

Aus der Abteilung für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendheilkunde
(Direktor: Univ. - Prof. Dr. med. Holger Lode)
der Universitätsmedizin
der Universität Greifswald

**Untersuchung der Rolle regulatorischer myeloider Zellen im Rahmen
einer Immuntherapie und der Kombination mit dem chimären
Anti-GD₂-Antikörper ch14.18/CHO beim Neuroblastom**

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald

2023

vorgelegt von
Leon Aliya von Lojewski
geboren am 21.01.1996
in Dresden

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Holger N. Lode

2. Gutachter: PD Dr. med. Stefan Fest

Tag der Disputation: 22. Dezember 2023

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	v
Zusammenfassung.....	vi
Abstract.....	vii
Abbildungsverzeichnis.....	viii
Tabellenverzeichnis.....	viii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Neuroblastom und konventionelle Therapie.....	1
1.2 Immuntherapiekonzepte.....	3
1.3 Immunregulatorische und -inhibitorische Effekte	6
1.4 Modulatoren der MRC.....	10
1.4.1 Pro-inflammatorische Zytokine	10
1.4.2 Anti-inflammatorische Zytokine und Enzyme.....	11
1.4.3 Zytokine und Enzyme mit dualer Regulation der Inflammation.....	12
1.4.4 Chemokine und Wachstumsfaktoren	14
1.5 Zielsetzung	15
2 Material.....	17
2.1 Laborgeräte und Hilfsmittel	17
2.2 Chemikalien	17
2.3 Verbrauchsmaterialien	18
2.4 Reaktionskits, Nährmedien und Fertiglösungen.....	18
2.5 Puffer und Lösungen.....	19
2.6 Datenbanken und Software.....	19
2.7 PCR-Primer-Sequenzen	20

3	Methoden.....	21
3.1	Zellkultur.....	21
3.2	Isolierung von Tumorzellen und Splenozyten.....	22
3.3	RNA-Isolierung.....	23
3.4	Primer-Design.....	23
3.5	RT-PCR.....	24
3.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
3.7	Densitometrische Analyse.....	27
3.8	Tierexperimentelle Methoden.....	27
3.8.1	Ethische Erklärung.....	27
3.8.2	Haltung der experimentellen Tiere.....	28
3.8.3	Tumorimplantation und Bestimmung des Tumolvolumens.....	29
3.8.4	Behandlungsschema der tierexperimentellen Versuche.....	29
3.8.5	Sektion der Mäuse, Tumor- und Gewebeaufbereitung.....	30
3.9	Datenauswertung.....	31
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Analyse des Tumorwachstums und der Überlebenszeit.....	33
4.2	Gelelektrophorese und Densitometrische Analyse.....	36
4.3	Expressionsanalyse MRC-modulierender Gene im murinen TME.....	38
4.4	Expressionsanalyse MRC-modulierender Gene in murinen Splenozyten.....	44
4.5	Einfluss der MRC-Depletion auf die Expression MRC-modulierender Gene im Rahmen einer Anti-GD ₂ -Immuntherapie.....	47
5	Diskussion.....	50
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	50
5.2	Einfluss des TME auf die Immunsuppression.....	52
5.2.1	Therapiebedingte immunregulatorische Effekte im TME.....	52
5.2.2	Einfluss der MRC auf die Genexpression.....	53

5.3	Wirkung der Therapeutika.....	55
5.4	Optimierung des In-vivo-Modells	57
5.5	Statistische Methodik	58
5.6	Ausblick und mögliche Anwendung	59
6	Literaturverzeichnis.....	61
	Eidesstattliche Erklärung.....	73
	Veröffentlichungen.....	74
	Danksagung.....	75

Vorwort

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten und Ergebnisse stellen die Grundlage für eine zuvor veröffentlichte Publikation der Arbeitsgruppe in der Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie unter Herrn Professor Lode in einer internationalen Fachzeitschrift dar (Siebert, N., Zumpe, M., von Lojewski, L. A., Troschke-Meurer, S., Marx, M., Lode, H. N. (2020): Reduction of CD11b⁺ myeloid suppressive cells augments anti-neuroblastoma immune response induced by the anti-GD₂ antibody ch14.18/CHO. *OncolImmunology*. 9(1): 1-12). Zu dieser habe ich maßgeblich als Co-Autor beigetragen. In dieser Arbeit können daher ähnliche Textpassagen sowie Abbildungen in der Einleitung, den Methoden, den Ergebnissen und der Diskussion enthalten sein.

In dieser Arbeit wurde gemäß den Richtlinien des "Leitfaden zur geschlechterneutralen Sprache" der Universität Greifswald versucht, eine möglichst geschlechterneutrale Sprache zu verwenden. Falls dies nicht möglich war, wurde das Gender-Sternchen (*) verwendet. Durch diese Maßnahme sollen alle Menschen inkludiert und gleichgestellt werden. Auch soll der Sprachgebrauch erweitert werden, um auch Personen einzubeziehen, die sich nicht in ein binäres Geschlechtersystem einordnen können oder wollen, wie zum Beispiel transsexuelle, transgender und intersexuelle Personen. (Selbst-)Definitionen kann hierdurch Raum gegeben werden.

Zusammenfassung

Das Neuroblastom (NB) stellt als Tumor des sympathischen Nervenstranges den häufigsten extrakraniellen soliden Tumor des Kindesalters dar. Ein Bedarf innovativer Therapien, welche eine effektive Anti-Tumorantwort induzieren, ergibt sich aus dessen heterogener Charakteristik, höchst aggressivem Wachstum und trotz Therapien hohen Rezidivraten der *high-risk*-Patient*innen. In den letzten Jahren konnten durch zunehmende Erkenntnisse im Bereich der Tumormimmunologie verschiedene immuntherapeutische Verfahren etabliert werden. So stellt die Anti-GD₂-Therapie (ch14.18/CHO) einen zentralen klinischen Pfeiler der multimodalen Therapie des *high-risk*-NB dar. Hierbei werden Anti-GD₂-AK verabreicht, die das NB-spezifische Antigen GD₂ erkennen, was zur gezielten Aktivierung des körpereigenen Immunsystems hauptsächlich durch NK-Zellen mit anschließender Tumorzelllyse führt. Herausforderungen ergeben sich aus der Überwindung der immuninhibitorischen Tumorumgebung sowie der Reduzierung natürlicher Regulationsmechanismen.

Vorherige Arbeiten der Arbeitsgruppe haben eine Anti-GD₂-Immuntherapie abhängige Induktion des Immuncheckpoints PD-1/PD-L1 sowie der regulatorischen myeloiden CD11b⁺-Zellen (MRC) gezeigt. Für die vorliegende Arbeit war nun die Rolle der CD11b⁺ MRC von besonderem Interesse. Hierfür wurden CD11b⁺ Zellen in einem syngenem NB-Mausmodell mittels Anti-CD11b-AK blockiert oder durch 5-FU selektiv depletiert, was zu einem deutlich reduzierten Tumorstadium und verbessertem Überleben führte. Zusätzlich wurde mittels RT-PCR die relative Genexpression MRC-modulierender Gene (*Arg1*, *CCL2*, *GM-CSF*, *IDO*, *IFN γ* , *IL-1 β* , *IL-4*, *IL-6*, *IL-6R*, *IL-8*, *IL-10*, *M-CSF*, *M-CSFR*, *iNOS*, *TGF- β 1* und *VEGF-A*) in der Tumormikroumgebung sowie der Milz evaluiert. Hier wurde eine Reduktion der modulierenden Gene nicht nur in der Tumormikroumgebung, sondern sogar peripher durch die Depletion von MRC nachgewiesen. Somit konnte eine negative Rolle der MRC beim NB bestätigt werden.

Diese Ergebnisse stellen eine Grundlage für die kombinierte Immuntherapie aus Anti-GD₂-AK und MRC-Depletion dar. Eine Steigerung der antitumoralen Wirksamkeit im Vergleich zu den entsprechenden Monotherapien wurde gezeigt. Dabei wurden eine verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit und ein reduziertes Tumorstadium festgestellt. Die vorliegenden Ergebnisse liefern daher die Grundlage für einen neuartigen kombinierten Therapieansatz, um die immer noch schlechten Überlebenschancen der *high-risk*-Patient*innen zu verbessern.

Abstract

Neuroblastoma (NB) is a tumor derived of the sympathetic nerve cord and the most common extracranial solid tumor of childhood. A need for new, innovative therapies that induce an effective anti-tumor response arises from its heterogeneous characteristics, highly aggressive growth, and high recurrence rates in high-risk patients despite multimodal therapies. In recent years, increasing knowledge in the field of tumor immunology has led to the establishment of various immunotherapeutic methods. Challenges arise from the identification of a tumor-specific antigen, overcoming the immunoinhibitory tumor environment, and reducing natural regulatory mechanisms. The anti-GD₂ therapy (ch14.18/CHO) represents a central clinical pillar of multimodal therapy for high-risk NB. Here, tumor cells highly expressing GD₂ are recognized and eliminated by anti-GD₂-dependent activation of the immune system.

The previous findings of our group showed that anti-GD₂ immunotherapy led to the induction of the immune checkpoint PD-1/PD-L1 as well as regulatory CD11b⁺ cells, we investigated whether blockade of these regulatory mechanisms leads to an improvement of the antitumor immune response mediated by anti-GD₂ antibodies. This hypothesis was previously confirmed for anti-PD-1 immunotherapy. In this project, we investigated the role of CD11b⁺ myeloid regulatory cells (MRC). First, CD11b⁺ cells were blocked in a syngeneic NB mouse model by an anti-CD11b antibody or selectively depleted by 5-FU. Significantly reduced tumor growth and improved survival was observed for both therapy groups. In addition, RT-PCR analysis was performed to evaluate the expression of MRC-modulating genes (*Arg1*, *CCL2*, *GM-CSF*, *IDO*, *IFN γ* , *IL-1 β* , *IL-4*, *IL-6*, *IL-6R*, *IL-8*, *IL-10*, *M-CSF*, *M-CSFR*, *iNOS*, *TGF- β 1* und *VEGF-A*) in the tumor microenvironment and spleen. Here, a reduction of these modulating genes was not only demonstrated in the tumor microenvironment but also peripherally through the depletion of myeloid regulatory cells. These results provided a rationale to combine the anti-GD₂ immunotherapy with an MRC blockade to further improve the antitumor response against NB.

As hypothesized, the combination of immunotherapy with ch14.18/CHO and 5-FU used for MRC depletion improved survival and reduced tumor growth compared to the respective single-agent treatment even further. Thus, these results may provide a novel therapeutic approach to effectively reduce NB growth and to improve survival of high-risk NB patients.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der aktiven und passiven Immuntherapie gegen Tumoren.....	6
Abbildung 2: Regulationsmechanismen in der Tumorumgebung.....	9
Abbildung 3: Gradienten-PCR zur Bestimmung der annealing-Temperatur für Primerpaare am Beispiel von <i>CCL2</i>	25
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Behandlung mit Anti-CD11b-AK, 5-FU und ch14.18/CHO im tierexperimentellen Versuch.	30
Abbildung 5: Sektion der Versuchstiere.	31
Abbildung 6: Einfluss der Reduktion von MRC auf das Tumorwachstum.	34
Abbildung 7: Einfluss von Anti-CD11b-AK, 5-FU, ch14.18/CHO oder der Kombinationstherapie auf das <i>overall survival</i>	35
Abbildung 8: Visualisierung der Agarose-Gelelektrophorese und Densitometrie der RT-PCR am Beispiel <i>CCL2</i> und <i>GAPDH</i>	37
Abbildung 9: Relative Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen und <i>IL-6</i> -Rezeptor.....	39
Abbildung 10: Relative Genexpression von anti-inflammatorischen Zytokinen und Enzymen.	40
Abbildung 11: Relative Genexpression von dual wirkenden Zytokinen und Enzymen.	42
Abbildung 12: Relative Genexpression von Chemokinen und Wachstumsfaktoren.....	43
Abbildung 13: <i>Heatmap</i> der relativen Genexpression MRC-modulierender Gene in murinen Splenozyten.....	47
Abbildung 14: <i>Heatmap</i> der relativen Genexpression MRC-modulierender Gene im TME nach Immuntherapien.	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gen-spezifische PCR-Programme mit Angabe der individuellen PCR-Bedingungen.....	26
Tabelle 2: Bewertungsskala des Belastungszustandes der Mäuse.....	28
Tabelle 3: Relative Genexpression (<i>CCL2</i>).....	38

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
ACK-Lysepuffer	Ammoniumchlorid-Kalium-Lysepuffer
ADCC.....	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ADCP	antikörperabhängige Phagozytose
AG	Arbeitsgruppe in der Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie
AK	monoklonaler Antikörper
APC.....	antigenpräsentierende Zellen
Arg1.....	Arginase 1
BLAST.....	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
B _{reg}	regulatorische B-Zellen
CCL2.....	C-C-Motiv Chemokinligand 2
CCR	C-C Chemokinrezeptor
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität
cDNA.....	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COG.....	<i>Children's Oncology Group</i>
CTL	zytotoxische T-Zellen
CTLA-4.....	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DB	Dinutuximab beta
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	<i>event-free survival</i>
FC	<i>fold change</i>
FCS.....	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GD ₂	Disialogangliosid
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN γ	Interferon gamma
IL.....	Interleukin
iNOS.....	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
INRG	<i>International Neuroblastoma Risk Group</i>
INRGSS.....	<i>International Neuroblastoma Risk Group Staging System</i>
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
IQR	Interquartilsabstand
JAK/STAT	Januskinase/ <i>signal transducer and activator of transcription</i>
KG	Körpergewicht
LALLF M-V	Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern
Mac-1	Makrophagen-1-Antigen-Komplex
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
M-CSFR	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor-Rezeptor
MDSC.....	<i>myeloide derived suppressor cells</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIBG	Metaiodbenzylguanidin
MRC	regulatorische myeloide Zellen
MW	arithmetischer Mittelwert
MYCN.....	<i>V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived</i>
NaCl	Natriumchlorid
NB.....	Neuroblastom
NCBI.....	<i>National center for Biotechnology Information</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen

NO	Stickstoffmonoxid
NTC	<i>no template control</i>
OS	<i>overall survival</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed death ligand 1</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	reverse Transkription
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TAA	tumorassoziiertes Antigen
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β 1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TH	Tyrosinhydroxylase
T _H -Zellen	T-Helferzellen
T _m	Primer Schmelztemperatur
TME	Tumormikroumgebung
T _{min}	niedrigste Schmelztemperatur
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	tumorspezifisches Antigen
VEGF-A	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A

1 Einleitung

1.1 Neuroblastom und konventionelle Therapie

Krebs ist nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache weltweit und zeichnete im Jahr 2020 für ca. 10 Millionen Todesfälle verantwortlich [1]. In Deutschland erkrankten 2018 etwa 498.000 Menschen neu an Krebs, hierunter 2.255 Kinder im Alter von unter 18 Jahren [2, 3]. Das Neuroblastom (NB) ist mit fast 8 % der häufigste solide, extrakranielle Tumor bei Kindern und ist für 15 % der pädiatrisch-onkologischen Todesfälle verantwortlich [4]. Für erkrankte Kinder, die einer *high-risk*-NB-Gruppe zugeordnet werden, gibt es derzeit noch immer keine zuverlässige und wirkungsvolle Therapie. Eine Todesrate von fast 50 % in der *high-risk*-Gruppe bei Standardtherapie unterstreicht die Notwendigkeit, die bestehenden immuntherapeutischen Therapieansätze zu verbessern bzw. innovative Therapien zu etablieren [5-7].

Die NB-Tumoren entstammen den sympatho-adrenergen Vorläuferzellen der Neuralleiste, wodurch sich der Tumor im ganzen sympathischen Nervensystem bilden kann. Primärtumoren sind vorwiegend im Abdomen lokalisiert und entwachsen hier insbesondere den Nebennieren (36 %) oder liegen extraglandulär (18 %) [8]. Das NB stellt sich sowohl molekularbiologisch als auch klinisch sehr heterogen dar. Der Tumor besitzt ein breites Spektrum unspezifischer Symptome wie Fieber, Abgeschlagenheit, Gewichtsverlust und Knochenschmerzen bis hin zu motorischen Störungen [4]. Allerdings kann die Erkrankung auch gänzlich symptomlos verlaufen oder in Abhängigkeit von Lokalisation, Ausbreitung und dem Vorhandensein paraneoplastischer Syndrome sehr spezifische Symptome aufweisen [4].

Diagnostisch empfiehlt die S1-Leitlinie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie die Quantifizierung verschiedener Stoffwechselprodukte des Tumors im Urin und Serum [9]. Zwei häufige Tumormarker hierbei sind Vanillinmandelsäure und Homovanillinmandelsäure, beides Abbauprodukte des Katecholaminstoffwechsels. Diese können frühzeitig detektiert und zusätzlich als therapeutische Marker zur Therapiekontrolle genutzt werden. Um den Primärtumor und mögliche Metastasen genau zu lokalisieren, wird häufig eine Metaiodbenzylguanidin-(MIBG)-Szintigraphie genutzt [9]. Dabei wird radioaktives Iod (^{131}I oder ^{123}I) an MIBG gekoppelt und über den Blutkreislauf von neuroektodermalem Gewebe

aufgenommen [10]. MIGB ist ein inaktives Harnstoffderivat von Noradrenalin, das durch natriumabhängige Norepinephrin-Transporter selektiv in adrenerge Zellen, wie die des NB, aufgenommen und in Vesikeln gespeichert wird. Hier kann es detektiert werden [10]. Um das Stadium der Erkrankung genauer einzuschätzen, wird eine Biopsie des Tumors entnommen und genetisch untersucht.

In der Klinik haben sich verschiedene Tumorstagingssysteme etabliert. Das *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) teilt den Tumor auf pathologisch-chirurgischer Grundlage post-operativ in fünf verschiedene Gruppen (1 bis 4 und 4S) anhand der Größe, Ausbreitung und chirurgischen Resektion ein [11]. Im Gegensatz hierzu ist das neuere *International Neuroblastoma Risk Group Staging System* (INRGSS) ein präoperatives Stagingssystem auf Basis von 20 *Image Defined Risk Factors*. Dieses teilt den Tumor in regionale (L1/2) oder metastasierte Tumoren (M/Ms) ein [12]. Als eines von sieben Faktoren der prätherapeutischen Risikostratifizierung der *International Neuroblastoma Risk Group* (INRG) definiert das INRGSS zusammen mit verschiedenen Variablen, wie dem Alter bei Diagnosestellung, Tumorhistologie, Tumordifferenzierung sowie molekularbiologischen Faktoren (MYCN-Amplifikation, 11q- und DNA-Ploidie), Risikogruppen für die Therapieeinteilung [12]. Die aktuelle Risikostratifizierung der *Children's Oncology Group* (COG) vereint und ergänzt das INSS und INRGSS. Hierbei werden die Patient*innen in drei Gruppen eingeteilt (anteilig von untersuchten NB-Patient*innen in Prozent): *low-risk* (32 %), *intermediate-risk* (22 %), *high-risk* (46 %) [13].

Auch das klinische Ansprechen auf Therapien stellt sich sehr heterogen dar. Dieses reicht von spontaner Tumorregression über durch die Standardtherapie behandelbare Tumoren bis hin zu Tumoren, die aufgrund ihres aggressiven und metastatischen Wachstums auf keine aktuelle Therapie ansprechen [14]. Die chirurgische Resektion stellt bei lokalen, noch nicht gestreuten Tumoren die häufigste Therapieform dar und kann, je nach Größe und Tumorbiologie, durch Radio- und Chemotherapie ergänzt werden. Dieses Schema ist auch bei *high-risk* und metastasiertem NB als multimodale Hochdosis-Therapie in Kombination mit einer autologen Stammzelltransplantation sowie konsolidierender Therapie mit 13-cis-Retinsäure etabliert [14]. Die Risikogruppen unterscheiden sich insbesondere in ihrem 5-Jahres *event-free survival* (EFS). Dieses beträgt bei der *low-* und *intermediate-risk*-Gruppe

85 – 90 %, bei den *high-risk*-Patient*innen dagegen nur 50 % [13]. Basierend auf erweiterten Erkenntnissen der Tumor-Immunsystem-Interaktionen wurden in den letzten Jahren neue immuntherapeutische Strategien entwickelt, um die Überlebenswahrscheinlichkeit, vor allem der *high-risk*-Patient*innen, zu verbessern.

1.2 Immuntherapiekonzepte

In den letzten 100 Jahren konnten in der Forschung immunmodulierende Effekte beobachtet und weitreichende Erkenntnisse zu Immuntherapien gewonnen werden. Erste Beobachtungen wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts publiziert [15, 16] und dienten als Grundlage für die Etablierung von Bakterien in der Tumortherapie [17, 18]. In den 1970er Jahren konnten die Erkenntnisse der Tumorüberwachung maßgeblich erweitert werden. Das betrifft insbesondere die Erkennung von Tumoren durch das Immunsystem [19], die Struktur und Produktion von monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen spezifisch ausgewählte Antigene [20] sowie die T-Zell-Rezeptor-Struktur (*T cell receptor*, TCR) [21] und die Bindung von Tumorantigenen durch den TCR [22]. Hierdurch rückten das Immunsystem und dessen Manipulation in Hinblick auf eine spezifische Anti-Tumorantwort sowie die Reduktion von inhibitorisch wirkenden Regulationsmechanismen (z. B. Immuncheckpoints) und Regelkreisläufen in den Fokus von Forschung und Klinik. In den 1990er Jahren konnten die ersten Grundlagen gelegt werden für die spätere Immuncheckpoint-Blockade von *programmed cell death protein 1/programmed death ligand 1* (PD-1/PD-L1) [23] und *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA-4) [24] in Tumormodellen. Um die Überlebenswahrscheinlichkeiten von Patient*innen mit einem therapieresistenten NB zu verbessern, wurden seitdem neue, oft kombiniert angewendete Immuntherapien entwickelt [25]. Das Ziel hierbei war es, das Immunsystem der Patient*innen zu aktivieren bzw. zu stimulieren, so dass Tumorzellen durch körpereigene Effektormechanismen selektiv erkannt und getötet werden.

Die Identifizierung von Tumoren im Körper durch das Immunsystem basiert auf der Erkennung von tumorspezifischen Antigenen (TSA), die unter anderem durch onkogene Treibermutationen hervorgerufen werden [26]. Die TSA, auch als Neoantigene bezeichnet, werden ausschließlich von Tumorzellen exprimiert und somit durch das Immunsystem als körperfremd erkannt [26]. Tumorassoziierte Antigene (TAA) sind wiederum Antigene, die prädominant von Tumorzellen, seltener aber auch von

gesunden Zellen exprimiert werden [27]. Hierdurch erkennt das Immunsystem sie nicht als fremd [27]. Die bekanntesten TAA, die für das NB beschrieben wurden, sind das Glykolipid Disialogangliosid (GD₂) [28], das Onkoprotein MYCN [29, 30], die Tyrosinhydroxylase (TH) als Schrittmachereozym der Katecholaminsynthese [31], die anaplastische Lymphomkinase [32] sowie das Apoptose-hemmende Protein Survivin [33, 34]. Die TSA und TAA stellen ein mögliches Ziel von aktiven und passiven Immuntherapien dar und stehen im Fokus verschiedener Untersuchungen.

Weitreichende Erwartungen werden an die Entwicklung und Umsetzung von **aktiven Immuntherapien** gestellt. Hierbei werden Vakzine mit TAA-Strukturen oder DNA-Sequenzen, die für TAA oder deren Epitope kodieren, verabreicht (Abbildung 1A). Die Vakzinierung soll zur Induktion der zellulären (z. B. Aktivierung TAA-spezifischer zytotoxischer T-Zellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL)) oder humoralen Immunantwort (z. B. Bildung TAA-spezifischer AK) führen. Das Antigen wird von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC), durch deren Haupthistokompatibilitätskomplex-I (*major histocompatibility complex*, MHC), den naiven CD8⁺-T-Zellen präsentiert. Dabei bewirkt die Interaktion die Aktivierung und Differenzierung der CD8⁺-T-Zellen zu CTL und T-Gedächtniszellen, welche ein langanhaltendes zelluläres Immungedächtnis bewirken [35]. Über die Präsentation des Antigens durch den MHC-II-Komplex auf APC induziert die Vakzinierung die humorale Immunantwort. Dabei binden naive CD4⁺-T-Zellen mit ihren TCR das von APC präsentierte Antigen. Aktivierte B-Zellen, welche das gleiche Antigen über MHC-II präsentieren, binden an den TCR der aktivierten CD4⁺-T-Zellen. Durch multiple Rezeptor-Liganden-Interaktionen und Zytokine differenzieren sich diese B-Zellen zu Plasmazellen, welche spezifische, gegen das Tumorantigen gerichtete, AK produzieren [36, 37]. Außerdem kann durch die Anwendung von Adjuvantien (z. B. Zytokine) das Immunsystem zusätzlich stimuliert werden, um die anti-tumoralen Effekte des Vakzins zu erhöhen [38]. Derzeit besteht allerdings noch keine effektive Vakzintherapie für NB-Patient*innen, so dass weitere Forschungsergebnisse und klinische Testphasen abzuwarten sind.

Große Fortschritte wurden in den letzten Jahren hingegen in der Entwicklung und Implementierung AK-basierter **passiver Immuntherapien** beim NB gemacht (Abbildung 1B). Dabei handelt es sich beispielsweise um tumorspezifische mAK

(z. B. gegen das GD₂ auf NB-Zellen), die das TAA und/oder TSA auf Tumorzellen binden und diese hierdurch u. a. für Effektorzellen markieren [39]. Die Effektorzellen, vorrangig natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Granulozyten, binden mit ihren Fc-gamma-Rezeptoren die Fc-Region der mAK. Hierdurch lösen sie eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) aus, die zur Tumorzelllyse führt [40]. Weitere Möglichkeiten der Tumorzelllyse durch die mAK bestehen in der komplementabhängigen Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) und der antikörperabhängigen Phagozytose (*antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP). Weiterhin stehen verschiedene zelluläre Therapieansätze wie z. B. CAR-T-Zellen oder Tumordinfiltrierende Lymphozyten) zur Verfügung [41, 42]. Eine effektive Anti-GD₂-Immuntherapie mit Dinutuximab beta (DB, ch14.18/CHO) in Kombination mit IL-2 und GM-CSF ist bereits in der klinischen Anwendung bei *high-risk-NB-Patient*innen* etabliert. Hierbei konnte eine Verbesserung des 5-Jahres EFS um 10,5 % und des 5-Jahres *overall survival* (OS) um 16,6 % erreicht werden [43]. Der Erfolg passiver Immuntherapien ist im Gegensatz zur aktiven Immunisierung von einer wiederholten Gabe der Effektormoleküle oder -zellen abhängig.

Das Immunsystem, welches eine Homöostase und somit ein Gleichgewicht von stimulierenden und hemmenden Faktoren anstrebt, wird durch die genannten Therapieverfahren gezielt stimuliert. Dieser Einfluss kann eine generalisierte Gegenregulation des Körpers und damit eine Immunsuppression bewirken [44]. Diese Gegenregulation kann unter anderem durch Immuncheckpoints orchestriert werden, welche als inhibitorische Modulatoren des Immunsystems eine Autoregulation bewirken können (u. a. Einfluss auf Antigenerkennung durch TCR). Auch Tumorzellen machen sich diese Funktion zunutze, um einer Anti-Tumor-Immunantwort zu entkommen [45]. Im Rahmen einer AK-Therapie kann sich das Sekretionsverhalten von Zellen des Immunsystems und die Expression von Oberflächenmarkern (u. a. Immuncheckpoints) verändern. Durch eine Tumor-bedingte erhöhte Ausschüttung von löslichen Faktoren, der Expression inhibitorischer Moleküle sowie der Reduktion immunogener Oberflächenmarker (*cancer immunoeediting*) kann eine immunsuppressive Tumorumgebung geschaffen werden. Diese Bedingungen können Tumorzellen ermöglichen, der Erkennung durch das

Immunsystem zu entkommen [44]. Diese Tumor-assoziierte Immunsuppression kann die Wirkung einer Immuntherapie reduzieren.

