei den Flagellin-induzierten MDSCs die CD14-Expression deutlich erhöht, was mit erniedrigten Messwerten im SSC einhergeht. Zusätzlich ist im Vergleich zu den MDSCs aus Kontroll- und GM-CSF-Ansatz die Expression von CXCR4 erhöht, während die Expression von HLA-DR geringer ausfällt.

Durch CFSE-Proliferationsassays kann gezeigt werden, dass die entstandenen CD33-positiven Zellen tatsächlich die Teilung von CD4- und CD8-positiven Lymphozyten hemmen können und es sich somit definitionsgemäß um MDSCs handelt.

Die Abbildung 22 zeigt dies bei MDSCs, die durch Flagellin-Zugabe in die Zellkultur induziert wurden:

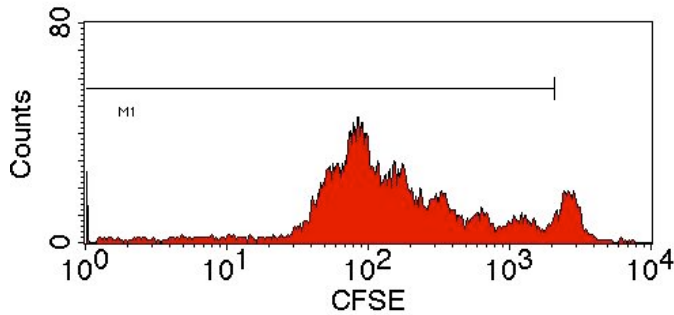


Abbildung 21: CFSE-Proliferationsanalyse von CD4-positiven Zielzellen als Kontrolle.

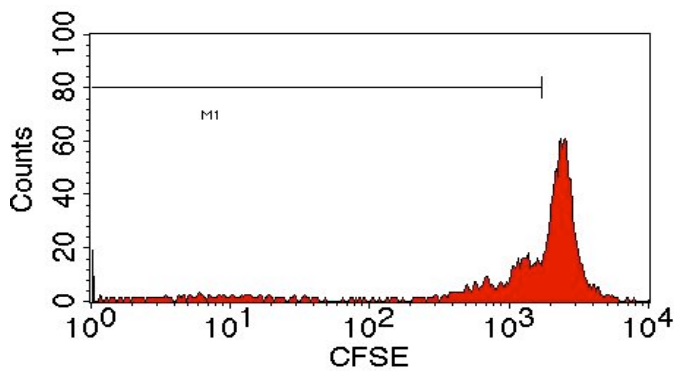


Abbildung 22: CFSE-Proliferationsanalyse von CD4-positiven Zielzellen. Zugabe von CD33-positiven Zellen nach Kultur mit Flagellin-Stimulation.

Die beiden MDSC-Populationen, die nach GM-CSF- und Flagellin-Stimulation entstanden sind, besitzen somit zwar gleiche Funktionalität, weisen jedoch in Morphologie und Genexpression deutliche Unterschiede auf.

3.4 Einfluss von *S. aureus* auf die Induktion von MDSCs

3.4.1 Effekt von Methicillin-sensitivem *S. aureus* auf die MDSC-Induktion

Zu den isolierten PBMCs gesunder Spender wurde Kulturüberstand des Methicillin-sensitiven *S. aureus* (MSSA) - Stammes RN 6390 in den Kulturansatz gegeben. Anschließend wurde nach Kultivierung über 6 Tage der Anteil der MDSCs in der Durchflusszytometrie bestimmt.

Dabei kann eine leichte Expansion der MDSC-Population beobachtet werden. Diese kann bei Steigerung der Konzentration des Überstandes von 0,01% (Volumenprozent) auf 1% nicht weiter erhöht werden.

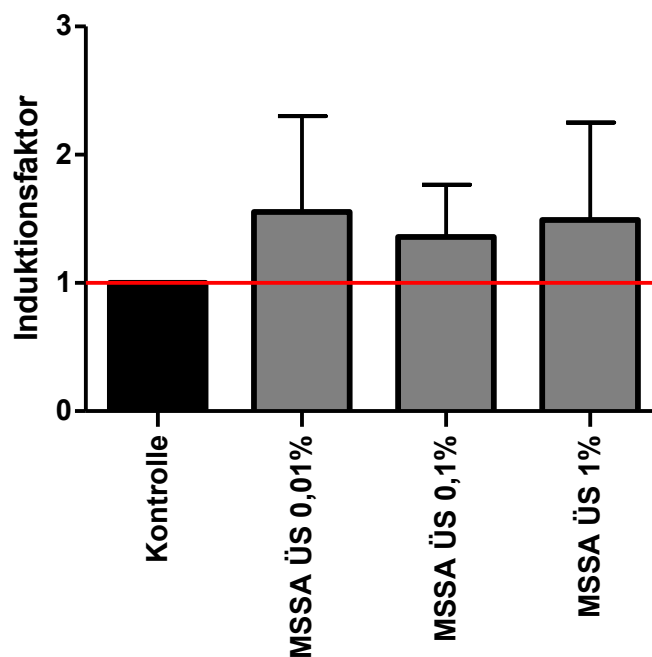


Abbildung 23: Anteil CD33-positiver Zellen bei Zugabe von MSSA-Überstand im Vergleich zur Kontrolle; (n (0,01%, 0,1%, 1%)=8)

3.4.2 Effekt von Methicillin-resistentem *S. aureus* auf die MDSC-Induktion

Zu den Zellkultur-Ansätzen wurde nun in gleicher Weise Kulturüberstand des Methicillin-resistenten *S. aureus* (*MRSA*) - Stammes USA 300 gegeben. Auch hier wurden entsprechende Konzentrationen gewählt.

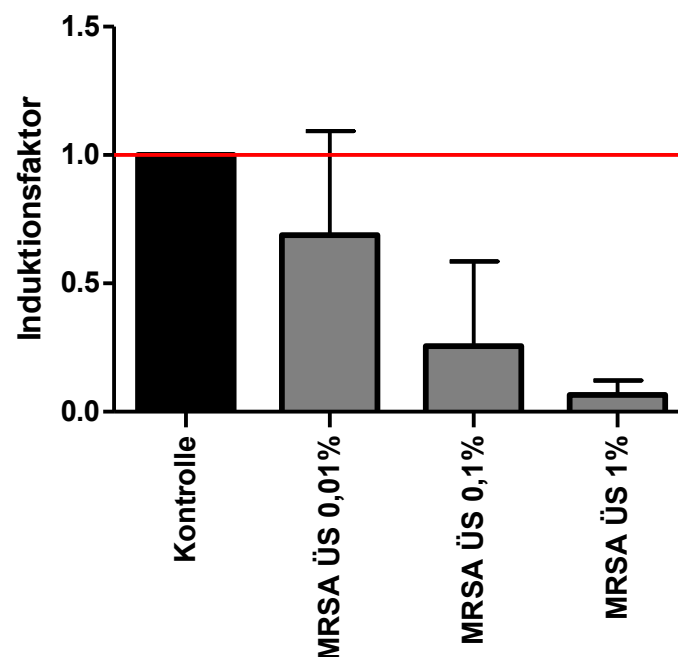


Abbildung 24: Vergleich des Anteils CD33-positiver Zellen bei Zugabe von *MRSA*-Überstand zur Kontrolle; (n (0,01%) = 14; n (0,1%) = 19; n (1%) = 13)

Hier zeigt sich, dass dieser Überstand im Gegensatz zu dem Kulturüberstand des *MSSA* nicht in der Lage ist, eine vergrößerte MDSC-Population zu induzieren.

Wird eine sehr niedrige Volumen-Konzentration des Überstands eingesetzt, so ist die Größe der entstehenden MDSC-Population nicht größer als die der Kontrolle. Bei höheren Volumenkonzentrationen des Überstands schrumpft diese gering ausgeprägte MDSC-Population jedoch und ist bei einer Konzentration des *MRSA*-Überstandes von 1% nahezu nicht mehr existent.

