

**Die immunsuppressive Wirkung von
Tumormetaboliten auf humane T-Zellen**

Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät III -
Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg**

eingereicht von

Dipl. Biol. Katrin Singer

Regensburg, Juli 2010

Promotionsgesuch eingereicht am: 07. Juli 2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. A. Mackensen

Prüfungsausschuss: 1. Prüfer: Prof. Dr. R. Warth
2. Prüfer: Prof. Dr. A. Mackensen
3. Prüfer: Prof. Dr. R. Wirth
Vorsitz: Prof. Dr. A. Kurtz
Ersatz: Prof. Dr. R. Sterner

Für Martin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Das Immunsystem	8
1.2 Die Rolle des Immunsystems bei der Tumorabwehr.....	9
1.2.1 Überwachung von maligne entarteten Zellen durch das Immunsystem.....	9
1.2.2 Tumor-assoziierte Antigene (TAA) und adoptiver T-Zelltransfer	10
1.2.3 Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs)	11
1.3 <i>Immune Escape</i> Mechanismen	13
1.3.1 Regulatorische T-Zellpopulationen	13
1.3.2 Antigenverlust und Produktion immuninhibitorischer Zytokine.....	14
1.3.3 Tumormetabolismus	15
1.4 Methylthioadenosin: ein neuer <i>Immune Escape</i> Mechanismus?	17
1.4.1 Methylthioadenosin Phosphorylase (MTAP)-Defizienz in Tumoren.....	17
1.4.2 Mögliche Mechanismen der MTA-vermittelten Suppression	19
1.5 Der Warburg-Phänotyp in Tumoren.....	20
1.5.1 Selektionsvorteile einer hohen Glykolyserate	20
1.5.2 Die Regulation der Glykolyse durch HIF-1	21
1.5.3 Der Einfluss von Laktat auf das Tumorstroma.....	23
1.6 Zielsetzung	24
2. Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Medien, Puffer und Lösungen	26
2.1.2 Farbstoffe.....	27
2.1.3 Chemikalien.....	27
2.1.4 HLA-A2-bindende Peptide.....	28
2.1.5 Peptid-MHC-Tetramere.....	28
2.1.6 Antikörper	28
2.1.7 Beads	31
2.1.8 Oligonukleotide	31
2.1.9 Zellkulturflaschen, -platten, -röhrchen.....	31
2.1.10 Zytokine.....	32
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Ermittlung der Zellzahl durch Trypanblau-Ausschlussfärbung	33
2.2.2 Kryokonservierung von Zellen.....	33

2.2.3 Auftauen von Zellen.....	33
2.2.4 Kultivierung von Zelllinien.....	34
2.2.5 Beladung der T2 Zellen.....	34
2.2.6 Dichtegradientenzentrifugation.....	34
2.2.7 Gegenstromelutriation zur Isolierung von Monozyten.....	35
2.2.8 Generierung von dendritischen Zellen (DCs) aus Monozyten <i>in vitro</i>	35
2.2.9 Exogene Beladung von DCs.....	35
2.2.10 Magnetische Separation.....	36
2.2.11 Durchflusszytometrie.....	37
2.2.12 Antikörperfärbung.....	38
2.2.13 pMHC-Tetramerfärbung.....	38
2.2.14 Generierung von antigen-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen.....	39
2.2.15 Generierung von allogene-spezifischen CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	39
2.2.16 Polyklonale Stimulation von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	39
2.2.17 ⁵¹ Cr-Zytotoxizitätstest.....	40
2.2.18 CFSE-Färbung.....	40
2.2.19 Isolierung von Gesamt-RNA.....	41
2.2.20 Reverse Transkription.....	41
2.2.21 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	41
2.2.22 Bestimmung des Glukose-Flux mit [1,2- ¹³ C ₂]Glukose.....	42
2.2.23 Analyse von MTA und Laktat in Zellüberständen.....	43
2.2.24 Sauerstoffkonzentrationsmessungen.....	44
2.2.25 Aufarbeitung von Tumor – und Normalgewebeproben von Patienten mit RCC.....	44
2.2.26 Immunhistochemische Färbungen an Tissuemicroarrays.....	45
2.2.27 Analyse der immunhistochemischen Färbungen an TMAs.....	45
2.2.28 Detektion von intrazellulärem cAMP.....	46
2.2.29 Statistische Auswertungen.....	47
3. Ergebnisse.....	48
3.1 Suppression humaner T-Zellen durch Milchsäure.....	48
3.1.1 Einfluss von Milchsäure auf den Energiehaushalt der CTLs.....	49
3.1.2 Sensitivität ruhender und aktivierter T-Zellen gegenüber Milchsäure.....	52
3.1.3 Einfluss von Milchsäure auf verschiedene T-Zellpopulationen.....	54
3.2 Einfluss von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) auf humane T-Zellen.....	56
3.2.1 Effekte von MTA auf humane zytotoxische CD8 ⁺ T-Zellen.....	56
3.2.1.1 Hemmung der Aktivierung zytotoxischer CD8 ⁺ T-Zellen durch MTA.....	56
3.2.1.2 MTA-vermittelte Suppression der antigen-spezifischen Zytokinsekretion in CTLs.....	57

3.2.1.3 MTA-vermittelte Suppression der Zytotoxizität von antigen-spezifischen CD8 ⁺ CTLs.....	58
3.2.2 Einfluss von MTA auf die Viabilität und Proliferation von CD8 ⁺ T-Zellen.....	60
3.2.2.1 Apoptoseinduktion in CTLs durch MTA.....	60
3.2.2.2 Inhibition der Proliferation von CTLs durch MTA.....	61
3.2.2.3 Suppression der Proliferation allogen oder polykonal stimulierter CD8 ⁺ T-Zellen.....	62
3.2.3 Die MTA-induzierte Suppression von T-Zellen ist reversibel.....	63
3.2.4 Das <i>in vitro</i> Priming antigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen wird durch MTA inhibiert.....	64
3.2.5 Effekte von MTA auf dendritische Zellen.....	66
3.2.6 Mechanismus der MTA-vermittelten Immunsuppression von humanen T-Zellen.....	67
3.2.6.1 Wirkung von Adenosin, NECA und Forskolin auf die Proliferation von CD8 ⁺ T-Zellen.....	67
3.2.6.2 Einfluss von MTA auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration in CD8 ⁺ T-Zellen.....	68
3.2.6.3 Einfluss von Dipyridamol auf die MTA-induzierte T-Zellsuppression.....	69
3.2.6.4 Einfluss des Adenosindeaminase-Inhibitions EHNA auf die MTA-vermittelte T-Zellsuppression.....	70
3.3 Assoziation zwischen Immunzellinfiltration im Tumor und Glykolyse bzw. MTA-Stoffwechsel beim Nierenzellkarzinom.....	72
3.3.1 MTA-Metabolismus im RCC.....	72
3.3.1.1 MTAP-Expression und MTA in RCC-Zelllinien.....	72
3.3.1.2 MTAP Expression im RCC auf Proteinebene.....	73
3.3.2 LDHA, GLUT-1 und Laktat im RCC.....	76
3.3.2.1 LDHA und Laktat in RCC-Zelllinien.....	76
3.3.2.2 mRNA-Expression von Glykolyse-assoziierten Genen in primärem RCC.....	76
3.3.2.3 Immunhistochemische Analysen zur Expression von GLUT-1 und LDH5 im primären RCC.....	78
3.3.3 Immunzellinfiltration im RCC.....	80
3.3.4 Korrelation zwischen Immunzellinfiltration und dem MTA - bzw. Glukosestoffwechsel.....	83
3.3.4.1 Zusammenhang zwischen MTAP-Expression und Immunzellinfiltration im primären RCC.....	83
3.3.4.2 Assoziation zwischen GLUT-1 bzw. LDH5 Expression und Immunzellinfiltration im RCC.....	83
4. Diskussion.....	86
4.1 Suppression humaner T-Zellen durch Milchsäure.....	86
4.2 Einfluss von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) auf humane T-Zellen.....	89
4.2.1 Effekte von MTA auf humane CD8 ⁺ T-Zellen.....	89

4.2.2 Mechanismus der MTA-vermittelten Immunsuppression.....	91
4.3 Zusammenhang zwischen Immunzellinfiltration und Glykolyse im Nierenzellkarzinom.....	94
4.4 Die Rolle des MTA-Metabolismus im RCC	97
4.5 Zusammenfassung und Ausblick.....	98
5. Literaturverzeichnis	102
6. Anhang	125
6.1 Abkürzungsliste.....	125
6.2 Veröffentlichungen.....	128
6.3 Danksagung.....	129

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Aufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus gegen Viren, Bakterien und andere Krankheitserreger zu schützen. Zudem ist das Immunsystem in der Lage, entartete körpereigene Zellen als fremd zu erkennen und abzutöten. Im Menschen existieren zwei miteinander kooperierende Immunsysteme: die angeborene und die erworbene (adaptive) Immunität.

Das angeborene Immunsystem kann sehr schnell auf Krankheitserreger reagieren und besteht aus zellulären und löslichen Abwehrmechanismen. Einen ersten Schutz gegen Krankheitserreger stellen physikalische und chemische Barrieren, wie Epithelien, dar. Einen weiteren Schutz gewährleisten spezialisierte Fresszellen, wie Granulozyten und Makrophagen, welche die Krankheitserreger phagozytieren und lysieren können. Weitere Bestandteile der angeborenen Immunantwort sind die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und das Komplementsystem, ein System von Plasmaproteinen, das im Zuge der Immunantwort auf zahlreichen Oberflächen von Mikroorganismen aktiviert werden kann. Bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems werden Botenstoffe (Zytokine) sezerniert, die zu einer Stimulation der Zellen des adaptiven Immunsystems führen.

Eine adaptive Immunantwort entwickelt sich meist als Antwort auf eine Infektion. Die Hauptkomponenten des adaptiven Immunsystems sind die Lymphozyten. Diese können eine hohe Anzahl an mikrobiellen und nichtmikrobiellen Strukturen (Antigene) erkennen. Lymphozyten zeichnen sie sich durch hohe Spezifität und Diversität aus. Die adaptive Immunantwort kann in eine humorale und eine zelluläre Immunantwort aufgeteilt werden.

Die humorale Immunantwort beinhaltet die Produktion von Antikörpern, die von aus B-Lymphozyten differenzierten Plasmazellen sezerniert werden und als lösliche Proteine im Blutplasma und in der Lymphe flüssigkeit zirkulieren. Antikörper binden an Antigene auf der Zelloberfläche und können über verschiedene Mechanismen wie Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC, *antibody dependent cellular cytotoxicity*) oder Komplement-vermittelte Lyse Zielzellen abtöten.

T-Lymphozyten, entscheidend für die zelluläre Immunantwort, bekämpfen viral oder bakteriell infizierte Zellen, sowie entartete körpereigene Zellen. T-Lymphozyten erkennen

Peptidantigene, die über MHC-Moleküle (*Major Histocompatibility Complex*, Haupt-histokompatibilitätskomplex) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die Antigen-MHC-Komplexe werden von spezifischen T-Zell-Rezeptoren (TCR, *T cell receptor*) erkannt. Die hohe Diversität der T-Zellrezeptoren entsteht durch somatische Rekombination, bei der V- (*variable*), D- (*diversity*) bzw. J- (*joining*) DNA-Elemente von einem RAG - (Rekombination-aktivierendes-Gen) Enzymkomplex beliebig kombiniert werden.

Zur Induktion einer adaptiven Antigen-spezifischen Immunantwort werden Antigen-präsentierende Zellen (APC, *antigen presenting cell*) benötigt, die Proteine von infizierten oder malignen Zellen aufnehmen, prozessieren und deren Antigene auf ihrer Oberfläche den T-Lymphozyten präsentieren. Für eine vollständige Aktivierung der T-Zellen bedarf es sogenannter kostimulatorischer Moleküle der B7-Familie (CD80, CD86) (1). Nach Aktivierung folgt eine klonale Expansion und Differenzierung in Antigen-spezifische Effektor-T-Zellen, welche die Krankheitserreger beseitigen oder Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren und deren Immunantwort verstärken. Ein Teil der Effektor-T-Zellen differenziert zu Gedächtnis-T-Zellen, die für eine schnelle und effiziente Immunantwort bei erneuter Exposition mit einem spezifischen Antigen sorgen (2).