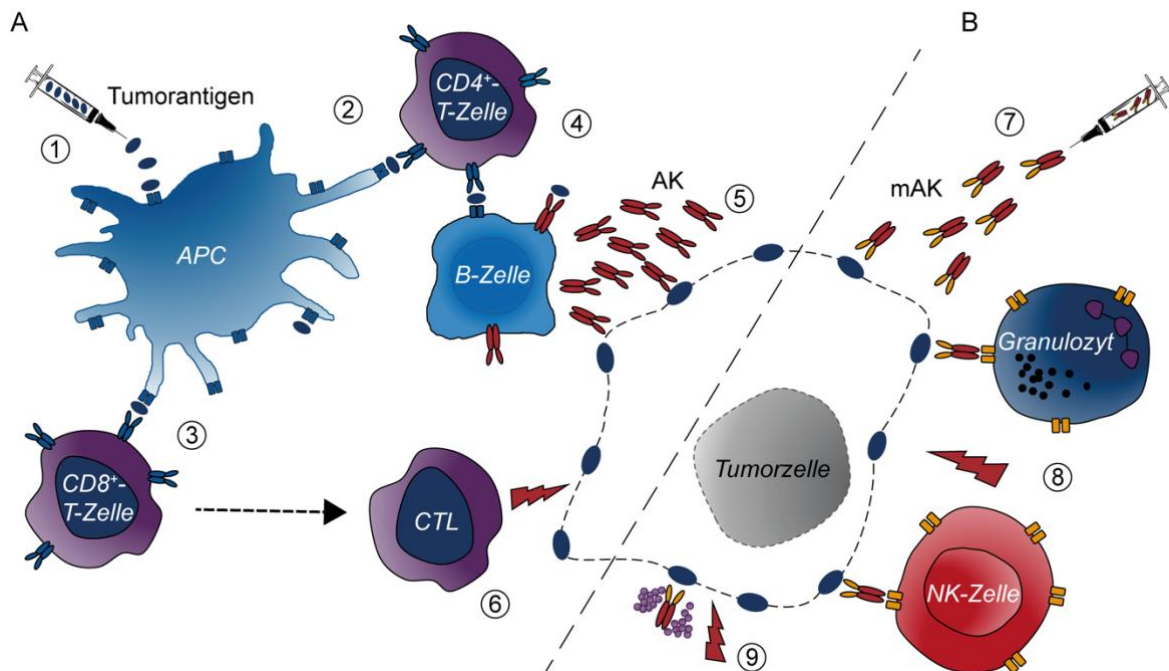


Abbildung 1: Schematische Darstellung der aktiven und passiven Immuntherapie gegen Tumoren. (A) Im Rahmen aktiver Immuntherapien wird das verabreichte Tumorantigen durch APC aufgenommen (1). Die prozessierten Antigene werden naiven CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen über den MHC-II- (2) bzw. MHC-I-Komplex (3) präsentiert. Durch Zell-Zell-Interaktion (u. a. TCR/MHC-II, CD40L/CD40) sowie Zytokinausschüttung interagieren die aktivierten CD4⁺-T-Zellen mit B-Zellen, welche das gleiche Antigen gebunden haben (4). Hierdurch können sich diese zu Plasmazellen differenzieren und tumorspezifische AK produzieren (5). Weiterhin können durch die APC-Interaktion aktivierte CD8⁺-T-Zellen (3) Tumorzellen erkennen und diese töten (6). (B) Bei passiven Immuntherapien werden z. B. Tumor-spezifische AK verabreicht, die antitumorale Effektormechanismen induzieren (7). Die Tumorzellen werden hierbei hauptsächlich antikörperabhängig mittels ADCC (8) und CDC (9) sowie durch unspezifische Mechanismen (u. a. CTL) (6) lysiert. Modifiziert nach Schuster et al. [39].

1.3 Immunregulatorische und -inhibitorische Effekte

Im Rahmen einer gesunden Immunantwort werden Immunzellen reguliert, um eine überschießende Reaktion gegen körpereigene Zellen, eine Autoimmunreaktion, zu verhindern und die Zahl funktionsloser Zellen zu minimieren. Hierfür gibt es verschiedene aktive und passive Mechanismen. Eine zu geringe Antigenpräsenz hat eine Nichtaktivierung von T-Zellen (Ignoranz) zur Folge [46]. Die Apoptose der T-Zellen wird durch zu starke Antigen-Reize bzw. eine gehäufte Reaktivierung der T-Zellen ausgelöst (Deletion) [47]. Fehlende kostimulatorische Signale bzw. die Aktivierung inhibitorischer Moleküle und Rezeptoren (z. B. die Immuncheckpoints CTLA-4 und PD-1/PD-L1) führen zur Anergie der Zellen [48]. Zusätzlich kann eine Dämpfung der Immunantwort durch immunsuppressive

Zellpopulationen wie regulatorische T- (T_{reg}) und B-Zellen (B_{reg}), regulatorische myeloide Zellen (*myeloid regulatory cells*, MRC) oder auch durch immunsuppressive Zytokine und Wachstumsfaktoren wie z. B. Interleukin (IL)-10 und *transforming growth factor beta 1* (TGF- β 1) ausgelöst werden [49]. Bei Tumorpatient*innen kann sich diese natürliche Regulation des Immunsystems negativ auf die Anti-Tumor-Immunantwort oder das Ansprechen auf eine Therapie auswirken [49]. Die Tumorentstehung kann auch durch die Bildung von chronischen Entzündungen im Gewebe, unterstützt durch die Fehlregulation von Chemokinen und Zytokinen (u. a. C-C-Motiv Chemokinligand 2 (CCL2), IL-1 β , IL-6, IL-8, Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)) [50] sowie der Akkumulation von MRC [51], gefördert werden. Eine vielversprechende Möglichkeit die anti-tumorale Wirksamkeit von Therapien zu verbessern stellt daher die Blockade immuninhibitorischer Faktoren und Zellen wie den erwähnten T_{reg} , B_{reg} und MRC dar.

Die bekanntesten immunhemmenden Zellen sind die weitreichend erforschten T_{reg} (CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺/CD127⁻) [52]. Sie besitzen ein breites Wirkspektrum und können durch die Sezernierung von IL-10 und TGF- β 1 sowie die Modulierung der Funktion von APC eine Suppression von CTL und NK-Zellen bewirken (Abbildung 2) [53]. Weiterhin konnte die Inhibition von Effektorzellen durch die Expression von Immuncheckpoints und direkte Zell-Zell-Kontakte mit inhibitorisch-wirkenden Zellen beobachtet werden [53]. Diese Mechanismen können in einer starken Hemmung der Immunantwort resultieren.

In den letzten Jahren erlangte die Forschung weitere Erkenntnisse zu der heterogenen Population der B_{reg} , welche u. a. durch die Antigenexpression CD19⁺/PD-1⁺/PD-L1⁺ charakterisiert ist. Diese kann durch die Sekretion von Zytokinen Effektorzellen inhibieren und immuninhibitorische Zellpopulationen (z. B. T_{reg} und MRC) stimulieren (Abbildung 2) [54]. Außerdem können B_{reg} die Differenzierung von Makrophagen und T-Zellen hin zu einem immunsuppressiven Phänotyp induzieren. Weiterhin wird die Immunantwort durch die Expression des Immuncheckpoints PD-1/PD-L1 inhibiert [55]. Diese immunsuppressiven Funktionen vermitteln die Inhibition einer anti-tumoralen Immunantwort und umschreiben eine pro-tumorale Wirkung der B_{reg} .

Der Fokus dieser Doktorarbeit liegt auf der Population der heterogenen **MRC** (u. a. des humanen Phänotyps CD11b⁺/Lin⁻/CD33⁺/HLA⁻/DR⁻), welche als potente

Regulatoren der tumorassoziierten Immunsuppression betrachtet werden [56]. Diese unreifen Zellen myeloider Abstammung mit wenig ausdifferenzierten Fähigkeiten werden in der Literatur auch als suppressive Zellen myeloider Abstammung (*myeloid derived suppressor cells, MDSC*) bezeichnet. Eine detaillierte Klassifizierung wird aufgrund der regen Veränderung der Oberflächenmarker durch die Exposition gegenüber verschiedenen inflammatorischen Mediatoren in der Tumormikroumgebung (*tumor microenvironment, TME*) erschwert [57]. Daher wurde für diese Arbeit vorrangig die Nomenklatur der unspezifischen MRC übernommen, die auf den Erkenntnissen des *European Network of Investigators Triggering Exploratory Research on Myeloid Regulatory Cells* basiert [58].

Alle MRC haben zwei gemeinsame Eigenschaften: die schnelle Expansion im Tumorgewebe und ihre immunmodulierende Aktivität [58]. Erstere basiert auf dem Zusammenspiel der durch den Tumor ausgelösten pathologischen Hämatopoese, einer *tumor-derived factor*-bedingten Expansion von myeloiden Zellen sowie einer erhöhten Konzentration von Chemokinen (u. a. CCL2, Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), IL-8, Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF), TGF- β 1 und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A (*Vascular Endothelial Growth Factor A, VEGF-A*)) [59, 60]. Die zweite Eigenschaft der Immunmodulation der MRC ist vielfältig (Abbildung 2) und gründet u. a. auf der Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine (u. a. IL-1 β , IL-6 und TNF α), welche eine chronische Entzündung induzieren, das TME modulieren und die Tumorgenese begünstigen können [61, 62]. MRC können im Krankheitsverlauf neben der direkten Modulation des TME auch andere Immunzellen durch die Sekretion von Effektormolekülen wie z. B. Arginase 1 (Arg1), IL-4, IL-10, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (*inducible nitric oxide synthase, iNOS*), reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species, ROS*) und TGF- β 1 beeinflussen und so eine pro-tumorale Umgebung bilden [63, 64]. Hierbei können immuninhibitorische T_{reg} stimuliert und CTL sowie NK-Zellen gehemmt werden [65]. Auch direkte Zell-Zell-Kontakte der MRC scheinen eine Immunsuppression zu bewirken [66]. Zusammenfassend können MRC durch die Inhibierung von Effektorzellen und der Stimulation von immuninhibitorischen Zellpopulationen sowie der direkten Modulation der Tumorumgebung durch Zytokine und Wachstumsfaktoren aber auch durch einen

direkten Zell-Zell-Kontakt zu einem pro-tumoralen TME beitragen und die Funktionen des Immunsystems negativ modulieren.

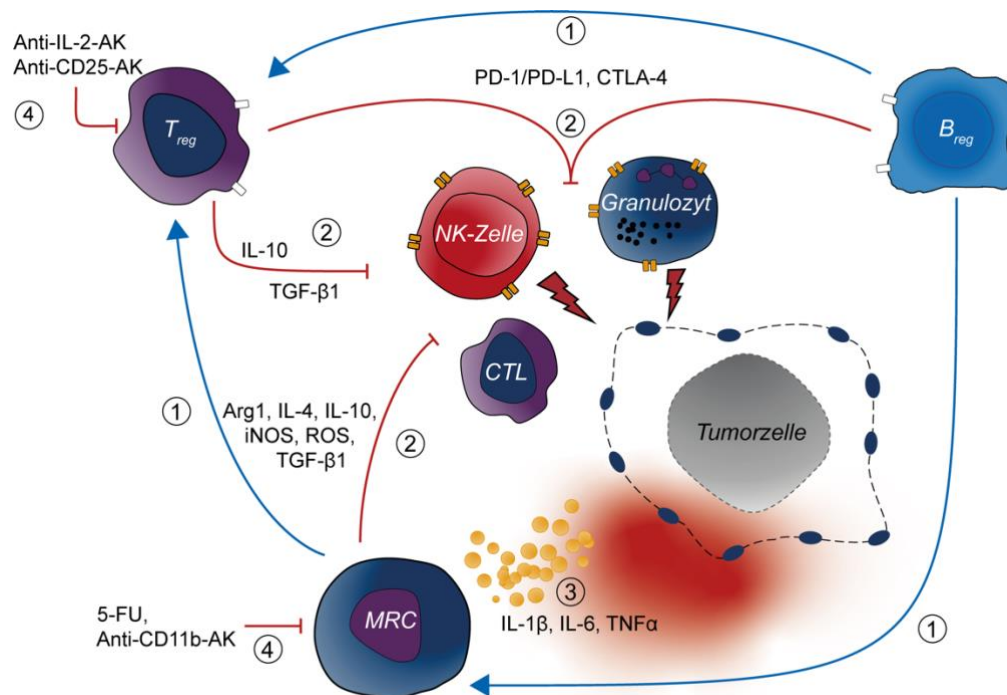


Abbildung 2: Regulationsmechanismen in der Tumorumgebung. In der Tumorumgebung werden immunregulatorische Zellen zur Gegenregulation einer aktiven Immunantwort im Sinne der Homöostase aktiviert. Hierbei spielen insbesondere Breg, Treg und MRC eine zentrale Rolle (1). Diese können über verschiedene Mechanismen (u. a. Zytokinsekretion) die Immunantwort gegen Tumorzellen inhibieren (2). Durch die kontinuierliche Präsenz inflammatorischer Zytokine und Gewebefaktoren einer Inflammation in der Tumorumgebung wird eine chronische Entzündung gestärkt (3). Mögliche Therapieoption zur Begrenzung der immunmodulatorischen Treg- und MRC-Aktivität stellen Antikörper sowie verschiedene Chemo- und Immuntherapien (u. a. 5-FU, Anti-CD11b-AK) dar (4). Modifiziert nach Salomon et al. [67].

In humanen Tumoren und verschiedenen Tumormausmodellen konnte eine negative Korrelation zwischen der Zellzahl von MRC im Blut bzw. Tumorgewebe und dem Tumorstadium, der Prognose sowie dem Gesamtüberleben der Patient*innen gezeigt werden [68, 69]. Eine erhöhte Tumordinfiltration durch MRC in metastatischen Tumoren im Vergleich zu lokalen Tumoren konnte insbesondere beim NB durch Asgharzadeh et al. gezeigt werden [70]. Eine Assoziation besteht zusätzlich zwischen schlechterer Prognose und der erhöhten Expression von Genen im Tumormilieu, welche in Zusammenhang mit MRC stehen [70]. Auch in einem von unserer AG etablierten NB-Mausmodell konnte im Tumorgewebe eine starke Infiltration CD11b⁺-Zellen, die hauptsächlich aus myeloiden Zellen bestehen, gezeigt werden [71]. Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe (AG) ergaben, dass die Induktion des Immuncheckpoints PD-1/PD-L1 nach DB-vermittelter

GD₂-spezifischer ADCC gegen NB-Zellen *in vitro* durch eine CD11b-Blockade deutlich reduziert werden konnte, was zur Steigerung der ADCC führte [72]. Die Beobachtung der starken Tumordinfiltration von CD11b-positiven Leukozyten bei der Hemmung der GD₂-spezifischen ADCC gegen NB-Zellen und die beschriebene Rolle myeloider Zellen in der Vermittlung von pro-tumoralen Mechanismen im Tumormilieu gaben unserer AG Anlass für weitere Analysen im Rahmen dieser Arbeit. Diese werden ausführlicher in der Zielsetzung beschrieben.

1.4 Modulatoren der MRC

Die Arbeit untersucht die Rolle der MRC im Kontext einer GD₂-gerichteten Immuntherapie in Kombination mit einer MRC-Blockade; hierfür wird die relative Expression von verschiedenen MRC-modulierenden Genen analysiert. Die Genprodukte der analysierten Gene lassen sich, abhängig von ihrer vorherrschenden Rolle im TME, in (I) pro-inflammatorische Zytokine, (II) anti-inflammatorische Zytokine, (III) Zytokine mit einer dualen Regulation der Inflammation sowie (IV) Chemokine und Wachstumsfaktoren gruppieren. Diese weisen verschiedene Wirkweisen und Relevanz im TME auf, die näher beleuchtet werden.

1.4.1 Pro-inflammatorische Zytokine

Chronisch entzündete Gewebe stehen in engem Zusammenhang mit der Entartung von Zellen und der Formierung eines Tumors [50]. Hierfür untersucht die Arbeit die jeweilige Genexpression der inflammatorischen Zytokine **IL-1 β** und **IL-6** sowie dem **IL-6R**. Lokale Mechanismen dieser Zytokine sind hierbei die Bildung durch, Wirkung auf oder Interaktion mit MRC im TME. IL-1 β und IL-6 werden im TME sowohl durch Tumorzellen als auch MRC [73, 74] sezerniert. Durch die vermehrte Aktivierung von APC und die Induktion von B-Zellen (IL-1 β) [73] sowie die Induktion einer Akute-Phase-Reaktion mit der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren durch IL-6 [74] wird eine Immunantwort induziert und eine inflammatorische Umgebung hergestellt. Mittels der Aktivierung von *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) (IL-1 β und IL-6) sowie dem JAK/STAT3-Signalweg (IL-6) kann die Transkription weiterer pro-inflammatorischer Gene induziert sowie MRC rekrutiert werden [74-76]. Hierdurch kann IL-6 die Sezernierung von VEGF-A verstärken, was eine vermehrte Angiogenese zur Folge hat und die vaskuläre Permeabilität erhöht [74]. Das sind zwei pathologische Merkmale einer Entzündung. Weiterhin

können die durch IL-6 modulierten Veränderungen der epigenetischen Suppression von Tumorsuppressorgenen und die erhöhte Expression anti-apoptotischer Regulatoren in Tumorzellen die Tumorgenese begünstigen [62]. Die dysregulierte Sezernierung der inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 sowie des IL-6R kann somit die chronische Entzündung aufrechterhalten und das Tumorwachstum stärken.

Zusammengefasst betrachtet spielen diese Zytokine offenbar eine zentrale Rolle in der Bildung eines chronisch entzündeten TME und dadurch in der Tumorgenese, Angiogenese und Metastasierung.

1.4.2 Anti-inflammatorische Zytokine und Enzyme

Eine starke Inflammation des Gewebes bewirkt im Sinne der Homöostase sowie des Schutzes von gesunden Zellen stets eine Gegenregulation durch anti-inflammatorische Zytokine und Prozesse [77]. Dieser Mechanismus kann allerdings auch eine nötige Immunreaktion, wie z. B. die Eliminierung von Tumorzellen, inhibieren und es dem Tumor ermöglichen, der Überwachung des Immunsystems zu entkommen [78]. Hierbei kommt es durch tumorinduzierte Interaktionen zur Sezernierung von anti-inflammatorischen Mediatoren, welche ein immunsuppressives TME zum Schutz des Tumors bilden können. Die in dieser Arbeit untersuchten Gene ***Arg1***, ***Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)***, ***IL-4*** und ***IL-10*** kodieren für Moleküle, welche Immunzellen und die Zytokinausschüttung im TME modulieren können. Induziert werden die Genprodukte durch verschiedene Mechanismen. Hierbei spielen zur Induktion

- der *Arg1* Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- β 1 [79] sowie Prostaglandine [80],
- der *IDO* die vermehrte Transkription der JAK/STAT-Kinase [81],
- des *IL-4* positive Feedback-Loops [82] und
- des *IL-10* durch CD4⁺-T-Zellen sezerniertes IL-2 und IL-27 [83] eine zentrale Rolle.

Die genannten Regulationsmechanismen erhöhen die jeweilige Expression von *Arg1* in MRC und Makrophagen [79] und von *IDO* in APC, MRC und Tumorzellen [81, 84]. Vermehrt sezerniert wird IL-4 durch APC, Typ-2-T-Helferzellen (T_H2) und Granulozyten [82], IL-10 zusätzlich durch weitere Immunzellen wie B-Zellen, CTL, DC, Makrophagen, MRC und NK-Zellen [85].

Die vier untersuchten Mediatoren beeinflussen die Aktivität und Differenzierung von T-Zellen; IL-4 und IL-10 besitzen zusätzliche Effekte auf Makrophagen. *Arg1*

depletiert in der Zellumgebung Arginin; dies führt zu einer Reduktion der Expression des T-Zell-Rezeptors, der Effektormechanismen und der T-Zell-Proliferation (Stagnation in G₀/G₁-Phase). Potenziert wird dieser Mechanismus durch die synchrone Wirkung von iNOS, wodurch die Apoptose der T-Zellen induziert wird [57, 79]. Der Abbau von Tryptophan durch die IDO inhibiert CTL und die T-Zell-Differenzierung zu T_H17-Zellen. Das Zwischenprodukt Kynurenin steigert zusätzlich die Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Zellen zu T_{reg} [86]; dies führt z. B. in einem Melanom-Mausmodell von Holmgaard et al. zur Akkumulation suppressiver CD11b⁺-Zellen im TME [87]. Die Sezernierung von IL-4 bewirkt die Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen zu T_H2; T_H1 werden hingegen supprimiert. Weiterhin werden Monozyten zu einer Makrophagen-Population mit immunsuppressiven Eigenschaften, bekannt als M2-Makrophagen, aktiviert; diese exprimieren vermehrt Arg1 und IL-10 [82]. Eine anti-tumorale Reaktion durch die direkte Inhibierung der Zytotoxizität von CTL wird dadurch unterdrückt [88]. Als anti-inflammatorisches und Zellprotektives Zytokin inhibiert IL-10 DC und Makrophagen. Dies resultiert in geringeren Konzentrationen inflammatorischer Mediatoren wie GM-CSF, IFN γ , IL-2 und TNF α sowie der Induktion von IL-10-sezernierenden T_{reg} [85]. Die Expression von MHC-II auf APC, DC und Makrophagen wird durch IL-10 reduziert und die Antigen-spezifische Immunreaktion hierdurch supprimiert [89]. Weiterhin konnte eine positive Korrelation zwischen erhöhten IL-10 Konzentrationen und einer schlechten Tumorprognose nachgewiesen werden [90].

Insgesamt betrachtet induzieren diese Genprodukte verschiedene Mechanismen, welche die antitumorale Immunreaktion im TME inhibieren und die Wirkung der MRC verstärken.

1.4.3 Zytokine und Enzyme mit dualer Regulation der Inflammation

Die stringente Einteilung in pro- und anti-inflammatorisch wirkende Botenstoffe ist nicht überall möglich, da Zytokine bei Tumorpatient*innen abhängig von Konzentration im TME, Resistenzbildung, Kostimulanzen und Zeitpunkt der Tumorgenese unterschiedliche Wirkungen auf Zellpopulationen ausüben können. Die hier vorgestellten Genprodukte Interferon gamma (IFN γ), iNOS und TGF- β 1 wirken heterogen und können verschiedene Reaktionen in Bezug auf MRC, TME und Tumorgewebe ausüben. Die Mediatoren werden durch eine Reihe von Immunzellen exprimiert:

- IFN γ durch CD4⁺-T-Zellen, CTL und NK-Zellen nach Stimulation durch inflammatorische Stimuli oder Antigene [91],
- iNOS vornehmlich auf Makrophagen nach Stimulation durch diverse Zytokine (u. a. IFN γ , IL-1 β , TNF α) und Lipopolysaccharide [92] und
- TGF- β 1 durch B-Zellen, MRC und T_{reg} [93].

Hieraus folgen diverse Mechanismen der anti-tumoralen Immunreaktion:

- IFN γ aktiviert Makrophagen und NK-Zellen, steigert die Zytotoxizität von CTL und NK-Zellen [94], erhöht die MHC-I-Expression auf Tumorzellen und hierdurch die Erkennung durch CTL [95], beeinflusst den Immunglobulinklassenwechsel, induziert die Immunglobulinproduktion von B-Zellen [96] und inhibiert das Tumorstadium durch Zellzyklusarrest und Supprimierung der Tumorangio-genese [97].
- TGF- β 1 wirkt in frühen Phasen der Tumorgenese durch die Blockade des Zell-Zyklus, die Induktion der Apoptose bei geschädigten Zellen sowie die Unterdrückung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen als Tumorsuppressor [93].
- Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO) besitzt eine konzentrationsabhängige Wirkung, so dass hohe Konzentrationen direkt die Zell-Apoptose durch oxidativen Stress induzieren und über diese Inflammation anti-tumoral wirken können [98, 99].

Die untersuchten Genprodukte wirken jedoch auch immunsuppressiv. So verhindern niedrige NO-Konzentrationen die Apoptose und begünstigen die Tumorgenese [98]. Durch eine Dysregulation der Konzentration im TME und Selektion von Tumorzellen kann auch IFN γ die Anti-Tumorantwort durch die Reduktion der Antigenexpression auf Tumorzellen unterdrücken [97]. Weiterhin kann IFN γ die Expressierung der Immuncheckpoints PD-L1 und CTLA-4 auf Tumor-, Stromazellen und Monozyten induzieren [100-102]. Auch die iNOS kann, durch die bereits beschriebenen Synergien mit Arg1 durch den L-Argininmangel, die T-Zell-Aktivität hemmen und deren Apoptose bewirken [79].

Bei Tumoren mit hohen TGF- β 1-Konzentrationen konnte eine Resistenz gegenüber den anfänglichen anti-tumoralen Mechanismen gezeigt werden. Diese Tumoren zeichneten sich durch erhöhte Tumorprogression, Metastasierung, Angiogenese und einen schlechteren Endpunkt aus [103]. So induzierte TGF- β 1 über Foxp3 die

Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen zu T_{reg} [104], supprimierte CTL sowie NK-Zellen [60] und hemmte die Zytotoxizität von CTL und NK-Zellen durch die Inhibierung von Genen (u. a. für Perforine und Granzyme) und Rezeptoren [93].

Zusammengefasst stellen sich diese Mediatoren als eine heterogene Gruppe dar, welche abhängig von Konzentration im Gewebe, Kostimulanzen, Resistenzbildung und Zeitpunkt der Tumorgenese sowohl pro- als auch anti-tumorale sowie anti-inflammatorische Eigenschaften aufweisen.

1.4.4 Chemokine und Wachstumsfaktoren

Abseits der inflammationsbedingten Einteilung von Botenstoffen sind auch Chemokine und Wachstumsfaktoren im Rahmen der Tumorgenese von Relevanz. Die Produkte der analysierten Gene **CCL2**, **GM-CSF**, **IL-8** und **M-CSF**-Rezeptor (**M-CSFR**) bilden wichtige Pfeiler, da sie die Zellbildung im Knochenmark und Akkumulation von verschiedenen Zellpopulationen im TME beeinflussen. **VEGF-A** stellt den treibenden Faktor der Angiogenese dar [105] und ermöglicht erst durch die Neovaskularisierung des TME ein Tumorwachstum über zwei Millimeter Größe [106].

CCL2, GM-CSF, IL-8, M-CSF/R und VEGF-A werden durch pro-inflammatorisch wirkende Mediatoren (u. a. IL-1 β , IL-6, TGF- β 1, TNF α , NF- κ B, ROS, Hypoxie) induziert [106-109] und von MRC und Tumorgewebe (CCL2, IL-8) [109, 110], sowie DC, Endothelzellen und Fibroblasten (GM-CSF, IL-8, M-CSF, VEGF-A) [105, 108, 109] sezerniert.

Als Chemokine beeinflussen sie die Chemotaxis myeloider Zellen und wirken hierdurch auf die zelluläre Zusammensetzung des TME. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion kann CCL2 verschiedene Zellpopulationen (DC, Makrophagen, Monozyten, MRC, NK-Zellen sowie T-Zellen) rekrutieren [111], allerdings ist die Wirkung Rezeptor-abhängig. Für den CCL2/C-C-Chemokinrezeptor (CCR)-2-Signalweg konnte eine zentrale, vorantreibende Rolle des Tumorzellwachstums, der Zellinvasion und der -migration im Rahmen des metastatischen Prozesses sowie der Chemotaxis von MRC und T_{reg} gezeigt werden [110]. Für GM-CSF konnte eine Wirkungsabhängigkeit zur Konzentration im Gewebe beschrieben werden [112]. Geringe Konzentrationen stimulierten die Differenzierung von DC und verbesserten die Antigenpräsentation, wodurch die Immunreaktion gestärkt werden konnte. Bei hohen GM-CSF-Konzentrationen wurden hingegen vermehrt MRC rekrutiert, T_{reg}

induziert und CTL inhibiert; dies führte zur Hemmung der Anti-Tumorantwort [112]. Uschach et al. konnten weiterhin darlegen, dass die rekrutierten myeloiden Zellen unter Einfluss von IL-1 β , IL-6 und TNF α zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp differenzierten und hierdurch eine chronische Entzündung im TME aufrechterhalten werden konnte [108]. Die Bindung von IL-8 am CCR1/-2 wirkte chemotaktisch auf MRC [113] und induzierte durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Proteasen im TME die Angiogenese, Tumorzellmigration, -invasion und -proliferation, Metastasierung, Chemoresistenz sowie die Evasion der Tumorzellen vor der Apoptose [114, 115]. Auch M-CSF rekrutierte myeloide Zellen aus dem Knochenmark und induzierte sowohl die Extravasation in das TME [116] als auch die Induktion eines suppressiven Phänotyps [108]. Dieser war durch hohe CCL2- und IL-10-Expression sowie geringe Antigenpräsentation (MHC-II^{low}) definiert [108]. VEGF-A stellte den entscheidenden Faktor für die Blutversorgung des wachsenden Tumors sowie möglicher Metastasen dar. Ein derartiger Zusammenhang mit einer erhöhten Expression von VEGF-A konnte in verschiedenen Tumoren gezeigt werden [117], u. a. auch in Knochenmetastasen des NB [118].

Zusammenfassend lässt sich die hohe Relevanz der Chemokine auf die Rekrutierung und Chemotaxis von myeloiden Zellen, insbesondere MRC, sowie deren weitere Differenzierung aufzeigen. VEGF-A stellt weiterhin die Grundlage für das weitere Tumorstadium und die Metastasierung dar.

1.5 Zielsetzung

Die noch immer schlechte Prognose der *high-risk*-NB-Patient*innen zeigt den dringenden Bedarf einer Therapieverbesserung und Entwicklung von neuen innovativen Therapiestrategien auf. In dieser Arbeit wird der Fokus auf die Depletion der MRC im Rahmen einer GD₂-gerichteten Immuntherapie beim NB gelegt. Basierend auf den bereits gewonnenen Erkenntnissen unserer AG sowie weiterer Untersuchungen in Zusammenhang mit CD11b⁺-Zellen und MRC wird die Hypothese aufgestellt, dass eine möglichst selektive Blockade der MRC das Tumorstadium bestmöglich inhibiert, das Überleben verbessert und die inflammatorische Umgebung des TME reduziert. Es wird darüber hinaus postuliert, dass die Kombination von spezifischer MRC-depletierender Therapie mit einer GD₂-gerichteten Immuntherapie eine Verbesserung des Tumorstadiums und der Überlebenswahrscheinlichkeit der Anti-GD₂-Immuntherapie bewirken könne.