Dieser Effekt lässt sich im Wesentlichen durch zwei mögliche Mechanismen erklären. Zum Einen könnte der Überstand der *MRSA*-Kultur toxisch wirken und die PBMCs abtöten, bevor sie sich zu MDSCs entwickeln können. Zum Anderen könnte aber auch eine Hemmung der Differenzierung zu MDSCs aufgetreten sein. Diese Fragestellung habe ich im Folgenden genauer untersucht.

Im FSC-SSC ist zu darüber hinaus zu sehen, dass im Bereich der Lymphozyten und Monozyten eine Proliferation im Vergleich zur Kontrolle stattgefunden hat. Insofern könnte eine eventuell zytotoxische Wirkung nicht für alle Zellen gelten.

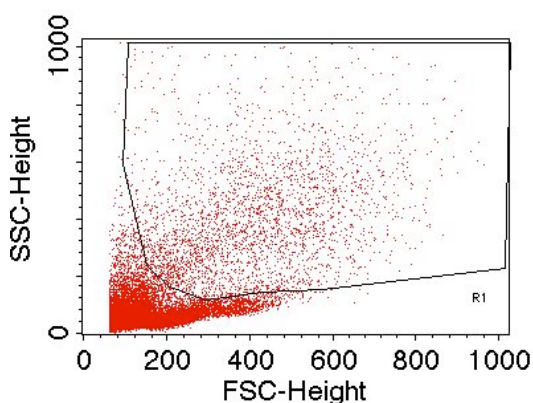


Abbildung 25: FSC-SSC-Graph der kultivierten PBMCs einer Kontrolle

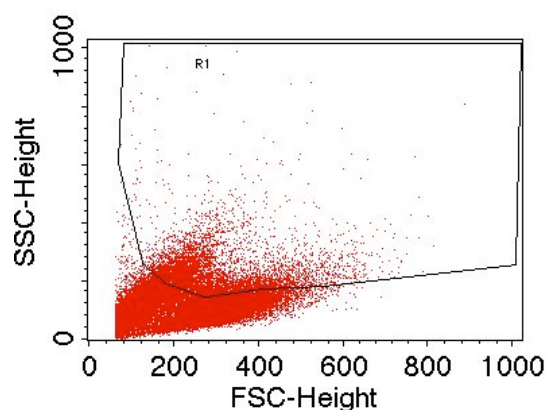


Abbildung 26: FSC-SSC-Graph der kultivierten PBMCs nach Zugabe von 1% *MRSA*-Überstand

Da MDSCs als CD33-positive Zellen beschrieben sind und aus myeloischen Zellen entstehen, isolierte ich aus PBMCs mittels MACS die CD33-positiven Zellen. Diese Zellen setzte ich in einer Zellkultur an und gab den *MRSA*-Überstand in den bereits verwendeten Volumenkonzentrationen hinzu. Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen wurde eine Durchflusszytometrie nach Färbung mit Propidiumiodid durchgeführt. Hier zeigte sich, dass der Anteil der toten Zellen selbst bei einer hohen Volumenkonzentration des Überstands im Vergleich zu der Kontrolle nicht erhöht war; dies spricht gegen eine Toxizität des *MRSA*-Überstandes.

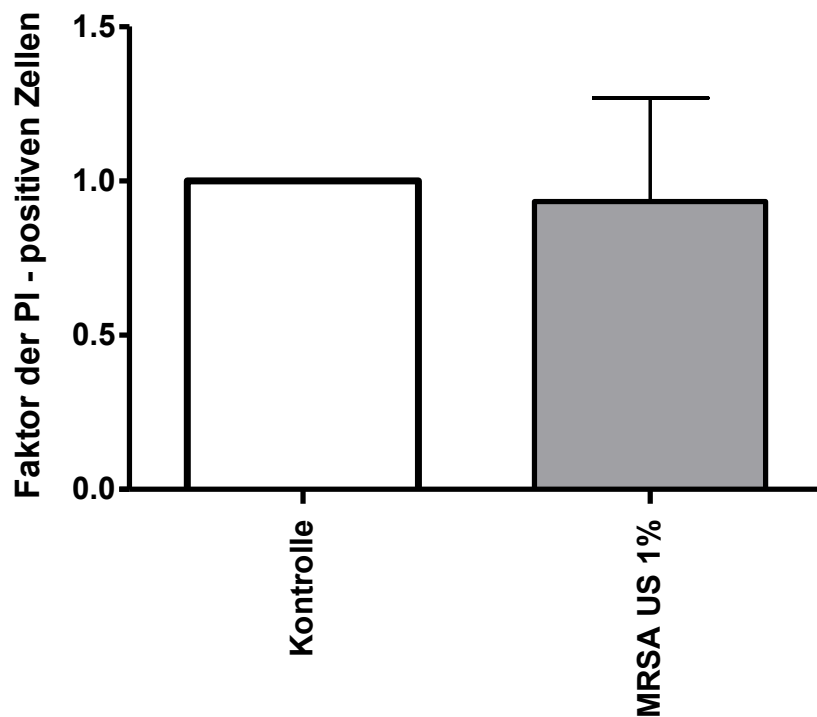


Abbildung 27: Vergleich des Anteils der Propidiumiodid-positiven, CD33-positiven PBMCs nach 6 Tagen in Kultur zwischen Kontrollen und bei Zugabe von 1% *MRSA*-Überstand; (n=4)

Um herauszufinden, wodurch die Bildung einer MDSC-Population bei Zugabe von *MRSA*-Überstand inhibiert wurde, wurden weitere Versuche mit einigen wichtigen Pathogenitätsfaktoren von *MRSA* durchgeführt.

Es wurde Phenol-soluble Modulin (PSM) zu den PBMCs in Kultur gegeben, um festzustellen, ob dies die Bildung von MDSCs inhibierte.

Dabei zeigte sich jedoch, dass PSM sogar eine Vergrößerung der MDSC-Population induzierte.

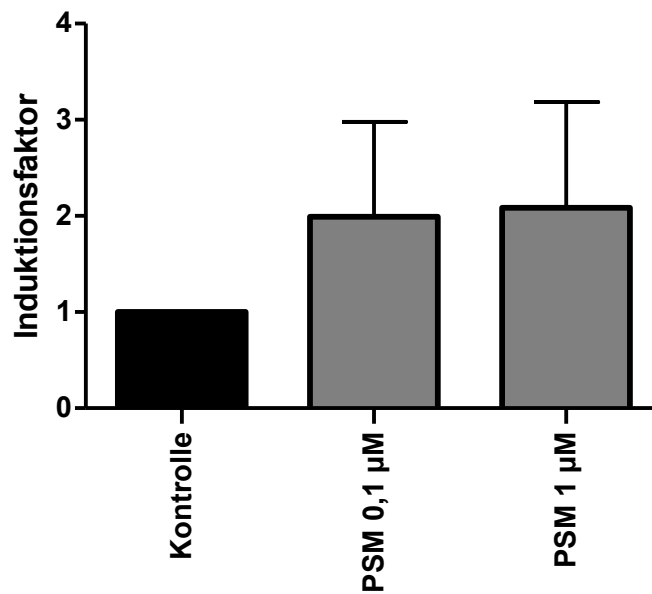


Abbildung 28: Vergleich des Anteils CD33-positiver Zellen von Kontrollen und bei Zugabe von Phenol-soluble Modulin (PSM); (n (0,1µM, 1µM) = 4)

Ein ähnliches Ergebnis konnte bei Zugabe von isolierten Wall teichoic acids (WTA) beobachtet werden; auch hier stieg der prozentuale Anteil der CD33-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle an.