T-Helferzellen (Th-Zellen), die CD4 (CD, *cluster of differentiation*) als Korezeptor exprimieren, erkennen Antigen-MHC-Klasse-II-Komplexe, auf denen Antigene von phagozytierten Zellen präsentiert werden. Die zytotoxischen T-Zellen (CTLs, *cytotoxic T cells*) mit CD8 als Korezeptor können Antigen-MHC-Klasse-I-Komplexe auf fast allen Körperzellen erkennen. Zellproteine werden in der Körperzelle endogen prozessiert und die so entstandenen Antigene werden über die MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert (3). Hauptaufgabe der CTLs ist es, virusinfizierte und entartete Zellen als fremd zu erkennen und zu lysieren. Das Abtöten der Zielzellen wird hauptsächlich durch die Effektormoleküle Perforin, das in der Membran der Zielzelle Poren formt, und Granzyme-B, eine pro-apoptotische Serinprotease, vermittelt (4).

1.2 Die Rolle des Immunsystems bei der Tumorabwehr

1.2.1 Überwachung von maligne entarteten Zellen durch das Immunsystem

Die Rolle des Immunsystems bei der Abwehr von Tumoren wird kontrovers diskutiert. Zum einen können Immunzellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und

Granulozyten zur Tumorprogression beitragen, was unter anderem durch die Tumor-Angiogenese und Metastasierung über die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine und Metalloproteinasen vermittelt wird (5-8). Zum anderen sind die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems prinzipiell in der Lage, entartete Zellen zu eliminieren, um dadurch einen immunologischen Schutz gegen spontane Karzinome zu gewährleisten. Dieser Vorgang, der auch als *Immunosurveillance* (Immunüberwachung) bezeichnet wird, wurde durch Burnet und Thomas bereits in den 70er Jahren geprägt (9, 10). Der experimentelle Nachweis der Tumor-*Immunosurveillance* gelang mit Hilfe verschiedener Tiermodelle. Dementsprechend wiesen Mäuse, in denen Schlüsselproteine der adaptiven Immunantwort wie IFN- γ (Interferon- γ) oder Perforin deletiert wurden, eine deutlich gesteigerte Anfälligkeit gegenüber chemisch induzierten oder spontan auftretenden Tumoren auf (11-13). In einer weiteren Studie hatten Mäuse, die aufgrund einer Deletion der RAG-Gene RAG-1 und RAG-2 keine funktionsfähigen T-, B- und NKT-Zellen bilden konnten, eine höhere Inzidenz von chemisch induzierten Tumoren als die entsprechenden Wildtypmäuse (14). Weitere Hinweise für die *Immunosurveillance* konnten auch im Menschen erbracht werden (15, 16). In einer Studie an 905 immunsupprimierten Patienten bei Zustand nach Herz-, Lungen-, Knochenmark- und Nierentransplantation konnte eine 7-fach erhöhte Frequenz an malignen Tumoren, hauptsächlich Leukämien und Lymphome, beobachtet werden (17). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass immunsupprimierte Patienten ein erhöhtes Risiko für virusinduzierte Tumore wie das Kaposi-Sarkom oder das Non-Hodgkin-Lymphom aufweisen (18, 19).

1.2.2 Tumor-assoziierte Antigene (TAA) und adoptiver T-Zelltransfer

Die Tumorigenese ist ein multifaktorieller Prozess, bei dem genetische Alterationen zur Transformation von normalen in maligne Zellen führen. So kann es beispielsweise durch Mutationen zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie p53 (*protein 53*) oder pRB (*protein retinoblastoma*) oder zur Aktivierung von Onkogenen, wie Ras (*rat sarcoma*) oder c-myc kommen, was ein unkontrolliertes Wachstum von Zellen, eine Invasion in gesundes Gewebe und schließlich eine Metastasierung zur Folge hat (20, 21). Bei diesem sich oft über Jahre entwickelnden Prozess kommt es zu einer Interaktion zwischen Tumorzellen und den umgebenden Stromazellen (16). Das Tumorstroma setzt sich aus multiplen Zelltypen wie Fibroblasten, Epithelzellen, Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems,

Zellen zur Bildung von Blutgefäßen und mesenchymalen Zellen zusammen (22). Die genetische Instabilität der Tumorzellen führt dazu, dass sich die entarteten Zellen in ihrem biologischen Verhalten und in ihrer Antigen-Komposition stark von nicht-malignen Zellen unterscheiden (23). Durch die Expression von Neo-Antigenen können entartete Zellen prinzipiell durch die CD8⁺ CTLs des adaptiven Immunsystems erkannt werden. Diese können die von den Tumorzellen über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentierten Tumor-assoziierten Antigene (TAA) als fremd erkennen und die Tumorzellen anschließend lysieren (4, 24). Vor allem im malignen Melanom konnten eine Reihe von TAAs wie die Melanozyten-Differenzierungs-Antigene MART-1 (*melanoma antigen recognized by T-cells*), Tyrosinase und Glycoprotein gp100 identifiziert werden (25, 26). Diese TAAs stellen jedoch keine tumor-spezifischen Antigene dar, da sie auch auf Melanozyten exprimiert werden. Die Charakterisierung der TAAs, die von humanen T-Zellen erkannt werden, hat die Möglichkeiten der *in vitro* Generierung tumor-reaktiver T-Zellen für einen adoptiven Transfer bzw. der Entwicklung von antigen-spezifischen Impfstoffen erweitert. Beim adoptiven T-Zell-Transfer handelt es sich um die Re-Transfusion von aus dem Patienten gewonnenen tumor-spezifischen autologen T-Zellen, welche *in vitro* stimuliert und expandiert werden (27). In ersten klinischen Phase-I Studien wurden Patienten mit metastasiertem Melanom CD8⁺ T-Zellen mit einer Spezifität gegen MART-1 und gp100 transferiert. In 8 von 10 Patienten konnten die adoptiv transferierten CD8⁺ CTLs eine Regression der Metastasen herbeiführen (28). In einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe mit MART-1 spezifischen T-Zellen konnte in 3 von 11 Patienten eine komplette oder partielle Remission erreicht werden (29). Ein weiterer interessanter Ansatz ist der genetische Transfer von tumorspezifischen T-Zell-Rezeptoren in polyklonale T-Lymphozyten, wie z.B. von TCRs gegen MART-1. Hier führten erste Studien mit TCR-transgenen T-Zellen zu Regressionen in 2 von 15 Patienten (30).

1.2.3 Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs)

Humane Tumore werden häufig von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten infiltriert (31, 32). In vielen dieser Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) konnte eine Spezifität für TAAs identifiziert werden. TILs weisen meist einen aktivierten Effektor- oder Effektor-Memory-Phänotyp auf (33, 34). Erst durch die Anwesenheit von *Memory*-T-Zellen ist eine langandauernde Anti-Tumor-Antwort möglich (35). In zahlreichen Studien beim malignen Melanom, Kolon-, Ovarial-, Mamma- und Urothelkarzinom konnte eine Korrelation zwischen

der Dichte des Lymphozyteninfiltrats im Tumor und einer Verlängerung des Gesamtüberlebens gezeigt werden (36-41). Ferner konnte im Kolonkarzinom nachgewiesen werden, dass auch der Typ und die Lokalisation der Immunzellen im Tumor einen signifikanten prognostischen Einfluss haben (42-44). Nichtmetastasierende Tumore wiesen hier eine erhöhte Expression der mit einer Th1-Antwort assoziierten Marker T-bet (*T-Box expressed in T cells*), IFN- γ , CD8 und Granzyme-B, sowie eine verminderte Expression immunsuppressiver Moleküle auf. Auch im Nierenzellkarzinom konnte die Expression Th1-assoziiertes Zytokine, Chemokine und Chemokinrezeptoren mit einer besseren Prognose in Verbindung gebracht werden (45). Interessanterweise fehlen jedoch Daten, die eine Verbesserung der Prognose mit der Anzahl der TILs beim Nierenzellkarzinom belegen können (46, 47). Vielmehr konnte gezeigt werden, dass Nierenzellkarzinome zwar eine hohe Anzahl an aktivierten TILs aufwiesen, diese aber funktionell beeinträchtigt waren (48).

Weitere Argumente für eine Anergie der TILs konnten in zahlreichen Studien an humanen und murinen Tumoren dargelegt werden (13, 49, 50). Anergie T-Zellen sind funktionell inaktiv und können auch nach adäquater Stimulation nicht mehr auf das Antigen reagieren. So waren in einer Studie bei Patienten mit malignem Melanom MART-1-spezifische CD8⁺ T-Zellen sowohl intratumoral als auch in den metastasierten Lymphknoten in einer hohen Frequenz vorzufinden; diese waren jedoch funktionell inaktiv und produzierten nach *ex vivo* Stimulation weder IFN- γ , Perforin noch Granzyme-B (51). In einigen Fällen exprimierten TILs zwar die Effektormoleküle, doch die lytischen Granulae konnten nicht freigesetzt und somit die Lyse der Tumorzellen nicht induziert werden (52). Diese in den TILs beschriebene funktionelle Toleranz lässt sich unter anderem durch Störungen in deren Signaltransduktion begründen. Dementsprechend konnte in einigen Tumoren eine deutliche Herabregulation der für die T-Zell-Aktivierung essentiellen Moleküle TCR-CD3- ζ (Zeta-Kette des TCR-CD3-Komplexes), Lck (*leukocyte-specific protein tyrosine kinase*) und Zap-70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*) nachgewiesen werden. Durch Zugabe von exogenem IL (Interleukin) -2 konnte die Expression teilweise gesteigert werden (53, 54). Gleichfalls konnte mittels immunhistochemischer Untersuchungen im Mundhöhlenkarzinom eine Defizienz in der Expression der TCR-CD3- ζ mit einem schlechteren Überleben der Patienten aufgezeigt werden (55). Darüber hinaus konnte nicht nur ein funktioneller Defekt der TILs, sondern auch eine erhöhte Apoptoserate der CD8⁺ Lymphozyten in Tumorpatienten im Vergleich zum Gesunden beschrieben werden (56).

1.3 Immune Escape Mechanismen

Tumore haben verschiedene Strategien entwickelt, einem gezielten Angriff durch das Immunsystem zu entgehen. Diverse Faktoren in der Tumorumgebung können in den TILs den Verlust ihrer Funktionalität und eine erhöhte Apoptoserate induzieren und somit zu einer Immunevasion (*Immune Escape*) beitragen. Im Folgenden sollen einige der *Immune Escape* Mechanismen beschrieben werden.

1.3.1 Regulatorische T-Zellpopulationen

Regulatorische T-Lymphozyten spielen nicht nur bei der Entwicklung von Selbsttoleranz, sondern auch bei der Kontrolle der Immunantwort gegen Tumore eine wichtige Rolle. In verschiedenen malignen Tumoren wurden regulatorische T-Zellpopulationen identifiziert, deren primäre Aufgabe es ist, periphere Toleranz zu vermitteln, indem Selbst-Antigen-reaktive Lymphozyten supprimiert werden (57). Da die überwiegend exprimierten TAAs Selbst-Antigene darstellen, wird angenommen, dass regulatorische T-Zellen auch TAA-spezifische T-Zellen supprimieren können (58). Die derzeit am besten untersuchte Population von regulatorischen T-Zellen sind CD4⁺ T-Zellen, die die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) und den Transkriptionsfaktor FOXP3 (*forkhead box p3*) konstitutiv exprimieren und im gesunden Menschen circa 2% aller CD4⁺ T-Lymphozyten ausmachen. CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen können über verschiedene Mechanismen die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion von T-Lymphozyten unterdrücken (57). Dazu zählen u. a. die Sekretion von inhibitorischen Molekülen (TGF- β , IL-10 und Adenosin) und die Konkurrenz um Wachstumsfaktoren wie IL-2 (59). CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen können sowohl intratumoral als auch im peripheren Blut von Patienten mit verschiedenen Tumoren, wie Mammakarzinom, kolorektalem Karzinom, Kopf-Hals-Tumoren und Melanom in sehr viel höheren Frequenzen als in gesunden Individuen detektiert werden (60-64). Ferner führte eine systemische Depletion der CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen mit Ontak[®] (Denileukin-Diftitox) bei Patienten mit Ovarialkarzinom zu einer Wiederherstellung der Anti-Tumor-Immunität und zu einer Reduktion des Tumorwachstums (65).