Das Ziel der Arbeit besteht einerseits in der Untersuchung der Rolle der MRC beim NB und zweitens in einer möglichen Verbesserung der antitumoralen Wirksamkeit des Anti-GD₂-AK ch14.18/CHO. Hierzu werden das Tumorwachstum und die Überlebenskurven verschiedener Therapiekombinationen in einem in der AG etablierten immunkompetenten murinen In-vivo-Tumormodell verglichen. Zusätzlich wird die Expression von MRC-modulierenden Genen auf mRNA-Ebene im Tumormilieu und im peripheren Blut quantifiziert und untersucht, um den Wirkmechanismus der Therapien darzulegen.

Um die pro-tumorale Funktion dieser Zellen und ihren Effekt auf die GD₂-gerichtete Immuntherapie zu untersuchen, werden initial zwei MRC-hemmende Therapien in Hinblick auf Tumorwachstum, Überleben und Genexpression verglichen. In einem ersten In-vivo-Mausversuch werden die pro-tumoral wirkenden CD11b⁺-myeloiden Zellen mit einem Anti-CD11b-AK blockiert. Aufgrund der Expression von CD11b auf NK-Zellen [119], werden im zweiten In-vivo-Versuch MRC selektiver durch das Zytostatikum 5-Fluoruracil (5-FU) depletiert [120]. Des Weiteren werden die antitumoralen Mechanismen der Immuntherapien untersucht. Hierbei liegt der Fokus auf den Genexpressionsanalysen verschiedener MRC-modulierender Gene im Tumorgewebe, deren Genprodukte das TME und hierdurch die Tumorgenese beeinflussen können. Um eine mögliche veränderte Inflammation im peripheren Blut zu erkennen, wird zusätzlich das respektive Milzgewebe analysiert. Anschließend wird der Einfluss der MRC-depletierenden Therapie in Kombination mit einer Anti-GD₂-Immuntherapie auf das Überleben, das Tumorwachstum und die Expression MRC-modulierender Gene untersucht. Aus diesen Daten soll eine mögliche Verbesserung des Überlebens, die Reduktion des Tumorwachstums sowie die Beeinflussung des Tumormilieus und des peripheren Blutes durch pro-tumorale MRC im Rahmen der Immunreaktion gezeigt werden.

2 Material

2.1 Laborgeräte und Hilfsmittel

CO ₂ -Inkubator HeraCell® 240i	Thermo Scientific, Langenselbold
Eismaschine	KBS Kältetechnik, Mainz
Eve™ <i>Automatic cell counter</i>	NanoEnTek Inc., Soul, Südkorea
Gefrierbehälter <i>Mr. Frosty™</i>	Thermo Scientific, Langenselbold
Hochanalysenwaage XT 220 A	Precisa Gravimetrics Ag, Dietikon, Schweiz
Kühlzentrifuge <i>Biofuge fresco</i>	Heraeus Instruments, Hanau
Kühlzentrifuge <i>Multifuge 3 S-R</i>	Heraeus Instruments, Hanau
Kühlzentrifuge Rotina 35R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Rotixa 120 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Magnetrührgerät MR 3002	Heidolph, Schwabach
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II <i>Hera Safe</i>	ThermoScientific, Langenselbold
Mikroliterzentrifuge <i>Biofuge pico</i>	Heraeus Instruments, Hanau
Mini-Zentrifuge Rotilabo®- <i>Uni fuge</i>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>NanoDrop Lite Spectralphotometer</i>	ThermoScientific, Langenselbold
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
PCR-cycler <i>Arktik Thermal Cyclers</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PCR-cycler <i>Mastercycler gradient</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten <i>Research plus®</i>	Eppendorf, Hamburg
Schüttler Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Waage Sartorius	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zellkulturflasche 25, 75, 175 cm ²	SPL Life Sciences, Korea (South)
Zellsieb EASYStrainer 70 µm	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Zentrifuge <i>MiniSpin</i>	Eppendorf AG, Hamburg

2.2 Chemikalien

10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)	WAK Chemie Medical GmbH, Steinbach
Agarose	VWR, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig) >99,5 %, CHEMSOLUTE®	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Ethidiumbromid (1 %, 10 mg/ml)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

2.3 Verbrauchsmaterialien

0,2 ml PCR-Gefäß	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
1,5 ml Reagiergefäß	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
96-well PCR-Platte	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Einmalspritzen (5, 10, 20 ml)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Flat Cap Streifen	Peqlab, Erlangen
HydroGel™	clearh2o, Westbrook, ME, USA
Kanülen	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
mikrozid® universal wipes	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Objektträger Superfrost® Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Primer-Sequenzen	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
Seropipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
terralin® liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Verschlussfolie	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Wattestäbchen	Paul Hartmann, Heidenheim
Zellstofftupfer	Paul Hartmann, Heidenheim

2.4 Reaktionskits, Nährmedien und Fertiglösungen

100 bp DNA Ladder, 500 gel lanes	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M.
5-Fluoruracil	Merck, Darmstadt, Germany
anti-mouse/human CD11b, <i>InVivo</i> MAb clone M1/70	Bio X Cell, West Lebanon, NH, USA
Aqua B. Braun, bidestilliert	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose (4.5 g/l), with Stable Glutamine, with Sodium Pyruvate	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS) w/o	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Gel Loading Dye, blue (6x)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M.

NaCl 0,9 % steril 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Macherey Nagel, Düren
qScript cDNA Synthesis Kit	Quantabio, Beverly, MA, USA
RedTaq 1,1x Master Mix, 1,5 mM MgCl ₂	VWR, Darmstadt
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande

2.5 Puffer und Lösungen

ACK-Lysepuffer	8,02 g NH ₄ Cl, 1,0 g KHCO ₃ , 29,2 mg EDTA auf 1 l mit VE-H ₂ O auffüllen, pH auf 7,2-7,4 einstellen, steril filtrieren. Lagerung bei 4 °C.
PUCKs-EDTA	8,0 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,25 g D-Glukose, 0,35 g NaHCO ₃ , 0,29 g EDTA, 2,386 g HEPES, 0,006 g Phenolrot auf 1 l mit VE-H ₂ O auffüllen, pH auf 7,2-7,3 einstellen und steril filtrieren. Lagerung bei RT.
TAE-Puffer (50x)	0,5 M EDTA herstellen: 14,6 g EDTA in 100 ml VE-H ₂ O lösen, mit NaOH pH auf 8,0 einstellen. Stammlösung 50xTAE-Puffer: 242 g TRIS, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA, auf 1 l VE-H ₂ O auffüllen, pH auf 8,2 einstellen. Arbeitslösung 1xTAE-Puffer: 1:50 in VE-H ₂ O verdünnen. Lagerung bei RT.

2.6 Datenbanken und Software

Endnote 20.4	Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA
GraphPad Prism v8.4.0	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Image J 1.48v	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Image Lab™ Software	BioRad Laboratories GmbH, München
NCBI <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (BLAST)	National center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
Office 365	Microsoft, Seattle, WA, USA
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA
Sigma Plot 13.0	Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA

2.7 PCR-Primer-Sequenzen

Gen	<i>forward</i> Primersequenz (5'-3')	<i>reverse</i> Primersequenz (5'-3')
<i>Arg1</i>	ATCGGAGCGCCTTTCTCAAA	GCAGATTCCCAGAGCTGGTT
<i>CCL2</i>	GAAGGAATGGGTCCAGACAT	ACGGGTCAACTTCACATTCA
<i>GM-CSF</i>	CTCACCCATCACTGTCACCC	TGAAATTGCCCCGTAGACCC
<i>IDO</i>	CTGGGTCCTTGTGGCTAGAA	CAGGCCCAACTTCTCTGAGA
<i>IFNγ</i>	GCTCTGAGACAATGAACGCT	AAAGAGATAATCTGGCTCTGC
<i>IL-1β</i>	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	AAGGTCCACGGGAAAGACAC
<i>IL-4</i>	CCATATCCACGGATGCGACA	AAGCCCGAAAGAGTCTCTGC
<i>IL-6</i>	ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGA	TGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>IL-6R</i>	ACACACTGGTTCTGAGGGAC	CCCGTTGGTGGTGTGATTT
<i>IL-8</i>	CCATATCCACGGATGCGACA	AAGCCCGAAAGAGTCTCTGC
<i>IL-10</i>	TGGCCCAGAAATCAAGGAGC	CAGCAGACTCAATACACACT
<i>iNOS</i>	CCCCGCTACTACTCCATCAG	CCACTGACACTTCGCACAAA
<i>M-CSF</i>	GGGCCTCCTGTTCTACAAGT	AGGGGTGGCTTTAGGGTACA
<i>M-CSFR</i>	GAGGCTATGCTAGGACCCAG	AAGAAGTCGAGACAGGCCTC
<i>TGF-β1</i>	TCAGACATTCGGGAAGCAGT	TCGAAAGCCCTGTATTCCGT
<i>VEGF-A</i>	CACAGCAGATGTGAATGCAG	TTTACACGTCTGCGGATCTT
<i>GAPDH</i>	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Mittels Zellkulturtechniken wurde die in der AG etablierte murine NB-Zelllinie [121] kultiviert, die in den zugrunde liegenden In-vivo-Experimenten verwendet wurde. Diese Zellen entstammen der Hybridisierung der GD₂-negativen murinen NB-Zelllinie C1330 (A/J Hintergrund) mit murinen GD₂-positiven Ganglienzellen (C57BL/6J) mit hoher Dopaminsekretion. Diese Fusions-Zelllinie zeichnet sich durch die Expression typischer NB-Marker wie z. B. GD₂ und MYCN aus. Durch wiederholte In-vivo-Passagen und selektive Auswahl GD₂-positiver Tumorzellen wurde eine Zelllinie etabliert, die auch in höheren Passagen stabil NB-spezifische Antigene exprimiert. Die Zelllinie wurde NXS2-HGW genannt [72]. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Kultiviert wurden die Zellen in T25-, T75-, T175-Zellkulturflaschen unter einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt und 37 °C. Die adhärent wachsenden Zellen wurden alle zwei bis drei Tage mit frischem zellspezifischem Medium aus *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM mit 4,5 g/l Glukose, stabilem Glutamin), 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS), 33 U/ml Penicillin und 0,03 mg/ml Streptomycin (0,3xP/S) versorgt. Das benötigte Zellmedium und die Puffer wurden vor der Verwendung auf 37 °C aufgewärmt. Zum Passagieren der Zellen ab einer Konfluenz von 80 – 100 % wurde das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 1x phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) (5 ml/T25-Zellkulturflasche) gewaschen. Anschließend erfolgte eine zweiminütige Inkubation mit 2 – 3 ml PUCKS-EDTA-Lösung im CO₂-Inkubator (HeraCell® 240i, Thermo Scientific). Diese Lösung enthält Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als Chelator, der Kalziumionen bindet und diese den Cadherinen entzieht, wodurch deren Funktion als Zelladhäsionsmolekül inhibiert wird. Als Folge lösen sich die Zellen voneinander sowie von der Zellkulturflasche. Die Reaktion der PUCKS-Lösung wurde anschließend mit dem doppelten Volumen des Zellmediums durch die Komplexbildung des EDTA mit den enthaltenen Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen neutralisiert und die Zellsuspension in ein 50 ml Tube überführt. Durch Zentrifugation (300xg, 5 min) wurde ein Zellpellet gewonnen, welches in 10 ml Medium resuspendiert wurde. Hieraus wurde die Zellzahl und -vitalität mittels Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer oder einem automatischen

Zellzählgerät (Eve™ *automatic cell counter*) bestimmt. Anschließend wurde ein Teil der Zellsuspension 1:20 – 1:100 mit Medium zu einem Endvolumen von 25 ml verdünnt und zur Weiterkultivierung verwendet. Für die RT-PCR-Analysen (5×10^6) sowie zur Zell-Kryokonservierung (2×10^6) wurden die restlichen Zellen aliquotiert, zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Die gewonnenen Zellpellets für die RNA-Isolation wurden bei -80 °C gelagert. Die Zellen, die kryokonserviert werden sollten, wurden in 1,5 ml Einfriermedium (Humanalbumin, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert und stufenweise (1 °C/min) auf -80 °C gekühlt (Gefrierbehälter, Thermo Scientific) und zur weiteren Lagerung anschließend in Flüssigstickstoff (-196 °C) überführt. Zur erneuten Kultivierung wurden diese Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, anschließend in ein 50 ml Tube überführt und mit 30 ml 1xPBS gewaschen ($300 \times g$, 5 min). Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert. Die Kulturdauer der Zelllinie beschränkte sich auf maximal 20 Passagen.

3.2 Isolierung von Tumorzellen und Splenozyten

Die Expression von MRC-relevanten Genen in Tumorzellen (NXS2-HGW), im Tumorgewebe und Splenozyten wurde auf mRNA-Ebene analysiert. Hierfür wurde RNA aus den Zellen, die den experimentellen Mäusen entnommen wurden, isoliert. Nach der postmortalen Entnahme wurden Gewebeproben zur Homogenisierung mit einem Stößel durch einen Zellfilter (EASYStrainer, $70\text{ }\mu\text{m}$) gerieben, mit 1xPBS in einem Falcon-Tube resuspendiert und zentrifugiert ($1000 \times g$, 5 min). Anschließend wurde der Vorgang der Zentrifugation des Überstandes wiederholt, um mögliche noch im Überstand vorhandene Zellen ebenfalls zu ernten. Zur Lyse der Erythrozyten wurde die Zellsuspension mit 10 – 15 ml Ammoniumchlorid-Kalium-(ACK)-Lysepuffer behandelt (4 °C , 5-10 min). Anschließend wurde erneut fünf Minuten bei $1000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1xPBS gelöst, um die Zellkonzentration und -vitalität zu bestimmen. Aus der Zellsuspension wurden 5×10^6 Zellen entnommen und in ein 1,5 ml Sammelröhrchen überführt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gewonnene Zellpellet wurde bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C kryokonserviert.

3.3 RNA-Isolierung

RNA wurde aus Tumor- und Milzzellpellets sowie murinen NB-Zellen NXS2-HGW (5×10^6 Zellen) gewonnen, um die Expression von MRC-modulierenden Genen auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Zur RNA-Isolierung wurde das RNeasy Mini Kit von QIAGEN genutzt und nach Herstellerprotokoll verfahren. Hierbei wurden die Zellen im ersten Schritt lysiert (98 % β -Mercaptoethanol in Lysepuffer, Verhältnis 1:101). Nachdem alle Zellen vollständig lysiert wurden, wurde die mRNA mit 70 %-Ethanol ausgefällt, an die Siliziumoxid-Membran gebunden und dreimal mit Waschpuffern gewaschen, um überschüssige Salze, Makromoleküle und Metabolite zu entfernen. Im anschließenden Schritt wurde die aufgereinigte mRNA in 40 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Photometrisch wurde die Konzentration der mRNA mittels des NanoDrop Lite Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, bestimmt und bei -80 °C bis zur Analyse gelagert. Um eine Aussage bezüglich der Reinheit der mRNA-Proben zu treffen, wurde der Absorptionsquotient bei 260 nm und 280 nm gebildet, da das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm liegt. Dieser Wert spricht für eine geringe Verunreinigung der Probe bei $A_{260/280} = 1,8 - 2,0$ [122].

3.4 Primer-Design

Für die Analyse von zu untersuchenden Genen wurden genspezifische Primer entwickelt. Primer sind kurze 20 – 40 Basenpaar (bp) lange Nukleotide (Oligonukleotide), die mit dem komplementären DNA-Matrizenstrang, der für ein bestimmtes Gen codiert, hybridisieren und so durch das freie 3'-Hydroxy-Ende verschiedenen Polymerasen als Startpunkt zur Synthese des Gegenstranges dienen. Zur Genanalyse wurden Primer mittels des Primer-BLAST (*GAPDH*, *Arg1*, *GM-CSF*, *IL-1 β* , *IL-4*, *IL-6*, *IL-6R*, *IL-8*, *M-CSF*, *TGF- β 1*), bereitgestellt durch das *National Center for Biotechnical Information* (NCBI) [123], oder des Primer3 Tools [124] entwickelt. In einigen Fällen wurden Primer (*CCL2*, *IFN γ* , *IL-10*, *VEGF-A*) den wissenschaftlichen Publikationen entnommen [125-128]. Das NCBI BLAST wurde genutzt, um auszuschließen, dass zu amplifizierende DNA-Abschnitte der untersuchten Gene eine Sequenz-Homologie mit DNA-Sequenzen anderer Gene aufweisen. Durch die Lokalisation des *forward* und *reverse* Primers in zwei verschiedenen Exonabschnitten ließ sich zwischen genomischer DNA, die zwischen den Exons Introns besitzt, und der mRNA differenzieren. Durch die

Variation des GC-Gehalts und der Länge der Primer wurde versucht, eine möglichst ähnliche Schmelztemperatur der *forward* und *reverse* Primer zu ermöglichen. Die lyophilisierten Primer (Eurofins Genomics) wurden mit RNase- und DNase-freiem Wasser (PCR-Wasser) zu einer Stammlösung (100 pmol/μl) und einer Arbeitslösung (10 pmol/μl) verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.5 RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*, RT-PCR) ermöglicht u. a. die Analyse von Genen auf mRNA-Ebene. Hierfür wurde eine *two-step* RT-PCR genutzt, die aus der reversen Transkription (*reverse transcriptase*, RT), die RNA in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umschreibt, sowie einer Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), die genspezifische Sequenzen durch spezifische Primer repliziert und amplifiziert, besteht.

Die RT wurde mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase durchgeführt, die Oligo-d(T)-Primer, welche komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA binden, benötigt. Die Reaktionslösung beinhaltet außerdem ein rekombinantes Ribonuklease-Inhibitor-Protein, einen Reaktionspuffer aus verschiedenen Nucleosidtriphosphaten und MgCl₂, sowie Enzymstabilisatoren, die optimale Voraussetzungen für die Aktivität der DNA-Polymerase schaffen. Für den RT-Ansatz (qScript™ cDNA Synthese-Set) wurde eine Lösung aus 2 μg mRNA, 4 μl qScript *reaction mix* und 1 μl qScript-RT angesetzt und mit PCR-Wasser auf 20 μl Endvolumen verdünnt. Dieser Reaktionsansatz wurde zur Primerhybridisierung fünf Minuten bei 25 °C, zur cDNA-Synthese 30 Minuten bei 42 °C und fünf Minuten bei 85 °C zur Inaktivierung der DNA-Polymerase inkubiert. Hiernach wurden die 20 μl des Reaktionsansatzes im Verhältnis 1:4 mit PCR-Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Anschließend wurden genspezifische PCR mittels einer Gradienten-PCR etabliert. Diese diente der empirischen Bestimmung der optimalen *annealing*-Temperatur, bei der ein spezifisches Bandensignal ohne Gen-irrelevante Banden reproduziert werden kann, und wurde mittels des Eppendorf Mastercycler Gradient durchgeführt. Hierfür wurden 12 identische PCR-Ansätze bei 12 verschiedenen *annealing*-Temperaturen mit einem Temperaturgradienten von 20 °C (1,67 °C je Ansatz)

durchgeführt. Die niedrigste Schmelztemperatur (T_{\min}) hierfür wurde 5 – 10 °C niedriger ausgewählt als die der durch den GC-Gehalt berechneten Primer Schmelztemperatur T_m . Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese (siehe Agarose-Gelelektrophorese) durchgeführt. Die höchste Temperatur, bei der ein spezifisches Bandensignal deutlich zu erkennen war, wurde als primerspezifische *annealing*-Temperatur festgelegt (Abbildung 3).

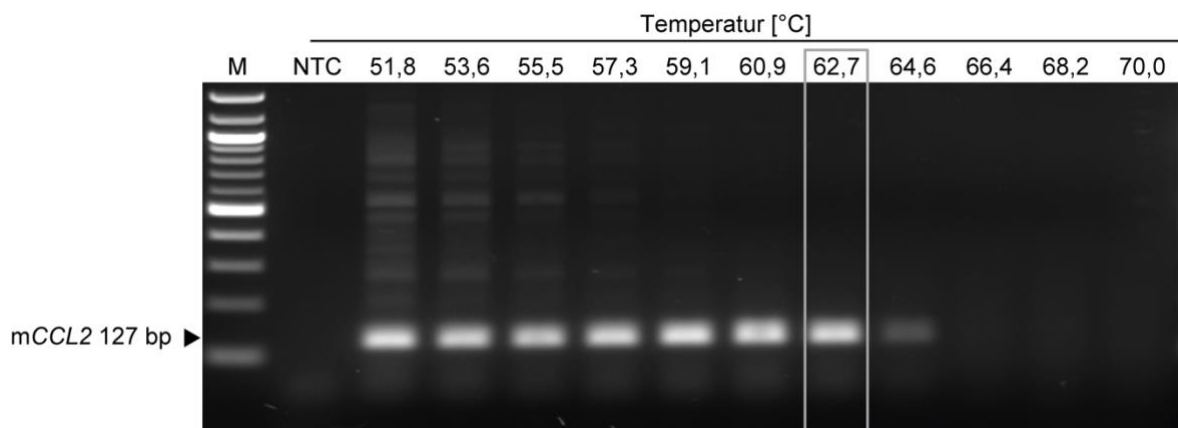


Abbildung 3: Gradienten-PCR zur Bestimmung der *annealing*-Temperatur für Primerpaare am Beispiel von *CCL2*. Ausgehend von der mittleren Schmelztemperatur der beiden Primer ($T_m = 56,3$ °C) wurde ein Temperaturgradient von 20 °C (50 – 70 °C) gewählt, um die optimale *annealing*-Temperatur des Primerpaares zu bestimmen. Durch die Visualisierung mittels der Gelelektrophorese konnte eine deutlich zu erkennende Bande bei der höchst möglichen Temperatur von 62,7 °C ausgemacht werden. Diese Temperatur wurde als *CCL2*-spezifische *annealing*-Temperatur für die Amplifikation des Genproduktes von *CCL2* in allen weiteren Analysen genutzt. M – Marker, NTC – *no template control*, bp – Basenpaare.

Die PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von Gensequenzen eines DNA-Stranges und wurde in dieser Doktorarbeit zum Nachweis MRC-relevanter Gene auf mRNA-Ebene genutzt. Weiterhin stellt die PCR die Grundlage zur relativen mRNA-Quantifizierung dar. Eine PCR ist wie folgt aufgebaut:

- (1) Initial wird der cDNA-RNA-Doppelstrang zwei Minuten lang bei 95 °C denaturiert, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen zerstört werden und die cDNA als Einzelstrang vorliegt.
- (2) Anschließend hybridisiert der *forward* Primer im ersten Zyklus, ab dem zweiten Zyklus auch der *reverse* Primer, bei der zuvor bestimmten primerspezifischen *annealing*-Temperatur mit dem cDNA-Einzelstrang.
- (3) Im nächsten Schritt, der Elongation, bindet eine DNA-Polymerase an den Primer-cDNA-Komplex und synthetisiert das komplementäre Genfragment.

Für die PCR wurde eine Mg^{2+} -Ionenlösung genutzt, die Desoxyribonukleosidtriphosphate und eine *taq*-DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*

enthält (Red-Taq DNA-Polymerase 1,1x *master mix*, 1,5 mM MgCl₂). 18 µl dieser Lösung wurden jeweils 1 µl des spezifischen Primers (*forward/reverse*, 10 pmol/µl), sowie 2 µl cDNA oder 2 µl PCR-Wasser für die Negativkontrolle (*no template control*, NTC) zugesetzt. Durchgeführt wurde die PCR im Thermozykler (Arktik Thermal Cycler, Thermo Scientific). Die Zykluszahl ist abhängig von der Expressionsstärke, während die Zykluslänge der Elongation von der Produktgröße abhängig ist. Die genspezifischen PCR-Temperaturen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Gen-spezifische PCR-Programme mit Angabe der individuellen PCR-Bedingungen. Angabe von Temperatur (°C), Dauer (s) für Denaturierung, *annealing* und Elongation, Zykluszahl und Produktgröße. Zusätzlich zu einer allgemeinen initialen Denaturierung von zwei Minuten bei 95 °C und einer finalen Elongation von zwei Minuten bei 72 °C sind die genspezifischen PCR-Bedingungen für die Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene zusammengefasst.

Gen	Denaturierung (°C/s)	<i>annealing</i> (°C/s)	Elongation (°C/s)	Zykluszahl	Produktgröße (bp)	cDNA-Volumen (µl)
<i>Arg1</i>	95/15	65/15	72/15	30	391	2
<i>CCL2</i>	95/15	62/15	72/3	28	127	2
<i>GM-CSF</i>	95/15	65/3	72/0	38	191	2
<i>IDO</i>	95/15	63/3	72/0	35	247	2
<i>IFNγ</i>	95/15	62/15	72/3	33	229	2
<i>IL-1β</i>	95/15	61/15	72/15	33	220	2
<i>IL-4</i>	95/15	61/15	72/3	35	254	2
<i>IL-6</i>	95/15	60/15	72/15	38	153	2
<i>IL-6R</i>	95/15	60/15	72/15	40	239	3
<i>IL-8</i>	95/15	60/15	72/3	35	293	2
<i>IL-10</i>	95/15	62/15	72/15	35	264	2
<i>iNOS</i>	95/15	64/15	72/3	33	185	2
<i>M-CSF</i>	95/15	63/15	72/3	35	209	2
<i>M-CSFR</i>	95/15	66/15	72/3	27	160	2
<i>TGF-β1</i>	95/15	62/15	72/15	30	243	2
<i>VEGF-A</i>	95/15	61/15	72/15	30	118	2
<i>GAPDH</i>	95/15	55/15	72/15	22	223	2

3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente der Visualisierung und densitometrischen Analyse von amplifizierten DNA-Fragmenten. Durchgeführt wurde die Gelelektrophorese in einem 2 %-Agarosegel (in TRIS-Acetat-EDTA-(TAE)-Puffer nach Herstellerprotokoll, vermischt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid). Im durchlässigen Agarosegel

wurde die negativ geladene DNA über einen Spannungsgradienten (120 V, 40 min) in Richtung des positiven elektrischen Pols der Größe nach aufgetrennt. Durch die Interkalation des Ethidiumbromids zwischen den Basen der DNA konnten die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht (BioRad UV Transilluminator) und anschließend mit der ImageLab Software analysiert werden (ImageLab 3.0). Zur Differenzierung der Basenpaarlänge wurde ein 100 Basenpaar-Marker genutzt (18 µl TAE-Puffer, 1,5 µl *loading dye*, 0,75 µl 100 bp DNA *ladder*).

3.7 Densitometrische Analyse

Zur relativen Quantifizierung der Genexpression auf mRNA-Ebene wurden die PCR-Produkte nach der Visualisierung densitometrisch analysiert. Hierfür wurde das Programm Image J 1.48v genutzt, welches die Intensität des PCR-Produktsignals nach gelelektrophoretischer Auftrennung quantifiziert. Die Expression des zu analysierenden Gens wurde in ein Verhältnis mit einer internen Kontrolle gesetzt. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Enzym der Glykolyse, welches trotz exogener und endogener Einflüsse relativ konstant exprimiert wird. Dies wurde benötigt, um abweichende cDNA-Konzentrationen, die Qualität der RNA-Extraktion, sowie intra- und interexperimentelle Abweichungen zwischen den einzelnen RT-PCR zu berücksichtigen. Die relative mRNA-Expression wurde für jede zu analysierende Probe in drei voneinander unabhängigen Experimenten gemessen und als arithmetischer Mittelwert (MW) angegeben.

3.8 Tierexperimentelle Methoden

3.8.1 Ethische Erklärung

Für alle Tierversuche, die im Rahmen dieser Arbeit stattfanden, lag eine Genehmigung des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V) vor (Aktenzeichen 722.3-1.1-049/16). Zusätzlich wurden die Versuche durch die Tierschutzbeauftragte der Universitätsmedizin Greifswald überwacht. Ein ganzheitlicher Organismus mit einem kompetenten Immunsystem, physiologischen sowie nach Tumorzellimplantation (NXS2-HGW) pathologischen Wechselwirkungen war erforderlich, um die anti-tumorale Effektivität von in dieser Arbeit erwähnten Immuntherapien zu analysieren. Hierfür wurde ein kliniknahes, in der Arbeitsgruppe etabliertes In-vivo-Modell genutzt [121].