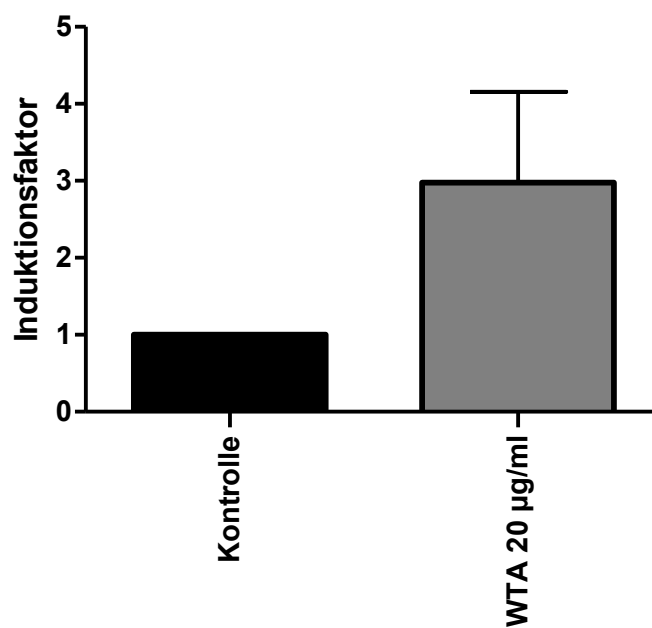


Abbildung 29: Vergleich des Anteils CD33-positiver Zellen von Kontrollen und bei Zugabe von Wall teichoic acid (WTA); (n = 6)

Somit konnten diese beiden Pathogenitätsfaktoren als Ursache der Inhibition der MDSC-Bildung ausgeschlossen werden.

Um die Ursache weiter eingrenzen zu können, wurden nun Versuche mit Überständen von Mutanten desselben *MRSA*-Stammes gemacht, in welchen der „accessory gene regulator“ (*agr*) ausgeschaltet war. Diese Überstände wurden in gleicher Weise zu den kultivierten PBMCs gegeben.

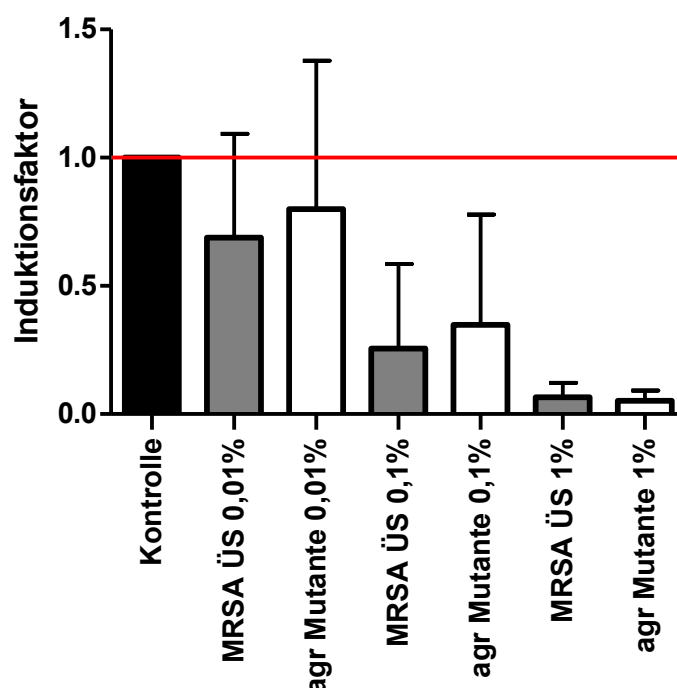


Abbildung 30: Vergleich des Anteils CD33-positiver Zellen von Kontrollen und bei Zugabe von Überstand des *MRSA*-Stammes USA 300 mit aktivem und inaktivem *agr*; (n (*agr*): 0,01% = 4; 0,1% = 5; 1% = 6)

Im Vergleich zwischen den Überständen von Staphylokokken-Kulturen mit und ohne intaktem *agr* konnte in Bezug auf die MDSC-Generierung kein Unterschied festgestellt werden. Auch bei einer höheren Volumenkonzentration des Überstands vom *MRSA*-Stamm ohne intaktem *agr* war die Bildung einer MDSC-Population inhibiert; ein zytotoxischer Effekt wurde auch hier nach Zugabe zu CD33-positiven PBMCs in Zellkultur und Färbung mit PI ausgeschlossen.

Um herauszufinden, zu welcher Stoffgruppe die Substanz gehört, welche die Entstehung der MDSCs verhindert, wurde der Überstand des *MRSA*-Stammes mit Proteinase K behandelt. Durch die Proteinase K werden fast alle Proteine, die sich in dem Überstand befinden, zerstört. Andere Substanzen wie Zucker oder Lipide werden dagegen nicht beeinflusst.

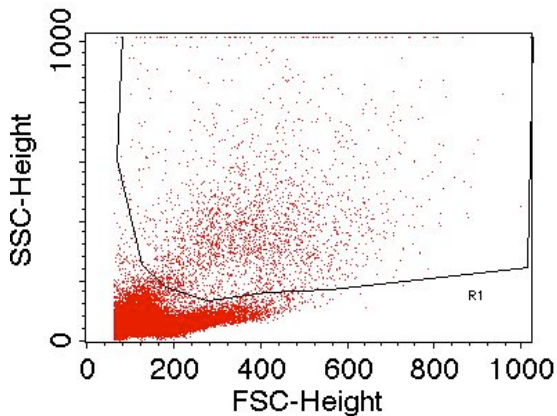


Abbildung 31: FSC-SSC-Graph der kultivierten PBMCs einer Kontrolle

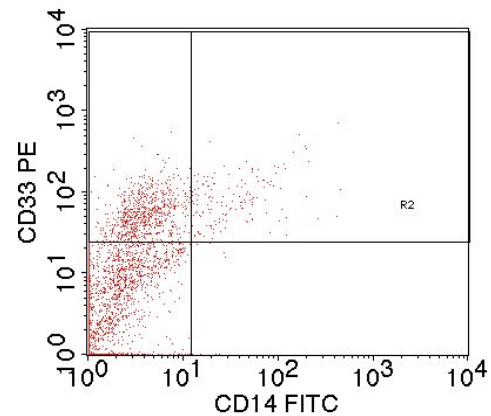


Abbildung 32: CD14-CD33-Graph der kultivierten PBMCs einer Kontrolle; Gate wie in Abbildung 31

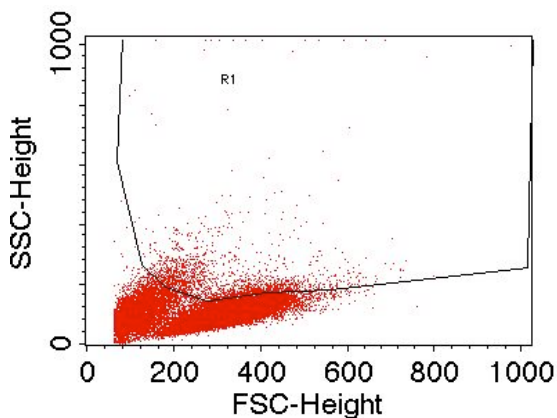


Abbildung 33: FSC-SSC-Graph der kultivierten PBMCs bei Zugabe von 1% *MRSA*-Überstand

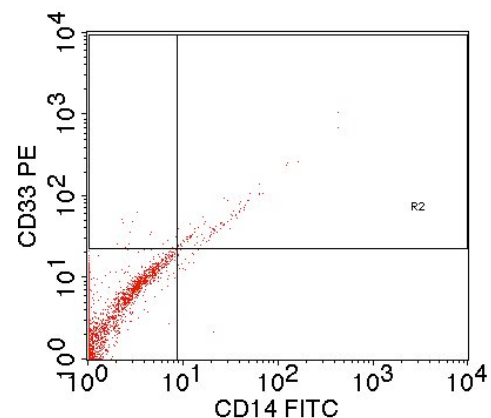


Abbildung 34: CD14-CD33-Graph der kultivierten PBMCs bei Zugabe von 1% *MRSA*-Überstand; Gate wie in Abbildung 33