Darüber hinaus konnten in malignen Tumoren noch weitere immunsuppressive Zellpopulationen detektiert werden. Dazu zählen die myeloiden Suppressorzellen (MDSC, *myeloid derived suppressor cells*), die sowohl im Blut, im Knochenmark und in der Milz als

auch in Lymphknoten und in der Tumorumgebung detektiert werden konnten (66). Bei den MDSCs handelt es sich um eine sehr heterogene Zellpopulation von reifen und unreifen myeloiden Zellen. So ließ sich zum Beispiel bei Patienten mit Nierenzellkarzinom eine CD11b⁺ CD14⁻ CD15⁺ MDSC-Population identifizieren, welche einen Verlust der TCR-CD3- ζ -Kette in den TILs induzierte, einhergehend mit einer geringeren Produktion von IFN- γ und IL-2 nach polyklonaler Stimulation. Eine Depletion der CD11b⁺ CD14⁻ MDSCs führte *in vitro* zu einer Rekonstitution der Proliferation und Expression der TCR-CD3- ζ -Kette in den TILs (67).

1.3.2 Antigenverlust und Produktion immuninhibitorischer Zytokine

Um der Kontrolle des Immunsystems zu entkommen, haben maligne Zellen Mechanismen entwickelt, die sowohl spezifische Immuneffektorzellen inaktivieren, als auch die Aktivierung von potentiell antitumoralen Effektormechanismen verhindern. So konnte in einem Case Report bei Patienten mit malignen Melanomen trotz einer exzessiv hohen Frequenz peripherer und tumorinfiltrierender Lymphozyten mit Spezifität gegen MART-1 keine effektive Anti-Tumorantwort beobachtet werden. Als Grund dafür wurde ein Defekt in der Antigenprozessierungsmaschinerie (APM) in den Tumorzellen nachgewiesen, die es den Tumorzellen ermöglichte, von den MART-1 spezifischen CTLs nicht erkannt zu werden, da MART-1 nicht prozessiert und auf der Oberfläche präsentiert werden konnte. In diesem Zusammenhang konnte die Resistenz der Melanomzellen gegenüber einer antigenspezifischen Lyse durch eine *in vitro* Stimulation der Tumorzellen mit IFN- γ , das die APM induzieren kann, teilweise aufgehoben werden (34).

Epigenetisch, transkriptionell oder posttranskriptionell entstandene Alterationen oder Defizienzen in der APM wurden ebenso in zahlreichen anderen Neoplasien beschrieben (68-71). Dabei reicht meist nur der Verlust oder die Verminderung einer Komponente der APM aus, um einer Erkennung der Tumorzellen durch tumor-spezifische CTLs zu entgehen. Zu den am häufigsten beschriebenen funktionellen Defizienzen zählt beispielsweise ein Verlust der APM-assoziierten Transporter TAP-1 und -2 (*transporter associated with antigen presentation-1 and -2*) und der Immunoproteasom-Komponenten LMP-2, -7 und -10 (*low molecular mass protein-2, -7, -10*) (68, 72). Außerdem konnte im Prostata- und Nierenzellkarzinom eine Herunterregulation von Bestandteilen der APM mit Tumorprogression, Metastasierung und schlechterem Überleben der Patienten assoziiert

werden (73-75). Darüber hinaus wurden in zahlreichen Tumoren, wie dem Melanom, Cervix- und Mammakarzinom der partielle oder totale Verlust der schweren Kette der MHC-Klasse-I-Moleküle und Mutationen in der Untereinheit β 2-Mikroglobulin beobachtet, was eine schlechtere Prognose der Patienten bedingt hat (69, 73, 76-79).

Weiterhin werden kostimulatorische Moleküle, wie CD80 und CD86, die für eine vollständige Aktivierung der T-Zellen essentiell sind, nur in geringem Maße von Tumorzellen exprimiert. Dafür kann man auf malignen Zellen nicht selten eine konstitutive Expression der koinhibitorischen Moleküle PD-L1 und -L2 (*programmed death ligand-1* und -2) oder anderer inhibitorischer Vertreter der B7-Familie beobachten (80, 81). Durch die Bindung an PD-L1 oder -L2 wird in aktivierten T-Zellen, die den Rezeptor PD-1 (*programmed death-1*) exprimieren, Apoptose induziert (80, 82). Im Nierenzellkarzinom korrelierte eine Expression von PD-L1 mit einer schlechteren Prognose der Patienten (83, 84). *In vitro* konnte durch die Blockade von PD-L1 auf humanen Nierenzellkarzinom-Zelllinien eine tumor-spezifische T-Zellantwort wiederhergestellt werden (85). Ein weiteres inhibitorisches Molekül ist Fas-L, das ebenso häufig auf Tumorzellen anzufinden ist und in Fas-exprimierenden Lymphozyten zum Zelltod führen kann (86, 87).

Tumore sezernieren auch immunsuppressive Zytokine, wie IL-10 und TGF- β . IL-10 supprimiert T-Zell-Effektorfunktionen wie Proliferation, Produktion von Zytokinen und die Zytotoxizität. Weiterhin kann IL-10 eine Herunterregulation der Expression der MHC-Klasse-I Moleküle in Tumorzellen induzieren (88, 89). Ein erhöhter IL-10 Serumspiegel bei Patienten mit soliden Tumoren wurde als ein negativer prognostischer Faktor beschrieben (90). TGF- β (*transforming growth factor β*) fördert sowohl Metastasierung und Tumorprogression, kann aber auch immunsuppressive Immunzellpopulationen rekrutieren und zytotoxische T-Zellantworten inhibieren (91, 92). Aktuelle Studien an Mausmodellen haben ergeben, dass durch eine Blockade des TGF- β Rezeptors die Invasion von Tumorzellen und die Einwanderung immunsuppressiver Zellen inhibiert werden kann (93).

1.3.3 Tumormetabolismus

Die Erforschung des Tumormetabolismus und dessen Wirkung auf das adaptive Immunsystem ist in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses in der Tumormunologie gerückt. Tumore sind in der Lage, sich durch Modulation ihres Metabolismus gegenüber dem umgebenden Gewebe Wachstumsvorteile zu verschaffen. So

kommt es unter anderem durch die Überexpression von einzelnen Enzymen im Aminosäurestoffwechsel sowohl zur Depletion essentieller Moleküle für die Immunzellen als auch zur Akkumulation toxischer Zwischenprodukte.

Als Beispiel sei hier die Überexpression der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) im Tumor angeführt. IDO entzieht den TILs die essentielle Aminosäure Tryptophan. Weiterhin kommt es durch eine Akkumulation von schädlichen Kynureninderivaten wie Hydroxyanthranilin zu einer Inhibition von T- und B-Lymphozyten. Eine Inhibition von IDO führte *in vitro* im Mausmodell zu einer Wiederherstellung der T-Zellantwort und einer stark verminderten Tumorprogression (94-96). Weiterhin korrelierte in zahlreichen klinischen Studien eine Hochregulation der IDO-Expression mit einer schlechteren Prognose (97). Beispielsweise konnte in kolorektalen Karzinomen und im Nierenzellkarzinom die mit einer gesteigerten IDO-Expression assoziierte erhöhte Malignität der Tumore zudem negativ mit der Anzahl der TILs in Zusammenhang gebracht werden (98, 99). Ebenso korrelierten hohe Kynureninkonzentrationen im Serum von Kolonkarzinom Patienten mit einem negativen Krankheitsverlauf (100).

Auch die erhöhte Expression der Arginin-metabolisierenden Enzyme iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase) und Arginase wurde in verschiedenen Neoplasien beschrieben (101). So führt eine Überexpression von iNOS zu einer gesteigerten Produktion von NO (Stickstoffmonoxid), welches die Angiogenese, Metastasierung und Immunsuppression induzieren kann (102). Ebenso korrelierte eine Überexpression von iNOS mit einer schlechteren Prognose im Prostatakarzinom (103). Auch im Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom und im Multiplem Myelom ließ sich ein Zusammenhang zwischen einer hohen Arginase-Expression und einer reduzierten Aktivierung der TILs erkennen (104, 105). Eine gezielte Blockade der iNOS/Arginase in den Tumorzellen durch selektive Inhibitoren führte interessanterweise im Mausmodell zu einer verstärkten T-Zellantwort (106).

Ebenso exprimieren MDSCs im Tumor im hohen Maße Arginase und iNOS und können hierüber T-Zellen supprimieren (107). Durch Hemmung der MDSC-assoziierten Arginase konnte in zahlreichen Tumormodellen eine Rekonstitution der T-Zellfunktion, der immunologischen Tumorkontrolle und eine konsekutive Hemmung des Tumorwachstums dokumentiert werden (104).

1.4 Methylthioadenosin: ein neuer *Immune Escape Mechanismus*?

1.4.1 Methylthioadenosin Phosphorylase (MTAP)-Defizienz in Tumoren

In Tumorzellen kann es jedoch nicht nur zu einer Dysregulation des Aminosäure-, sondern auch des Nukleotid- und Polyaminstoffwechsels kommen. Adenosin akkumuliert in vielen Tumoren und kann über Bindung an die Adenosinrezeptoren zu einer Suppression der T-Zellen führen. Entsprechend können Adenosinrezeptor-Antagonisten das Tumorwachstum über eine Reaktivierung der T-Zellaktivität inhibieren (108, 109).

Des Weiteren konnte beim Mammakarzinom, Osteosarkom und bei hämatologischen Neoplasien eine Defizienz in dem Gen für die Methylthioadenosin Phosphorylase (MTAP) auf Chromosom 9p21 detektiert werden, die auf einer Promotorhypermethylierung oder Mutation beruht (110-112). Das Gen für MTAP liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zu Genen für die Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p16^{INK4a} und p15^{INK4b}, die in Tumoren sehr oft deletiert sind (113, 114). Im Methionin - und Polyaminstoffwechsel nimmt MTAP eine Schlüsselposition ein: so katalysiert es die Spaltung von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) zu Adenin und Methylthioribose-1-Phosphat (**Abb. 1**). Letzteres kann für die Methioninsynthese genutzt werden, wohingegen Adenin in der Nukleotidbiosynthese oder für die Generierung von ATP (Adenosintriphosphat) weiter Verwendung findet. MTA ist somit ein Abfallprodukt der Polyaminsynthese und akkumuliert normalerweise nicht in gesunden Zellen (115). Die ständige Entfernung von MTA aus dem Zytoplasma durch MTAP ist für eine Aufrechterhaltung des Methioninstoffwechsels und der Spermidinsynthese unerlässlich (116).

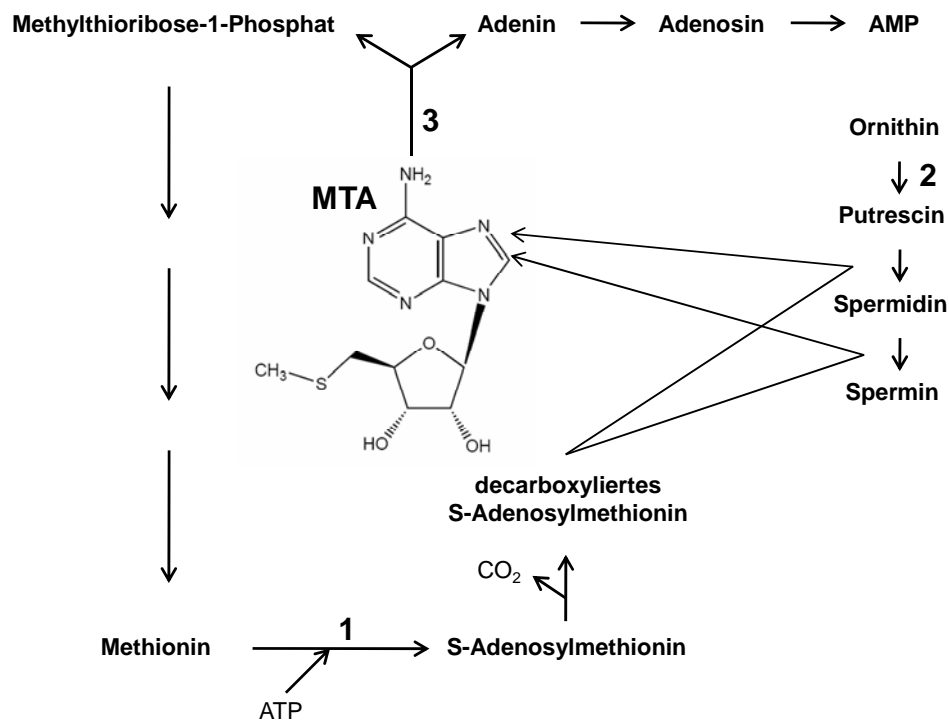


Abb. 1: Synthese und Metabolismus von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) (117). S-Adenosylmethionin entsteht durch Phosphorylierung von Methionin über die Adenosyltransferase (1), wird anschließend decarboxyliert und für die Synthese der Polyamine Spermin, Spermidin und Putrescin verwendet. Den ersten Schritt der Polyaminsynthese katalysiert die Ornithindecarboxylase (2). MTA entsteht als Abfallprodukt aus der Polyaminsynthese und wird über Phosphorylierung durch die Methylthioadenosin Phosphorylase (3) zu Adenin und Methylothioribose-1-Phosphat gespalten.