3.8.2 Haltung der experimentellen Tiere

Die Experimente wurden an weiblichen A/J-Mäusen von Charles River Laboratories, welche syngen zu der genutzten murinen NB-Zelllinie (NXS2-HGW-Zellen) sind, durchgeführt. Die Mäuse wurden im Alter von sechs bis acht Wochen mit einem Mindestgewicht von 20 g zugestellt. Ihnen wurde eine zweiwöchige Eingewöhnungszeit in einem Käfig mit maximal sechs Mäusen gewährt. Die Haltung wurde durch die Zentrale Service- und Forschungseinrichtung für Versuchstiere der Universitätsmedizin Greifswald (ZSFV) im spezifisch Pathogen-freien-Bereich unter Einhaltung eines festen 12 Stunden Hell-Dunkel-Lichtregimes, sowie regulierter Raumtemperatur ($20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) und Luftfeuchtigkeit ($60\% \pm 20\%$) durchgeführt. Trockenfutter (Standardhaltungsdiät) und Tränkwasser (angesäuert, pH 2,5) wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Versuchsmäuse erhielten Ohrlochmarkierungen, um sie während des Versuch-Zeitraumes differenzieren zu können.

Tabelle 2: Bewertungsskala des Belastungszustandes der Mäuse. Die Belastung der Versuchstiere wurde während des tierexperimentellen Versuches alle zwei Tage (bis Tag 10) und täglich (ab Tag 11) anhand der Veränderungen des Verhaltens und des Erscheinungsbildes sowie einmal wöchentlich anhand der Veränderung des Körpergewichts bestimmt.

Einzelbelastungsscore	Verhaltensveränderung	Erscheinungsbild	Gewichtsverlust
0 – keine Belastung	normales Verhalten (schlafen, lebhaft, neugierig, Sozialkontakte)	normale Körperhaltung, gepflegtes Fell	keiner
1 – leichte Belastung	ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik	gesträubtes Fell	< 10 %
2 – mittlere Belastung	Isolation, Koordinationsstörungen	Schmerzäußerungen	11 – 20 %
3 – schwere Belastung	Seitenlage, Apathie	fehlende Fellpflege, geschlossene Augenlider	> 20 %

Um die Belastung der Mäuse nach der Tumorzellimplantation möglichst gering zu halten und ein Leiden zu verhindern, wurde ein Belastungsscore eingeführt, mit dem die Belastung quantifiziert werden konnte. Dieser basiert auf klinischen Symptomen (Verhaltensänderungen und Erscheinungsbild) und metrischen Parametern (Änderung des Körpergewichts (KG) und Tumorzellvolumens), welche mit einem Score von 0 bis 3 bewertet wurden (Tabelle 2). Bei einer Einzelbelastung von 1 wurde das Tier weiter beobachtet, bei 2 wurde die Begutachtung durch einen Tierarzt

angeordnet und bei einem Score von 3 wurde eine starke Belastung angenommen und das Tier aus dem Versuch entfernt. Weiterhin wurde ein Summenbelastungsscore eingeführt, wobei 0 für keine Belastung, 1 – 3 für eine geringe Belastung (weitere Beobachtung), 4 – 6 für eine mittlere Belastung (ggf. Tierärztliche Untersuchung) und 7 für eine schwere Belastung steht. Musste eine schwere Belastung angenommen werden, wurde das Tier aus dem Versuch genommen. Die Mäuse wurden hierfür einmal wöchentlich gewogen und der Belastungsscore wurde alle zwei Tage, ab dem elften Tag nach Tumorzellimplantation täglich bestimmt. Zum Versuchsende, aber auch bei Erreichen eines kritischen Belastungsscores oder einem kritischen Tumolvolumen von 750 mm³ wurden die Mäuse mittels eines Gasgemisches (CO₂/O₂-Gemisch, 6:4) betäubt und durch eine CO₂-Gehaltssteigerung euthanasiert.

3.8.3 Tumorimplantation und Bestimmung des Tumolvolumens

Für die Tumorimplantation wurde ein Gemisch aus Tumorzellen und einer basalmembranartigen Matrix genutzt. Diese Matrix (Matrigel, 1:2 Lösung in 1×PBS, 100 µl) verbessert das Anwachsen des Tumors und dient zu Beginn als Wachstumsgrundlage. Zur Vorbereitung auf die Tumorimplantation wurde den Mäusen einen Tag vorher die linke Flanke mit einem Haarschneider rasiert. Anschließend wurde die Implantationsstelle desinfiziert und 2×10⁶ NXS2-HGW-Zellen (≥ 95 % Zellviabilität) in 100 µl 1×PBS/Matrigel s.c. mit einer Kanüle injiziert (25G, 0,50 mm × 16 mm). Im Versuchsverlauf wurde die Tumorgöße alle zwei Tage, ab Tag 11 täglich mit einem digitalen Messschieber kontrolliert. Für die Volumenberechnung wurde folgende Formel genutzt:

$$\text{Tumolvolumen [mm}^3\text{]} = \frac{1}{2} \times \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe}$$

3.8.4 Behandlungsschema der tierexperimentellen Versuche

Im vorliegenden Tierversuch wurden zunächst zwei Medikamente in Bezug auf deren Wirkung auf myeloide Zellen und ihre anti-tumorale Wirkung im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, welche keine Therapie erhielt und mit 0,9 % Natriumchlorid (NaCl) Volumenäquivalent behandelt wurde, getestet (Abbildung 4). Hierfür wurde bei der ersten Versuchsgruppe eine CD11b-Blockade durchgeführt, die alle CD11b⁺-Zellen blockiert (Anti-CD11b-AK, 25 mg/kg KG *i.p.* je Injektion, zweimal wöchentlich). In einer weiteren Versuchsgruppe wurden suppressive myeloide

Zellen mittels 5-FU spezifisch abgetötet (50 mg/kg KG *i.p.* je Injektion, einmal wöchentlich). An Tag 1 wurden den Mäusen die Tumorzellen implantiert (2×10^6 NXS2-HGW-Zellen in 100 μ l 1xPBS/Matrigel). Beginnend mit Tag 4 wurde der einen Versuchsgruppe zu sieben Zeitpunkten zweimal wöchentlich ein Anti-CD11b-AK verabreicht. 5-FU wurde den Mäusen drei Wochen lang einmal wöchentlich verabreicht. Ein anschließendes Experiment wurde zur Evaluierung der Wirkung von ch14.18/CHO (15 mg/kg KG *i.p.* je Injektion, Tag 4 bis 8) in Mono- sowie Kombinationstherapie mit 5-FU durchgeführt. Dabei wurde unter anderem die Halbwertszeit ($t_{1/2}$), die Applikationsart und Bioverfügbarkeit der zu applizierenden Substanzen berücksichtigt. Das Tumolvolumen wurde durch einen digitalen Messschieber bestimmt. Am Versuchsende (Tag 27) oder bei Erreichen des kritischen Tumolvolumens wurden die Mäuse seziiert und anschließend Tumoren und Organe für Analysen entnommen.

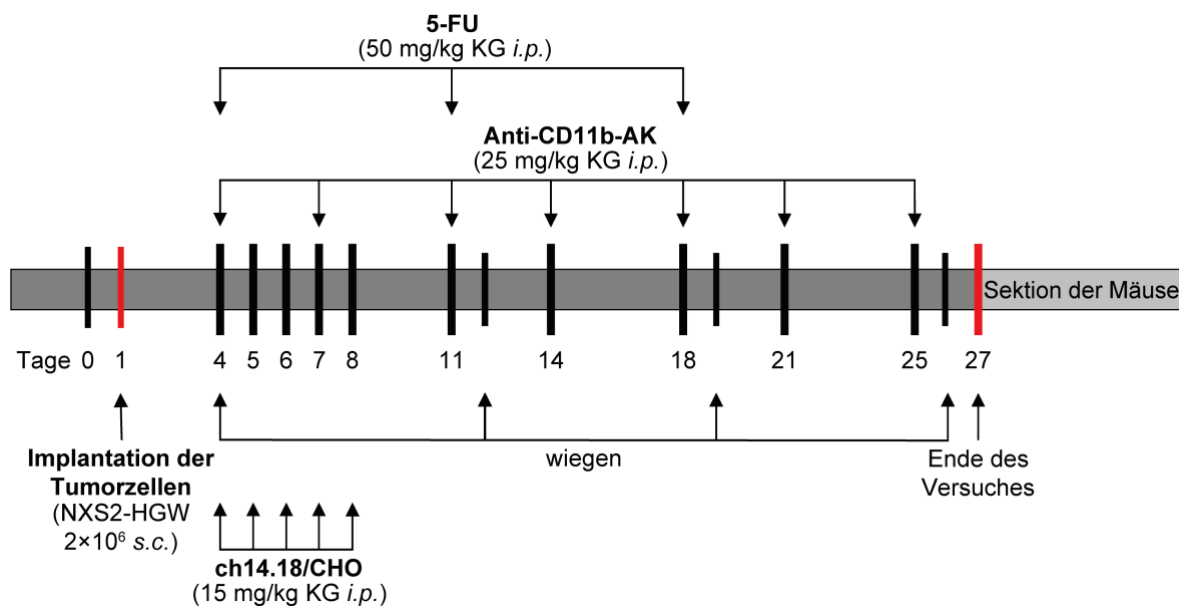


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Behandlung mit Anti-CD11b-AK, 5-FU und ch14.18/CHO im tierexperimentellen Versuch. Implantation der Tumorzellen (2×10^6 NXS2-HGW s.c.) an Tag 1. Ab Tag 5 wurden alle Tiere einmal pro Woche gewogen und täglich evaluiert. Therapie zweimal wöchentlich mit Anti-CD11b-AK (25 mg/kg KG *i.p.* je Injektion) an sieben Zeitpunkten, einmal wöchentlich mit 5-FU (50 mg/kg KG *i.p.* je Injektion) für drei Wochen, ch14.18/CHO (15 mg/kg KG *i.p.* je Injektion) an den Tagen vier bis acht oder die Kombination aus ch14.18/CHO mit 5-FU. Versuchsende an Tag 27 und Sektion der Versuchstiere.

3.8.5 Sektion der Mäuse, Tumor- und Gewebeaufbereitung

Nach Euthanasie der Versuchstiere wurden diese seziiert und auf Metastasen begutachtet (Abbildung 5, B und C). Anschließend wurden der Tumor und die Milz entnommen und für Genanalysen aufbereitet (siehe Isolierung von Tumorzellen und Splenozyten).



Abbildung 5: Sektion der Versuchstiere. Die Abbildungen stellen die Lokalisation des Primärtumors sowie der Metastasen nach einem tierexperimentellen Versuch dar. Der Tumor wächst gut messbar nach s.c. Applikation der Tumorzellen in die linke Flanke (weißer Pfeil, A). In der linken Axilla ist eine Lymphknotenmetastase ersichtlich (weißer Pfeil, B) sowie eingekreist rechts eine Ovarmetastase (B). Zusätzlich zur axillären Lymphknotenmetastase sind weitere diffuse Metastasen im Abdomen sowie am rechten Ovar zu finden (weiße Pfeile, C). Außerdem ist ein großes Tumorrezidiv der linken Flanke durch die weiße Pfeilspitze markiert (C). Abbildung bereitgestellt durch Dr. Marx [129].

3.9 Datenauswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mittels *GraphPad* (GraphPad Prism v8.4.0, GraphPad Software, San Diego, California USA) durchgeführt. Für die akquirierten Daten der relativen Genexpression konnte aufgrund der niedrigen n-Zahl der Test auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson Test) nicht durchgeführt werden. Daher wurden bezüglich der Signifikanz eines metrischen Merkmals für die nicht-parametrische statistische Auswertung der Daten jeweils der Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben (*Rank-sum Test*) bzw. der Kruskal-Wallis-Test (ANOVA on Ranks mit *Dunn's multiple comparisons test*) bei mehr als zwei Gruppen durchgeführt. Die relative Expression wurde für jedes biologische Replikat aus dem MW von drei unabhängigen technischen Replikaten berechnet und als Median mit Interquartilsabstand (*interquartile range*, IQR) je Gruppe dargestellt. Mit der Darstellung der einzelnen Datenpunkte stellt dies bei kleinen Datensätzen mit extremen Beobachtungen und schiefen Daten ein besseres Maß für die zentrale Tendenz und Streubreite als der $MW \pm$ Standardfehler des MW (*standard error of the mean*, SEM) dar. Für Datensätze ohne statistische Signifikanz wurde zusätzlich ein *Sign-Test* durchgeführt. Dieser zeigte mögliche Tendenzen der Therapien mit geringerer statistischer Power auf, wurde aber nicht visualisiert. Die Ergebnisse der Expression im TME wurden in

einem *scatter dot plot* mit IQR (alle Datenpunkte gezeigt) dargestellt. Die Ergebnisse wurden in der Form (Median|IQR) beschrieben. Zur Darstellung der Differenzen der Kombinationstherapie sowie der peripheren Genexpression der einzelnen Behandlungsgruppen wurde eine *Heatmap* mit einer weiß-schwarz-Abstufung genutzt. Jedem Median wurde ein Grauton zwischen Minimum (weiß) und Maximum (schwarz) zugeordnet.

Die akquirierten Daten zu den Tumorumfängen wurden zunächst auf Normalverteilung (D'Agostino & Pearson Test) und Varianzhomogenität (Brown-Forsythe-Test) getestet. Basierend hierauf wurde bezüglich der Signifikanz eines metrischen Merkmals bei normalverteilten Daten eine einfaktorische ANOVA (*Welch*-ANOVA) zum Vergleich der Behandlungsgruppen durchgeführt. Zusätzlich wurden multiple Behandlungsgruppen untereinander mittels des *Dunnett's T3 multiple comparisons test* verglichen. Eine Kaplan-Meier-Analyse wurde im Rahmen einer Ereigniszeitanalyse zur Darstellung der Überlebensfunktion genutzt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede der Versuchsgruppen wurde mittels des *Log-rank Mantel-Cox test (adjusted p-value)* untersucht. Für die Auswertung des Gesamtüberlebens der Versuchstiere wurden Tiere, die vor Versuchsende aufgrund eines erhöhten Belastungsscores oder nach Erreichen des kritischen Tumorumfanges von 750 mm³ ausschieden, betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse des Tumorwachstums und der Überlebenszeit

Diese Arbeit hat die anti-tumoralen Eigenschaften verschiedener Therapien in dem A/J-Mausmodell unter Verwendung der syngenon Zelllinie NXS2-HGW untersucht. Hierfür wurde initial die Effektivität zweier Therapien (Anti-CD11b-AK und 5-FU), welche gegen suppressive myeloide Zellen gerichtet sind, mit einer Negativkontrolle (NaCl) verglichen. Abbildung 6A stellt das aufgezeichnete Tumolvolumen der einzelnen Versuchsgruppen als $MW \pm SEM$ dar. Bis Tag 11 nach der Tumorimplantation wiesen die Versuchsgruppen ein vergleichbares, niedriges Tumorwachstum auf. Nachfolgend stieg das Tumolvolumen der NaCl-Kohorte (schwarze Quadrate) bis Tag 25 stetig an und erreichte hier ein kritisches Volumen von $628 \pm 80 \text{ mm}^3$. Das mittlere Tumolvolumen der Anti-CD11b-Gruppe (schwarze Kreise) stellte sich bis Tag 15 ähnlich dem der NaCl-Gruppe dar ($258 \pm 46 \text{ mm}^3$ vs. $247 \pm 82 \text{ mm}^3$). Die Wachstumsdynamik nahm ab diesem Zeitpunkt ab und das Tumolvolumen der Versuchsgruppe erreichte bis zum Ende des Experimentes an Tag 27 einen mittleren Maximalwert von $563 \pm 109 \text{ mm}^3$. In der mit 5-FU behandelten Gruppe (weiße Kreise) stellte sich das Tumorwachstum mit einem deutlich verzögerten Tumorwachstumseintritt ab Tag 15 am geringsten dar. Ab Tag 18 stellte sich ein paralleles Tumorwachstum beider Therapiegruppen dar. Der Versuch endete an Tag 27 in der mit 5-FU therapierten Gruppe mit einem Tumolvolumen von $510 \pm 105 \text{ mm}^3$. Beide Therapien wiesen eine deutliche Wachstumsverzögerung im Vergleich zur NaCl-Gruppe auf. Hierbei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Therapie mit 5-FU und der NaCl-Kontrolle an Tag 23 ($*P < 0,05$), Tag 19 und 22 ($**P < 0,01$) sowie Tag 21 und 22 ($***P < 0,001$). Insgesamt ließ sich eine deutliche Reduzierung der Wachstumsdynamik und der Tumorumfänge in den Therapiegruppen im Vergleich zu der NaCl-Kontrolle erkennen. Die Ergebnisse der 5-FU-Therapie zeigten eine weitere Verzögerung des Tumorwachstumseintritts und leichte Reduktion des Tumorumfanges durch die selektive MRC-Depletion im Vergleich zur Therapie mit einem Anti-CD11b-AK. Diese Daten zeigen eine pro-tumorale Rolle der MRC beim NB auf und stellen eine Grundlage für die klinische Anwendung der Therapeutika dar, die zur Reduktion der MRC dienen.

Da die 5-FU-Therapie stärkere Effekte auf die Reduktion des Tumorumfanges gezeigt hat, wurde sie im nächsten Schritt anstelle der Anti-CD11b-Therapie mit

ch14.18/CHO kombiniert. Zur Evaluation der Effektivität dieser Kombinationstherapie wurden zunächst die jeweiligen Monotherapien in Abbildung 6B verglichen. Hierbei stellte sich ein ähnliches Tumorwachstum bis Tag 20 für die beiden Monotherapien 5-FU und ch14.18/CHO dar (respektive $161 \pm 43 \text{ mm}^3$ vs. $148 \pm 74 \text{ mm}^3$). Ab diesem Zeitpunkt stagnierte das Tumolvolumen der ch14.18/CHO-Behandlungsgruppe bei einem MW von $153 \pm 84 \text{ mm}^3$ bis zum Versuchsende. Hingegen stieg das Tumolvolumen der 5-FU-Gruppe ab Tag 20 weiter bis auf $510 \pm 105 \text{ mm}^3$ an Tag 27 an. Die Kombinationstherapie ch14.18/CHO + 5-FU zeigte insbesondere bis Tag 14 ein niedrig stagnierendes Tumorwachstum ($9 \pm 3 \text{ mm}^3$) im Vergleich zu beiden Monotherapien. Insbesondere im Applikationszeitraum der Therapeutika bis Tag 18 wurde ein deutlich niedrigeres Tumorwachstum im Vergleich zu den Monotherapien beobachtet. Unerwartet zeigte sich ab Tag 23 ein nicht signifikant ansteigendes Tumolvolumen der Kombinationstherapie im Vergleich zur ch14.18/CHO-Monotherapie. Allerdings konnte für keine der drei Versuchsgruppen eine signifikante Differenz des Tumorzustandes nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte die klinisch etablierte GD₂-gerichtete Immuntherapie mit DB durch eine zusätzliche MRC-Depletion insbesondere im Therapiezeitraum verbessert und das Tumorwachstum reduziert werden.

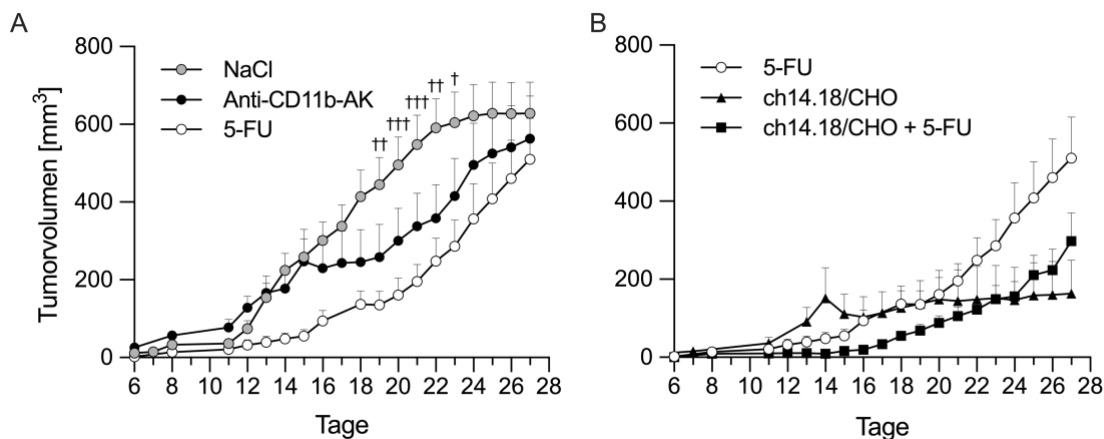


Abbildung 6: Einfluss der Reduktion von MRC auf das Tumorwachstum. Den Mäusen wurden an Tag 1 Tumorzellen implantiert (2×10^6 NXS2-HGW, s.c.). Ab Tag 4 wurde das Tumorzustand bis zum Versuchsende an Tag 27 aufgezeichnet. Die Daten sind als MW \pm SEM angegeben ($n_{\text{NaCl}} = 25$, $n_{\text{Anti-CD11b-AK}} = 12$, $n_{\text{5-FU}} = 10$, $n_{\text{ch14.18/CHO}} = 10$, $n_{\text{ch14.18/CHO + 5-FU}} = 12$). (A) Das Tumorzustand wurde basierend auf den MRC-depletierenden Therapien mit anti-CD11b-AK (25 mg/kg KG *i.p.*, schwarze Kreise) und 5-FU (50 mg/kg KG *i.p.*, weiße Kreise) mit einer volumenäquivalenten Applikation von NaCl (graue Kreise) verglichen. (B) Die Tumorentwicklung der Kombinationstherapie (ch14.18/CHO + 5-FU, schwarze Quadrate) aus 5-FU (50 mg/kg KG *i.p.*, weiße Kreise) und ch14.18/CHO (15 mg/kg KG, schwarze Dreiecke) wurde mit den Monotherapien verglichen. $^{\dagger}P < 0,05$, $^{\dagger\dagger}P < 0,01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0,001$ vs. 5-FU. mm^3 – Kubikmillimeter.

Weiterhin konnten die Daten zur Tumorstadiumsanalyse bei der Analyse des OS bestätigt werden (Abbildung 7). Für die Analyse des OS wurde das Ausscheiden der Versuchstiere nach Erreichen des kritischen Belastungsscores oder Tumorstadiums von $\geq 750 \text{ mm}^3$ betrachtet. Das erste Ausscheiden von Tieren wurde in der Kontrollgruppe (Tag 13) und nach MRC-depletierender Therapie mit Anti-CD11b-AK (Tag 15) protokolliert. Ab diesem Zeitpunkt sank die Überlebenswahrscheinlichkeit der NaCl-Gruppe regelmäßig. Am Endpunkt des Experimentes am Tag 27 waren nur noch 36 % der Kontrolltiere vital (9/25 Mäuse). Das Überleben in der Anti-CD11b-Gruppe hielt sich bis Tag 23 konstant auf 83 % (10/12 Mäuse). Hiernach nahm auch in dieser Gruppe das OS stetig bis auf 50 % (6/12 Mäuse) zum Versuchsende ab. Ein verbessertes OS konnte für die Kohorte nach 5-FU-Therapie gezeigt werden. In dieser Kohorte verstarb bis Tag 24 keine Maus. Dennoch sank auch für diese Therapie die Überlebenswahrscheinlichkeit bis zum Versuchsende auf 50 % (5/10 Mäuse) ab. Demnach kann eine Parallele zwischen dem Tumorstadium sowie der Wahrscheinlichkeit des Überlebens der MRC-depletierenden Therapiegruppen aufgezeigt werden. 5-FU konnte hierbei die Therapieerfolge des Anti-CD11b-AK bestätigen. Für diesen neuen Therapieansatz konnte sowohl ein deutlich geringeres Tumorstadium als auch verbessertes OS aufgezeigt werden.

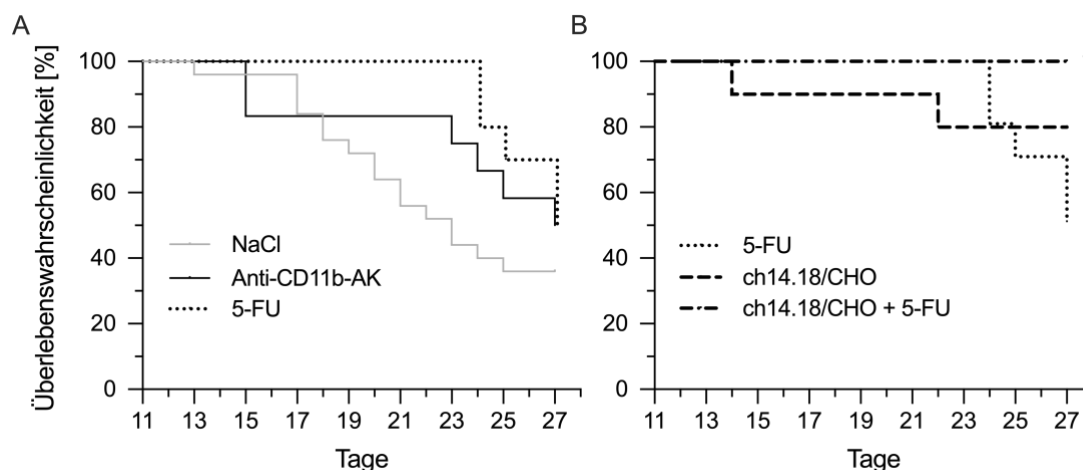


Abbildung 7: Einfluss von Anti-CD11b-AK, 5-FU, ch14.18/CHO oder der Kombinationstherapie auf das overall survival. Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeiten im Rahmen einer Ereigniszeitanalyse nach Kaplan-Meier in Abhängigkeit der Therapien. (A) Evaluation der MRC-depletierenden Therapie mit Anti-CD11b-AK (schwarze Linie) und 5-FU (gepunktete Linie) in Relation zur einer NaCl-Kontrolle (graue Linie). (B) Auswirkung der Kombinationstherapie aus ch14.18/CHO + 5-FU (gepunktet-gestrichelte Linie) auf das Überleben im Vergleich zu den entsprechenden Monotherapien mit ch14.18/CHO (gestrichelte Linie) und 5-FU (gepunktete Linie). $^{\dagger}P < 0,05$ vs. 5-FU.

Die anschließend durchgeführten GD₂-gerichteten Immuntherapien mit ch14.18/CH sowie aus der Kombination ch14.18/CHO + 5-FU zeigten ein weiter verbessertes OS im Vergleich zu allen anderen Therapiegruppen. Hierbei zeigte bereits die Monotherapie trotz des ersten verstorbenen Tieres an Tag 14 ein verbessertes OS von 80 % (8/10 Mäuse) zum Versuchsende. Durch die Kombination mit der MRC-depletierenden 5-FU-Therapie konnte die Überlebenswahrscheinlichkeit noch weiter verbessert werden, da kein Versuchstier bis zum Versuchsende an Tag 27 verstarb (100 %, 12/12 Mäuse). Dies stellte eine deutliche Verbesserung im Vergleich zur 5-FU-Therapie ($^{\dagger}P < 0,05$) und zur NaCl-Kontrollgruppe ($^{**}P < 0,01$) dar. Zusammenfassend zeigen diese Daten die deutliche Verbesserung des OS der Anti-GD₂-Immuntherapie durch die MRC-Depletion mit 5-FU auf.

4.2 Gelelektrophorese und Densitometrische Analyse

In vivo zeigte sich, dass die ch14.18/CHO-Immuntherapie durch die Depletion der MRC verbessert werden kann. Im nächsten Schritt wurde untersucht, welchen Einfluss die Kombination aus den beiden Therapeutika auf die Expression der MRC-modulierenden Gene im Tumorgewebe und im peripheren Blut hat. Hierfür wurden ausgewählte MRC-modulierende Gene auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR relativ zu der internen Kontrolle *GAPDH* quantifiziert. Im ersten Schritt wurden die Gen-spezifischen PCR etabliert. Dabei wurden Primer entworfen und eine Gradienten-PCR mit anschließender Gelelektrophorese zur Bestimmung der *annealing*-Temperatur der entsprechenden Primer durchgeführt (siehe RT-PCR und Abbildung 3).

Anschließend wurden die mRNA-Proben aus NXS2-HGW Tumorzellen und Gewebeproben (Tumor, Milz) in Bezug auf das zu analysierende Gen sowie *GAPDH* untersucht. Die amplifizierten DNA-Fragmente wiesen in der Gelelektrophorese beispielhaft für *CCL2* eine Länge von 127 bp und für *GAPDH* von 223 bp auf (Abbildung 8A). Zur genaueren Bestimmung der relativen Expression und Differenzen wurde eine densitometrische Analyse durchgeführt (Abbildung 8B). Die anhand der PCR-Produktmenge berechnete Fläche des Graphen entsprach hierbei der mRNA-Expressionsstärke des zu analysierenden Genes der zugehörigen Probe. Die relative Expression lässt sich als Quotient in der folgenden Formel darstellen: Expression des zu analysierenden Genes / *GAPDH*-Expression = relative Genexpression. Sie wird als MW von drei technischen Replikaten angegeben.

Hieraus lässt sich die mediane relative Genexpression der biologischen Replikate berechnen. Sie wird exemplarisch für *CCL2* in Tabelle 3 aufgeführt.