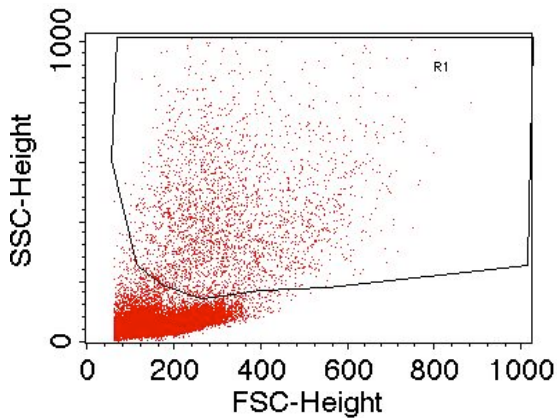


Abbildung 35: FSC-SSC-Graph der kultivierten PBMCs bei Zugabe von 1% *MRSA*-Überstand, der mit Proteinase K behandelt wurde

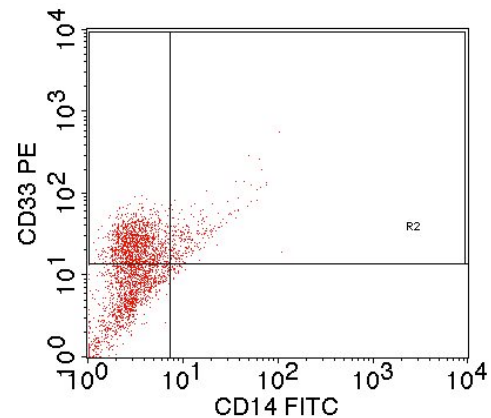


Abbildung 36: CD14-CD33-Graph der kultivierten PBMCs bei Zugabe von 1% *MRSA*-Überstand, der mit Proteinase K behandelt wurde; Gate wie in Abbildung 35

Es zeigt sich, dass der mit Proteinase K behandelte *MRSA*-Überstand keinen Effekt mehr auf die PBMCs hat. Die Zellen nach 6 Tagen in Kultur entsprechen praktisch denen der Kontrollen. Dies spricht dafür, dass eine proteinhaltige Substanz an der Verhinderung der MDSC-Entstehung beteiligt ist.

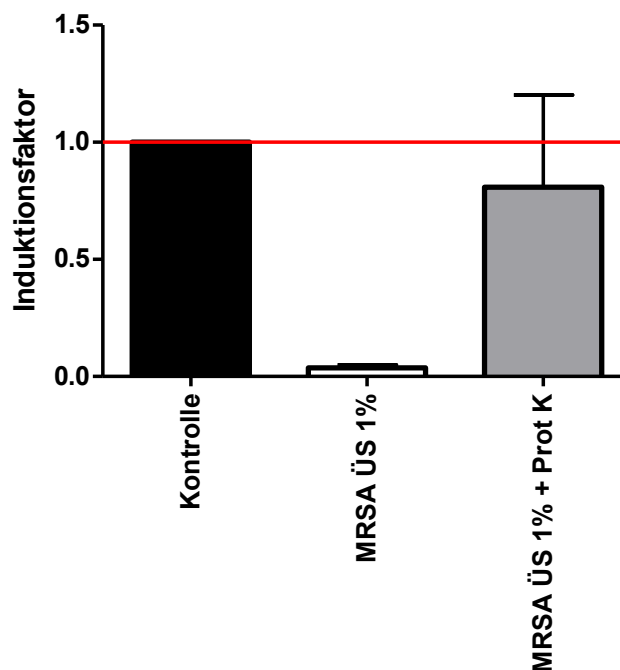


Abbildung 37: Vergleich des Anteils an CD33-positiven Zellen zwischen Kontrolle und bei Zugabe von *MRSA* ÜS bzw. mit Proteinase K vorbehandeltem *MRSA* ÜS; (n = 3)

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der Überstand des *MRSA*-Stammes auf etwa 95°C für 30 Minuten erhitzt und anschließend zu den PBMC-Kulturen zugegeben. Durch die Erhitzung denaturiert ein Großteil der Proteine - mit Ausnahme der hitzeresistenten.

Das Erhitzen hatte keinen Effekt; die MDSC-Entstehung wurde im Vergleich zum nicht-erhitzten *MRSA*-Überstand nicht beeinflusst.

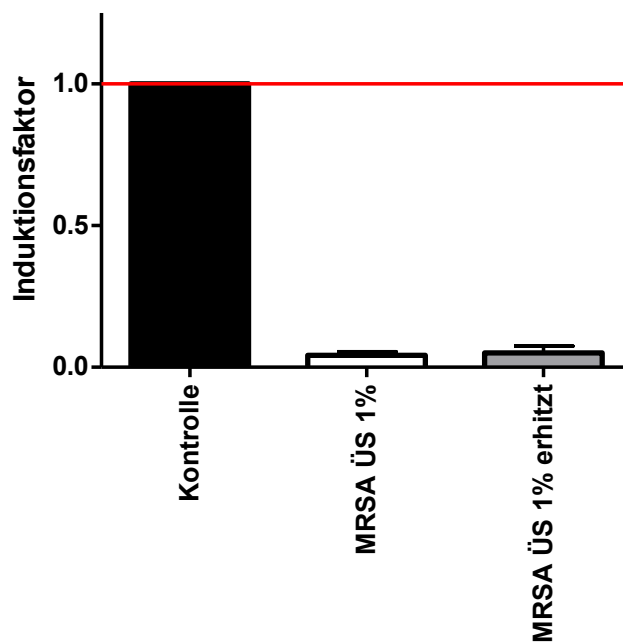


Abbildung 38: Vergleich des Anteils CD33-positiver Zellen zwischen Kontrolle und bei Zugabe von *MRSA* ÜS bzw. vorerhitztem *MRSA* ÜS; (n = 4)

4 Diskussion

4.1 MDSC-Populationen von Kontrollen und bei GM-CSF-Stimulation

In meinen Experimenten zeigte sich, dass bereits durch Kultivierung von PBMCs in dem Zellkulturmedium eine kleine CD33-positive Zellpopulation entsteht, welche die T-Zell-Proliferation inhibieren kann. Dieser Effekt war in sämtlichen Experimenten sichtbar. Diese Beobachtung könnte auf der Wirkung des fetalen Kälberserums im Zellkulturmedium beruhen. Von diesem weiß man, dass es Zellen zur Proliferation anregen kann und auch relativ hohe Konzentrationen von verschiedenen Wachstumsfaktoren enthält^{91,92}.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen meiner Versuche haben Lechner et al. jedoch bei der Kultivierung von PBMCs in reinem Zellkulturmedium keine funktionell wirksamen MDSCs nachweisen können⁹⁰. Das Zellkulturmedium, in welchem sie die PBMCs kultivierten, war von der Zusammensetzung her gleich wie bei meinen Experimenten. Auch sonst sind die Versuchsprotokolle sehr ähnlich. Da fetales Kälberserum allerdings kein standardisiertes Produkt ist, könnten sich Unterschiede zwischen verschiedenen Chargen ergeben haben.

Auffällig waren die Unterschiede in der CD14-Expression bei den MDSC-Populationen der Kontrollen. Auf der einen Seite gab es rein CD14-negative MDSC-Populationen, die demnach eher granulozytär waren. Auf der anderen Seite wurden auch MDSC-Populationen mit hoher CD14-Expression gemessen, die einen Monozyten-Marker aufwiesen.