Eine Wiederherstellung der MTAP-Expression in MTAP-defizienten Zelllinien resultierte in einer dramatischen Verminderung der Tumorigenität *in vivo* und *in vitro* (110). Daher wird angenommen, dass MTAP ein Tumorsuppressorgen darstellt. Fehlt dieses Enzym, kommt es zu Veränderungen des intrazellulären Polyamin-Pools, welcher in zahlreiche zelluläre Funktionen (z.B. Proliferation, Permeabilität von Ionenkanälen etc.) involviert ist. Dabei spielt das Enzym Ornithin Decarboxylase (ODC) eine bedeutende Rolle: durch ODC wird Ornithin, welches im Harnstoffzyklus synthetisiert wird, weiter zu Polyaminen verstoffwechselt. In vielen Tumoren wird ODC überexprimiert. In diesem Zusammenhang wird spekuliert, ob eine Defizienz von MTAP zu einer Hochregulation der ODC führt (118, 119). In aktuellen Studien konnte beim malignen Melanom ein Verlust des MTAP-Gens *in vivo* und *in vitro* dokumentiert werden. Ein Verlust des MTAP-Gens korreliert dabei mit erhöhter Tumordinvasion und Metastasierung (120). Interessanterweise hat MTAP aber nicht nur eine Tumorsuppressorfunktion; Melanopatienten mit MTAP-Verlust profitieren weniger von einer adjuvanten Immuntherapie mit IFN- α als Patienten mit MTAP-positivem Melanom. Es wird vermutet, dass der Verlust von MTAP zu einer Inhibition des durch IFN- α regulierten STAT (*signal transducer and activator of transcription 1*) - Signalwegs führt (121). Dabei

könnte MTA die zur Aktivierung von STAT-1 essentielle Methylierung durch die Protein Arginin N-Methyltransferase (PRMT) inhibieren (122, 123).

1.4.2 Mögliche Mechanismen der MTA-vermittelten Suppression

In humanen MTAP-defizienten Leukämiezelllinien konnten Kamatani *et al.* postulieren, dass MTA in das umgebende Milieu sezerniert wird (124). Ebenso zeigen aktuelle Studien bei malignen Melanomen, dass MTAP-defiziente Tumorzellen MTA sekretieren, das daraufhin die Expression von Metalloproteinasen in den Tumorzellen induziert und dadurch zu einer gesteigerten Proliferation und erhöhten Invasivität der Tumorzellen führt (125).

Die Wirkung von MTA auf humane T-Zellen ist noch weitgehend unerforscht. In ersten Arbeiten in den 80er Jahren wurde beschrieben, dass MTA bei Konzentrationen über 100µM humane und murine Lymphoblasten in ihrer Proliferation hemmt, wobei die inhibitorischen Effekte dosisabhängig und reversibel waren (126, 127). Außerdem konnte gezeigt werden, dass MTA neben einer Proliferationshemmung ebenso eine Suppression der Antikörperproduktion in B-Zellen und die Zytotoxizität von NK-Zellen induziert (128, 129).

Über welchen Mechanismus die Inhibition der Lymphozyten geschieht, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zum Beispiel wurde in Tiermodellen für die Wirkung von MTA eine Hemmung der Phosphodiesterase und eine daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) - Konzentration in den T-Zellen postuliert (130, 131). Einhergehend mit diesen Beobachtungen konnte in Bindungsstudien gezeigt werden, dass MTA an die Adenosinrezeptoren A1 und A2 bindet. Dabei fungiert MTA als Agonist beider Rezeptoren, was letztendlich eine Aktivierung der an die Rezeptoren gekoppelten Adenylatcyclase auslöst (132).

In weiteren Studien konnte MTA eine Inhibition der Polyaminsynthese durch eine Hemmung der Sperminsynthase induzieren (119, 133). Doch konnte in diesem Zusammenhang bisher noch nicht gezeigt werden, dass eine MTA-vermittelte Inhibition durch exogene Zugabe von Spermin oder Spermidin aufgehoben werden kann (116). Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Inhibition der Adenosylhomocystein Hydrolase durch MTA, woraus Adenosylhomocystein in den Zellen akkumulieren und Methyltransferasen inhibieren könnte (134).

1.5 Der Warburg-Phänotyp in Tumoren

1.5.1 Selektionsvorteile einer hohen Glykolyserate

Charakteristisch für viele maligne Tumore ist eine gesteigerte Glykolyserate. Bereits in den 60er Jahren hat Warburg postuliert, dass solide Tumoren vermehrt aerobe Glykolyse betreiben, das heißt, dass ihre Energie auch in der Anwesenheit von Sauerstoff hauptsächlich aus der Reduktion von Pyruvat zu Laktat gewonnen wird und nicht über oxidative Phosphorylierung wie in normalen Zellen (135). Dabei handelt es sich nicht nur um eine Adaption der Tumorzellen an die hypoxischen Bedingungen, sondern die Glykolyse ist durch genetische und epigenetische Veränderungen konstitutiv hochreguliert (136). Dies zeigt sich unter anderem dadurch, dass Tumorzellen unter normalen Sauerstoffbedingungen ihren metabolischen Phänotyp beibehalten (137).

Dieser „glykolytische Phänotyp“ scheint malignen Zellen selektiv Wachstumsvorteile zu verschaffen, trotz der Tatsache, dass pro Molekül Glukose nur zwei Moleküle ATP im Gegensatz zu 38 Molekülen ATP über die oxidative Phosphorylierung gebildet werden können. So sichert die erhöhte Glykolyserate zum einen Energie in Form von ATP, zum anderen können die Zwischenprodukte der Glykolyse für anabolische Prozesse verwendet werden (138). In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass hoch proliferierende Zellen vermehrt Glykolyse betreiben, da Mitochondrien, in denen die Atmungskette statt findet, dazu benötigt werden, Komponenten für die Generation von Nukleotiden und Lipiden für neue Zellstrukturen zu synthetisieren (137, 139).

Die molekulare Basis für die erhöhte Glykolyserate in Tumorzellen war lange Zeit unklar. Erst in den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Onkogene wie KRAS/BRAF, Src, HER-2/Neu und c-myc zur Induktion des glykolytischen Phänotyps führen (140-143). So reguliert c-myc die Laktatdehydrogenase A (LDHA) und den Glukosetransporter-1 (GLUT-1) auf transkriptioneller Ebene (144, 145). Durch den Verlust von Tumorsuppressorgenen wie p53 und pVHL (von Hippel-Lindau-Protein) kommt es zu einer Stabilisierung von HIF-1 (*Hypoxia inducible transcription factor 1*). HIF-1 führt zu einer Reduktion der Respiration, gefolgt von einer Erhöhung der Glykolyserate (146-150).

1.5.2 Die Regulation der Glykolyse durch HIF-1

HIF-1 zählt zu den basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren und besteht aus dem Sauerstoff-sensitiven HIF-1 α und dem konstitutiv exprimierten HIF-1 β (150). In Anwesenheit von Sauerstoff wird HIF-1 α über Prolinhydroxylasen oxidiert und kann somit von einem Komplex bestehend aus der Ubiquitinligase pVHL, Elongin B und C erkannt werden. Anschließend kann HIF-1 α ubiquitinyliert und über das 26S Proteasom abgebaut werden. Das unter Hypoxie stabilisierte HIF-1 α bildet mit dem konstitutiv exprimierten HIF-1 β ein Dimer, welches an HREs (*hypoxia responsible elements*) bindet und die Expression zahlreicher Zielgene induziert. Eine vermehrte Expression von HIF-1 α ist in zahlreichen Tumorentitäten mit gesteigerter Proliferation, Progression und Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie assoziiert (151, 152).

Durch die Stabilisierung von HIF-1 kommt es zur Expression zahlreicher Gene, die es dem Tumor ermöglichen, unter hypoxischen Bedingungen zu überleben. Neben proliferationsinduzierenden Genen wird ebenso die Expression von Genen induziert, die an einer gesteigerten Angiogenese, z.B. VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und besserer Sauerstoffversorgung, z.B. Transferrin und Erythropoitin, beteiligt sind (153). Die Generation neuer Blutgefäße ist für das Wachstum von Tumoren sehr kritisch, da diese den Tumor mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen und schädliche Stoffwechselprodukte und CO₂ abtransportieren können.

Um die relativ geringe ATP-Ausbeute bei der Glykolyse auszugleichen, muss Glukose in hohen Mengen aufgenommen werden, was in primären und metastasierenden Tumoren mit einer positiven ¹⁸Fluorodeoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie (¹⁸FDG-PET) bestätigt werden konnte (154). Für die gesteigerte Glukoseaufnahme in die Tumore sind hauptsächlich die Glukosetransporter GLUT-1 und GLUT-3 verantwortlich, deren Expression über HIF-1 induziert wird (155). Diese beiden Glukosetransporter gehören der Familie der passiven Glucosetransporter an, welche insgesamt aus 13 Isoformen besteht. Darunter haben GLUT-1 und GLUT-3 die höchste Spezifität für Glukose, wobei GLUT-1 normalerweise ubiquitär und GLUT-3 Neuronen-spezifisch exprimiert wird (156). Eine Überexpression von GLUT-1 und GLUT-3 konnte bisher in verschiedenen Malignomen beschrieben und zumeist mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden (157-160).

Neben der gesteigerten Glukoseaufnahme führt HIF-1 auch zu einer Hochregulation der Glykolyse und glykolyseaktivierenden Genen wie der Serin/Threoninkinase Akt, welche die Aktivierung der Hexokinase veranlasst (161-164). Die Hexokinase II, die in Tumoren am

häufigsten vorkommende Isoform, ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und phosphoryliert Glukose zu Glukose-6-phosphat (165). Glukose-6-phosphat kann nicht mehr aus der Zelle transportiert werden und wird im Zytosol weiter über die Glykolyse zu Pyruvat abgebaut (166). An der Glykolyse sind verschiedene Enzyme beteiligt, welche in diversen Tumorentitäten deutlich hochreguliert nachweisbar waren (167, 168). Beispielhaft sei hier die Pyruvatkinase genannt, welche den ATP-erzeugenden Schritt in der Glykolyse katalysiert. In Tumorzellen überwiegt die Pyruvatkinase Typ 2 (M2-PK), die bei der Regulation der Glykolyseintermediate in Richtung synthetische Prozesse oder glykolytische Energieproduktion von Bedeutung ist (138) (Abb. 2).