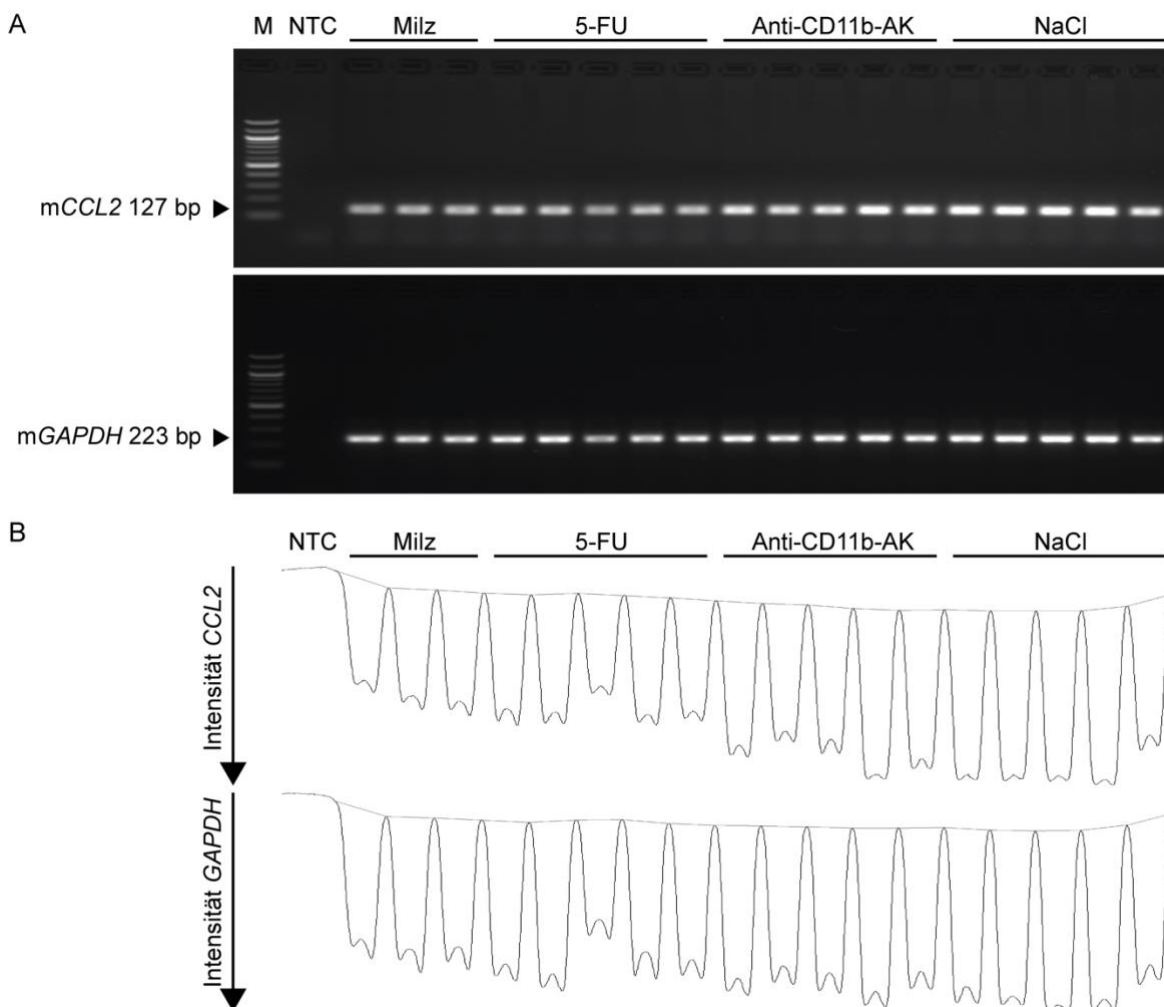


Abbildung 8: Visualisierung der Agarose-Gelelektrophorese und Densitometrie der RT-PCR am Beispiel *CCL2* und *GAPDH*. (A) Die Gelelektrophorese wurde genutzt, um die amplifizierten DNA-Fragmente der Gene *CCL2* und *GAPDH* darzustellen. Jede Spalte entspricht einer Milzprobe; die zugehörige Versuchsgruppe ist gekennzeichnet. *CCL2* stellt sich hierbei mit einer bp-Länge von 127, *GAPDH* von 223 dar (weiße Banden). (B) Zur Identifizierung der Länge wurde ein 100 bp-Marker genutzt. Die densitometrische Analyse der interkalierten DNA-Banden im Agarosegel ermöglicht die Quantifizierung der Intensität der amplifizierten Gene (Fläche der Kurve). Hier stellen sich keine Unterschiede der Intensität zwischen den Versuchstiergruppen (Milz, NaCl, Anti-CD11b-AK, 5-FU) dar. Zur Analyse wurde das Verhältnis von *CCL2* zu der internen Kontrolle *GAPDH* genutzt. bp – Basenpaare, M – Marker, NTC – *no template control*.

Tabelle 3: Relative Genexpression (CCL2). Von jeder Probe des Milzgewebes (n_{1-5}) wurden drei technische Replikate angefertigt (I-III). Aus den Mittelwerten der technischen Replikate ($MW_{\text{Replikate}}$) lässt sich der Median sowie IQR für jede Therapie berechnen. IQR – Interquartilsabstand, MW – Mittelwert, n – Probe.

		Replikat I	Replikat II	Replikat III	$MW_{\text{Replikate}}$	Median	IQR
Milz	n_1	0,83	0,87	0,78	0,82		
	n_2	0,76	0,81	0,85	0,81	0,81	0,02
	n_3	0,74	0,82	0,79	0,78		
5-FU	n_1	0,83	0,86	0,95	0,88		
	n_2	0,82	0,88	0,90	0,87		
	n_3	0,84	0,92	0,90	0,89	0,88	0,01
	n_4	0,84	0,82	0,96	0,87		
	n_5	0,95	0,79	0,99	0,91		
Anti-CD11b-AK	n_1	0,86	1,00	0,89	0,92		
	n_2	0,96	0,98	0,93	0,96		
	n_3	0,88	0,90	0,95	0,91	0,92	0,01
	n_4	0,87	0,91	0,99	0,92		
	n_5	0,75	0,95	1,08	0,93		
NaCl	n_1	0,88	0,93	0,99	0,93		
	n_2	1,02	0,97	0,98	0,99		
	n_3	0,89	0,92	0,95	0,92	0,93	0,02
	n_4	0,90	0,95	0,95	0,93		
	n_5	0,91	0,97	0,98	0,95		

4.3 Expressionsanalyse MRC-modulierender Gene im murinen TME

Zur Evaluation des Einflusses einer MRC-Blockade im Rahmen einer Anti-GD₂-Immuntherapie auf die Tumormikroumgebung wurden MRC-modulierende Gene im Tumorgewebe untersucht. Zur graphischen Darstellung der Genexpressionsstärke und -veränderung war es von Vorteil, die Gene basierend auf ihrer vorrangigen Funktion in die vier bereits dargelegten Gruppen zu unterteilen:

- (1) pro-inflammatorischen Zytokine und deren Rezeptor
- (2) anti-inflammatorische Zytokine und Enzyme
- (3) Zytokine und Enzyme mit einer dualen Rolle
- (4) Chemokine und Wachstumsfaktoren

(1) *Pro-inflammatorische Zytokine und IL-6-Rezeptor.* Die Expression der für pro-inflammatorische Zytokine und deren Rezeptor kodierenden Gene wies mit wenigen Ausnahmen eine vergleichbare Veränderung in Abhängigkeit der Therapien auf (Abbildung 9). *IL-1 β* und *IL-6R* zeigten eine sehr niedrige Expression in der NXS2-HGW-Zellkultur. Diese Genexpressionen stellten sich im Tumorgewebe signifikant

induziert dar ($[1,36|0,54$ vs. $0,04|0,02]_{IL-1\beta}$ und $[1,13|0,52$ vs. $0,20|0,06]_{IL-6R}$. $**P < 0,01$). Dies verdeutlichte der *fold change* (FC) von 32,02 bzw. 5,63. Dem entgegengesetzt stellte sich die Expression von *IL-6* bereits in der Zellkultur gut nachweisbar dar und zeigte nur eine leichte Tumor-abhängige Induktion der Expression ($[1,57|1,23$ vs. $1,14|0,23]_{IL-6}$).

Die Expression von *IL-1 β* , *IL-6* und *IL-6R* wurde durch die MRC-Blockade mit Anti-CD11b-AK im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich inhibiert ($[0,81|0,53]_{IL-1\beta}$, $[0,87|0,67]_{IL-6}$, $[0,80|0,21]_{IL-6R}$). Die MRC-Depletion mittels 5-FU konnte diese Ergebnisse für diese drei Gene bestätigen ($[0,87|0,44]_{IL-1\beta}$, $[1,01|0,35]_{IL-6}$, $[0,80|0,21]_{IL-6R}$).

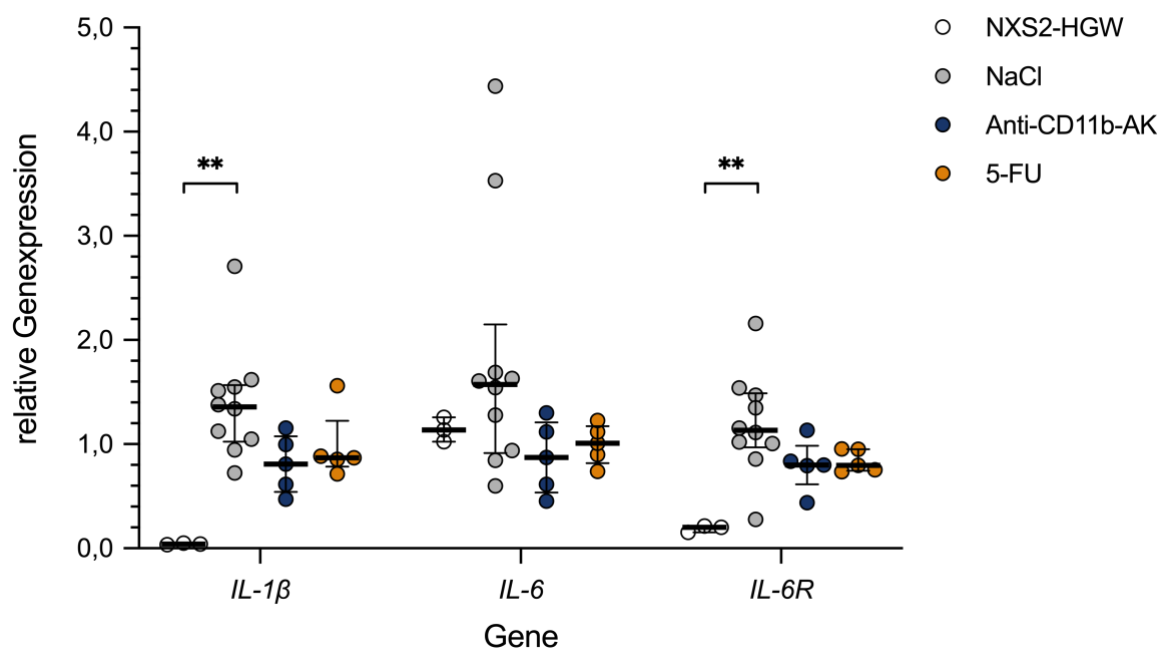


Abbildung 9: Relative Genexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen und *IL-6*-Rezeptor. Analyse der relativen Genexpression von *IL-1 β* , *IL-6* und *IL-6R* bei NXS2-HGW-Zellen (weiß) sowie im Tumorgewebe in Abhängigkeit zu den Therapien mit Anti-CD11b-AK (blau) und 5-FU (orange) sowie der NaCl Kontrolle (grau). Darstellung des 25 %-Quartils, Medians und 75 %-Quartils, alle Datenpunkte dargestellt. $**P < 0,01$ für NXS2-HGW vs. NaCl.

Zusammenfassend zeigen diese Daten eine Tumor-bedingte Induktion der Genexpression *in vivo* und eine hohe Basisexpression von *IL-6 in vitro*. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expressionen der untersuchten Gene *IL-1 β* , *IL-6* und *IL-6R* im Rahmen der MRC-depletierenden Therapien im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht abnahmen. Diese Daten deuten auf eine Tumor-bedingte Induktion der Genexpression sowie eine durch die MRC-Depletion bedingte Reduktion der inflammatorischen Umgebung des Tumorgewebes hin. Das lässt auf antitumorale Effekte einer MRC-Depletion beim NB schließen.

(2) *Anti-inflammatorische Zytokine und Enzyme*. Die Expressionen der für anti-inflammatorisch wirkende Zytokine und Enzyme kodierenden Gene *Arg1*, *IDO*, *IL-4* sowie *IL-10* werden in Abbildung 10 dargestellt. Auch in dieser Gruppe ließen sich Parallelen und Unterschiede der Auswirkungen einer Reduktion der MRC auf die Genexpression erkennen. Es zeigte sich deutlich, dass alle Gene in den NXS2-HGW-Zellen eine geringe Basisexpression und einen sehr geringen IQR aufwiesen ($[0,02|0,01]_{Arg1}$, $[0,06|0,04]_{IDO}$, $[0,24|0,10]_{IL-4}$, $[0,01|0,01]_{IL-10}$). Für *Arg1*, *IL-4* sowie *IL-10* stellte sich eine signifikante Tumor-assoziierte Erhöhung der Expression mit einem FC von respektive 43,59, 3,86 und 55,43 im Vergleich zu den NXS2-HGW dar ($[0,89|0,98]_{Arg1}$, $[0,92|0,61]_{IL-4}$, $[0,62|0,80]_{IL-10}$. * $P < 0,05_{Arg1}$, ** $P < 0,01_{IL-4, IL-10}$).

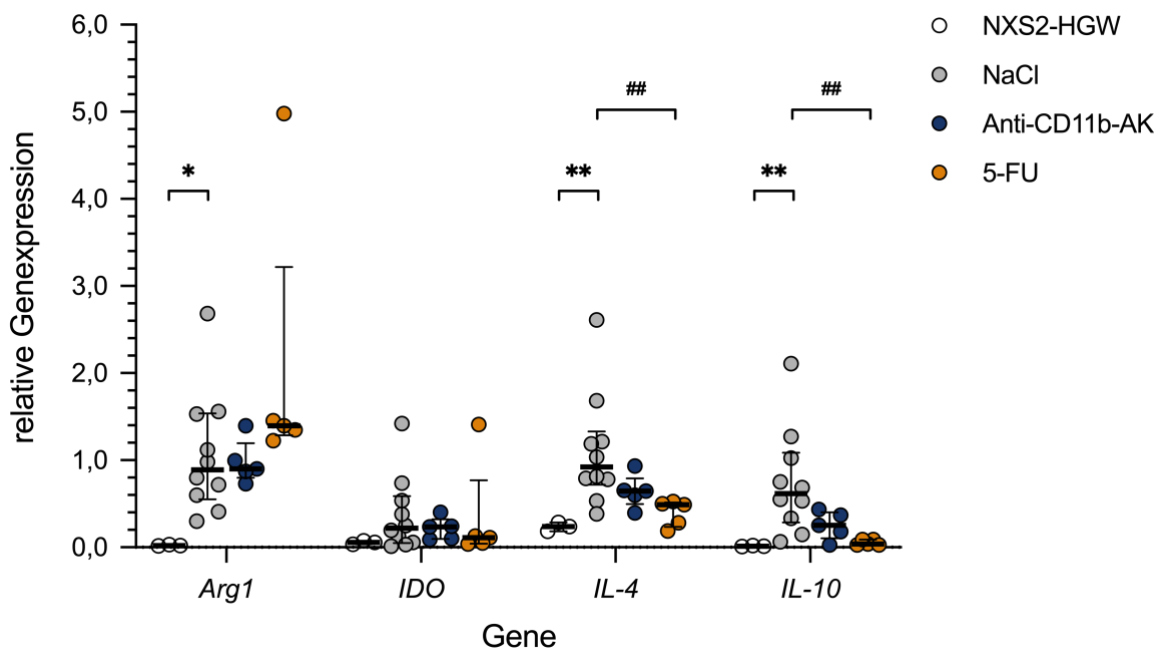


Abbildung 10: Relative Genexpression von anti-inflammatorischen Zytokinen und Enzymen. Analyse der relativen Genexpression von *Arg1*, *IDO*, *IL-4* und *IL-10* bei NXS2-HGW-Zellen (weiß) sowie im Tumorgewebe in Abhängigkeit der Therapien mit Anti-CD11b-AK (blau) und 5-FU (orange) sowie der Kontrolle NaCl (grau). Darstellung des 25 %-Quartils, Medians und 75 %-Quartils, alle Datenpunkte dargestellt. * $P < 0,05$ für NXS2-HGW vs. NaCl, ** $P < 0,01$ NXS2-HGW vs. NaCl, ## $P < 0,01$ NaCl vs. 5-FU.

Für *Arg1* und *IDO* ließ sich keine starke Veränderung durch die MRC-Blockade der Anti-CD11b-Therapie im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Hingegen zeigte sich für *IL-4* und *IL-10* eine MRC-abhängige Tendenz zur Reduktion der Genexpression (FC respektive 0,70 und 0,41). Unerwartet bewirkte die 5-FU Therapie eine Induktion der Genexpression für *Arg1* im Vergleich zur Kontrolle ($[1,40|1,93$ vs. $0,89|0,98]_{Arg1}$); eine deutliche Rechtsschiefe der Daten durch den Maximalwert von 4,98 war zu beachten. Für *IDO* zeigte sich eine geringe Reduktion der Express-

ion durch die MRC-Depletion mit 5-FU im Vergleich zu NaCl. Hierbei fiel die erhöhte Spannweite der *IDO*-Daten auf, welche auf den Maximalwert von 1,41 zurückzuführen war. Eine von der MRC-Depletion mittels 5-FU abhängige signifikante Reduzierung der Genexpression wurde bei *IL-4* und *IL-10* im Vergleich zu der Kontrolle beobachtet ($[0,49|0,28$ vs. $0,92|0,61]_{IL-4}$, $[0,04|0,06$ vs. $0,62|0,80]_{IL-10}$. $##P < 0,01$).

Zusammenfassend wurde eine signifikante Tumor-bedingte Induktion der Expression von *Arg1*, *IL-4* und *IL-10* nachgewiesen. Für *IL-4* und *IL-10* konnte weiterhin eine von der MRC-Depletion abhängige Reduktion nach Therapie mit Anti-CD11b-AK nachgewiesen werden, welche sich nach 5-FU-Therapie signifikant darstellte. Für *IDO* zeigte sich eine 5-FU-abhängige Tendenz zur Reduktion der Genexpression. *Arg1* wies hingegen eine überraschende Induktion durch die 5-FU-Therapie auf.

(3) *Zytokine und Enzyme mit dualer Funktion*. Viele Zytokine besitzen nicht nur eine primäre Funktion in der Regulation der Immunreaktion, sondern werden von verschiedenen Faktoren beeinflusst, so dass sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen zu beobachten sind – sie wirken somit dual. In diesem Kontext wurden *IFN γ* , *iNOS* und *TGF- β 1* analysiert (Abbildung 11). Die Genexpression von NXS2-HGW-Zellen war für *IFN γ* und *iNOS* jeweils sehr niedrig; im primären Tumorgewebe wies die Kontrollgruppe signifikant induzierte Expressionen dieser Gene auf ($[0,37|0,66$ vs. $0,08|0,05]_{IFN\gamma}$, $[0,78|0,63$ vs. $0,06|0,04]_{iNOS}$. $*P < 0,05_{IFN\gamma}$, $**P < 0,01_{iNOS}$). Die Genexpression von *TGF- β 1* in NXS2-HGW-Zellen präsentierte sich hingegen bereits deutlich nachweisbar; eine Tumor-abhängige Induktion der Expression konnte jedoch nicht gezeigt werden ($[0,95|0,07$ vs. $1,07|1,54]_{TGF-\beta 1}$).

Die MRC-Blockade durch Anti-CD11b-AK bewirkte nur für *TGF- β 1* eine leichte, nicht signifikante Reduktion im Vergleich zur NaCl-Kontrolle. Eine einheitlichere Reduktion der Genexpression konnte durch die 5-FU-Therapie gezeigt werden. So zeigte die spezifischere MRC-Depletion eine signifikante Reduktion der *IFN γ* -Expression ($[0,03|0,23$ vs. $0,37|0,66]_{IFN\gamma}$. $##P < 0,01$) sowie eine leichte Reduktion Expression von *TGF- β 1* im Vergleich zur Kontrolle. Die Expression von *iNOS* wurde durch keine der Therapien deutlich beeinflusst.

Im Überblick zeigte sich für *IFN γ* und *iNOS* eine Induktion der Genexpression im primären Tumorgewebe *in vivo* sowie eine Therapie-abhängige Reduktion der Expression durch 5-FU (*IFN γ*) und negative Tendenz nach Anti-CD11b-Therapie (*TGF- β 1*).

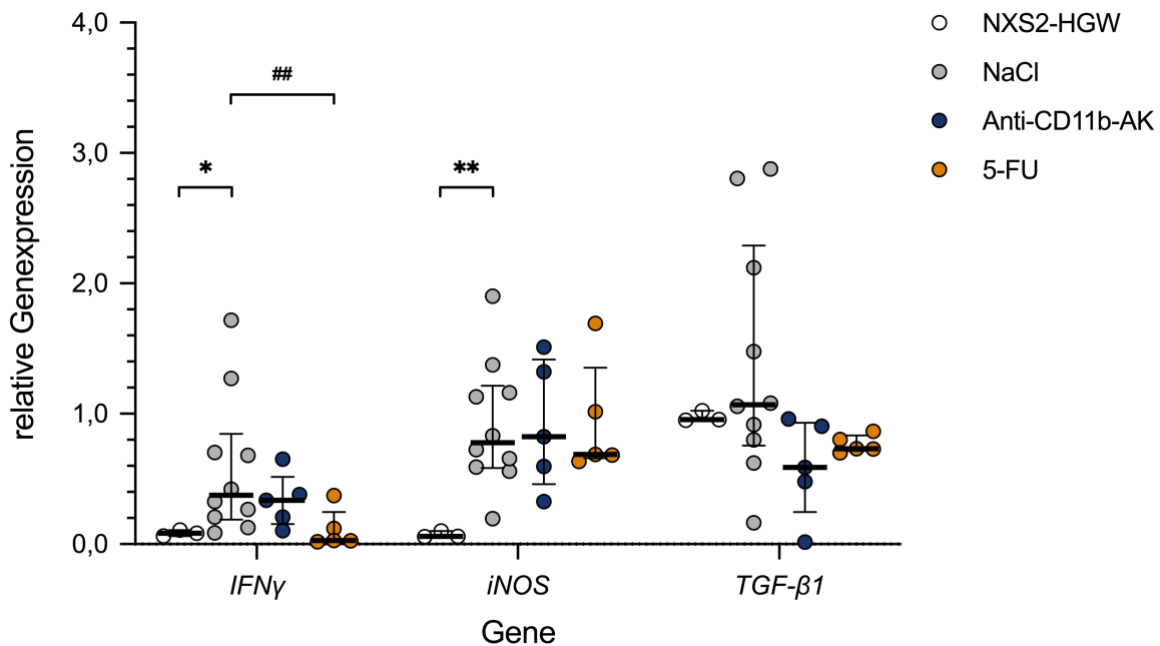


Abbildung 11: Relative Genexpression von dual wirkenden Zytokinen und Enzymen. Analyse der relativen Genexpression von *IFN γ* , *iNOS* und *TGF- β 1* bei NXS2-HGW-Zellen (weiß) sowie im Tumorgewebe in Abhängigkeit der Therapien mit Anti-CD11b-AK (blau) und 5-FU (orange) sowie der Kontrolle NaCl (grau). Darstellung des 25 %-Quartils, Medians und 75 %-Quartils, alle Datenpunkte dargestellt. * $P < 0,05$ für NXS2-HGW vs. NaCl, ** $P < 0,01$ für NXS2-HGW vs. NaCl, ## $P < 0,01$ NaCl vs. 5-FU.

(4) *Chemokine und Wachstumsfaktoren.* In der vierten Subgruppe der Chemokine und Wachstumsfaktoren, welche für die Migration und Proliferation von u. a. myeloiden Zellen fundamental sind, wurden *CCL2*, *GM-CSF*, *IL-8*, *M-CSF*, *M-CSFR* sowie *VEGF-A* untersucht (Abbildung 12). Auch hier zeigte sich für NXS2-HGW-Zellen bei der Mehrheit der analysierten Gene (*CCL2*, *GM-CSF*, *IL-8*, *M-CSF*) eine niedrige Genexpression. *In vivo* konnte eine signifikante Tumor-bedingte Erhöhung der Genexpression im Vergleich zu NXS2-HGW festgestellt werden ([1,05|0,85 vs. 0,05|0,00]_{*CCL2*}, [0,57|0,84 vs. 0,10|0,05]_{*GM-CSF*}, [0,94|1,02 vs. 0,18|0,07]_{*IL-8*}, [0,66|0,83 vs. 0,11; 0,07]_{*M-CSFR*}. ** $P < 0,01$). Die Genexpression von *M-CSF* und *VEGF-A* konnten schon in den NXS2-HGW-Zellen deutlich nachgewiesen werden. Es konnte für die *M-CSF*-Expression eine signifikante Tumor-assoziierte Induktion beobachtet werden ([0,76|0,07 vs. 1,06|0,49]_{*M-CSF*}. * $P < 0,05$). *VEGF-A* hingegen zeigte aufgrund einer starken Streuung der Werte keine signifikanten Differenzen zu der Kontrollgruppe [1,03|0,06 vs. 1,21|2,67]_{*VEGF-A*}).

Nach MRC-Blockade mittels Anti-CD11b-AK zeigte sich für fast alle betrachteten Gene eine leichte Reduktion der Expression. Für *M-CSF* stellte sich diese sogar signifikant dar ([0,78|0,21 vs. 1,06|0,49]_{*M-CSF*}. \$ $P < 0,05$). Bei Betrachtung der mit

5-FU behandelten Gruppe zeigte sich ein heterogenes Bild. Für *IL-8* zeigte sich im Vergleich zu NaCl eine signifikante 5-FU-abhängige Expressionsreduktion ($[0,43|0,20$ vs. $0,94|1,02]_{IL-8}$. $\#P < 0,05$). *M-CSFR* wies eine geringe Erhöhung der Expression im Vergleich zur Kontrolle auf ($[0,72|0,54$ vs. $0,66|0,83]_{M-CSFR}$). Für die übrigen Gene konnte eine Tendenz zur Reduktion ihrer Expressionen gezeigt werden (FC 0,49 – 0,77).

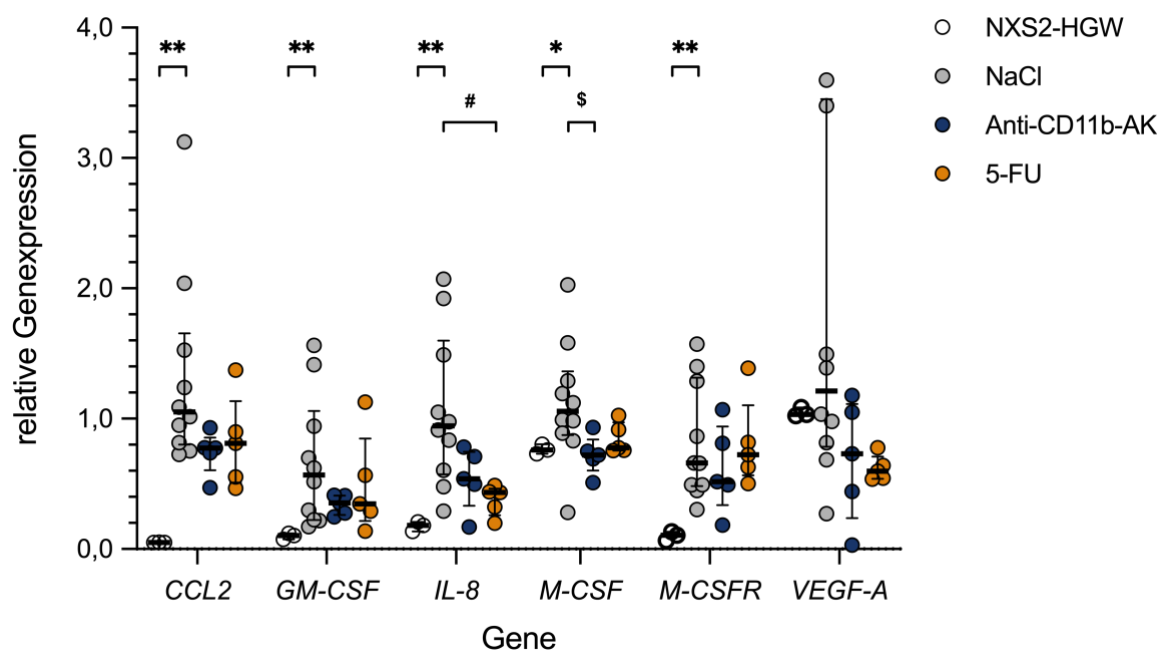


Abbildung 12: Relative Genexpression von Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Analyse der relativen Genexpression von *CCL2*, *GM-CSF*, *IL-8*, *M-CSF*, *M-CSFR* und *VEGF-A* bei NXS2-HGW-Zellen (weiß) sowie im Tumorgewebe in Abhängigkeit der Therapien mit Anti-CD11b-AK (blau) und 5-FU (orange) sowie der Kontrolle NaCl (grau). Darstellung des 25 %-Quartils, Medians und 75 %-Quartils, alle Datenpunkte dargestellt. * $P < 0,05$ für NXS2-HGW vs. NaCl, ** $P < 0,01$ für NXS2-HGW vs. NaCl, § $P < 0,05$ NaCl vs. Anti-CD11b-AK, # $P < 0,05$ NaCl vs. 5-FU.