Von isolierten MDSCs aus peripherem Blut von Krebspatienten ist bekannt, dass es zwei Subtypen von MDSCs gibt: einen granulozytären, CD14-negativen Zelltyp, sowie einen monozytären, CD14-positiven Zelltyp^{93,94}.

In meinen Experimenten zeigte sich, dass diese Subtypen auch bei Kultivierung von PBMCs auftreten können.

Zu klären bleibt, wodurch es bei den Kontrollen zu einer CD14-positiven oder CD14-negativen MDSC-Population kam. Diese war nämlich bei gleichen

Spendern zu unterschiedlichen Zeitpunkten nicht konstant und könnte somit von Faktoren wie der Aktivierung der Zellen des Immunsystems abhängen.

In den Proliferations-Assays konnte der funktionelle Unterschied zwischen MDSCs und PMNs deutlich gemacht werden. Obwohl MDSCs des granulozytären Subtyps in der Expression von Oberflächenmarkern den PMNs stark gleichen, ist neben der anderen Dichte die immunsuppressive Wirkung das wichtigste Abgrenzungsmerkmal. Im Gegensatz zu den MDSCs können normale PMNs die Proliferation von T-Lymphozyten nicht hemmen.

Während die MDSC-Generierung aus PBMCs in Kultur ohne Zytokin-Zusatz noch nicht beschrieben war, war die MDSC-induzierende Wirkung von GM-CSF bereits bekannt⁹⁰. Dies wurde auch schon bei Mäusen in vivo demonstriert¹³.

GM-CSF führte bei meinen Experimenten zuverlässig zu einer vergrößerten MDSC-Population. Der Anteil an CD33+ Zellen, die auch funktionell immunsuppressiv waren, stieg durchschnittlich um das 2-3-fache.

Im Vergleich zu den Kontrollen waren die entstandenen MDSCs immer CD14-negativ. Dies war unabhängig davon, ob die geringe MDSC-Population der Kontrolle CD14-negativ oder CD14-positiv war. Übereinstimmend damit war der durchschnittliche SSC-Wert der GM-CSF-induzierten MDSCs höher als bei den Kontrollen. Da der SSC-Wert die Granularität der Zellen widerspiegelt, ist er bei granulozytären MDSCs höher als etwa bei monozytären Zellen.

Unterschiede zeigten sich dagegen bei der Expression von HLA-DR. Sowohl aus Patientenblut isolierte, wie auch in Kultur generierte MDSCs werden als HLA-DR-negativ oder -niedrig beschrieben^{5,90}. Bei den MDSCs, die in meinen Versuchen nach GM-CSF-Zugabe entstanden, war HLA-DR auch exprimiert, allerdings nicht in sehr hohem Maße. Lechner et al.⁹⁰ legten nahe, dass gerade die geringe Expression von HLA-DR zur Unterscheidung von suppressiv wirkenden gegenüber nicht suppressiv wirkenden CD33-positiven Zellen dienen könnte. Trotz der vorhandenen Expression von HLA-DR zeigten die generierten MDSCs bei mir jedoch in den Proliferations-Assays ihre typische immunsuppressive Wirkung.

4.2 TLR-Liganden induzieren MDSCs

Bei Versuchen an Mäusen wurde bereits festgestellt, dass Lipopolysaccharid von *E.coli* als Ligand von TLR4 zu einer Expansion der MDSC-Population führen kann. Delano et al. zogen aus ihren Experimenten die Schlussfolgerung, dass dieser Vorgang zwar nicht notwendigerweise abhängig von dem Lipopolysaccharid, jedoch von der Aktivierung von MyD88 war⁸.

In meinen Experimenten zeigte sich, dass bei humanen PBMCs ebenfalls über Toll-like Rezeptoren MDSCs induziert werden können. Dabei unterscheiden sich humane und murine MDSCs in ihrem Expressionsverhalten. So ist in der Maus das Antigen Gr1 ein wichtiger Marker von MDSCs, der beim menschlichen Äquivalent nicht exprimiert wird².

Beim Menschen sind Liganden für die TLR 1-9 bekannt. Eine Induktion von MDSCs konnte bei Aktivierung von jedem dieser Rezeptoren beobachtet werden.

Dies bedeutet einerseits, dass die Lokalisation des Rezeptoren hier keine Rolle spielt. Der Effekt konnte sowohl bei intrazellulär gelegenen TLR, wie auch bei TLR auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

Andererseits konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass die Expansion von MDSCs unabhängig von der hauptsächlich genutzten Signalvermittlung der TLR ist. Während fast alle TLR den MyD88-abhängigen Signalweg benutzen, wird die Aktivierung von TLR3 fast ausschließlich über den MyD88-unabhängigen Signalweg vermittelt⁴⁶. Dennoch ist es durchaus möglich, dass MyD88 für die Expansion der MDSCs notwendig ist. Man weiß, dass MyD88 in der Signaltransduktion von TLR3 zu einem gewissen Anteil ebenfalls involviert ist⁹⁵.

Es wäre allerdings auch denkbar, dass eher die Transkriptionsfaktoren der NFκB-Familie als MyD88 für die Expansion der MDSCs nötig sind. Denn sowohl der MyD88-abhängige, wie auch der MyD88-unabhängige Signalweg führen letztlich zu einer Aktivierung dieser Proteine, worin die Gemeinsamkeit der TLR-Signalvermittlung besteht. Da über sämtliche TLR eine Induktion von MDSCs stattfinden kann (siehe 3.3), wäre dies ebenso möglich.

Interessant ist, dass sich in dem Subtyp der MDSC-Population Unterschiede gegenüber den MDSCs zeigten, die durch GM-CSF hervorgerufen wurden.

Während GM-CSF granulozytäre MDSCs induziert, erzeugte Flagellin als TLR5-Ligand eine monozytäre, CD14-positive Zellpopulation. Diese monozytären MDSCs besitzen einen niedrigeren Messwert im SSC und exprimieren eine geringere Menge des MHC-Klasse II-Rezeptors HLA-DR. Sie sind dabei den „professionellen“ Antigen-präsentierenden Zellen sogar weniger ähnlich als die Zellen des granulozytären Subtyps.

Jedoch besaßen in den Proliferations-Assays beide Zellpopulationen dieselbe Wirkung. Der beschriebene, unterschiedliche Mechanismus in der immunsuppressiven Funktion beider Subtypen in der Maus scheint demnach zumindest bei der Proliferationshemmung von T-Lymphozyten beim Menschen keine entscheidende Rolle zu spielen.

4.3 Einfluss von *S. aureus* auf die MDSC-Entstehung

Es ist bereits bekannt, dass humane MDSCs durch verschiedene Pathogene induziert werden können. So konnte dies in meiner Arbeitsgruppe zum Beispiel für Überstand von *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Aspergillus fumigatus* gezeigt werden⁸⁵ und [Rieber et al., unveröffentlicht].

Dazu passt die Beobachtung, dass durch Kulturüberstand von *MSSA* eine vergrößerte MDSC-Population hervorgerufen werden kann. Dieser Effekt könnte auch dem Pathogen selbst einen Überlebensvorteil bieten. Findet um das Bakterium herum eine lokale Immunsuppression statt, dürfte sich die Überlebenswahrscheinlichkeit erhöhen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Zugabe von *MSSA*-Überstand in die PBMC-Kultur stehen die Ergebnisse über den Einfluss von Überstand des *MRSA*-Stammes.

Hier findet im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Verringerung des MDSC-Anteils statt. Dies ist ein konzentrationsabhängiger Vorgang.

Da bereits viele Virulenzfaktoren von *S. aureus* als Liganden des TLR 2 beschrieben sind, überrascht dies. Zu solchen Virulenzfaktoren zählen beispielsweise Lipoproteine, Panton-Valentine-Leukozidin oder auch Phenol-soluble Modulin⁹⁶.

Nachdem in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass über die Toll-like Rezeptoren eine MDSC-Induktion eingeleitet werden kann, war auch hier mit einem stimulierenden Effekt auf die MDSC-Population gerechnet worden.