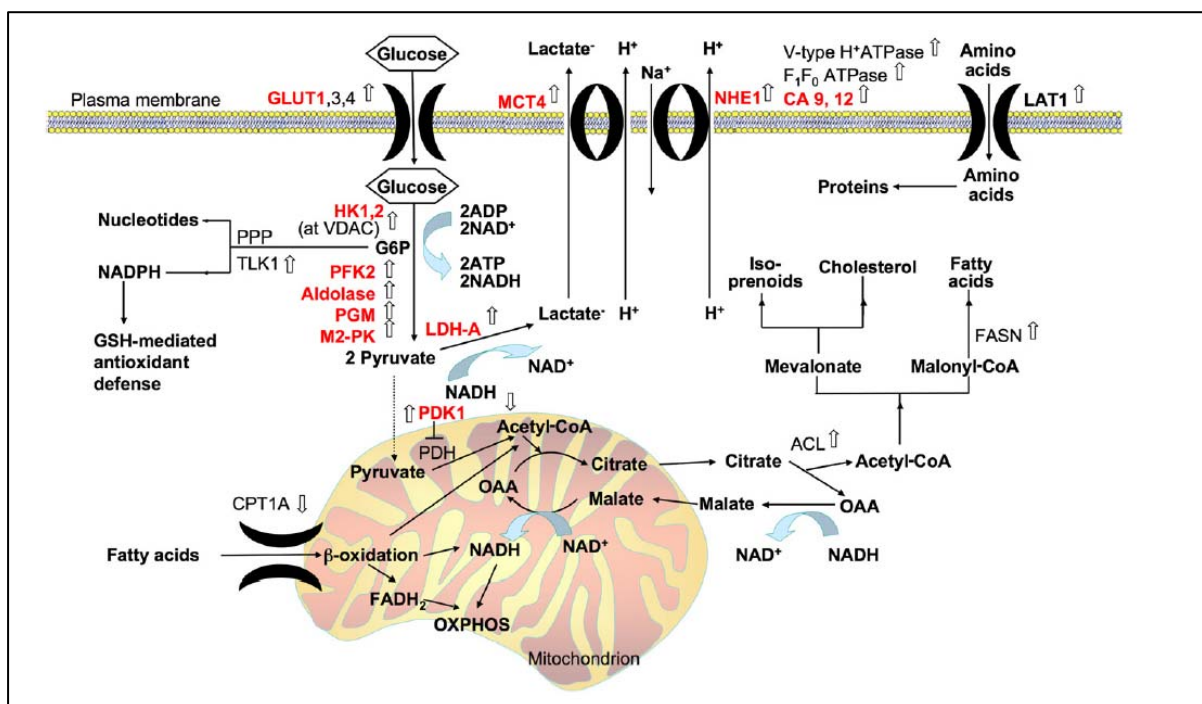


Abb. 2: Metabolische Veränderungen in Tumorzellen (169)

Des Weiteren induziert HIF-1 eine Verminderung der oxidativen Phosphorylierung über die Atmungskette. Durch die Inhibition der Pyruvatdehydrogenase 1 (PDH) gelangt Pyruvat, das Endprodukt der Glykolyse, nicht in den Citratzyklus, sondern wird über die Laktatdehydrogenase (LDH) weiter verstoffwechselt (170). LDH ist ein tetrameres Enzym mit fünf Isoformen aus unterschiedlichen Kombinationen von zwei Untereinheiten, LDHA und LDHB (LDH1 = 4x LDHB, LDH5 = 4x LDHA). LDHB katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat und liegt hauptsächlich in aeroben Organen wie dem Herz vor, während LDHA die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat katalysiert. Eine Überexpression von LDHA konnte in vielen Tumorentitäten nachgewiesen und teilweise mit erhöhten LDH-

Konzentrationen im Serum assoziiert werden (171-174). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression der LDHA mit einer erhöhten Aggressivität der Tumore und einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert ist (172). Im Mausmodell konnte beobachtet werden, dass transplantierte LDHA-defiziente Tumore deutlich langsamer als LDHA-exprimierende Tumore wachsen (175). Ebenso überlebten die Mäuse länger, denen die LDHA-defizienten Tumore injiziert worden waren. Dabei beeinflusst die Inhibition von LDHA nicht nur die Entstehung von Tumoren, sondern induziert zusätzlich oxidativen Stress und inhibiert somit die Tumorprogression (176). *In vitro* konnte durch eine Suppression der LDHA in Tumorzellen nicht nur die Entstehung von Laktat verringert, sondern auch deren Sauerstoffverbrauch und die oxidative Phosphorylierung erhöht werden (177). Laktat, das Endprodukt der aeroben Glykolyse, wird im Kotransport mit Protonen (H^+) aus der Zelle geschleust, wodurch eine deutliche Azidifikation (pH Werte bis zu 6.0) des extrazellulären Tumormilieus entsteht (178). Dies geschieht sowohl mithilfe der Monocarboxylattransporter MCT-1/-4, als auch mit Na^+-H^+ -Protonenpumpen, welche durch Hypoxie und durch eine intrazelluläre Abnahme des pH-Wertes aktiviert werden (179).

Eine intrazelluläre Ansäuerung wird auch dadurch verhindert, dass Tumorzellen die HIF-induzierbaren Carboanhydrasen 9 und 12 (CA9 und CA12) exprimieren. Diese sind membrangebundene Ektoenzyme, die extrazelluläres CO_2 zu HCO_3^- hydratisieren, das über Anionentransporter wieder zurück in die Zelle transportiert und somit die Aufrechterhaltung des normalen intrazellulären pH-Wertes (pH 7.4) sicher stellt (180). Durch diese Anpassungen der Tumorzellen kommt es durch einen H^+ -Konzentrationsgradienten oft zu einer deutlichen Ansäuerung der Tumorumgebung, was eine Modulation des Tumorstromas bzw. Apoptose oder Nekrose der normalen Zellen auslösen kann (181). Ferner unterstützt die extrazelluläre Azidität durch eine pH-abhängige Aktivierung von Cathepsinen und Metalloproteinasen die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen (182). So konnte in Studien gezeigt werden, dass eine Verminderung des pH-Wertes zu einer gesteigerten Invasivität *in vitro* und Metastasierung *in vivo* führen kann (183, 184).

1.5.3 Der Einfluss von Laktat auf das Tumorstroma

Durch die hypoxische Tumorumgebung kommt es nicht nur zu einer Ansäuerung des Tumorstromas, sondern unter anderem auch zu einer Akkumulation des Stoffwechselendproduktes Laktat, dem Salz der Milchsäure. So konnte gezeigt werden, dass stromale Zellen das von Tumorzellen produzierte Laktat über Monocarboxylattransporter

wieder aufnehmen und zu Pyruvat oxidieren können, wodurch es zu einer Anpassung des Tumorstromas kommt (172). Auch Fibroblasten werden durch Hypoxie und den veränderten Tumorstoffwechsel moduliert. So wird durch Laktat unter anderem die Expression von Hyaluronsäure, die die Zellmobilität und Tumordinvasion fördert, erhöht und es wird angenommen, dass Tumor-Fibroblasten insgesamt zu einer Angiogenese-Stimulation führen (185, 186). Außerdem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Laktat einen positiven Einfluss auf die Migration von Tumorzellen ausübt, was die verstärkte Metastasierung und schlechte Prognose von Laktat-sezernierenden Tumoren erklären könnte (187). Zudem konnte bei Tumorpatienten gezeigt werden, dass erhöhte Laktatkonzentrationen im Tumor mit einer gesteigerten Metastierungsrate und vermindertem Überleben korrelieren (188-190). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die metabolische Tumorumgebung inflammatorische Zellen wie die tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) anlockt. Diese immunsuppressive Population kommt oft in hypoxischen und perinekrotischen Umgebungen vor und kann Angiogenese induzieren, Tumorzellwachstum fördern und lokale immunsuppressive Effekte induzieren (191).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Milchsäure die Funktion humaner T-Zellen stark beeinträchtigt (192). Zum einen inhibiert Milchsäure signifikant die Proliferation von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen, zum anderen produzieren diese T-Zellen weniger Zytokine und Effektormoleküle, was mit einer deutlich reduzierten zytotoxischen Funktion einhergeht. Außerdem hemmt Milchsäure die Differenzierung und Aktivierung dendritischer Zellen und auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF in Monozyten (193, 194).

1.6 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss und die Mechanismen der Tumormetaboliten wie Milchsäure und MTA auf humane T-Zellen zu untersuchen, um langfristig einen möglichen Angriffspunkt für immuntherapeutische Ansätze zu identifizieren.

In dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, ob die suppressiven Effekte von Milchsäure durch eine Hemmung der Glykolyse in den T-Zellen zustande kommen. Hierfür wurde der Einfluss der Milchsäure auf die Glykolyserate von ruhenden und aktivierten CD8⁺ T-Zellen als auch von konventionellen und regulatorischen CD4⁺ T-Zellen mittels Aufnahme von Isotopen-markierter [1,2-¹³C₂]Glukose analysiert.

Da in der Literatur gezeigt werden konnte, dass MTAP-defiziente Tumorzellen MTA sezernieren, sollte untersucht werden, inwieweit T-Zellen sensitiv gegenüber einer Behandlung von MTA sind. Hierbei sollte sowohl die Proliferation, Apoptoserate und Funktionalität der T-Zellen, als auch die Induktion einer Tumorantigen-spezifischen Immunantwort im Mittelpunkt stehen. Weiterhin sollte der Mechanismus der MTA-induzierten T-Zell Suppression entschlüsselt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Relevanz der *in vitro* beobachteten inhibitorischen Einflüsse von Milchsäure und MTA auf humane T-Lymphozyten *in vivo* dargestellt werden. Als Modell hierfür diente das Nierenzellkarzinom (RCC, *renal cell carcinoma*), das durch eine sehr hohe Immuninfiltration und eine hohe Glykolyserate charakterisiert ist. Zunächst sollten RCC-Tumorzelllinien auf die Expression von MTA- und Glykolyse-assoziierten Proteinen und auf die Sekretion von MTA bzw. Laktat analysiert werden. Darüber hinaus sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Lymphozyteninfiltration in das Tumorgewebe und dem Glukose- bzw. MTA-Metabolismus in Tissuemicroarrays (TMAs) von RCC-Patienten über immunhistochemische Färbungen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Medien, Puffer und Lösungen

AB-Serum, human: PAN Biotech, Aidenbach

Annexin-Puffer: Pharmingen/BD, Heidelberg

BSA (Bovine serum albumin): PAA, Linz (Österreich)

Dimethylsulfoxid: Sigma, München

DYNAL-Puffer: PBS + 2% Fötale Kälberserum

Einfriermedium: 90% Fötale Kälberserum + 10% Dimethylsulfoxid

FACSclean: BD, Heidelberg

FACSflow: BD, Heidelberg

FACSRinse: BD, Heidelberg

FCS (Fötale Kälberserum): Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

FCS-haltiges Medium: Standardmedium + 10% FCS

HSA (Human serum albumin): Octapharma, Langenfeld

Lymphozytenseparationslösung (Ficoll): PAA, Linz (Österreich)

MACS-Puffer: PBS + 2 mM EDTA (Sigma) + 0.5% HSA

PBS (Phosphate buffered saline): Biochrom, Berlin

Standardmedium (serumfrei): insgesamt 500 ml RPMI mit Phenolrot (PAN Biotech) mit folgenden Zusätzen: 200 mmol/l L-Glutamin (Gibco) , 2 ml Vitamine (100 x) (PAN Biotech), 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (100 x) (PAN Biotech), 100 mmol/l Natriumpyruvat (PAN Biotech), 40 U/ml Penicillin (Gibco), 40 µg/ml Streptomycin (Gibco), 50 µmol/l β-Mercaptoethanol (Gibco)

T-Zell-Medium: Standardmedium + 10% humanes AB-Serum

T-Zell-Stimulationsmedium: T-Zell-Medium + TCGF (isoliert aus Zellüberstand) oder 100 U/ml IL-2

2.1.2 Farbstoffe

Farbstoff	Konjugation	Hersteller
7AAD	-	Pharmingen/BD, Heidelberg
AnnexinV	FITC	Pharmingen/BD, Heidelberg
CFSE	-	Sigma, München

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Adenosin	Sigma, München
Alloxazin	Sigma, München
Caffein	Sigma, München
5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin	Sigma, München
Dipyridamol	Sigma, München
Erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)adeninhydrochlorid (EHNA)	Sigma, München

Forskolin	Sigma, München
L-Milchsäure	Fluka, München
Natriumlaktat	Fluka, München

2.1.4 HLA-A2-bindende Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	Lösung	Hersteller
MART-1	ELAGIGILTV	Standardmedium 20% DMSO	Calbiochem, Läfelfingen (Schweiz)
gp100	ITDQVPFSV	Standardmedium 5% DMSO	Bachem, Heidelberg

2.1.5 Peptid-MHC-Tetramere

Tetramer	Konjugation	Hersteller
MART-1	PE	Beckman Coulter, Krefeld

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 FACS Antikörper

Für den Nachweis von Oberflächen - oder intrazellulären Markern wurden folgende monoklonale Antikörper, die direkt mit Fluorochromen konjugiert sind, verwendet:

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugation	Hersteller
B7-H3	IgG2a	M3.2D7	Ratte	PE	eBioscience, Frankfurt
B7-H4	IgG1	H74	Maus	PE	eBioscience, Frankfurt
CCR7	IgG2a	150503	Maus	APC	R&D, Minneapolis (USA)
CD3	IgG1	SK7	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD3	IgG1	SK7	Maus	PE	BD, Heidelberg