Zusammenfassend konnte für alle Gene mit Ausnahme von *VEGF-A* eine signifikante Tumor-bedingte Induktion der Genexpression nachgewiesen werden. Weiterhin wurde für die Mehrheit der Chemokine nach Depletion der MRC eine leichte Reduktion der Genexpression gezeigt. Allerdings war durch interne Abweichungen und Überschneidung eine signifikante Reduktion und Gruppenspezifität nur bei *M-CSF* durch die Anti-CD11b-AK-Therapie und bei *IL-8* durch die 5-FU-Therapie im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Für *CCL2*, *GM-CSF*, *VEGF-A* (Anti-CD11b-AK, 5-FU) sowie *M-CSFR* (Anti-CD11b-AK) konnte nur ein leichter Trend zur Reduktion der Genexpression im Vergleich zur NaCl-Gruppe beobachtet werden.

4.4 Expressionsanalyse MRC-modulierender Gene in murinen Splenozyten

Zusätzlich zur Analyse des Tumorgewebes wurden Splenozyten untersucht, um ein Bild der peripheren Genexpressionsdynamik nach verschiedenen Therapien zu gewinnen (Abbildung 13). Hierfür wurden die Splenozyten aus gesunden Mäusen (nachstehend „Milz“) mit den Kontrollen (NaCl) verglichen sowie der Einfluss der Therapien (Anti-CD11b-AK, 5-FU) auf die Genexpression untersucht.

(1) *Pro-inflammatorische Zytokine*. In der Gruppe der pro-inflammatorisch wirkenden Zytokine zeigte sich ein heterogenes Bild. *IL-1 β* und *IL-6R* wurden in der Milz gesunder, nicht behandelter Mäuse stärker als in der Milz tumortragender Mäuse exprimiert ([0,70|0,27 vs. 0,52|0,36]_{*IL-1 β*} , [0,79|0,13 vs. 0,27|0,24]_{*IL-6R*}). Für *IL-6R* stellte sich diese Verringerung statistisch signifikant dar (FC: 0,34_{*IL-6R*}. **P* < 0,05). *IL-6* zeigte hingegen nur eine geringe Expression in den gesunden Geweben und blieb konstant exprimiert ([0,06|0,02 vs. 0,06|0,02]_{*IL-6*}).

Weiterhin konnten keine Unterschiede der *IL-6*-Expression durch MRC-depletierende Therapien mit Anti-CD11b-AK und 5-FU festgestellt werden (respektive [0,06|0,02] und [0,07|0,03]). Nach CD11b-Blockade konnte für *IL-1 β* und *IL-6R* eine niedrigere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (FC: 0,37_{*IL-1 β*} und 0,29_{*IL-6R*}). Die Expression dieser Gene wies eine unerwartete Erhöhung um das 1,64- bzw. 3,10-fache nach 5-FU-Therapie auf.

Zusammenfassend stellte sich *IL-6* nur geringfügig in allen Gruppen nachweisbar dar. Im Gegensatz zum Tumorgewebe zeigte sich eine Tumor-assoziierte Reduktion der Expression von *IL-1 β* und *IL-6R* in der Kontrollgruppe. Weiterhin zeigten sich für die beiden Gene gegensätzliche Regulationen aufgrund der MRC-depletierenden Therapien (Anti-CD11b-AK reduzierend, 5-FU induzierend). Hieraus lässt sich eine leicht reduzierte systemische Expression inflammatorischer Gene nach MRC-Depletion mittels Anti-CD11b-AK ableiten, welche ebenfalls im Tumorgewebe gezeigt werden konnte. Für 5-FU konnte hingegen keine Reduktion der Expression in Splenozyten festgestellt werden.

(2) *Anti-inflammatorische Zytokine*. Die Gruppe der anti-inflammatorischen Zytokine stellte sich, bezogen auf die Genexpression, zweigeteilt dar. *Arg1* und *IL-10* wurden nicht bzw. nur reduziert im gesunden Gewebe exprimiert und wiesen in tumor-

tragenden Mäusen keine Veränderung der Expression im Vergleich auf ($[0,00|0,00$ vs. $0,00|0,00$] $_{Arg1}$, $[0,09|0,05$ vs. $0,08|0,04$] $_{IL-10}$). *IDO* und *IL-4* stellten sich hingegen in beiden Gruppen mit deutlich nachzuweisender Expression und Tumor-bedingter Induktion dar ($[0,33|0,26$ vs. $0,40|0,22$] $_{IDO}$, $[0,47|0,29$ vs. $0,71|0,26$] $_{IL-4}$).

Im Rahmen der MRC-Reduktion mittels Anti-CD11b-AK zeigte sich eine einheitliche Reduktion der Genexpressionen für *IDO*, *IL-4* und *IL-10* im Vergleich zur Kontrollgruppe (FC: $0,82_{IDO}$, $0,67_{IL-4}$ und $0,62_{IL-10}$); die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. *Arg1* konnte nach MRC-Depletion mittels Anti-CD11b-AK- und 5-FU erstmalig geringfügig nachgewiesen werden. Die *IL-10*-Expression erhöhte sich durch die 5-FU-Therapie im Vergleich zur NaCl-Gruppe (FC: $2,39_{IL-10}$). *IDO* und *IL-4* wiesen nach der selektiven MRC-Depletion eine reduzierte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle auf (FC: $0,57_{IDO}$ und $0,46_{IL-4}$). Hierbei handelte es sich um eine für *IL-4* signifikante Reduktion ($\#P < 0,05$).

Zusammenfassen zeigte *Arg1* eine schwache Expression mit geringen Tumor- und Therapie-bedingten Veränderungen. Die MRC-Reduktion wirkte in Abhängigkeit der Therapie gegensätzlich auf die Expression von *IL-10* (Reduktion durch Anti-CD11b-AK, Induktion durch 5-FU). Die Expression von *IDO* und *IL-4* wurde hingegen durch beide Therapien reduziert. Es zeigte sich insgesamt eine Tendenz zur Reduktion der Expression anti-inflammatorischer Gene in der Analyse der Splenozyten nach MRC-depletierender Therapie. Diese Ergebnisse entsprachen auch der Analyse der Anti-CD11b- (*IL-4*, *IL-10*) und 5-FU-Therapie (*IDO*, *IL-4*) des Tumorgewebes.

(3) *Zytokine mit dualer Funktion*. In der Gruppe der dual wirkenden Zytokine zeigten sich verschiedene Tendenzen in der Veränderung der Expression der analysierten Gene. *IFN γ* präsentierte sich als einziges Gen in dieser Gruppe mit einer Tumor- und Therapie-unabhängigen, konstant niedrigen Genexpression ($[0,07-0,10]_{IFN\gamma}$). Dahingegen wiesen *iNOS* und *TGF- β 1* eine deutlich detektierbare Genexpression im gesunden Gewebe auf. Die jeweilige Genexpression der tumorbelasteten Mäuse stellte sich mit reduzierter Expression dar ($[0,70|0,57$ vs. $0,32|0,45$] $_{iNOS}$, $[0,80|0,34$ vs. $0,50|0,44$] $_{TGF-\beta1}$).

Die beiden Therapien mit Anti-CD11b-AK und 5-FU zeigten jedoch sehr unterschiedliche Resultate. Die Genexpression von *iNOS* und *TGF- β 1* wurde Anti-CD11b-AK-abhängig im Vergleich zur Kontrolle reduziert (FC: $0,79_{iNOS}$ und $0,63_{TGF-\beta1}$). Die MRC-Depletion mittels 5-FU führte zu einem differenzierteren Bild

im Vergleich zur Blockade mittels Anti-CD11b-AK: Hier konnte für *iNOS* eine fast konstante und für *TGF-β1* eine induzierte Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (FC: 1,10_{*iNOS*}, 1,94_{*TGF-β1*}). Allerdings wiesen die Datenpunkte von *TGF-β1* für die 5-FU-Therapie eine große Spannweite auf.

Zusammenfassend präsentierten sich die Ergebnisse der Genexpression der dual wirkenden Zytokine mit einer konstant niedrigen Expression von *IFNγ* und leichter therapieabhängigen Reduktion von *iNOS*; diese zeigten keine statistischen Signifikanzen. Eine gegensätzliche Wirkung der Therapien konnte für *TGF-β1* gezeigt werden (Reduktion der Expression durch Anti-CD11b-AK, Induktion durch 5-FU). Die für dual wirkenden Zytokine kodierenden Gene zeigten eine heterogene Regulation und Beeinflussung durch die Therapien, auf die detaillierter in der Diskussion eingegangen wird.

(4) *Chemokine und Wachstumsfaktoren*. Auch in der Gruppe der Chemokine und Wachstumsfaktoren ließen sich unterschiedliche Tendenzen in der Dynamik der Genexpression in Abhängigkeit zu verschiedenen Therapien feststellen. Die Analyse von *CCL2* und *IL-8* zeigte bereits im gesunden Gewebe eine deutlich nachweisbare Expression, die sich Tumor-bedingt signifikant erhöhte ([0,93|0,04 vs. 0,81|0,04]_{*CCL2*} und [0,50|0,16 vs. 0,38|0,15]_{*IL-8*}. **P* < 0,05). Im gesunden Gewebe konnten auch *GM-CSF*, *M-CSF* und *M-CSFR* deutlich nachgewiesen werden; die Genexpression reduzierte sich hierbei Tumor-abhängig in der Kontrollgruppe (FC: 0,51 – 0,84).

Durch die MRC-Blockade mittels Anti-CD11b-AK stellte sich eine fast konstante Expression der Gene *GM-CSF* und *M-CSFR* dar (FC: 0,94 – 0,97), für *CCL2* und *IL-8* zeigte sich nur eine leichte Tendenz zur Reduktion. Abweichend zeigte sich *M-CSF*, dessen Expression Anti-CD11b-AK-abhängig deutlich gehemmt wurde (FC: 0,24). Die *CCL2*-Expression sank durch die Depletion der MRC mittels 5-FU signifikant ([0,88|0,03] vs. [0,93|0,04]_{*CCL2*}. ##*P* < 0,05). Eine Tendenz zur Reduktion der Genexpression ergab sich nach 5-FU-Therapie weiterhin für *IL-8* und *M-CSF* ([0,30|0,23 vs. 0,50|0,16]_{*IL-8*}, [0,23|0,20 vs. 0,26|0,11]_{*M-CSF*}). *GM-CSF* und *M-CSFR* präsentierten sich nach dieser Therapie hingegen mit leicht bis deutlich erhöhten Expressionen (FC respektive 1,09 und 2,03). Hierbei zeigte sich eine große Spannweite der Daten für *M-CSFR*. *VEGF-A* nahm als Wachstumsfaktor eine Sonderrolle

ein und wurde in allen Geweben unabhängig einer Tumorbelastung oder der Therapie nur geringfügig und mit kleinem IQR exprimiert.

Zusammengefasst stellte sich eine Tumor-bedingte Induktion der Genexpression von *CCL2* und *IL-8* peripher dar. Die Depletion von MRC zeigte eine Expressions-reduzierende Wirkung auf die Gene *CCL2*, *IL-8* und *M-CSF*. Für die Therapien bei *GM-CSF* und *M-CSFR* konnte jedoch durch interne Variabilität bei niedriger Grund-expression keine eindeutige Wirkung festgestellt werden. Insbesondere für *CCL2*, *IL-8* und *M-CSF* zeigten sich vergleichbare Tendenzen der beiden Therapien in den Splenozyten, wie im zuvor analysierten Tumorgewebe.

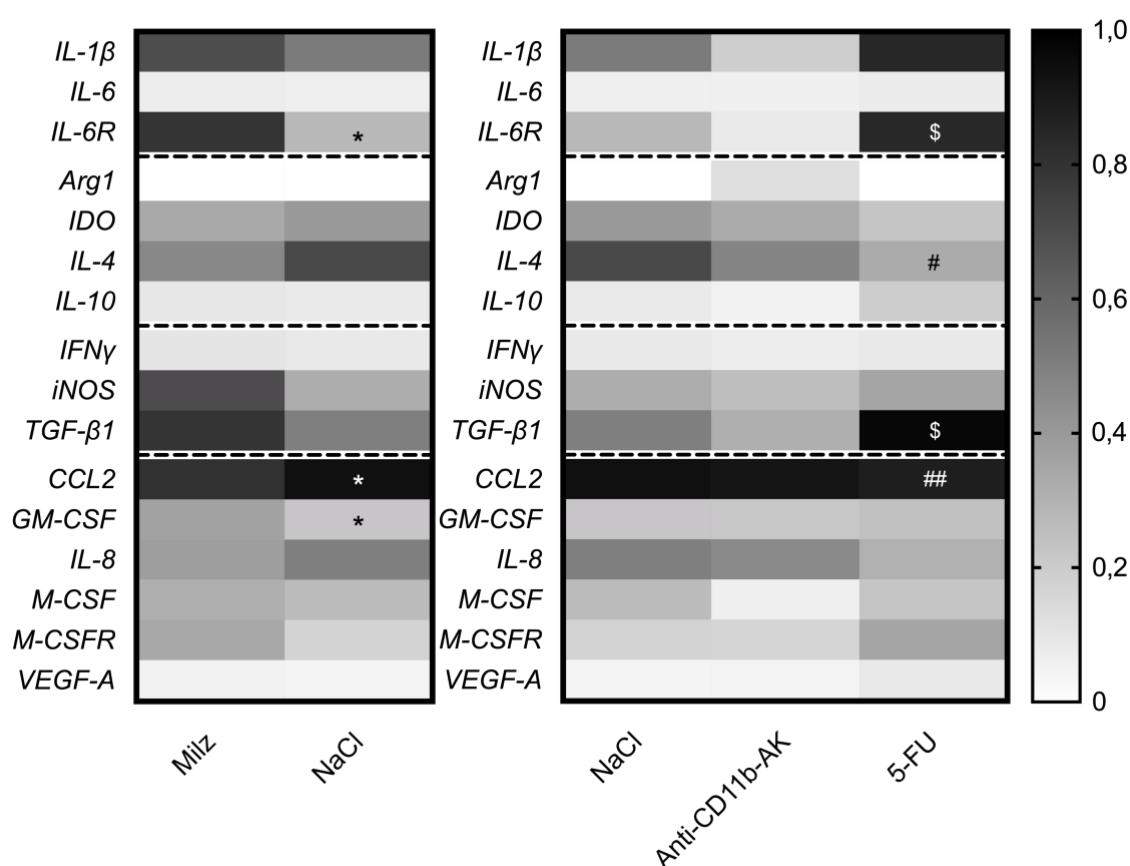


Abbildung 13: Heatmap der relativen Genexpression MRC-modulierender Gene in murinen Splenozyten. Darstellung der medianen relativen Genexpression in Graustufen von 0,0 (weiß) bis 1,0 (schwarz) in Abhängigkeit zur Therapie. * $P < 0,05$ vs. Milz, # $P < 0,05$ vs. NaCl, ## $P < 0,01$ vs. NaCl, \$ $P < 0,05$ vs. Anti-CD11b-AK.

4.5 Einfluss der MRC-Depletion auf die Expression MRC-modulierender Gene im Rahmen einer Anti-GD₂-Immuntherapie

Die zu untersuchenden MRC-modulierenden Gene des TME wurden weiterhin nach Anti-GD₂-Immuntherapie in Kombination mit einer MRC-Depletion analysiert.

Hierfür wurde zuerst der Einfluss der Anti-GD₂-Monotherapie auf die Genexpression im TME untersucht. Anschließend wurde diese mit der im Fokus dieser Arbeit stehenden Kombinationstherapie (ch14.18/CHO + 5-FU) verglichen (Abbildung 14). Es zeigte sich für fast alle Gene eine deutliche Anti-GD₂-AK-abhängige Induktion der Genexpression des TME im Vergleich zur Kontrolle. Insbesondere *IDO*, *IFN γ* und *IL-10* zeigten einen FC von respektive 2,48, 3,83 und 2,24. Auch die Genexpressionen von *Arg1*, *IL-4* und *IL-8* wiesen eine Therapie-bedingte Induktion um mindestens 50 % auf.

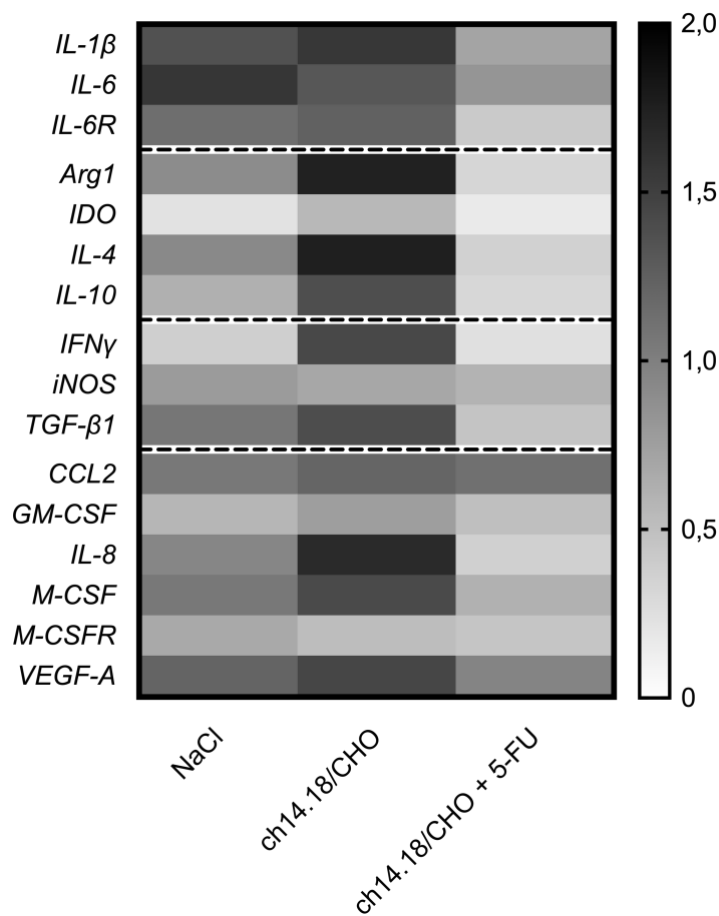


Abbildung 14: Heatmap der relativen Genexpression MRC-modulierender Gene im TME nach Immuntherapien. Darstellung der medianen relativen Genexpression in Graustufen von 0,0 (weiß) bis 2,0 (schwarz) in Abhängigkeit zur Therapie mit dem Anti-GD₂-AK ch14.18/CHO oder einer Kombination aus ch14.18/CHO und 5-FU im Vergleich zur NaCl-Kontrolle. Basierend auf eigener Darstellung in Siebert et al. [71].

Die zusätzliche Depletion von MRC mittels 5-FU in Kombination mit dem Anti-GD₂-AK ch14.18/CHO resultierte bereits im Vergleich zur Kontrolle in einer deutlichen Reduktion der Expressionsstärke fast aller MRC-modulierender Gene im Tumorgewebe; für *Arg1*, *IL-4*, *IL-6R*, *IL-8*, *IL-10* und *TGF- β 1* sogar um mehr als die Hälfte. Weiterhin konnte die deutliche Therapie-bedingte Reduktion der Genexpression

durch die Kombination mit 5-FU im Vergleich zur ch14.18/CHO-Monotherapie gezeigt werden. Die Expression aller Gene konnte hier eindeutig reduziert werden. Dies zeigte sich insbesondere in einer Reduktion der Genexpression um mindestens 50 % für *Arg1*, *IDO*, *IFN γ* , *IL-1 β* , *IL-4*, *IL-6R*, *IL-8*, *IL-10*, *M-CSF* und *TGF- β 1*. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die etablierte Anti-GD₂-Immuntherapie die Genexpression MRC-modulierender Gene im TME im Vergleich zur Kontrolle induziert und diese durch die Kombination mit 5-FU effektiv reduziert werden kann.

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Das NB präsentiert sich als häufigster solider extrakranieller Tumor im Kleinkindalter für *high-risk*-Patient*innen noch immer als meist letale Erkrankung. Durch neue GD₂-gerichtete AK-basierte Immuntherapien konnte in den letzten Jahren das OS für dieses Patient*innenkollektiv von 56 % auf 73 % verbessert werden [43]. Dies unterstreicht die weiterhin nötige Forschung auf dem Feld der pädiatrischen Onkologie, um das Überleben der Patient*innen weiter zu verbessern. Ziel dieser Arbeit war daher zu untersuchen, ob die antitumorale Wirksamkeit der Anti-GD₂-Immuntherapie mit dem chimären AK ch14.18/CHO durch die Depletion der immunsupprimierenden MRC, deren pro-tumorale Wirkung bereits bei vielen Tumorerkrankungen gezeigt worden ist, verbessert werden kann. Hierfür wurden die MRC mittels zweier Ansätze (Anti-CD11b-AK und 5-FU) reduziert und die Effekte dieser Therapien auf das Tumorwachstum, das Überleben sowie die relative Expression von MRC-modulierenden Genen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen für beide MRC-gerichtete Therapien eine anti-tumorale Wirkung *in vivo* auf. Hierfür maßgeblich sind eine deutlich verringerte Dynamik des Tumorwachstums nach Anti-CD11b-AK-Therapie sowie ein verbessertes Überleben der Versuchstiere. Diese Ergebnisse werden durch 5-FU bestätigt und zum Teil weiter verbessert. Die in dieser Arbeit für Zytokine, Enzyme, Chemokine und Wachstumsfaktoren kodierenden Gene zeigen fast alle eine deutliche Tumor-bedingte Induktion der Expression auf. Dies verdeutlicht die pro-tumoral wirkende Tumorumgebung und den Einfluss auf die periphere Inflammation.

In Abhängigkeit zu der Therapiegruppe und des untersuchten Gewebes stellt sich die Expression der untersuchten Gene hingegen heterogen dar. So kann die Reduktion der inflammatorischen Gene im TME durch beide Therapien erreicht werden. Peripher (Milz) zeigen sich vergleichbare Effekte nach Therapie mit dem Anti-CD11b-AK. Diese Daten legen eine reduzierte inflammatorische Umgebung sowohl des Tumors als auch peripher durch die Reduktion von MRC dar.

Für die anti-inflammatorischen Gene können keine so starken Tendenzen im TME beobachtet werden; nur *IL-4* und *IL-10* werden durch beide Therapien inhibiert. Unerwartet stellt sich *Arg1* nach Therapie mit 5-FU erhöht dar. Erwartet wurde hier

eine Reduktion der Expression, da in anderen Tumoren gezeigt werden konnte, dass *Arg1* durch MRC exprimiert wird und eine immunsuppressive Wirkung aufweist. Die hierbei zugrundeliegenden Mechanismen sollten weiter untersucht werden. In der Analyse der peripheren Genexpressionen wird eine Reduktion anti-inflammatorischer Gene gezeigt. Dies kann die Reduktion inhibitorischer Effekte der Genprodukte sowie eine Stärkung der Anti-Tumorantwort bewirken.

Unter den dual wirkenden Genen zeigt sich eine Reduktion der Genexpression im TME für *IFN γ* durch 5-FU und für *TGF- β 1* durch den Anti-CD11b-AK. Für *IFN γ* stellt die Reduktion ein zu diskutierendes Ergebnis dar, welches ebenfalls genauer untersucht werden muss. Dieser Trend zur Reduktion der Genexpression wird auch in der Peripherie gezeigt. Eine eindeutige Aussage zur Auswirkung der Therapien auf die Tumorgenese und die Inflammation auf Basis der heterogenen Genexpression der dual-wirkenden Genprodukte und ihrer differenzierten Wirkung kann nicht getroffen werden.

Die Analyse der Chemokine lässt auf eine fast einheitliche Reduktion der Genexpression durch die Depletion von MRC schließen. Auch in der Peripherie zeigt sich eine leichte Tendenz zur Reduktion. Dies deutet auf eine leicht verminderte Chemotaxis der Tumorgenese hin.

Zusammenfassend ergeben sich Anti-NB-spezifische Effekte durch ein verbessertes OS und vermindertes Tumorwachstum besonders durch die MRC-Depletion mittels 5-FU. Weiterhin wird initial die Induktion der Expression pro-tumoraler Gene *in vivo* gezeigt. Durch die Blockade und Depletion von MRC wird die Reduktion der Genexpression im TME sowie der Milz von Versuchstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht. Somit stellt die Depletion von MRC im Tumormodell des NB eine neuartige Therapiemöglichkeit dar. Diese Daten dienen als Grundlage, um die anti-tumorale Wirksamkeit der in der Klinik bereits etablierten Anti-GD₂-Immuntherapie durch eine Reduktion der MRC weiter zu steigern.

Zur Evaluation der Kombinationstherapie aus ch14.18/CHO und 5-FU wurden weiterführende Analysen durchgeführt. Hier wird ein deutlich verbessertes OS durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie mit 5-FU oder ch14.18/CHO sowie ein verzögertes Tumorwachstum gezeigt. Die Überlegenheit der Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie wird auch durch die Auswertung der Genexpression im TME verdeutlicht. Die GD₂-gerichtete Monotherapie

induziert die Expression pro-tumoraler MRC-modulierender Gene im Vergleich zur NaCl-Kontrolle deutlich. Diese Induktion wird durch die Kombination der Anti-GD₂-Therapie mit 5-FU effektiv reduziert.

Zusammenfassend stellt sich die Depletion der MRC als eine vielversprechende Zusatztherapie zur Verbesserung der klinisch etablierten Anti-GD₂-Immuntherapie gegen das NB dar.

5.2 Einfluss des TME auf die Immunsuppression

5.2.1 Therapiebedingte immunregulatorische Effekte im TME

In den letzten Jahren konnten verschiedene immuntherapeutische Verfahren, wie z. B. die Applikation von Anti-GD₂-AK, den Behandlungserfolg von *high-risk*-NB-Patient*innen verbessern [130]. Trotzdem wird eine heterogene Anti-Tumorantwort beobachtet und mehr als 25 % der Patient*innen dieser Gruppe versterben immer noch [43]. Mögliche Mechanismen der Tumorevasion, die die Effektivität der Therapien reduzieren können, sind u. a. regulatorischer Natur (z. B. Immuncheckpoints, immunsuppressive Zellen) als Reaktion auf die Therapie oder direkt durch *cancer immunoediting* des Tumors [44].

In früheren Arbeiten legte unsere AG dar, dass der Immuncheckpoint PD-1/PD-L1 auf Tumor- und Effektorzellen nach ADCC durch den chimären Anti-GD₂-AK ch14.18/CHO *in vitro* stark ansteigt [72]. Hieraus resultiert eine Resistenz gegenüber den anti-tumoralen Effekten des AK, welche durch zusätzliche Blockade des PD-1/PD-L1-Signalwegs teilweise wiederhergestellt werden kann [72]. Weiterhin zeigen frühere Arbeiten der AG, dass eine Kombinationstherapie von ch14.18/CHO mit einem Anti-CD11b-AK die PD-L1-Expression auf Tumorzellen nach Induktion durch ADCC reduziert und anti-tumorale Effekte *in vitro* verstärkt. Dies weist auf eine pro-tumoral wirkende Beteiligung von CD11b⁺-Zellen im Rahmen der Tumorevasion hin. Eine starke Infiltration dieser Zellen in das TME wird in dem dieser Arbeit zugrundeliegenden Mausmodell durch Siebert et al. bestätigt [71]. Weiterhin zeigt sich nach ADCC mit ch14.18/CHO eine Induktion von verschiedenen MRC-modulierende Zytokinen *in vitro* (CCL2, GM-CSF, IFN γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, M-CSF, TGF- β 1) [71].

In der vorliegenden Arbeit bestätigt sich die durch Siebert et al. beschriebene, ch14.18/CHO-vermittelte Induktion der Zytokine auf Genexpressionsebene *in vivo*.

Die hier untersuchten Gene repräsentieren eine Gruppe pro-tumoraler, MRC-induzierender Mediatoren [131]. Weiterhin zeigt diese Arbeit, dass die MRC-depletierende Kombinationstherapie aus ch14.18/CHO und 5-FU die Induktion der untersuchten Gene *in vivo* vermindert.

Zusammengenommen unterstreichen die zusätzlich gewonnen Erkenntnisse die Komplexität der Auswirkung von Immuntherapeutika: Sie induzieren nicht nur eine Anti-Tumorantwort, sondern aktivieren auch weitere regulatorische Mechanismen, die sogar pro-tumoral wirken können. Hieraus ergibt sich zusätzlicher Bedarf MRC-hemmender Therapien, wie der CD11b-Blockade oder Depletion durch 5-FU. So kommen auch Frosch et al. [132], Tumino et al. [133] und Weber et al. [134] zu dem Erkenntnis, dass MRC-fokussierte Therapien eine wirkungsvolle Verbesserung in Kombination mit AK-basierten Immuntherapien darstellen.