Zugleich konnte beobachtet werden, dass es unter anderem im Bereich der Lymphozyten zu einer deutlichen Zunahme der Zellzahl kam. Dieser Teilaspekt ist sicherlich für weitere Untersuchungen interessant.

Die Verhinderung der MDSC-Entstehung lässt sich durch zwei mögliche Mechanismen erklären.

Zum Einen könnte der *MRSA*-Überstand toxisch wirken und die PBMCs abtöten, bevor sie sich zu MDSCs entwickeln können. Zum Anderen könnte aber auch eine Hemmung der Differenzierung zu MDSCs aufgetreten sein.

Um eine Toxizität auszuschließen, wurde eine PI-Färbung nach Kultivierung von CD33-positiven PBMCs durchgeführt. Dabei war zwischen den Kontrollen und bei Zugabe von einer hohen Konzentration *MRSA*-Überstand (1%) kein Unterschied festzustellen. Somit kann ein zytotoxischer Effekt des *MRSA*-Überstandes auf die myeloischen Vorläuferzellen der MDSCs ausgeschlossen werden. Dies deutet darauf hin, dass durch den Überstand des *MRSA*-Stammes die Differenzierung zu MDSCs verhindert wird.

Da viele Virulenzfaktoren von *S. aureus* als TLR-Liganden beschrieben sind, sollte herausgefunden werden, welche Substanz aus dem *MRSA*-Überstand diesen Effekt vermittelt. Trotz der Fähigkeit, als TLR-Agonist zu wirken, könnten bekannte Virulenzfaktoren auch über andere Signalwege auf die MDSC-Entstehung wirken und den stimulativen Effekt über den TLR überdecken.

Daher galt es, einige wichtige Virulenzfaktoren definitiv auszuschließen. Hierfür erhielt ich von Kooperationspartnern aufgereinigte α -PSM und WTA.

Phenol-soluble Modulins zählen zu den Toxinen, die von *MRSA*, aber nicht von *MSSA* sezerniert werden. Sie werden vor allem von *ca-MRSA*-Stämmen produziert; einen solchen *MRSA*-Stamm verwendete ich auch in meinen Versuchen.

Bei Zugabe zu den PBMC-Kulturen zeigte sich jedoch, dass α -PSM in der Tat als TLR 2-Liganden eine Induktion der MDSCs bewirken.

Gleiches geschah bei Zugabe von Wall teichoic acids (WTA). Diese gehören zu den Polysacchariden, welche einen Teil der bakteriellen Zellwand bilden.

Um die MDSC-inhibierende Substanz besser eingrenzen zu können, wurde Überstand einer Mutante desselben *MRSA*-Stammes verwendet, den ich zuvor auch schon eingesetzt hatte. Bei dieser Mutante war der accessory gene regulator (*agr*) ausgeschaltet. Über diesen wird die Expression vieler wichtiger Virulenzfaktoren gesteuert. Es zeigte sich, dass zwischen Wildtyp und *agr*-Mutante kein Unterschied feststellbar war. Somit konnten sämtliche Toxine, Proteasen und Hämolsine ausgeschlossen werden, deren Produktion über den *agr* vermittelt wird.

Im Folgenden wurde Proteinase K eingesetzt, um sämtliche Proteine des *MRSA*-Überstandes zu zerstören und so herauszufinden, ob die Verhinderung der MDSC-Entstehung über ein Protein vermittelt wurde. Hier konnte deutlich gezeigt werden, dass *MRSA*-Überstand, der mit Proteinase K behandelt war, keinen Effekt mehr auf die Bildung der MDSCs hatte.

Passend dazu konnte beobachtet werden, dass nach Auftrennung des *MRSA*-Überstandes in wasserlösliche und lipidhaltige Bestandteile, die Verhinderung der MDSC-Entstehung durch eine Substanz der wasserlöslichen Phase vermittelt wurde. Bei vorheriger Inkubation von Proteinase K mit dem wasserlöslichen Anteil des *MRSA*-Überstandes konnte dieser Effekt wieder ausgelöscht werden.

Im *MRSA*-Überstand scheint demnach ein Protein oder eine proteinhaltige Substanz, wie zum Beispiel Peptidoglykane, dafür verantwortlich zu sein, die Entstehung der MDSCs zu verhindern. Da sich diese Substanz in der wasserlöslichen Phase des Überstandes befindet, können Lipoproteine im Folgenden ausgeschlossen werden.

Durch das Erhitzen des *MRSA*-Überstandes auf 95°C für 30 Minuten werden sämtliche hitzesensitive Proteine zerstört.

Da nach diesem Vorgang die Entstehung der MDSCs immer noch verhindert wurde, scheint dieser Effekt somit durch ein hitzeresistente, proteinhaltige Substanz vermittelt zu werden.

Welcher Nutzen sich hierdurch für das Bakterium ergibt, ist unklar.

Als hitzestabile Virulenzfaktoren sind vor allem die Superantigene von *S. aureus* bekannt. Diese lösen das Toxic shock-Syndrom, sowie verwandte Krankheitsbilder aus und führen auch zu Lebensmittelvergiftungen⁹⁷.

Zu den Superantigenen zählen die Enterotoxine von *S. aureus* sowie das Toxic Shock Syndrom Toxin 1 (TSST-1)⁹⁸.

Die Expression dieser Toxine ist teilweise über den *agr* reguliert; dies spricht gegen eine Beteiligung der Superantigene von *MRSA* in der Verhinderung der MDSC-Bildung. Das Enterotoxin A wird jedoch konstant produziert und auch die Bildung des TSST-1 ist offensichtlich nicht direkt mit dem *agr* verknüpft^{97,99}.

Darüber hinaus ist für das Enterotoxin B von *S. aureus* bereits eine immunsuppressive Wirkung beschrieben¹⁰⁰.

Allerdings ist charakteristisch für Superantigene, dass sie starke T-Zell-Antworten auslösen. Die Induktion von MDSCs wird durch aktivierte T-Lymphozyten gefördert¹⁰¹. Auch sind einige der Superantigene Protease-stabil.

Somit stellen die Superantigene von *MRSA* eine interessante Gruppe an Substanzen dar, die in der Verhinderung der MDSC-Bildung eine Rolle spielen könnten. Allerdings sollten auch weitere Virulenzfaktoren im Auge behalten werden.

Die Ergebnisse meiner Versuche könnten zu der klinischen Beobachtung passen, dass community-acquired *MRSA* seltener zu systemischen septischen Zuständen, sondern eher zu lokalen Haut- und Weichteilinfektionen führt⁷². Der *MRSA*-Stamm USA 300, dessen Überstand ich in meinen Versuchen verwendete, zählt zu diesen *ca-MRSA*-Stämmen.

Eine geringere Menge an MDSCs führt im Bereich der Bakterien zu einer vermehrten inflammatorischen Reaktion, die sich in Form von Haut- oder Weichteilinfektionen äußern könnte. Zugleich ist aufgrund der stärkeren Immunantwort eine systemische Ausbreitung des Bakteriums weniger wahrscheinlich, weshalb es seltener zu einer systemischen Sepsis kommen könnte.

Die Substanz, welche die Bildung der MDSCs verhindert, könnte auch für therapeutische Zwecke interessant sein. Insbesondere bei Tumorpatienten werden MDSCs vermehrt gebildet und dadurch die Bekämpfung des Tumors durch das Immunsystem geschwächt. Hier könnte ein Wirkstoff, der die Bildung von MDSCs verhindert, zum Einsatz kommen.

Allerdings könnte eine Hemmung der entsprechenden Substanz beispielsweise auch bei hyperinflammatorischen *MRSA*-Infektionen von Nutzen sein.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich humane MDSCs aus PBMCs durch Kultivierung und Zugabe von Stimulantien zuverlässig induzieren lassen. Dabei können sowohl monozytäre als auch granulozytäre MDSCs entstehen; dies hängt unter anderem von den zugegebenen Stimulantien ab.