CD4	IgG1	SK3	Maus	PerCP	BD, Heidelberg
CD4	IgG1	13B8.2	Maus	APC	Coulter, Krefeld
CD8	IgG1	SK1	Maus	APC-Cy7	BD, Heidelberg
CD8	IgG1	SK1	Maus	PerCP	BD, Heidelberg
CD8	IgG1	RPA-T8	Maus	APC	BD, Heidelberg
CD14	IgG2b	MOP9.89	Maus	PE	BD, Heidelberg
CD25	IgG1	2A3	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD25	IgG1	2A3	Maus	PE	BD, Heidelberg
CD25	IgG1	2A3	Maus	APC	BD, Heidelberg
CD27	IgG1	M-T271	Maus	PE	BD, Heidelberg
CD28	IgG1	10F3	Maus	FITC	Caltag, Hamburg
CD45RA	IgG2b	MEM56	Maus	APC	Caltag, Hamburg
CD45RA	IgG1	L48	Maus	PE-Cy7	BD, Heidelberg
CD54	IgG1	84H10	Maus	FITC	Millipore, Schwalbach
CD62L	IgG1	DREG-56	Maus	APC	BD, Heidelberg
CD69	IgG1	L78	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD80	IgM	BB1	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD83	IgG1	HB15e	Maus	APC	BD, Heidelberg
CD86	IgG1	FUN1	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD95	IgG1	DX2	Maus	PE	BD, Heidelberg
CD107a	IgG1	H4A3	Maus	PE	eBiosciences, Frankfurt
CD137	IgG1	4B4-1	Maus	APC	BD, Heidelberg
Granzyme-B	IgG1	HC2	Maus	PE	Hözl Diagnostika, Köln
HLA-A2	IgG2b	BB7.2	Maus	PE	Acris, Herford
IFN- γ	IgG1	B27	Maus	FITC	BD, Heidelberg
IL-2	IgG2a	MQ1-17H12	Ratte	PE	BD, Heidelberg
ILT3	IgG2a	293623	Maus	APC	R&D, Minneapolis (USA)
Ki-67	IgG1	556026	Maus	FITC	BD, Heidelberg
Ki-67	IgG1	556027	Maus	PE	BD, Heidelberg
Perforin	IgG2b	delt9G9	Maus	PE	Hözl Diagnostika, Köln
PD-1	IgG1	MIH4	Maus	APC	eBiosciences, Frankfurt
PD-L1	IgG1	MIH1	Maus	PE	eBiosciences, Frankfurt

TCR $\alpha\beta$	IgG2b	BW242/412	Maus	PE	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
-------------------	-------	-----------	------	----	--

Für die Kontrollfärbungen wurden folgende Fluoreszenz-konjugierte Isotyp-Antikörper verwendet:

Isotyp	Klon	Herkunft	Fluoreszenz	Hersteller
IgG1	X40	Maus	FITC	BD, Heidelberg
IgG1	X40	Maus	PE	BD, Heidelberg
IgG1	557872	Maus	PE-Cy7	BD, Heidelberg
IgG1	X40	Maus	PerCP	BD, Heidelberg
IgG1	679.1MC7	Maus	APC	Beckman Coulter, Krefeld
IgG1	MOPC-21	Maus	APC-Cy7	BD, Heidelberg
IgG2a	G155-178	Maus	FITC	Pharmingen/BD, Heidelberg
IgG2a	X39	Maus	PE	BD, Heidelberg
IgG2a	5205	Maus	APC	Caltag, Hamburg
IgG2b	MPC-11	Maus	FITC	BD, Heidelberg
IgG2b	MPC-11	Maus	PE	BD, Heidelberg
IgG2b	MOPC-195	Maus	APC	Caltag, Hamburg
IgM	MsIgM	Maus	PE	Dianova, Hamburg

2.1.6.2 Antikörper für Immunhistochemie

Spezifit	Klon	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
CD3	-	Hase	1:200	Dako, Hamburg
CD8	C8/144B	Maus	unverdünnt	Ventana, Tucson, USA
LDH5	-	Schaf	1:200	Abcam, Cambridge, UK
GLUT-1	-	Hase	1:200	LabVision Corp., Fremont, USA
MTAP	-	Hase	1:500	Acris, Herford
Granzyme-B	GrB-7	Maus	1:30	Dako, Hamburg
Perforin	5B10	Maus	1:200	Abcam, Cambridge, UK
FOXP3	236A/E7	Maus	1:100	Abcam, Cambridge, UK

2.1.7 Beads

Name	Hersteller
CD4 ⁺ T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD8 ⁺ T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
anti-CD3/CD28 Dynabeads (T Cell Expander)	Invitrogen/Dynal, Oslo (Norwegen)
CD4 Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach

2.1.8 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
18S for	5'- acc gat tgg atg gtt tag tga g - 3'	18S sense
18S rev	5'- cct acg gaa acc ttg tta cga c - 3'	18S antisense
MTAP for	5'- ttg gaa taa ttg gtg gaa cag g - 3'	MTAP sense
MTAP rev	5'- ctt caa agc caa gat gtt cg - 3'	MTAP antisense
GLUT-1 for	5'- aac tct tca gcc agg gtc cac - 3'	GLUT-1 sense
GLUT-1 rev	5'- cac agt gaa gat gat gaa gac gta ggg - 3'	GLUT-1 antisense
LDHA for	5'- ggt tgg tgc tgt tgg cat gg - 3'	LDHA sense
LDHA rev	5'- tgc ccc agc cgt gat aat ga - 3'	LDHA antisense
LDHB for	5'- gat ggt ggt tga aag tgc cta tga agt c - 3'	LDHB sense
LDHB rev	5'- agc cac act taa tcc aat agc cca - 3'	LDHB antisense
MCT-1 for	5'- gca gct tet ttc tgt aac acc gt - 3'	MCT-1 sense
MCT-1 rev	5'- gtc gcc tet tgt aga aat act tgc c - 3'	MCT-1 antisense

2.1.9 Zellkulturflaschen, -platten, -röhrchen

25 cm ² Kulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
75 cm ² Kulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
162 cm ² Kulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
96-well Rundbodenplatten	Falcon/BD, Franklin Lakes (USA)
96-well Spitzbodenplatten	Corning/Costar, NY (USA)

24-well Platten	Corning/Costar, NY (USA)
12-well Platten	Corning/Costar, NY (USA)
6- well Platten	Corning/Costar, NY (USA)
15 ml Zentrifugationsröhrchen	Corning/Costar, NY (USA)
50 ml Zentrifugationsröhrchen	Corning/Costar, NY (USA)
200 ml Zentrifugationsröhrchen	Falcon/BD, Franklin Lakes (USA)
14 ml Polystyren Röhrchen	Falcon/BD, Franklin Lakes (USA)
Facs-Röhrchen steril	Falcon/BD, Franklin Lakes (USA)
Einfrier-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
1.5 ml Cups	Sarstedt, Nürnberg
2 ml Pipetten	Corning/Costar, NY (USA)
5 ml Pipetten	Corning/Costar, NY (USA)
10 ml Pipetten	Corning/Costar, NY (USA)
25 ml Pipetten	Corning/Costar, NY (USA)
50 ml Pipetten	Corning/Costar, NY (USA)
Zellsiebe (0.1µm – 100µm)	Falcon/BD, Franklin Lakes (USA)

2.1.10 Zytokine

Zytokin	Hersteller
IL-2 (Proleukin)	Novartis, Nürnberg
IL-4	Promokine, Heidelberg
TGF-β	PeptoTech, Rocky Hill (USA)
TNFα	CellGenix, Freiburg
PGE-2	Enzo, Lörrach
IL-1β	Promokine, Heidelberg
IL-6	Promokine, Heidelberg
GM-CSF (Leukine)	Novartis, Nürnberg

2.2 Methoden

2.2.1 Ermittlung der Zellzahl durch Trypanblau-Ausschlussfärbung

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden Zellen in einer Lösung von 0.4% Trypanblau (Gibco) in 0.9% NaCl (Merck) in Aqua bidest. verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Mikroskops (Axiostar Plus, Zeiss) ausgezählt. Diese Methode erlaubt die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen, da nur abgestorbene Zellen eine Blaufärbung aufgrund fehlender Membranintegrität aufweisen. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000 = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden gezählt und in 1 ml gekühltem Einfriermedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in gekühlte Einfrier-Röhrchen abgefüllt, wobei eine Zellzahl von 100×10^6 Zellen/Einfrier-Röhrchen nicht überschritten werden soll. Die befüllten Einfrier-Röhrchen werden in eine 4°C kühle Cryobox (Nalgene Nunc, International Hereford, U.K.) gestellt und für einige Tage bei -80°C gelagert. Die mit Isopropanol gefüllten Einfrierboxen gewährleisten ein definiertes Abkühlen der Zellen um -1°C/ml pro min. Danach werden die Zellen in flüssigem N_2 gelagert.

2.2.3 Auftauen von Zellen

Die tiefgekühlten Zellen werden langsam bei Raumtemperatur erwärmt. Danach wird den Zellen sukzessiv serumhaltiges Medium (je nach Zellart T-Zell-Medium oder FCS-haltiges Medium, Raumtemperatur) zugeführt. Dieses Protokoll gewährleistet ein zügiges und schonendes Auftauen der Zellen. Im Anschluss daran werden die Zellen sofort abgefügt und in frischem Medium aufgenommen.

2.2.4 Kultivierung von Zelllinien

Tumorzelllinien und die T2 Zelllinie wurden in FCS-haltigem Medium kultiviert. Bei den Zelllinien RW41, RH556, RC11503 und RJ494 handelte es sich um primäre RCC-Tumorzelllinien. Alle 3 - 4 Tage wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin-EDTA (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) vom Flaschenboden gelöst, mit PBS gewaschen und gesplittet.

2.2.5 Beladung der T2 Zellen

T2 Zellen sind eine humane HLA-A*0201 lymphoide Hybridomzelllinie, die aus einer T- und einer EBV-transformierten B-Zelllinie entstanden ist. T2 Zellen weisen eine Defizienz des TAP-Transporter-Proteins auf, weshalb die HLA-A2 Moleküle auf der Zelloberfläche leere MHC-Taschen tragen. Diese unbesetzten Bindungsstellen lassen sich deshalb effektiv mit exogenen HLA-A2-bindenden Peptiden beladen (195). T2 Zellen wurden in Standardmedium bei einer Zelldichte von $1.5 - 5 \times 10^6/\text{ml}$ mit $30 \mu\text{g/ml}$ Peptid und $10 \mu\text{g/ml}$ β 2-Mikroglobulin bei 37°C für 2 Stunden beladen. Um freies Peptid zu entfernen, wurden die beladenen T2 Zellen nach der Inkubationsphase 2x mit 20 ml T-Zell-Medium gewaschen.

2.2.6 Dichtegradientenzentrifugation

Die verwendeten Zellen wurden durch Leukapherese von gesunden Spendern gewonnen. Dabei wurde das Blut in eine erythrozytenreiche Fraktion, die den Spendern zurückgegeben wurde, sowie eine erythrozytenarme Fraktion aufgetrennt. Letztere Fraktion wurde anschließend mit PBS 1 : 1 verdünnt und auf Lymphozytenseparations-Lösung aufgetragen. Nach 20-minütiger Zentrifugation (1900 rpm/RT) hatte sich das Leukapherisat in eine schwere Fraktion (Erythrozyten), eine Interphase (mononukleäre Zellen, MNC) und den Überstand (Thrombozyten) getrennt. Die Interphase wurde mit einer Pipette abgesammelt und mit PBS gewaschen (1800 rpm/10 min). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen gezählt und entweder eingefroren oder zur Gewinnung von Monozyten verwendet.

2.2.7 Gegenstromelutriation zur Isolierung von Monozyten

Ein Teil der aus der Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen MNCs wurde in einer J6-MC Zentrifuge (Beckman) einer Elutriation unterzogen. Dabei handelte es sich um eine Gegenstrom-Zentrifugation, bei der die verschiedenen MNCs gemäß ihrer Größe und Dichte aufgetrennt werden konnten. Zunächst wurde das System mit einer H₂O₂-Lösung sterilisiert, mit PBS gewaschen und die Pumpe mit Hanks'-Puffer geeicht. Für die Elutriation wurden die Zellen in Hanks'-Puffer mit 6% autologem Plasma in das System eingebracht. Die einzelnen Zellfraktionen wurden durch Erhöhung der Durchflussrate bei einer konstanten Umdrehungszahl der Zentrifuge aufgetrennt und gesammelt. Die letzte Fraktion (III), in der sich die Monozyten befinden, wurde anschließend mit 1500 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, in Standardmedium aufgenommen und gezählt.