5.2.2 Einfluss der MRC auf die Genexpression

In den letzten Jahren lag ein verstärkter Fokus auf der Erforschung, Charakterisierung und Wirkung der immunsuppressiv wirkenden CD11b⁺-Zellen [131]. Diese Zellen umfassen eine heterogene Gruppe aus unausgereiften, myeloiden regulatorischen Zellen, welche T- und NK-Zellen inhibieren sowie zum Tumorstadium, der Metastasierung und der Bildung von Resistenzen gegenüber Immuntherapeutika beitragen [131]. So generiert die NB-Therapie mit ch14.18/CHO *in vitro* eine wirksame Anti-Tumorantwort, lässt allerdings zeitgleich die Anzahl von CD11b⁺-Zellen im TME ansteigen und induziert die untersuchten MRC-modulierenden Zytokine [71]. Die pro-tumorale Wirkung dieser Genprodukte durch die direkte Inhibierung von Effektorzellen und/oder Induktion immunsuppressiver T_{reg} und MRC sowie die Induktion von Immuncheckpoints werden in dieser Arbeit eingehend dargelegt.

Die Blockade der CD11b⁺-Zellen bewirkt eine Reduktion der Tumor-bedingten Induktion der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. Hervorzuheben ist, dass die Expression nicht nur im TME, sondern sogar auch in der Peripherie reduziert wird. Diese Ergebnisse werden durch die selektivere Depletion von MRC mittels 5-FU, ohne dabei NK-Zellen zu eliminieren, bestätigt und verbessert. In Zusammenschau mit dem ebenfalls verbesserten Überleben und reduzierten Tumorstadium legt dies deutlich die pro-tumorale Auswirkung von MRC im TME sowie

in der Peripherie dar und unterstreicht die Relevanz dieser Zellen in der Tumorgenese.

Im Rahmen dieser Arbeit lassen sich auch unerwartete Ergebnisse bei der Analyse der Expression im TME für *Arg1* und *IFN γ* sowie in der Milz für *IL-1 β* , *IL-6R* und *TGF- β 1* beobachten. So zeigt sich für *Arg1* eine Induktion der Genexpression nach therapeutischer Reduktion von MRC (Abbildung 10). Diese Daten legen eine mögliche anti-tumorale Funktion des Enzyms Arg1 nahe. So wird eine Überexpression von *Arg1* in Brustkrebszellen positiv mit dem Überleben assoziiert und eine mögliche Rolle als Tumorsuppressor postuliert [135]. Diese Wirkung scheint sich von der durch MRC im TME exprimierten Arg1 zu unterscheiden, welche eine starke immunsuppressive Wirkung aufweist und Effektorzellen inhibieren kann [57, 79, 136]. Eine Induktion durch IL-4 und IL-10 kann durch deren reduzierte Genexpression im TME weitgehend ausgeschlossen werden. Allerdings werden auch alternative, IL-4 unabhängige Mechanismen der Regulation der *Arg1*-Expression beschrieben, welche die Geninduktion bewirken können [137]. Weiterhin zeigt sich bei Betrachtung der Daten, dass insbesondere ein Einzelwert die rechtsschiefe Verteilung der Daten bewirkt (4,98 vs. 1,22 – 1,45). Allerdings haben verschiedene Studien gezeigt, dass Arg1 sowohl als Tumorpromoter agiert, als auch vereinzelte anti-tumorale Effekte auf das Tumorstadium hat [57, 79, 135-137]. Daher sind weitere Untersuchungen nötig, um das auffällige Resultat in unserem Modell zu erklären.

Für *IFN γ* können gegensätzliche Effekte gezeigt werden, da das Gen im TME durch die MRC-Depletion signifikant supprimiert wird (Abbildung 11). Dies deutet auf eine Tumor-induzierende Wirkung des Interferons hin. Die *IFN γ* -abhängige Tumorgenese wird in diversen Studien für verschiedene Tumoren durch die Induktion des PD-1/PD-L1-Checkpoints durch Effektorzellen dargelegt [100, 101, 138, 139]. Weiterhin wird eine Induktion des Immuncheckpoints CTLA-4, der die Immun-evasion des Tumors fördert, durch *IFN γ* im Melanom gezeigt [102]. Dennoch betont die Mehrheit an Studien die primär anti-tumorale Wirkung von *IFN γ* [94, 95, 97], so dass eine weiterführende Untersuchung der unerwarteten Ergebnisse auch hier notwendig ist.

Ähnlich wie im TME werden auffällige Ergebnisse auch in der Peripherie festgestellt. So kann für die pro-inflammatorischen Gene *IL-1 β* und *IL-6R* die Reduktion der

Genexpression nur durch Anti-CD11b-AK und nicht durch 5-FU nachgewiesen werden (Abbildung 13). Auch *TGF-β1*, als Gen der dual wirkenden Zytokine, stellt sich entgegen den Erwartungen im Rahmen der systemischen Untersuchung durch die 5-FU-Therapie mit erhöhten Werten in der Milz dar (Abbildung 13). Aufgrund der dualen Wirkung auf das Immunsystem ist ein genauer und eindeutiger Grund für die Induktion der Genexpression schwer zu identifizieren. So kann TGF-β1 zu Beginn der Tumorgenese als Tumorsuppressor wirken [93], bei hohen Konzentrationen wird durch Fabregat et al. allerdings eine Resistenz gegenüber den anfänglich dargelegten anti-tumoralen Mechanismen nachgewiesen [103].

Zusätzlich ist zu beachten, dass die Analyse der Genexpression durch RT-PCR nicht die tatsächliche Exprimierung der Mediatoren aufzeigen kann. Da komplexe Regulationsmechanismen der Epigenetik sowie posttranslationale Mechanismen die Transkription der DNA beeinflussen können, sind weitere Untersuchungen auch auf Proteinebene nötig [140]. Diese sollen die tatsächliche Auswirkung der Mediatoren im TME und systemisch auf den Tumor sowie das Immunsystem genauer darlegen. Daher ist eine weiterführende Analyse der untersuchten Gene und ihrer Produkte geboten, die auch die Expression auf Proteinebene betrachtet und die Wirkung dieser Zytokine im Rahmen weiterer *in vivo* NB-Versuche präziser untersucht.

5.3 Wirkung der Therapeutika

Zur Blockade und selektiven Depletion von MRC werden für die notwendigen Experimente im Rahmen dieser Arbeit ein Anti-CD11b-AK und 5-FU verwendet. Der Anti-CD11b-AK von *BioXCell* neutralisiert die Funktion der Zielzellen über die direkte Bindung an das Antigen CD11b. Dies verhindert die Bildung des Makrophagen-1-Antigen-Komplexes (Mac-1, CD11b/CD18) und dessen Bindung mit Liganden (u. a. CD40L) [141]. Die Blockade von CD11b ist allerdings in zweierlei Hinsicht unspezifisch. Nicht nur myeloide Zellen und MRC exprimieren diesen Oberflächenmarker, auch die Funktionen von B-, T- und vor allem NK-Zellen, die im Rahmen einer Anti-GD₂-AK-Therapie von enormer Bedeutung sind, können hierdurch beeinträchtigt werden [119]. Weiterhin kann die unspezifische Blockade des Mac-1 eine große Bandbreite der Zellfunktionalität (u. a. Phagozytose und Apoptose) inhibieren und einen Zytokinsturm *in vivo* induzieren [141]. Bei einer zukünftig möglichen therapeutischen Anwendung sollte daher differenziert werden, welche Auswirkungen

die unspezifische Blockade von CD11b und die selektive Blockade einzelner Liganden auf Effektorzellen haben.

5-FU hingegen ist bereits als Chemotherapeutikum in der klinischen Therapie diverser Tumoren etabliert [142]. Als Antimetabolit inhibiert es die DNA-Synthese und kann so die Zellteilung von Tumoren reduzieren [142]. Bekannte unerwünschte Effekte, welche für die Therapien in dieser Arbeit ausgeschlossen werden sollten, sind unter anderem die Leukopenie und Neutropenie [143]. Vincent et al. zeigen eine selektiv zytotoxische Wirkung auf MRC bei der genutzten Dosierung von 50 mg/kg KG [120]. Diese Erkenntnisse finden Eingang in diese Arbeit.

Unsere AG untersuchte auch die unspezifische zytotoxische Wirkung von 5-FU auf Effektorzellen sowie Tumorzellen. Mit einem XTT-basierten Assay wurde gezeigt, dass 5-FU nur eine geringfügige zytotoxische Wirkung auf die NB-Zellen NXS2-HGW hat, welche keine statistischen Signifikanzen aufweist [71]. Dies deutet auf eine primär anti-tumorale Wirkung von 5-FU durch die dargelegte Depletion der pro-tumoralen MRC hin, auch wenn eine leichte direkte Zytotoxizität auf Tumorzellen nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Festzustellen ist eine ähnliche Wirkung auf Effektorzellen sowie CD4⁺- und CD8⁺-Zellen, welche nicht signifikant in ihrer Zahl beeinträchtigt werden [71]. Dies hat bei der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration keinen oder einen nur sehr geringen Effekt auf die Viabilität von Immunzellen *in vitro*.

Einen wichtigen Punkt hinsichtlich der Optimierung der 5-FU-basierten Therapien stellt die richtige Konzentration des Zytostatikums dar. Orecchioni et al. zeigten, dass dosis- und zeitabhängig nicht nur MDSC/MRC und T_{reg} durch 5-FU depletiert werden können, sondern auch die Anzahl von APC und Effektorzellen unterschiedlich beeinflusst werden, welche für eine ausgeprägte Anti-Tumor-Immunantwort notwendig sind [144]. Daher könnte eine Alteration der Applikationshäufigkeit und -dosis das Tumorwachstum und mögliche Resistenzbildungen gegen 5-FU beim NB noch weiter verbessern. So nutzen Tian et al. ein Therapieregime mit geringerer Dosis, allerdings kombiniert mit einer häufigeren Applikation und längerer Therapiedauer im Vergleich zu dem hier genutzten Therapiemodell [145].

Die gegen GD₂-gerichtete AK-Therapie mittels ch14.18/CHO ist bereits klinisch etabliert. Dennoch stellen sich für die Kombinationstherapie mit 5-FU noch Möglichkeiten zur Verbesserung der Therapie dar. Insbesondere während der Therapie-

dauer (bis Tag 18) wird eine effektive Wirkung der Kombinationstherapie mit einer deutlichen Reduktion des Tumorwachstums dargelegt. Um diese Effekte zu potenzieren, könnte die Therapiedauer von ch14.18/CHO verlängert werden. Weiterhin sollte der Betrachtungszeitraum erweitert werden, um mögliche späte Therapieunterschiede aufzuzeigen. Dies wird durch die bereits dargelegte Verbesserung des Überlebens durch die Kombinationstherapie im Vergleich zu allen anderen Therapien verdeutlicht.

5.4 Optimierung des In-vivo-Modells

Für diese Arbeit wurden RT-PCR-Analysen des Tumorgewebes und der Milzzellen, die in einer fortgeschrittenen Tumorwachstumsphase asserviert wurden, durchgeführt. Um mögliche Variablen wie den Analysezeitpunkt auf die sensible Regulation der Genexpression auszuschließen, sollte die Entnahme an spezifischere Faktoren geknüpft sein. So könnte die Genexpression von Tumoren in weitere Subgruppen abhängig von der Tumorwachstumsphase eingeteilt werden (z. B. Frühphase = Tumor-bedingte Resistenzen noch nicht vorhanden, Mittel- bzw. Spätphase = Therapie-Resistenzen sind vorhanden, stark immunsuppressives TME entstanden). Hierdurch könnte eine stärkere Differenzierung zwischen den Therapien und Therapieerfolgen und den entsprechenden Genexpressionen stattfinden.

Zeitgleich unterstreicht diese Erkenntnis den effektiven Einfluss der Therapien auf die Genexpression; bereits ohne spezifische Subgruppenanalyse und trotz des deutlich immunsuppressiven TME werden signifikante Daten gewonnen. Erste Hinweise auf eine stärkere Inflammation im TME großer Tumoren hat unsere AG mit den vorliegenden Daten bereits dargelegt, allerdings nur im Rahmen einer geringen Stichprobengröße [71]. Daher sind zur Evaluation dieser Beobachtungen größere Tierversuchsgruppen, welche stets gegen ethische Argumente abgewogen werden müssen, und weiterführende Untersuchungen notwendig.

Weiterhin stellt das genutzte Tumormodell, welches nach subkutaner Injektion der NXS2-HGW-Zellen mit ihrer aggressiven Natur bereits innerhalb einer Woche zur Ausbildung eines etablierten Primärtumors führt, einen idealen Rahmen für den Vergleich verschiedener Therapien dar. Allerdings ist die AG gefordert, durch die stetig fortschreitende Verbesserung ihrer experimentell erprobten Therapien, die

etablierte Therapiestrategie weiterzuentwickeln (Beginn, Frequenz und Häufigkeit der Applikation). So bestehen derzeit deutliche Wachstumsdifferenzen der Tumoren zwischen den genutzten Therapien und der Kontrollgruppe (Abbildung 6). Unterschiede zwischen Therapien lassen sich allerdings nur schwer darstellen und zeigen selten Signifikanzen auf.

Um die möglichen Therapieeinflüsse auf das Tumorwachstum besser darstellen zu können, wurde für nachfolgende Untersuchungen das Applikationsschema durch die AG verändert [146]. Die Behandlungen erfolgen hierbei zu einem späteren Zeitpunkt nach Tumorapplikation, so dass die Tumoren bereits etabliert sind und ein Volumen von ca. 100 mm³ aufweisen [146]. Dadurch wird eine gewisse Resistenz des Tumors erreicht. Es konnten differenziertere Ergebnisse zwischen den Therapiegruppen erreicht werden. Daher sollte für weitergehende Versuche eine Anpassung des Therapieschemas bedacht werden.

5.5 Statistische Methodik

In der Arbeit wurden In-vivo-Versuche an Mäusen durchgeführt, um die Effekte des Anti-CD11b-AK, 5-FU, ch14.18/CHO und der Kombinationstherapie aus ch14.18/CHO + 5-FU auf das Tumorwachstum, die Überlebenswahrscheinlichkeit sowie die Genexpression MRC-modulierender Gene zu untersuchen. Hierfür wurde eine Versuchsgruppengröße von zehn bis zwölf Tieren, basierend auf vorherigen Berechnungen und Versuchen der AG, genutzt: Diese lieferten aussagekräftige Daten zum Tumorwachstum und Überleben. Weiterhin wurde die Genexpression von Tumoren und Milzen der Versuchstiere durch RT-PCR untersucht. Bei der geringen Stichprobengröße konnte kein Test auf Normalverteilung durchgeführt werden, sodass nicht-parametrische Tests zur statistischen Auswertung genutzt wurden.

Bei geringem Stichprobenumfang kann bei konstanter Power eine Signifikanz nur bei großer Effektstärke aufgezeigt werden. Sind die Effekte der Therapien hingegen klein, was bei dynamischen Systemen, der Betrachtung des heterogenen Immunsystems und durch den späten Zeitpunkt der Analyse in einer resistenten Phase anzunehmen ist, so muss entweder der Stichprobenumfang (Anzahl der Versuchstiere/Proben) steigen oder die Power der Versuche sinken. Bei geringer Power steigt somit die Wahrscheinlichkeit, relevante Auswirkungen der Therapien auf die

Genexpression MRC-modulierender Gene zu übersehen und als nicht signifikant zu werten. Daher sind weitere, gegebenenfalls größere und gezieltere Untersuchungen zur Auswirkung der Therapien auf die Genexpression in diesem NB-Modell von Relevanz.

5.6 Ausblick und mögliche Anwendung

Seit Anfang der 2000er-Jahre können neuartige Immuntherapien mit Anti-GD₂-AK in der Behandlung von *high-risk*-NB deutliche Verbesserungen des Überlebens für Patient*innen erzielen [130]. Es zeigen sich allerdings noch immer variable Ansprechraten unter der Therapie und Patient*innen mit Tumorrezidiven und schlechtem Überleben. Mögliche Erklärungen dieses Umstandes liefern durch den Tumor vermittelte immunsuppressive Effekte, durch die Immuntherapie induzierte regulatorische Mechanismen (z. B. Immuncheckpoints) sowie die Induktion immunsuppressiver Mechanismen der regulatorischen Zellpopulationen [72]. So hat unsere AG in vorangegangenen Arbeiten bereits eine Induktion von PD-L1 nach Anti-GD₂-Therapie beobachtet, welche durch die Kombination mit einer Anti-PD-1-Immuncheckpoint-Blockade oder dem Anti-CD11b-AK aufgehoben werden konnte [72]. Hieraus ließ sich die Beteiligung von CD11b⁺ MRC nachweisen.

In den letzten Jahren intensivieren sich die Untersuchungen zu dieser immunsuppressiven Zellpopulation sowie die Anstrengungen der Klassifizierung, Charakterisierung und Einordnung ihrer Funktion stetig. Die MRC stellen eine heterogene Gruppe unreifer myeloider Zellen dar, welche die T- und NK-Zell-Aktivität inhibieren und das Tumorwachstum, Metastasierung und Therapieresistenzen begünstigen können [131]. Auch beim NB kann eine verstärkte Infiltration von MRC [70, 147] und assoziierter Zytokine [148] im TME gezeigt werden, welche eine Korrelation zur negativen Prognose und erhöhter Expression MRC-modulierender Gene im TME aufweisen [70].

Auch in dieser Arbeit wird eine Tumor-bedingte Induktion der Expression modulierender Gene im TME, sowie die weitere Induktion durch den therapeutischen AK ch14.18/CHO gezeigt. Diese Gene können pro-tumorale Effekte in einer Reihe von Tumoren durch die direkte Inhibition von anti-tumoralen Effektorzellen und/oder Induktion immunsuppressiver Zellen (T_{reg} und MRC) und/oder Induktion von Immuncheckpoints bewirken [131]. Zudem kann die Reduktion des Tumolvolumens und

die Verbesserung des Überlebens durch die Anti-CD11b-AK-Therapie gezeigt werden. Weitere Untersuchungen zur konkreten Zellpopulation der CD11b⁺-Zellen/MRC, welche die beobachteten immunsuppressiven, pro-tumoralen Effekte bewirken, sind notwendig, um zielgenauere Therapeutika zu finden. Hierbei könnten funktionelle Essays einen direkten suppressiven Effekt der CD11b⁺-Zellen auf NK- und T-Zellen darlegen.

Eine verbesserte Therapieoption ermöglicht das in dieser Arbeit verwendete 5-FU, welches bei einer bestimmten Konzentration (50 mg/kg KG) selektiv die MRC dezimiert und in der genutzten Dosierung NK-Zellen nicht beeinflusst [71, 120]. Die Reduktion MRC-modulierender Gene durch die tumorsuppressiven Therapien mit Anti-CD11b-AK, 5-FU sowie ch14.18/CHO + 5-FU zeigt den deutlichen Zusammenhang zwischen verringertem Tumorwachstum und der Reduktion regulatorischer Mechanismen sowie pro-tumoraler Effekte im TME auf.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit durch die erfolgreiche Reduktion der MRC und ihrer modulierenden Gene besonders im TME durch die Therapie mit Anti-CD11b-AK und 5-FU eine neuartige Therapiestrategie des NB auf. Auch in anderen NB-Modellen scheint die Depletion von MRC durch 5-FU [149], Vorinostat [150], Polyphenol-E [151] und niedrig dosiertem Aspirin [148] erfolgreich zu sein und das Tumorwachstum zu inhibieren. Im Ausblick versprechen kombinierte Therapien mit bereits etablierten oder prä-klinischen monoklonalen AK [71, 152] und/oder Immuncheckpointinhibitoren [134] verbesserte Möglichkeiten zur effektiven Therapie des NB mit langfristiger Reduktion des Tumorwachstums und der Verbesserung des Überlebens für Patient*innen. Dies kann in der Arbeit bereits für die GD₂-gerichtete Kombinationstherapie aus ch14.18/CHO mit 5-FU, welche das Tumorwachstum reduziert und das Überleben der Versuchstiere verbessert, gezeigt werden. Ausblickend lassen sich die MRC als neue Zielstruktur für kombinierte Immuntherapien identifizieren. In Zukunft sollten weitere Anstrengungen unternommen werden, um möglichst zielgerichtete MRC-depletierende Medikamente zu identifizieren und ihre Wirkmechanismen sowie Auswirkungen auf andere Immunzellen und Subpopulationen aufzuschlüsseln.

6 Literaturverzeichnis

1. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. und Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 71(3): 209-249.
2. Erdmann, F., Spix, C., Katalinic, A., Christ, M., Folkerts, J., Hansmann, J., Kranzhöfer, K., Kunz, B., Manegold, K., Penzkofer, A., Tremel, K., Vollmer, G., Weg-Remers, S., Barnes, B., Buttman-Schweiger, N., Dahm, S., Fiebig, J., Franke, M., Gurung-Schönfeld, I., Haberland, J., Imhoff, M., Kraywinkel, K., Starker, A., von Berenberg-Gossler, P. und Wienecke, A. (2021). Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. Robert Koch-Institut und Die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin.
3. Erdmann, F., Kaatsch, P., Spix, C., Grabow, D. und Wellbrock, M. (2020). German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz. Mainz.
4. Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R. und Cohn, S. L. (2007). Neuroblastoma. *The Lancet*. 369(9579): 2106-2120.
5. Matthay, K. K., Reynolds, C. P., Seeger, R. C., Shimada, H., Adkins, E. S., Haas-Kogan, D., Gerbing, R. B., London, W. B. und Villablanca, J. G. (2009). Long-Term Results for Children With High-Risk Neuroblastoma Treated on a Randomized Trial of Myeloablative Therapy Followed by 13-cis-Retinoic Acid: A Children's Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology*. 27(7): 1007-1013.
6. Maris, J. M. (2010). Recent Advances in Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine*. 362(23): 2202-2211.
7. Valteau-Couanet, D., Le Deley, M.-C., Bergeron, C., Ducassou, S., Michon, J., Rubie, H., Le Teuff, G., Coze, C., Plantaz, D., Sirvent, N., Bouzy, J., Chastagner, P. und Hartmann, O. (2014). Long-term results of the combination of the N7 induction chemotherapy and the busulfan-melphalan high dose chemotherapy. *Pediatric Blood & Cancer*. 61(6): 977-981.
8. Jaffe, N. (1976). Neuroblastoma: Review of the literature and an examination of factors contributing to its enigmatic character. *Cancer Treatment Reviews*. 3(2): 61-82.
9. Simon, T., Hero, B., Eggert, A., Lode, H., Fischer, M., Timmermann, B., Schwarz, R., Fuchs, J. r., Von Schweinitz, D., Vokuhl, C., Schmidt, M., Körber, F. und Schäfer, J. r. (2019). S1-Leitlinie: Neuroblastom. 8. Version. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH).
10. Jaques, S., Tobes, M. C., Sisson, J. C., Baker, J. A. und Wieland, D. M. (1984). Comparison of the sodium dependency of uptake of meta-iodobenzylguanidine and norepinephrine into cultured bovine adrenomedullary cells. *Molecular Pharmacology*. 26(3): 539-546.
11. Nakagawara, A., Li, Y., Izumi, H., Muramori, K., Inada, H. und Nishi, M. (2018). Neuroblastoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 48(3): 214-241.

12. Cohn, S. L., Pearson, A. D. J., London, W. B., Monclair, T., Ambros, P. F., Brodeur, G. M., Faldum, A., Hero, B., Ichihara, T., Machin, D., Mosseri, V., Simon, T., Garaventa, A., Castel, V. und Matthay, K. K. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. *Journal of Clinical Oncology*. 27(2): 289-297.
13. Irwin, M. S., Naranjo, A., Zhang, F. F., Cohn, S. L., London, W. B., Gastier-Foster, J. M., Ramirez, N. C., Pfau, R., Reshmi, S., Wagner, E., Nuchtern, J., Asgharzadeh, S., Shimada, H., Maris, J. M., Bagatell, R., Park, J. R. und Hogarty, M. D. (2021). Revised Neuroblastoma Risk Classification System: A Report From the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. 39(29): 3229-3241.
14. Louis, C. U. und Shohet, J. M. (2015). Neuroblastoma: Molecular Pathogenesis and Therapy. *Annual Review of Medicine*. 66(1): 49-63.
15. Busch, W. (1868). Aus der Sitzung der medicinischen Section vom 13 November 1867. *Berliner Klinische Wochenschrift*. 5: 137.
16. Fehleisen, F. (1882). Über die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Übertragbarkeit auf den Menschen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 8(41): 553-554.
17. Coley, W. B. (1893). The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Inoculation of Erysipelas: With A Report of Ten Original Cases. *The American Journal of the Medical Sciences (1827-1924)*. 105(6): 487-511.
18. Old, L. J., Clarke, D. A. und Benaverraf, B. (1959). Effect of Bacillus Calmette-Guérin Infection on Transplanted Tumours in the Mouse. *Nature*. 184(4682): 291-292.
19. Burnet, F. M. (1970). The Concept of Immunological Surveillance. *Progress in Tumor Research*. 13: 1-27.
20. Köhler, G. und Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 256(5517): 495-497.
21. Yanagi, Y., Yoshikai, Y., Leggett, K., Clark, S. P., Aleksander, I. und Mak, T. W. (1984). A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature*. 308(5955): 145-149.
22. Van Der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van Den Eynde, B., Knuth, A. und Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 254(5038): 1643-1647.
23. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. und Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal*. 11(11): 3887-3895.
24. Leach, D. R., Krummel, M. F. und Allison, J. P. (1996). Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science*. 271(5256): 1734-1736.
25. Ehler, K., Hansjuergens, I., Zinke, A., Otto, S., Siebert, N., Henze, G. und Lode, H. (2020). Nivolumab and dinutuximab beta in two patients with refractory neuroblastoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 8(1): 1-6.

26. Jiang, T., Shi, T., Zhang, H., Hu, J., Song, Y., Wei, J., Ren, S. und Zhou, C. (2019). Tumor neoantigens: From basic research to clinical applications. *Journal of Hematology and Oncology*. 12(1): 1-13.
27. Morris, E. C., Bendle, G. M. und Stauss, H. J. (2003). Prospects for immunotherapy of malignant disease. *Clinical and Experimental Immunology*. 131(1): 1-7.
28. Schulz, G., Cheresh, D. A., Varki, N. M., Yu, A., Staffileno, L. K. und Reisfeld, R. A. (1984). Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients. *Cancer research*. 44(12 Pt 1): 5914-5920.
29. Brodeur, G., Seeger, R., Schwab, M., Varmus, H. und Bishop, J. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 224(4653): 1121-1124.
30. Sarkar, A. K. und Nuchtern, J. G. (2000). Lysis of MYCN-amplified neuroblastoma cells by MYCN peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer research*. 60(7): 1908-1913.
31. Lode, H. N., Pertl, U., Xiang, R., Gaedicke, G. und Reisfeld, R. A. (2000). Tyrosine hydroxylase-based DNA-vaccination is effective against murine neuroblastoma. *Medical and Pediatric Oncology*. 35(6): 641-646.
32. Lamant, L., Pulford, K., Bischof, D., Morris, S. W., Mason, D. Y., Delsol, G. und Mariamé, B. (2000). Expression of the ALK Tyrosine Kinase Gene in Neuroblastoma. *The American Journal of Pathology*. 156(5): 1711-1721.
33. Islam, A., Kageyama, H., Takada, N., Kawamoto, T., Takayasu, H., Isogai, E., Ohira, M., Hashizume, K., Kobayashi, H., Kaneko, Y. und Nakagawara, A. (2000). High expression of Survivin, mapped to 17q25, is significantly associated with poor prognostic factors and promotes cell survival in human neuroblastoma. *Oncogene*. 19(5): 617-623.
34. Coughlin, C. M., Fleming, M. D., Carroll, R. G., Pawel, B. R., Hogarty, M. D., Shan, X., Vance, B. A., Cohen, J. N., Jairaj, S., Lord, E. M., Wexler, M. H., Danet-Desnoyers, G.-a. H., Pinkus, J. L., Pinkus, G. S., Maris, J. M., Grupp, S. A. und Vonderheide, R. H. (2006). Immunosurveillance and Survivin-Specific T-Cell Immunity in Children With High-Risk Neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*. 24(36): 5725-5734.
35. Williams, M. A. und Bevan, M. J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annual Review of Immunology*. 25: 171-192.
36. Swain, S. L., McKinstry, K. K. und Strutt, T. M. (2012). Expanding roles for CD4 + T cells in immunity to viruses. *Nature Reviews Immunology*. 12(2): 136-148.
37. den Haan, J. M. M., Arens, R. und van Zelm, M. C. (2014). The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunology Letters*. 162(2): 103-112.
38. Vermaelen, K. (2019). Vaccine strategies to improve anticancer cellular immune responses. *Frontiers in Immunology*. 10(JAN): 1-17.
39. Schuster, M., Nechansky, A., Loibner, H. und Kircheis, R. (2006). Cancer immunotherapy. *Biotechnology Journal*. 1(2): 138-147.