In ihrer immunsuppressiven Wirkung konnte bei Proliferationsversuchen mit humanen T-Zellen jedoch kein Unterschied zwischen diesen MDSC-Subtypen festgestellt werden.

Durch Aktivierung von Toll-like Rezeptoren lassen sich MDSCs in Zellkultur induzieren. Dieser Vorgang ist grundsätzlich unabhängig davon, ob es sich um einen Toll-like Rezeptor handelt, der auf der Zelloberfläche oder intrazellulär an einer Membran lokalisiert ist. Es ist daher möglich, dass für die Induktion von MDSCs über Toll-like Rezeptoren die Aktivierung von MyD88 notwendig ist. Alternativ könnten bei dieser Signaltransduktion aber auch die Transkriptionsfaktoren der NF κ B-Familie entscheidend sein. Diese Fragestellung könnte für weitere Untersuchungen interessant sein.

Viele Pathogene sind in der Lage, eine Vergrößerung der MDSC-Population hervorzurufen. Dies gilt auch für Kulturüberstand des hier verwendeten Methicillin-sensitiven *S. aureus*-Stammes RN6390.

Im Gegensatz dazu führt Überstand des Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stammes USA 300 zu einer Verhinderung der MDSC-Entstehung.

Dieser Effekt wird konzentrationsabhängig vermittelt. Da der *MRSA*-Überstand keine zytotoxische Wirkung auf CD33-positive PBMCs hat, ist eine Hemmung der Differenzierung zu MDSCs wahrscheinlicher.

Die Produktion der Substanz, welche die Differenzierung zu MDSCs verhindert, wird nicht über den accessory gene regulator gesteuert. Somit kann eine Vielzahl wichtiger Virulenzfaktoren ausgeschlossen werden, beispielsweise α -PSM, welches isoliert als Toll-like Rezeptor 2-Ligand zu einer Induktion von MDSCs führt.

Beim Inhibitor handelt es sich um eine wasserlösliche, hitzestabile und proteinhaltige Substanz. Da diese im Überstand zu finden ist, wird sie vermutlich sezerniert. Es könnte sich allerdings auch um einen Bestandteil der Zellwand handeln, der sich bei der Kultivierung der Bakterien abgelöst hat.

Zur Klärung der Frage, um welche Substanz es sich dabei genau handelt, sind weitere Versuche notwendig. Hierfür bietet es sich an, verschiedene *MRSA*-Stämme miteinander zu vergleichen und diese auf die Beeinflussung der MDSC-Entstehung in Kombination mit ihrer Protein-Expression hin zu untersuchen.

Dieses Promotions-Projekt wurde gefördert von dem IZKF-Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen.

6 Literaturverzeichnis

1. Young, M.R., Newby, M. & Wepsic, H.T. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer research* **47**, 100-105 (1987).
2. Gabrilovich, D.I. & Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews. Immunology* **9**, 162-174 (2009).
3. Sinha, P., Clements, V.K., Bunt, S.K., Albelda, S.M. & Ostrand-Rosenberg, S. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol* **179**, 977-983 (2007).
4. Ochoa, A.C., Zea, A.H., Hernandez, C. & Rodriguez, P.C. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 721s-726s (2007).
5. Almand, B., *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* **166**, 678-689 (2001).
6. Zhu, B., *et al.* CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **179**, 5228-5237 (2007).
7. Haile, L.A., *et al.* Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology* **135**, 871-881, 881 e871-875 (2008).
8. Delano, M.J., *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* **204**, 1463-1474 (2007).
9. Youn, J.I., Nagaraj, S., Collazo, M. & Gabrilovich, D.I. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* **181**, 5791-5802 (2008).
10. Movahedi, K., *et al.* Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* **111**, 4233-4244 (2008).
11. Montero, A.J., Diaz-Montero, C.M., Kyriakopoulos, C.E., Bronte, V. & Mandruzzato, S. Myeloid-derived suppressor cells in cancer patients: a clinical perspective. *J Immunother* **35**, 107-115 (2012).
12. Pan, P.Y., *et al.* Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood* **111**, 219-228 (2008).
13. Serafini, P., *et al.* High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer research* **64**, 6337-6343 (2004).

14. Gabrilovich, D., *et al.* Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* **92**, 4150-4166 (1998).
15. Bromberg, J. Stat proteins and oncogenesis. *The Journal of clinical investigation* **109**, 1139-1142 (2002).
16. Nefedova, Y., *et al.* Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol* **172**, 464-474 (2004).
17. Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T. & Roth, J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *Journal of leukocyte biology* **81**, 28-37 (2007).
18. Cheng, P., *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* **205**, 2235-2249 (2008).
19. Bronte, V., *et al.* IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* **170**, 270-278 (2003).
20. Bronte, V. & Zanovello, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature reviews. Immunology* **5**, 641-654 (2005).
21. Rodriguez, P.C. & Ochoa, A.C. Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunological reviews* **222**, 180-191 (2008).
22. Sauer, H., Wartenberg, M. & Hescheler, J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **11**, 173-186 (2001).
23. Rutschman, R., *et al.* Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol* **166**, 2173-2177 (2001).
24. Gallina, G., *et al.* Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation* **116**, 2777-2790 (2006).
25. Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D.I. STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol* **174**, 4880-4891 (2005).
26. Mencacci, A., *et al.* CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis. *J Immunol* **169**, 3180-3190 (2002).
27. Goni, O., Alcaide, P. & Fresno, M. Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+)immature myeloid suppressor cells. *International immunology* **14**, 1125-1134 (2002).
28. Rodriguez, P.C., *et al.* Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *The Journal of biological chemistry* **277**, 21123-21129 (2002).
29. Bingisser, R.M., Tilbrook, P.A., Holt, P.G. & Kees, U.R. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol* **160**, 5729-5734 (1998).

30. Harari, O. & Liao, J.K. Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Current pharmaceutical design* **10**, 893-898 (2004).
31. Rivoltini, L., *et al.* Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunological reviews* **188**, 97-113 (2002).
32. Nagaraj, S., *et al.* Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nature medicine* **13**, 828-835 (2007).
33. Yang, R., *et al.* CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer research* **66**, 6807-6815 (2006).
34. Huang, B., *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* **66**, 1123-1131 (2006).
35. Serafini, P., Mgebhoff, S., Noonan, K. & Borrello, I. Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer research* **68**, 5439-5449 (2008).
36. Gabilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M. & Kast, W.M. Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol* **166**, 5398-5406 (2001).
37. Hengesbach, L.M. & Hoag, K.A. Physiological concentrations of retinoic acid favor myeloid dendritic cell development over granulocyte development in cultures of bone marrow cells from mice. *The Journal of nutrition* **134**, 2653-2659 (2004).
38. Talmadge, J.E., *et al.* Chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibition reduces immature myeloid suppressor cell expansion. *International immunopharmacology* **7**, 140-151 (2007).
39. Zea, A.H., *et al.* Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer research* **65**, 3044-3048 (2005).
40. Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A.S., Kaiser, L.R. & Albelda, S.M. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 6713-6721 (2005).
41. Ko, H.J., *et al.* A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. *Cancer research* **67**, 7477-7486 (2007).
42. Chow, L.Q. & Eckhardt, S.G. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**, 884-896 (2007).
43. Xin, H., *et al.* Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer research* **69**, 2506-2513 (2009).
44. Janeway, C.A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* **20**, 197-216 (2002).
45. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).

46. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* **4**, 499-511 (2004).
47. Bowie, A. & O'Neill, L.A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *Journal of leukocyte biology* **67**, 508-514 (2000).
48. Slack, J.L., *et al.* Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* **275**, 4670-4678 (2000).
49. Hornung, V., *et al.* Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**, 4531-4537 (2002).
50. Hornef, M.W. & Bogdan, C. The role of epithelial Toll-like receptor expression in host defense and microbial tolerance. *Journal of endotoxin research* **11**, 124-128 (2005).
51. Cristofaro, P. & Opal, S.M. The Toll-like receptors and their role in septic shock. *Expert opinion on therapeutic targets* **7**, 603-612 (2003).
52. Tang, S.C., *et al.* Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 13798-13803 (2007).
53. Caramalho, I., *et al.* Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine* **197**, 403-411 (2003).
54. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* **11**, 373-384 (2010).
55. Matsumoto, M., *et al.* Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* **171**, 3154-3162 (2003).
56. Heil, F., *et al.* The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *European journal of immunology* **33**, 2987-2997 (2003).
57. Latz, E., *et al.* TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature immunology* **5**, 190-198 (2004).
58. Ozinsky, A., *et al.* The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13766-13771 (2000).
59. Takeuchi, O., *et al.* Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International immunology* **13**, 933-940 (2001).
60. Hasan, U., *et al.* Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* **174**, 2942-2950 (2005).
61. Tsan, M.F. & Gao, B. Heat shock proteins and immune system. *Journal of leukocyte biology* **85**, 905-910 (2009).
62. de Weerd, N.A., Samarajiwa, S.A. & Hertzog, P.J. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *The Journal of biological chemistry* **282**, 20053-20057 (2007).

63. Giacometti, A., *et al.* Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *Journal of clinical microbiology* **38**, 918-922 (2000).
64. Gordon, R.J. & Lowy, F.D. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **46 Suppl 5**, S350-359 (2008).
65. Kayser, F.B., K.; Eckert, J.; Zinkernagel, R. *Medizinische Mikrobiologie*, (Georg Thieme Verlag, 2001).
66. Wertheim, H.F., *et al.* The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet infectious diseases* **5**, 751-762 (2005).
67. Hahn, H.K., S.; Schulz, T.; Suerbaum, S. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, (Springer Medizin Verlag, 2008).
68. Jevons, M.P., Coe, A.W. & Parker, M.T. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet* **1**, 904-907 (1963).
69. Kluytmans, J., van Belkum, A. & Verbrugh, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews* **10**, 505-520 (1997).
70. Laupland, K.B., Church, D.L., Mucenski, M., Sutherland, L.R. & Davies, H.D. Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *The Journal of infectious diseases* **187**, 1452-1459 (2003).
71. Safdar, N. & Bradley, E.A. The risk of infection after nasal colonization with *Staphylococcus aureus*. *The American journal of medicine* **121**, 310-315 (2008).
72. Naimi, T.S., *et al.* Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **290**, 2976-2984 (2003).
73. Smith, T., *et al.* Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The New England journal of medicine* **340**, 493-501 (1999).
74. Travassos, L.H., *et al.* Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO reports* **5**, 1000-1006 (2004).
75. O'Riordan, K. & Lee, J.C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clinical microbiology reviews* **17**, 218-234 (2004).
76. Deisenhofer, J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* **20**, 2361-2370 (1981).
77. Wang, R., *et al.* Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. *Nature medicine* **13**, 1510-1514 (2007).
78. Gillet, Y., *et al.* Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* **359**, 753-759 (2002).
79. Lowy, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England journal of medicine* **339**, 520-532 (1998).

80. Warrell, D., Cox, T. & Firth, J. *Oxford Textbook of Medicine: Infection*, (Oxford University Press, 2012).
81. Freemann-Cook, L. & Freemann-Cook, K. *Staphylococcus aureus infections*, (Chelsea House Pub, 2005).
82. Marieb, E. & Hoehn, K. *Human Anatomy & Physiology*, (Pearson Education, 2007).
83. Vollmar, A., Zündorf, I. & Dingermann, T. *Immunologie*, (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2013).
84. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. *Janeway Immunologie*, (Spektrum Akademischer Verlag, 2009).
85. Rieber, N., *et al.* Flagellin Induces Myeloid-Derived Suppressor Cells: Implications for *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis Disease. *J Immunol* **190**, 1276-1284 (2013).
86. Friemel, H. *Immunologische Arbeitsmethoden*, (Gutav Fischer Verlag, 1991).
87. Pezzutto, A., Ulrichs, T. & Burmester, G. *Taschenatlas der Immunologie*, (Georg Thieme Verlag, 2007).
88. Bruhn, H., Junker, R., Schäfer, H. & Schreiber, S. *Labormedizin*, (Schattauer, 2011).
89. Lyons, A. & Parish, C. Determination of lymphocytic division by flow cytometry. *J Immunol Methods* **171**, 131-137 (1994).
90. Lechner, M., Liebertz, D. & Epstein, A. Characterization of Cytokine-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells from Normal Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J Immunol* **185**, 2273-2284 (2010).
91. Moulin, V., Auger, F.A., O'Connor-McCourt, M. & Germain, L. Fetal and postnatal sera differentially modulate human dermal fibroblast phenotypic and functional features in vitro. *Journal of cellular physiology* **171**, 1-10 (1997).
92. Bastian, S.E., Dunbar, A.J., Priebe, I.K., Owens, P.C. & Goddard, C. Measurement of betacellulin levels in bovine serum, colostrum and milk. *The Journal of endocrinology* **168**, 203-212 (2001).
93. Filipazzi, P., *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* **25**, 2546-2553 (2007).
94. Serafini, P., *et al.* Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2691-2702 (2006).
95. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. & Flavell, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738 (2001).
96. Pietrocola, G., *et al.* Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. *Int J Artif Organs* **34**, 799-810 (2011).
97. Ortega, E., Abriouel, H., Lucas, R. & Gálvez, A. Multiple roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic activity and correlation to antibiotic resistance. *Toxins* **2**, 2117-2131 (2010).

98. Dinges, M., Orwin, P. & Schlievert, P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews* **13**, 16-34 (2000).
99. Nagao, M., *et al.* Variations in amount of TSST-1 produced by clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates and allelic variation in accessory gene regulator (*agr*) locus. *BMC Microbiol* **9**(2009).
100. Muraille, E., *et al.* Staphylococcal Enterotoxin B induces an early and transient state of immunosuppression characterized by V beta-unrestricted T cell unresponsiveness and defective Antigen-presenting cell functions. *J Immunol* **158**, 2638-2647 (1997).
101. Solito, S., *et al.* A human promyelocyte-like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood* **118**, 2254-2265 (2011).

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Prof. Dr. Dominik Hartl für die Bereitstellung des interessanten Themas und die inhaltliche Begleitung. Seine fortwährende Unterstützung, die schnelle Beantwortung meiner Fragen und die freundliche Art waren mir bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit eine große Hilfe!

Herzlichen Dank auch an Dr. Nikolaus Rieber für die hervorragende Betreuung dieser Promotion, die unzähligen Hilfestellungen, die Unterstützung mit fachlichem Wissen und die stetige Erreichbarkeit!

Ebenso danken möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe der Pädiatrischen Infektiologie und Immunologie. Ich habe mich in der freundschaftlichen Atmosphäre sehr wohl gefühlt.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Iris Schäfer bedanken. Angefangen von der Einarbeitung stand sie mir in unzähligen Stunden im Labor stets unterstützend zur Seite: Vielen Dank für die große Hilfsbereitschaft und die stets freundliche Art!

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich für die fortwährende Unterstützung danken – ohne sie wäre dies nicht möglich gewesen!

An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz besonders bei meinen Freunden bedanken, die mich seit Beginn des Studiums begleitet, unterstützt und ermutigt haben: Verena, Leonie, Janne, Christoph, Marco und Benni - vielen herzlichen Dank!

Ein ebenso herzlicher Dank gilt schließlich noch Max und Tete: Vielen Dank für alles!