2.2.8 Generierung von dendritischen Zellen (DCs) aus Monozyten *in vitro*

Die durch die Elutriation gewonnenen Monozyten wurden in FCS-haltigen Medium (10⁶ Zellen/ml) unter Zugabe der Zytokine IL-4 (25U/ml), GM-CSF (500U/ml) und TGF-β (5ng/ml) über 5-6 Tage zu unreifen dendritischen Zellen (DCs) differenziert. Nach der Differenzierung wurden die unreifen DCs durch Zugabe verschiedener proinflammatorischer Zytokine gereift. Dieses Zytokingemisch wurde von Jonuleit *et al.* (196) beschrieben und wird auch in klinischen Studien zur Reifung von DCs verwendet. Dazu wurden zu den unreifen DCs die Zytokine IL-4 (12.5U/ml), GM-CSF (250U/ml), IL-6 (1000U/ml), IL-1β und TNF (jeweils 10ng/ml) sowie Prostaglandin-E₂ (1µg/ml) für weitere 2 Tage zugegeben. Die reifen DCs wurden entweder direkt in den Versuchen verwendet oder eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.9 Exogene Beladung von DCs

Reife DCs wurden in 10 ml Standardmedium gewaschen und auf eine Zelldichte von 1 - 5 x10⁶ Zellen/ml Standardmedium eingestellt. 30 µg/ml des jeweiligen Peptids und 10 µg/ml β₂-Microglobulin, welches die zu beladenen MHC-Komplexe stabilisiert, wurde zugegeben. Diese Zellsuspension wurde für 2 - 3 h bei 37 °C unter gelegentlichem Schütteln, um die Adhäsion der DCs an das Plastik zu vermeiden, inkubiert. Um freies Peptid zu entfernen,

wurden die beladenen DCs nach der Inkubationsphase 2x mit 20 ml T-Zell-Medium gewaschen.

2.2.10 Magnetische Separation

Diese Zell-Anreicherungsmethode beruht auf der Bindung von Antikörper-beschichteten Eisenpartikeln („Beads“) an die Zelle. Das Prinzip beruht auf zwei Schritten: Im ersten Schritt werden die Eisenpartikel an die Zellen gebunden. Im zweiten Schritt wird die Zellsuspension an einem Magneten vorbeigeführt und separiert. Dabei gibt es positive Anreicherungsmethoden, in welchen die Beads an die gewünschte Subpopulation gebunden werden, und negative Anreicherungsmethoden, in denen die zu depletierenden Zellpopulationen mit Beads markiert werden.

Bei der Zellseparation nach der Miltenyi-Methode wurden die Zellen zunächst mit einem biotinylierten Antikörper-Cocktail gefärbt und anschließend mit Anti-Biotin Microbeads inkubiert. Da die verwendeten Beads lediglich einen Durchmesser von 50 nm („Microbeads“) aufweisen, muss die Zellsuspension über eine Säule laufen, welche dicht mit Eisenpartikeln gepackt ist. Für die Aufreinigung der Zellen wurden LS-Säulen (Miltenyi-Biotech, Bergisch-Gladbach) verwendet, die in einen Permanentmagneten eingespannt werden. Vor dem Säulenlauf wurde die Säule mit MACS-Puffer gewaschen. Die Isolation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist eine Negativselektion, d.h. es adhären alle Zellen an der Säule, die nicht den gewünschten Phänotyp besitzen. Die verwendeten Mengen Antikörper, MACS-Puffer, sowie die Inkubationszeiten sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Zellen mit einer FACS-Färbung auf ihre Reinheit untersucht.

		Selektion von CD4⁺	Selektion von CD8⁺	Depletion von CD4⁺
Depletion von Zellpopulationen		CD8 ⁺ , CD14 ⁺ , CD16 ⁺ , CD19 ⁺ , CD36 ⁺ , CD56 ⁺ , CD123 ⁺ , TCR $\gamma\delta$	CD4 ⁺ , CD14 ⁺ , CD16 ⁺ , CD19 ⁺ , CD36 ⁺ , CD56 ⁺ , CD123 ⁺ , TCR $\gamma\delta$	CD4 ⁺
1. Färbeschritt	MACS- Puffer	40 $\mu\text{l}/10^7$	40 $\mu\text{l}/10^7$	80 $\mu\text{l}/10^7$
	1. AK bzw.	10 $\mu\text{l}/10^7$	10 $\mu\text{l}/10^7$	20 $\mu\text{l}/10^7$

	Microbeads			
Inkubation (4 °C)		10 min	10 min	15 min
2. Färbeschritt	MACS- Puffer	30 µl/10 ⁷	30 µl/10 ⁷	-
	2. AK bzw. Microbeads	20 µl/10 ⁷	20 µl/10 ⁷	-
Inkubation (4 °C)		15 min	15 min	-
Waschen	MACS- Puffer	20 x Vol.	20 x Vol.	20 x Vol.
Säule (Waschen)	MACS- Puffer	3 ml	3 ml	3 ml
Eluieren	MACS- Puffer	3 x 3ml	3 x 3ml	3 x 3ml
Isolation		Negativ	Negativ	Negativ

2.2.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Detektion von Zell-gebundenen Farbstoffen und liefert phänotypische Aussagen über die gefärbten Zellen. Dabei werden die Zellen in einer Trägerflüssigkeit an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Im verwendeten Gerät (FACSCalibur und FACSCanto, BD, Heidelberg) standen zwei Laser (Argon- und UV-Laser) für die Anregung der Farbstoffe zur Verfügung. Die Emission der Farbstoffe wurde in vier bzw. sechs Kanälen gemessen. Außerdem wird die Lichtstreuung jeder Zelle detektiert: das sog. "Vorwärts-Streulicht" liefert Information über die Größe der Zellen, das sog. "Seitwärts-Streulicht" vermittelt Information über die Granularität der Zelle. Zusammengenommen werden damit für jede Zelle sechs bzw. acht Parameter ermittelt. Als Farbstoffkonjugate werden FITC (Fluorothioisocyanat), PE (Phycoerythrine), PE-Cy7, PerCP (Peridin-Chlorophyll-Protein), APC (Allophycocyanine) und APC-Cy7 verwendet.

2.2.12 Antikörperfärbung

2.2.12.1 Direkte Antikörperfärbung

Die zu untersuchenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen (Falcon/BD, Franklin Lakes, USA) geerntet und in FACS-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die vom Hersteller angegebene Menge an Antikörper auf das Zellpellet pipettiert und 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation mit FACS-Waschpuffer wurden die Zellen in 200-500 µl PBS oder Fixierungslösung aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit einem FACSCalibur und einem FACSCanto (BD, Heidelberg) Durchflusszytometer. Die Daten wurden mit der Software FlowJo (Tree Star, Ashland, USA) ausgewertet.

2.2.12.2 Intrazellulärfärbung

Für die durchflusszytometrische Untersuchung von intrazellulären Molekülen (IL-2, IFN- γ , Perforin, Granzyme-B und Ki-67) wurden die Zellen geerntet und mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Nach einer direkten Antikörperfärbung der Oberflächenmoleküle wurden die Zellen mit 250 µl Fixierungs/Permeabilisierungs-Lösung (BD, Heidelberg) für 20 min bei 4 °C fixiert. Die permeabilisierten Zellen wurden 2x mit BD Perm/Wash (BD, Heidelberg) gewaschen und anschließend mit dem Antikörper für die Intrazellulärfärbung für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit BD Perm/Wash wurden die Zellen in PBS aufgenommen und im FACSCalibur bzw. FACSCanto analysiert.

2.2.13 pMHC-Tetramerfärbung

Zum Nachweis spezifischer T-Zellen wurden die Zellen einmal mit FACS-Waschpuffer gewaschen und danach mit der angegebenen Menge des jeweiligen pMHC-Tetramers inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Oberflächenfärbung gegen weitere Antigene mit direkt-konjugierten Antikörpern durchgeführt, ohne das pMHC-Tetramer vorher abzuwaschen. Nach der Inkubationszeit der Antikörperfärbung wurden die Zellen mit FACS-Waschpuffer gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.14 Generierung von antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

CD8⁺ T Lymphozyten wurden aus MNCs durch magnetische Negativselektion nach dem Miltenyi-System angereichert. Die angereicherte Population bestand aus >90% CD8⁺ T Zellen. Als Stimulatorzellen dienten autologe, monozytengereifte, peptidbeladene DCs. Für die Expansionskultur wurden jeweils 10⁵ CD8⁺ Zellen/well mit 2 x 10⁴ peptidbeladenen, autologen DCs/well in 96-well Rundbodenplatten kultiviert. Als Medium wurde 225 µl T-Zell-Stimulationsmedium/well verwendet und alle 3 - 4 Tage gewechselt. Die CD8⁺ T-Zellen wurden wöchentlich mit peptidbeladenen, autologen DC mit den gleichen Stimulationsbedingungen restimuliert und mit Hilfe des Durchflusszytometers auf Reinheit und Antigenpezifität untersucht.

2.2.15 Generierung von allogen-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Die allogene Aktivierung wurde in einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR, *mixed lymphocyte reaction*) durchgeführt. Dabei nutzt man die MHC-Unterschiede zwischen T-Lymphozyten- und DC-Spender. CD4⁺ und CD8⁺ wurden aus MNCs durch magnetische Separation nach dem Miltenyi-System isoliert. Anschließend wurden die verschiedenen Zellpopulationen mit reifen DCs eines anderen Spenders stimuliert. Dabei wurden 7.5 x 10⁴ CD4⁺ oder CD8⁺ T Zellen/well mit 2.5 x 10⁴ reifen DCs/well in 225 µl T-Zell-Stimulationsmedium/well in 96-well Rundbodenplatten kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen in neuem Medium ausgesät und einmal wöchentlich mit reifen DCs restimuliert. Gleichzeitig wurde die Reinheit der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt.

2.2.16 Polyklonale Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Zur Generierung von polyklonalen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen wurden die Zellen mit Dynabeads (Invitrogen), an denen Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD3 und CD28 gebunden sind, in T-Zell-Stimulationsmedium inkubiert. Dazu wurden die verschiedenen Zellen durch magnetische Separation aus MNCs isoliert. Die Dynabeads wurden zunächst in PBS mit 0.1% BSA gewaschen und anschließend im Verhältnis ein Bead pro 1 bis 2 Zellen in T-Zell-Stimulationsmedium zugegeben. Die für den Glukose-Flux (siehe

unter 2.2.22) verwendeten regulatorischen CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen wurden mit 4 Beads pro Zelle in T-Zell-Stimulationsmedium mit 300 U/ml IL-2 expandiert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen in frisches Medium überführt und einmal wöchentlich mit neuen Beads restimuliert. Dazu wurden die Zellen geerntet und anschließend die Beads mit einem Handmagneten entfernt. Die Zellen wurden ausgezählt und mit neuen Beads in T-Zell-Stimulationsmedium ausgesät.

2.2.17 ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest

Die Effektorzellen wurden in den angegebenen Effektor : Zielzell Verhältnissen in T-Zell-Medium auf Mikrotiter-Platten mit Rundboden ausplattiert (NUNC, Langenselbold). Die Zielzellen wurden für 2 h mit 200 µCi ⁵¹Cr markiert, zweimal gewaschen und zu den Effektoren gegeben. Für die Ermittlung der Spontanfreisetzung wurden die Zielzellen in T-Zell-Medium ohne Effektorzellen ausplattiert. Die Maximalfreisetzung wurde ermittelt, indem die Zielzellen in 100 µl/well 6%-iger Perchlorsäure (Merck) kultiviert wurden. Nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C wurden die Überstände geerntet und die ⁵¹Cr-Freisetzung von Triplikaten gemessen. Die cpm (*counts per minute*) wurden in einem γ-Counter bestimmt. Die Zytotoxizität wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{cpm}_{\text{probe}} - \text{cpm}_{\text{spontanfreisetzung}}}{\text{cpm}_{\text{maximalfreisetzung}} - \text{cpm}_{\text{spontanfreisetzung}}} \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$$

2.2.18 CFSE-Färbung

Zur Untersuchung der Proliferation von Zellen wurde der fluoreszente Farbstoff CFSE (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) verwendet. Dieses Molekül, das im Durchflusszytometer detektiert wird, diffundiert durch die Zellmembran und bindet an zytoplasmatische Proteine. Wenn sich die Zelle teilt, wird der Farbstoff gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt. Somit können sowohl die proliferierenden Zellen als auch die Anzahl der Zellteilungen untersucht werden. Dazu wurden aus MNCs CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen separiert und gezählt. 1-5 x 10⁶ Zellen wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen

überführt und in PBS gewaschen. Anschließend wurde 500 µl Färbelösung (5 nM CFSE in PBS) auf das Zellpellet pipettiert und 4 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden einmal in PBS und einmal in T-Zellmedium gewaschen und ausgezählt.