40. Weiner, L. M., Surana, R. und Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 10(5): 317-327.
41. Papaioannou, N. E., Beniata, O. V., Vitsos, P., Tsitsilonis, O. und Samara, P. (2016). Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Annals of Translational Medicine*. 4(14): 1-15.
42. Khalil, D. N., Smith, E. L., Brentjens, R. J. und Wolchok, J. D. (2016). The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 13(5): 273-290.
43. Yu, A. L., Gilman, A. L., Ozkaynak, M. F., Naranjo, A., Diccianni, M. B., Gan, J., Hank, J. A., Batova, A., London, W. B., Tenney, S. C., Smith, M., Shulkin, B. L., Parisi, M., Matthay, K. K., Cohn, S. L., Maris, J. M., Bagatell, R., Park, J. R. und Sondel, P. M. (2021). Long-Term Follow-up of a Phase III Study of ch14.18 (Dinutuximab) + Cytokine Immunotherapy in Children with High-Risk Neuroblastoma: COG Study ANBL0032. *Clinical Cancer Research*. 27(8): 2179-2189.
44. Beatty, G. L. und Gladney, W. L. (2015). Immune Escape Mechanisms as a Guide for Cancer Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 21(4): 687-692.
45. Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 12: 252-264.
46. Ochsenshein, A. F., Klenerman, P., Karrer, U., Ludewig, B., Pericin, M., Hengartner, H. und Zinkernagel, R. M. (1999). Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(5): 2233-2238.
47. Ehl, S., Hombach, J., Aichele, P., Rüllicke, T., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R. und Pircher, H. (1998). Viral and Bacterial Infections Interfere with Peripheral Tolerance Induction and Activate CD8+ T Cells to Cause Immunopathology. *Journal of Experimental Medicine*. 187(5): 763-774.
48. Xing, Y. und Hogquist, K. A. (2012). T-Cell tolerance: Central and peripheral. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 4(6): 1-15.
49. Zhang, J., Xiao, X., Liu, W., Demirci, G. und Li, X. C. (2009). Inhibitory Receptors of the Immune System: Functions and Therapeutic Implications. *Cellular & Molecular Immunology*. 6(6): 407-414.
50. Hussain, S. P. und Harris, C. C. (2007). Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. *International Journal of Cancer*. 121(11): 2373-2380.
51. Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C. und Mantovani, A. (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 66(1): 1-9.
52. Gallimore, A. und Godkin, A. (2007). Regulatory T cells and tumour immunity - observations in mice and men. *Immunology*. 123(2): 157-163.
53. von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunology*. 6(4): 338-344.

54. Schwartz, M., Zhang, Y. und Rosenblatt, J. D. (2016). B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 4(1): 1-15.
55. Sarvaria, A., Madrigal, J. A. und Saudemont, A. (2017). B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cellular and Molecular Immunology*. 14(8): 662-674.
56. Elliott, L. A., Doherty, G. A., Sheahan, K. und Ryan, E. J. (2017). Human tumor-infiltrating myeloid cells: Phenotypic and functional diversity. *Frontiers in Immunology*. 8: 1-16.
57. Yin, Z., Li, C., Wang, J. und Xue, L. (2019). Myeloid-derived suppressor cells: Roles in the tumor microenvironment and tumor radiotherapy. *International Journal of Cancer*. 144(5): 933-946.
58. Brandau, S. (2019). MDSC and beyond: a symposium-in-writing on myeloid cells with immunoregulatory activity by members of the Mye-EUNITER network. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 68(4): 531-532.
59. Ugel, S., De Sanctis, F., Mandruzzato, S. und Bronte, V. (2015). Tumor-induced myeloid deviation: When myeloid-derived suppressor cells meet tumor-Associated macrophages. *Journal of Clinical Investigation*. 125(9): 3365-3376.
60. Berraondo, P., Sanmamed, M. F., Ochoa, M. C., Etxeberria, I., Aznar, M. A., Pérez-Gracia, J. L., Rodríguez-Ruiz, M. E., Ponz-Sarvisé, M., Castañón, E. und Melero, I. (2019). Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer*. 120(1): 6-15.
61. Fisher, D. T., Appenheimer, M. M. und Evans, S. S. (2014). The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Seminars in Immunology*. 26(1): 38-47.
62. Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A. und Bhatt, A. N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biology*. 37(9): 11553-11572.
63. Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D. und Gabrilovich, D. I. (2004). Antigen-Specific Inhibition of CD8+ T Cell Response by Immature Myeloid Cells in Cancer Is Mediated by Reactive Oxygen Species. *The Journal of Immunology*. 172(2): 989-999.
64. Zhao, Y., Wu, T., Shao, S., Shi, B. und Zhao, Y. (2016). Phenotype, development, and biological function of myeloid-derived suppressor cells. *OncolImmunology*. 5(2): 1-12.
65. Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M. und Cao, X. (2009). Cancer-Expanded Myeloid-Derived Suppressor Cells Induce Anergy of NK Cells through Membrane-Bound TGF- β 1. *The Journal of Immunology*. 182(1): 240-249.
66. Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D. L., Schneck, J. und Gaborilovich, D. I. (2007). Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nature Medicine*. 13(7): 828-835.
67. Salomon, B. L., Leclerc, M., Tosello, J., Ronin, E., Piaggio, E. und Cohen, J. L. (2018). Tumor Necrosis Factor α and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. *Frontiers in Immunology*. 9(MAR): 1-12.

68. Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P. und Adema, G. J. (2013). The immunosuppressive tumour network: Myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*. 138(2): 105-115.
69. Zhang, B., Wang, Z., Wu, L., Zhang, M., Li, W., Ding, J., Zhu, J., Wei, H. und Zhao, K. (2013). Circulating and Tumor-Infiltrating Myeloid-Derived Suppressor Cells in Patients with Colorectal Carcinoma. *PLoS ONE*. 8(2): 1-10.
70. Asgharzadeh, S., Salo, J. A., Ji, L., Oberthuer, A., Fischer, M., Berthold, F., Hadjidaniel, M., Liu, C. W.-Y., Metelitsa, L. S., Pique-Regi, R., Wakamatsu, P., Villablanca, J. G., Kreissman, S. G., Matthay, K. K., Shimada, H., London, W. B., Sposto, R. und Seeger, R. C. (2012). Clinical Significance of Tumor-Associated Inflammatory Cells in Metastatic Neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*. 30(28): 3525-3532.
71. Siebert, N., Zumpe, M., von Lojewski, L. A., Troschke-Meurer, S., Marx, M. und Lode, H. N. (2020). Reduction of CD11b+ myeloid suppressive cells augments anti-neuroblastoma immune response induced by the anti-GD2 antibody ch14.18/CHO. *Oncolimmunology*. 9(1): 1-12.
72. Siebert, N., Zumpe, M., Jüttner, M., Troschke-Meurer, S. und Lode, H. N. (2017). PD-1 blockade augments anti-neuroblastoma immune response induced by anti-GD2 antibody ch14.18/CHO. *Oncolimmunology*. 6(10): 1-14.
73. Bent, R., Moll, L., Grabbe, S. und Bros, M. (2018). Interleukin-1 Beta—A Friend or Foe in Malignancies? *International Journal of Molecular Sciences*. 19(8): 2155-2155.
74. Tanaka, T., Narazaki, M. und Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 6(10): 1-16.
75. Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E. A., Rickman, B., Betz, K. S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J. G. und Wang, T. C. (2008). Overexpression of Interleukin-1 β Induces Gastric Inflammation and Cancer and Mobilizes Myeloid-Derived Suppressor Cells in Mice. *Cancer Cell*. 14(5): 408-419.
76. Song, Y. und Yang, J. M. (2017). Role of interleukin (IL)-17 and T-helper (Th)17 cells in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 493(1): 1-8.
77. Crimeen-Irwin, B., Scalzo, K., Gloster, S., Mottram, P. L. und Plebanski, M. (2005). Failure of immune homeostasis - The consequences of under and over reactivity. *Current Drug Targets: Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*. 5(4): 413-422.
78. da Gama Duarte, J., Woods, K., Andrews, M. C. und Behren, A. (2018). The good, the (not so) bad and the ugly of immune homeostasis in melanoma. *Immunology and Cell Biology*. 96(5): 497-506.
79. Bronte, V., Serafini, P., Mazzoni, A., Segal, D. M. und Zanovello, P. (2003). L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends in Immunology*. 24(6): 301-305.

80. Draghiciu, O., Lubbers, J., Nijman, H. W. und Daemen, T. (2015). Myeloid derived suppressor cells - An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy. *Oncolimmunology*. 4(1): 1-10.
81. Munn, D. H. und Mellor, A. L. (2016). IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends in Immunology*. 37(3): 193-207.
82. Ho, I. C. und Miaw, S.-C. (2016). Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases. In X. Ma (Hrsg.), *Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases* (Bd. 941, S. 31-77). Dodrecht: Springer.
83. Iyer, S. S. und Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*. 32(1): 23-63.
84. Yu, J., Du, W., Yan, F., Wang, Y., Li, H., Cao, S., Yu, W., Shen, C., Liu, J. und Ren, X. (2013). Myeloid-Derived Suppressor Cells Suppress Antitumor Immune Responses through IDO Expression and Correlate with Lymph Node Metastasis in Patients with Breast Cancer. *The Journal of Immunology*. 190(7): 3783-3797.
85. Saraiva, M. und O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*. 10(3): 170-181.
86. Munn, D. H. und Mellor, A. L. (2013). Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends in Immunology*. 34(3): 137-143.
87. Holmgaard, R. B., Zamarin, D., Li, Y., Gasmi, B., Munn, D. H., Allison, J. P., Merghoub, T. und Wolchok, J. D. (2015). Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSCs in a Treg-Dependent Manner. *Cell Reports*. 13(2): 412-424.
88. Villacres, M. C. und Bergmann, C. C. (1999). Enhanced cytotoxic T cell activity in IL-4-deficient mice. *Journal of Immunology*. 162(5): 2663-2670.
89. Moore, K. W., Malefyt, R. D. W., Robert, L. und Garra, A. O. (2001). Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Molecular and Cellular Biology*. 1(1): 683-765.
90. Mannino, M. H., Zhu, Z., Xiao, H., Bai, Q., Wakefield, M. R. und Fang, Y. (2015). The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Letters*. 367(2): 103-107.
91. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M. und Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon- γ . *Annual Review of Immunology*. 15(1): 749-795.
92. Förstermann, U. und Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 33(7): 829-837.
93. Yang, L., Pang, Y. und Moses, H. L. (2010). TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*. 31(6): 220-227.
94. Young, H. A. und Hardy, K. J. (1995). Role of interferon- γ in immune cell regulation. *Journal of Leukocyte Biology*. 58(4): 373-381.

95. Martini, M., Testi, M. G., Pasetto, M., Picchio, M. C., Innamorati, G., Mazzocco, M., Ugel, S., Cingarlini, S., Bronte, V., Zanovello, P., Krampera, M., Mosna, F., Cestari, T., Riviera, A. P., Brutti, N., Barbieri, O., Matera, L., Tridente, G., Colombatti, M. und Sartoris, S. (2010). IFN- γ -mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine*. 28(20): 3548-3557.
96. Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. und Hume, D. A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 75(2): 163-189.
97. Mojic, M., Takeda, K. und Hayakawa, Y. (2017). The Dark Side of IFN- γ : Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(1): 1-13.
98. Vanini, F., Kashfi, K. und Nath, N. (2015). The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biology*. 6: 334-343.
99. Lechner, M., Lirk, P. und Rieder, J. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin. *Seminars in Cancer Biology*. 15(4): 277-289.
100. Vigneron, N. (2015). Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *BioMed Research International*. 2015: 1-17.
101. Bai, J., Gao, Z., Li, X., Dong, L., Han, W. und Nie, J. (2017). Regulation of PD-1/PD-L1 pathway and resistance to PD-1/PD-L1 blockade. *Oncotarget*. 8(66): 110693-110707.
102. Mo, X., Zhang, H., Preston, S., Martin, K., Zhou, B., Vadalía, N., Gamero, A. M., Soboloff, J., Tempera, I. und Zaidi, M. R. (2018). Interferon- γ Signaling in Melanocytes and Melanoma Cells Regulates Expression of CTLA-4. *Cancer Research*. 78(2): 436-450.
103. Fabregat, I., Fernando, J., Mainez, J. und Sancho, P. (2014). TGF- β Signaling in Cancer Treatment. *Current Pharmaceutical Design*. 20(17): 2934-2947.
104. Ikeda, S., Saijo, S., Murayama, M. A., Shimizu, K., Akitsu, A. und Iwakura, Y. (2014). Excess IL-1 Signaling Enhances the Development of Th17 Cells by Downregulating TGF- β -Induced Foxp3 Expression. *The Journal of Immunology*. 192(4): 1449-1458.
105. Melincovici, C. S., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., Moldovan, I. M., Roman, A. L. und Mişu, C. M. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 59(2): 455-467.
106. Carmeliet, P. (2005). VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology*. 69(3): 4-10.
107. Yoshimura, T. (2018). The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally? *Cellular & Molecular Immunology*. 15(4): 335-345.
108. Ushach, I. und Zlotnik, A. (2016). Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *Journal of Leukocyte Biology*. 100(3): 481-489.

109. Ha, H., Debnath, B. und Neamati, N. (2017). Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Theranostics*. 7(6): 1543-1588.
110. Lim, S. Y., Yuzhalin, A. E., Gordon-Weeks, A. N. und Muschel, R. J. (2016). Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget*. 7(19): 28697-28710.
111. Carr, M. W., Roth, S. J., Luther, E., Rose, S. S. und Springer, T. A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(9): 3652-3656.
112. Yan, W.-L., Shen, K.-Y., Tien, C.-Y., Chen, Y.-A. und Liu, S.-J. (2017). Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy*. 9(4): 347-360.
113. David, J., Dominguez, C., Hamilton, D. und Palena, C. (2016). The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance. *Vaccines*. 4(3): 1-15.
114. Waugh, D. J. J. und Wilson, C. (2008). The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 14(21): 6735-6741.
115. Liu, Q., Li, A., Tian, Y., Wu, J. D., Liu, Y., Li, T., Chen, Y., Han, X. und Wu, K. (2016). The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 31: 61-71.
116. Van Overmeire, E., Stijlemans, B., Heymann, F., Keirsse, J., Morias, Y., Elkrim, Y., Brys, L., Abels, C., Lahmar, Q., Ergen, C., Vereecke, L., Tacke, F., De Baetselier, P., Van Ginderachter, J. A. und Laoui, D. (2016). M-CSF and GM-CSF Receptor Signaling Differentially Regulate Monocyte Maturation and Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment. *Cancer Research*. 76(1): 35-42.
117. Poon, R. T.-P., Fan, S.-T. und Wong, J. (2001). Clinical Implications of Circulating Angiogenic Factors in Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*. 19(4): 1207-1225.
118. HaDuong, J. H., Blavier, L., Baniwal, S. K., Frenkel, B., Malvar, J., Punj, V., Sposto, R. und DeClerck, Y. A. (2015). Interaction between bone marrow stromal cells and neuroblastoma cells leads to a VEGFA-mediated osteoblastogenesis. *International Journal of Cancer*. 137(4): 797-809.
119. Fu, B., Tian, Z. und Wei, H. (2014). Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*. 141(4): 483-489.
120. Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rebe, C. und Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell-Dependent Antitumor Immunity. *Cancer Research*. 70(8): 3052-3061.
121. Lode, H. N., Xiang, R., Dolman, C. S., Reisfeld, R. A., Varki, N. M. und Gillies, S. D. (1997). Targeted Interleukin-2 Therapy for Spontaneous Neuroblastoma Metastases to Bone Marrow. *Journal of the National Cancer Institute*. 89(21): 1586-1594.

122. Wilfonger, W. W., Mackey, K. und Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*. 22(3): 474-481.
123. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. und Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13(1): 134-134.
124. Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. und Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*. 40(15): 1-12.
125. Schiller, K. R., Zillhardt, M. R., Alley, J., Borjesson, D. L., Beitz, A. J. und Mauro, L. J. (2009). Secretion of MCP-1 and other paracrine factors in a novel tumor-bone coculture model. *BMC Cancer*. 9(1): 1-17.
126. McCarthy, M. K., Procario, M. C., Twisselmann, N., Wilkinson, J. E., Archambeau, A. J., Michele, D. E., Day, S. M. und Weinberg, J. B. (2015). Proinflammatory Effects of Interferon Gamma in Mouse Adenovirus 1 Myocarditis. *Journal of Virology*. 89(1): 468-479.
127. Kawane, K., Tanaka, H., Kitahara, Y., Shimaoka, S. und Nagata, S. (2010). Cytokine-dependent but acquired immunity-independent arthritis caused by DNA escaped from degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(45): 19432-19437.
128. He, C., Zhao, C., Kumar, A., Lee, C., Chen, M., Huang, L., Wang, J., Ren, X., Jiang, Y., Chen, W., Wang, B., Gao, Z., Zhong, Z., Huang, Z., Zhang, F., Huang, B., Ding, H., Ju, R., Tang, Z., Liu, Y., Cao, Y., Li, X. und Liu, X. (2014). Vasoprotective effect of PDGF-CC mediated by HMOX1 rescues retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(41): 14806-14811.
129. Marx, M. (2019). Generierung eines bicistronischen DNA-Impfstoffes basierend auf der Tyrosinhydroxylase und Interleukin 15 in Kombination mit einer PD-1-gerichteten Immuncheckpoint-Blockade zur aktiven Immuntherapie beim Neuroblastom. [Dissertation, Universität Greifswald]. <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:gbv:9-opus-25561>.
130. Keyel, M. E. und Reynolds, C. P. (2019). Spotlight on dinutuximab in the treatment of high-risk neuroblastoma: Development and place in therapy. *Biologics: Targets and Therapy*. 13: 1-12.
131. Vetsika, E. K., Koukos, A. und Kotsakis, A. (2019). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Major Figures that Shape the Immunosuppressive and Angiogenic Network in Cancer. *Cells*. 8(12): 1-16.
132. Frosch, J., Leontari, I. und Anderson, J. (2021). Combined Effects of Myeloid Cells in the Neuroblastoma Tumor Microenvironment. *Cancers (Basel)*. 13(7): 1-25.
133. Tumino, N., Weber, G., Besi, F., Del Bufalo, F., Bertaina, V., Paci, P., Quatrini, L., Antonucci, L., Sinibaldi, M., Quintarelli, C., Maggi, E., De Angelis, B., Locatelli, F., Moretta, L., Vacca, P. und Caruana, I. (2021). Polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells impair the anti-tumor efficacy of GD2.CAR T-cells in patients with neuroblastoma. *Journal of Hematology & Oncology*. 14(1): 1-7.

134. Weber, R., Fleming, V., Hu, X., Nagibin, V., Groth, C., Altevogt, P., Utikal, J. und Umansky, V. (2018). Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Immunol.* 9: 1-9.
135. Ming, Z., Zou, Z., Cai, K., Xu, Y., Chen, X., Yi, W., Luo, J. und Luo, Z. (2021). ARG1 functions as a tumor suppressor in breast cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 52(11): 1257-1264.
136. Grzywa, T. M., Sosnowska, A., Matryba, P., Rydzynska, Z., Jasinski, M., Nowis, D. und Golab, J. (2020). Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response. *Frontiers in Immunology.* 11(May): 1-24.
137. Sharda, D. R., Yu, S., Ray, M., Squadrito, M. L., De Palma, M., Wynn, T. A., Morris, S. M. und Hankey, P. A. (2011). Regulation of Macrophage Arginase Expression and Tumor Growth by the Ron Receptor Tyrosine Kinase. *The Journal of Immunology.* 187(5): 2181-2192.
138. Spranger, S., Spaapen, R. M., Zha, Y., Williams, J., Meng, Y., Ha, T. T. und Gajewski, T. F. (2013). Up-regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells. *Science Translational Medicine.* 5(200): 1-10.
139. Abiko, K., Matsumura, N., Hamanishi, J., Horikawa, N., Murakami, R., Yamaguchi, K., Yoshioka, Y., Baba, T., Konishi, I. und Mandai, M. (2015). IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *British Journal of Cancer.* 112(9): 1501-1509.
140. Kagohara, L. T., Stein-O'Brien, G. L., Kelley, D., Flam, E., Wick, H. C., Danilova, L. V., Easwaran, H., Favorov, A. V., Qian, J., Gaykalova, D. A. und Fertig, E. J. (2018). Epigenetic regulation of gene expression in cancer: Techniques, resources and analysis. *Briefings in Functional Genomics.* 17(1): 49-63.
141. Wolf, D., Anto-Michel, N., Blankenbach, H., Wiedemann, A., Buscher, K., Hohmann, J. D., Lim, B., Bäuml, M., Marki, A., Mauler, M., Duerschmied, D., Fan, Z., Winkels, H., Sidler, D., Diehl, P., Zajonc, D. M., Hilgendorf, I., Stachon, P., Marchini, T., Willecke, F., Schell, M., Sommer, B., Von Zur Muhlen, C., Reinöhl, J., Gerhardt, T., Plow, E. F., Yakubenko, V., Libby, P., Bode, C., Ley, K., Peter, K. und Zirlik, A. (2018). A ligand-specific blockade of the integrin Mac-1 selectively targets pathologic inflammation while maintaining protective host-defense. *Nature Communications.* 9(1): 1-10.
142. Longley, D. B., Harkin, D. P. und Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer.* 3(5): 330-338.
143. Kadoyama, K., Miki, I., Tamura, T., Brown, J. B., Sakaeda, T. und Okuno, Y. (2012). Adverse event profiles of 5-fluorouracil and Capecitabine: Data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system, AERS, and reproducibility of clinical observations. *International Journal of Medical Sciences.* 9(1): 33-39.
144. Orecchioni, S., Talarico, G., Labanca, V., Calleri, A., Mancuso, P. und Bertolini, F. (2018). Vinorelbine, cyclophosphamide and 5-FU effects on the circulating and intratumoural landscape of immune cells improve anti-PD-L1 efficacy in preclinical models of breast cancer and lymphoma. *British Journal of Cancer.* 118(10): 1329-1336.

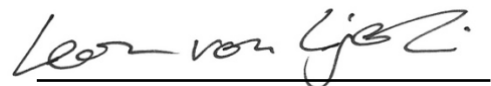
145. Tian, J., Zhang, D., Kurbatov, V., Wang, Q., Wang, Y., Fang, D., Wu, L., Bosenberg, M., Muzumdar, M. D., Khan, S., Lu, Q., Yan, Q. und Lu, J. (2021). 5-Fluorouracil efficacy requires anti-tumor immunity triggered by cancer-cell-intrinsic STING. *EMBO Journal*. 40(7): 1-17.
146. Siebert, N., Leopold, J., Zumpe, M., Troschke-Meurer, S., Biskupski, S., Zikoridse, A. und Lode, H. N. (2022). The Immunocytokine FAP-IL-2v Enhances Anti-Neuroblastoma Efficacy of the Anti-GD(2) Antibody Dinutuximab Beta. *Cancers (Basel)*. 14(19): 1-18.
147. Santilli, G., Anderson, J., Thrasher, A. J. und Sala, A. (2013). Catechins and antitumor immunity: Not MDSC's cup of tea. *Oncoimmunology*. 2(6): 1-2.
148. Carlson, L.-M., Rasmuson, A., Idborg, H., Segerström, L., Jakobsson, P.-J., Sveinbjörnsson, B. und Kogner, P. (2013). Low-dose aspirin delays an inflammatory tumor progression in vivo in a transgenic mouse model of neuroblastoma. *Carcinogenesis*. 34(5): 1081-1088.
149. Dierckx de Casterlé, I., Fevery, S., Rutgeerts, O., Poosti, F., Struyf, S., Lenaerts, C., Waer, M., Billiau, A. D. und Sprangers, B. (2018). Reduction of myeloid-derived suppressor cells reinforces the anti-solid tumor effect of recipient leukocyte infusion in murine neuroblastoma-bearing allogeneic bone marrow chimeras. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 67(4): 589-603.
150. Kroesen, M., Büll, C., Gielen, P. R., Brok, I. C., Armandari, I., Wassink, M., Looman, M. W. G., Boon, L., den Brok, M. H., Hoogerbrugge, P. M. und Adema, G. J. (2016). Anti-GD2 mAb and Vorinostat synergize in the treatment of neuroblastoma. *Oncolimmunology*. 5(6): 1-12.
151. Santilli, G., Piotrowska, I., Cantilena, S., Chayka, O., D'Alicarnasso, M., Morgenstern, D. A., Himoudi, N., Pearson, K., Anderson, J., Thrasher, A. J. und Sala, A. (2013). Polyphenol e enhances the antitumor immune response in neuroblastoma by inactivating myeloid suppressor cells. *Clinical Cancer Research*. 19(5): 1116-1125.
152. van den Bijgaart, R. J. E., Kroesen, M., Brok, I. C., Reijnen, D., Wassink, M., Boon, L., Hoogerbrugge, P. M. und Adema, G. J. (2020). Anti-GD2 antibody and Vorinostat immunocombination therapy is highly effective in an aggressive orthotopic neuroblastoma model. *Oncolimmunology*. 9(1): 1-9.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Leon Aliya von Lojewski, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, habe ich in jedem Fall durch Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt.

Ich erkläre hiermit, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.



Greifswald, den 22. Dezember 2023

Leon Aliya von Lojewski

Veröffentlichungen

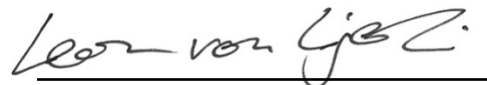
Präsentationen

1. Vortrag zur *XXXII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung* in Wilsede, Juni 2019. **von Lojewski, L. A.**, Marx, M., Zumpe, M., Troschke-Meurer, S., Lode, H. N., Siebert, N. Blockade of suppressive myeloid cells is effective against neuroblastoma.
2. Vortrag zum *13. Rostock Symposium for Tumor Immunology* in Rostock, Februar 2019. **von Lojewski, L. A.**, Marx, M., Zumpe, M., Troschke-Meurer, S., Lode, H. N., Siebert, N. Blockade of suppressive myeloid cells is effective against neuroblastoma.
3. Vortrag auf dem *Advances in Neuroblastoma Research Meeting (ANR)* in Amsterdam, Mai 2023. **von Lojewski, L. A.**, Siebert, N., Zumpe, M., Troschke-Meurer, S., Lode, H. N. Reduction of CD11b⁺ myeloid suppressive cells augments anti-neuroblastoma immune response.

Publikationen

1. Siebert, N., Zumpe, M., **von Lojewski, L. A.**, Troschke-Meurer, S., Marx, M., Lode, H. N. (2020). Reduction of CD11b⁺ myeloid suppressive cells augments anti-neuroblastoma immune response induced by the anti-GD₂ antibody ch14.18/CHO. *OncolImmunology*. 9(1): 1-12.

Greifswald, den 22. Dezember 2023



Leon Aliya von Lojewski

Danksagung

Ich möchte mich bei der stets unterstützenden, motivierenden Arbeitsgruppe unter Herrn Prof. Holger Lode für die Möglichkeit dieser Arbeit und intensive Begleitung bedanken. Nikolai Siebert hat mich mit seinem Wissen in die Welt der Labore, Pipetten und Tierversuche eingeführt und Forschung für mich aus der Theorie in die Praxis geholt. Die Möglichkeit an kleinen und großen Konferenzen teilzunehmen, die fachlichen Tage und freundschaftlichen Abende bleiben für mich in schöner Erinnerung. Ohne Sascha Troschke-Meurer wären die statistischen Überlegungen eine noch größere Hürde und deutlich trockenere Theorie geworden, die Zeit im Büro nicht so bereichernd gewesen. Maxi Zumpe und Madlen Marx waren mir stets eine Hilfe im Labor, für Beratungen und Diskussionen rund um Versuche, Auswertung und dem Textschreiben hatten sie immer ein offenes Ohr für mich. Für die Arbeit mit Versuchstieren, die Probenextraktion, RNA-Aufbereitung und PCR standen mir jederzeit Theodor Köppen und Maria Asmus zur Seite. Ohne euch und eure motivierende, lehrende Art, ausgiebige Frühstücksrunden, alltägliche Unterhaltungen und Abwechslung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Herzlichen Dank euch und allen weiteren klugen Köpfen und fleißigen Helfer*innen.

Viele gute Freundinnen und Freunde, Mitbewohnerinnen und Mitbewohner haben den Weg dieser Arbeit begleitet, interessiert zugehört, Geschichten aus dem Mäusestall gelauscht und mich in schwierigen Zeiten aufgemuntert. Tim Ziegler möchte ich für die langanhaltende Unterstützung und die Motivation in Phasen der Überforderung danken. Loisa Bonde gebührt mein ausdrücklicher Dank, nach unzähligen meiner Ausführungen zu Zytokinen und Problemen in der Forschung diese Arbeit auch noch kritisch gelesen und korrigiert zu haben. Mit einem Lachen, einer Umarmung und einem "Kopf hoch" zur rechten Zeit haben mir viele unerwähnte Freund*innen immer wieder Mut gemacht, mich aufgebaut und auf dem Weg zur Veröffentlichung dieser Arbeit mit mir mitgefiebert – ich danke euch von Herzen!

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken. Dank eurer unermüdlichen Unterstützung, dem Auffangen, Aushalten und Aufbauen in Krisenzeiten sowie langen Abenden des Austausches waren Kummer, Stress und Zweifel der letzten Jahre überwindbar.