2.2.19 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Die RNA der kryokonservierten Tumorbiopsien erfolgte durch Pulverisierung des Materials in einem mit Stickstoff und 100µl RLT-Puffer (+ 1% β-Mercaptoethanol) gefüllten Mörser. Die RNA wurde mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde die RNA photometrisch (ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab, Erlangen oder Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg) quantifiziert.

2.2.20 Reverse Transkription

Für die Einzelstrang-cDNA-Synthese wurden 250 ng bis 1 µg der isolierten Gesamt-RNA, 1µl Random Decamers (Ambion, Austin, USA) und 1 µl 10mM dNTPs (Gibco) mit Wasser auf 12 µl Gesamtvolumen verdünnt, für 10 min auf 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe einer Lösung, bestehend aus 2 µl 0.1 M DTT, 4 µl 5x First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl RNase Inhibitor Plus (Peqlab, Erlangen) wurde anschließend 1 µl SuperScript II RNase H-Reverse Transkriptase (Invitrogen) dazugegeben, gemischt und für 50 min bei 42 °C und dann für 15 min bei 70 °C inkubiert. Die cDNA wurde direkt zur Amplifizierung eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung auf -20 °C gelagert.

2.2.21 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion wurde mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen und einem Mastercycler Ep Realplex (Eppendorf, Hamburg) bzw. mit einem Brilliant II SYBR Green PCR Kit von der Firma Stratagene und einem StepOne Cycler (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt.

	Methode 1	Methode 2
cDNA	2 μ l	1 μ l
QuantiTect SYBR Green Mastermix	10 μ l	-
Brilliant II SYBR Green MasterMix	-	5 μ l
sense Primer (10pmol/ μ l)	1 μ l	0.5 μ l
antisense Primer (10pmol/ μ l)	1 μ l	0.5 μ l
UBS-Wasser	6 μ l	2 μ l
Referenzfarbstoff (1:333 mit H ₂ O)	-	1 μ l
Gesamtvolumen	20 μl	10 μl

Das Protokoll bestand, nach der 15 min Aktivierung bei 95 °C, aus 50 Zyklen mit 5 s Denaturierungsphase bei 95 °C und 15 s Annealing/Elongationsphase bei 60 °C. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase. Nach dem Ende des Amplifikationsprogramms wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0.1 °C/ sec) von 60 °C auf 95 °C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen.

2.2.22 Bestimmung des Glukose-Flux mit [1,2-¹³C₂]Glukose

Für die Bestimmung des Glukose-Flux wurden 1×10^6 aktivierte oder nicht vorstimulierte T-Zellen pro 1 ml T-Zell-Stimulationsmedium in 6-well oder 12-well Platten mit 20mM Natriumlaktat oder 20mM Milchsäure für 4 h inkubiert. Für die pH Kontrolle wurde das Medium mit HCl auf pH6.6 eingestellt. Zur Bestimmung des Glukose-Flux in die T-Zellen wurde ein Glukose-freies Medium verwendet, das mit den üblichen Zusätzen (siehe Standardmedium unter 2.1.1), 10% humanem AB-Serum und 2mg/ml [1,2-¹³C₂]Glukose (Euriso-top, Saint-Aubin Cedex, Frankreich) versetzt wurde. Ein Teil der Zellen wurde mit 20ng/ml PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat) und 1 μ M Ionomycin (Sigma) stimuliert. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet, gezählt, 3x mit PBS gewaschen, um anschließend schockgefroren und bei -80°C gelagert zu werden. Der Aufschluss der Zellen erfolgte über eine dreimalige Einfrier - und Auftauprozedur und Ultraschall. Um die Gesamtproteinmenge in den Proben zu analysieren, wurden die Probenvolumina und anschließend die Proteinkonzentrationen bestimmt (Coomassie, Pierce, Bonn). Um den Verlust der Metaboliten während der Extraktion und Evaporation auszugleichen, wurde den

Proben stabiles Isotopen-markiertes [U-¹³C]Pyruvat (Euriso-top, Saint-Aubin Cedex, Frankreich) beigefügt. Anschließend erfolgte die Fällung der intrazellulären Metaboliten mit 80% bzw. 100% Methanol (Merck). Die Proben konnten nach anschließender Lyophilisation (Hettich Combi-Dancer, Zinsser Analytic, Frankfurt) für die Massenspektrometrie verwendet werden.

Für die Analyse der sekretierten Metaboliten wurden 2 ml der Überstände nach dem ersten Zentrifugationsschritt abgenommen, schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Bevor die Metaboliten in den Überständen über Massenspektrometrie gemessen werden konnten, wurden durch Filtration mit 5kDa-Ultrafiltrationseinheiten (Vivaspin 4, Sartorius, Göttingen) Proteine entfernt und interne Standards zugefügt.

Die massenspektrometrischen Analysen wurden freundlicherweise am Lehrstuhl für Funktionelle Genomik, Universitätsklinikum Regensburg, durchgeführt. Die intra- und extrazellulären Laktatkonzentrationen wurden über LC-MS/MS (Flüssigkeitschromatographie) detektiert. Für die Bestimmung des relativen Glukose-Flux über die Glykolyse und den Pentosephosphatweg wurde die Verstoffwechslung von [1,2-¹³C₂]Glukose in [2,3-¹³C₂]Laktat, welches über die Glykolyse entsteht, und [3-¹³C]Laktat oder [1,3-¹³C₂]Laktat, welche aus dem Pentosephosphatweg entstehen, analysiert. Die Messungen wurden von Dipl.-Chem. Birgit Timischl und Dr. rer. nat. Katja Dettmer an einem Agilent 1200 SL HPLC System (Agilent, Böblingen) gekoppelt an ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API 4000 QTrap (Applied Biosystems, Concord, Ontario, Kanada) durchgeführt.

2.2.23 Analyse von MTA und Laktat in Zellüberständen

Zur Ermittlung der Konzentration der Metaboliten 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) und Laktat in verschiedenen Zellkulturüberständen wurden jeweils 2.5×10^6 Zellen in 4 ml FCS-haltigem- oder T-Zellstimulations-Medium in 6-well Platten kultiviert. Nach 24 bzw. 48 h wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert und die Überstände gesammelt, filtriert, schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Laktatmessungen wurden über eine Routineprozedur mit einem ADVIA 1650 (Bayer, Tarrytown, NY) und speziellen Reagenzien (Roche, Mannheim) in der Klinischen Chemie, Universitätsklinikum Regensburg, durchgeführt.

Für die MTA-Messungen erfolgte die weitere Aufarbeitung der Proben am Lehrstuhl für Funktionelle Genomik, Universitätsklinikum Regensburg. Die Analysen von MTA wurden von Dipl.-Chem. Axel Stevens über LC-ESI-MS/MS (Flüssigkeits-Elektronenspray-Massenspektrometrie) an einem Agilent 1200 SL HPLC System (Agilent, Böblingen) gekoppelt an ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API 4000 QTrap (Applied Biosystems, Darmstadt) bewerkstelligt.

2.2.24 Sauerstoffkonzentrationsmessungen

Der Sauerstoffverbrauch der T-Zellen wurde mit einem SDR SensorDish[®] Reader (PreSens Precision Sensing, Regensburg) analysiert. Das berührungslose Online-Messverfahren mit dem SDR SensorDish[®] Reader erlaubt eine quantitative Charakterisierung des Sauerstoffs in 24-well-Platten. Die Kultivierung von 2×10^6 T-Zellen erfolgte in 1 ml T-Zell-Stimulationsmedium für 24 h unter Standardbedingungen bei 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37°C. Als Kulturgefäße dienten OxoDishes[®], auf deren Böden Sauerstoffsensoren integriert waren. Diese optischen Sensoren wurden mit dem SDR SensorDish[®] Reader ausgelesen. Die Messung des Gehalts an gelöstem Sauerstoff im Medium erfolgte im Abstand von 30 Sekunden. Die Messergebnisse wurden mittels Software online graphisch dargestellt.

2.2.25 Aufarbeitung von Tumor – und Normalgewebeproben von Patienten mit RCC

Für die RNA-Isolation und anschließende qPCR-Analysen wurden die Gewebestücke aus den Tumoren und angrenzendem Normalgewebe freundlicherweise vom Lehrstuhl für Urologie, Universitätsklinikum Regensburg, bereit gestellt. Das Patientenkollektiv umfasste 30 Patienten, 24 Männer (80 %) und 6 Frauen (20 %), die sich einer Nephrektomie unterziehen mussten. Von den Patienten hatten 22 ein klarzelliges Nierenzellkarzinom, wobei es sich hier bei 6 Patienten um ein Karzinom des Klassifikationsgrades WHO I, bei 4 Patienten um WHO II, bei 8 Patienten um WHO III und bei 4 Patienten um WHO IV handelte. 7 Patienten hatten ein Nierenzellkarzinom vom papillären Typ, wobei diese Kohorte zwei Patienten mit WHO I inkludierte, einen Patienten mit WHO II, 3 Patienten mit WHO III und einen Patienten mit

WHO IV. Die histologischen Daten von einem Patienten waren unbekannt. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung betrug 63.4 Jahre. Einzelne Gewebestücke wurden zur Stickstoffasservierung abgetrennt. Zur besseren Stabilisierung der RNA wurden die Gewebestücke in 1 ml RNA-later gegeben, schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

2.2.26 Immunhistochemische Färbungen an Tissuemicroarrays

Die immunhistochemischen Färbungen an den Tissuemicroarrays (TMAs) wurden am Institut für Pathologie, Universität Erlangen, durchgeführt. Zur Entparaffinisierung wurden die Schnitte 10 min mit Xylol behandelt. Anschließend erfolgte die Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe. Für die Proteindemaskierung, die erst eine Bindung der Antikörper an entsprechende Zielepitope ermöglicht, wurden die Schnitte 5 min in einem Tris-EDTA-Puffer gekocht. Um endogene Peroxidase zu blockieren, wurde 5 min mit Peroxidase-Block (Dako, Hamburg) behandelt. Anschließend wurde 30 min mit entsprechenden Antikörpern inkubiert (siehe unter 2.1.6.2). Es wurden folgende Detektionssysteme verwendet:

1. ChemMate Envision Kit (Dako, Hamburg): Dabei handelt es sich um ein Polymerkonjugat, bei dem Sekundärantikörper und Detektionskomponenten an ein Dextranpolymer gekoppelt sind. Zur Visualisierung der Farbreaktion im Gewebe muss anschließend eine entsprechende Substrat-Chromogen-Lösung (Peroxidase/DAB) appliziert werden (CD3, CD8, GLUT-1, Perforin).
2. Anti-Sheep-Peroxidase-Konjugat (Sigma, Steinheim) (LDH5)
3. Streptavidin-biotinylierte alkalische Phosphatase (ABC-AP, Dako, Hamburg) (Granzyme-B, FOXP3)

Zur besseren Kontrastdarstellung im mikroskopischen Bild wurde mit Hämatoxylin oder Fast Red gegengefärbt.

2.2.27 Analyse der immunhistochemischen Färbungen an TMAs

Für einen Tissuemicroarray (TMA) werden ausgestanzte Gewebezylinder unterschiedlicher Herkunft auf einem Paraffinblock zusammengesetzt. Der Vorteil dieser Technik besteht darin, dass sich bis zu 60 Tumorstanzen auf einem Objektträger befinden und somit mit nur einer Antikörperfärbung zahlreiche Proben untersucht werden können.

Die in dieser Arbeit verwendeten TMAs wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie, Universität Erlangen, zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der TMAs erfolgte wie in Bubendorf *et al.* (197) beschrieben. Die Kohorte umfasste 249 Biopsien aus 145 männlichen und 83 weiblichen Patienten/-innen, die an einem Nierenzellkarzinom erkrankt waren. Das Durchschnittsalter betrug 62 Jahre (19 bis 88 Jahre). Die Proben konnten in 80 klarzellige, 66 papilläre, 73 chromophobe Nierenzellkarzinome und 30 Onkozytome klassifiziert werden. Die klinischen Parameter sind in Tabelle 1 (siehe unter 3.3.1.2) zusammengefasst.

Die TMAs konnten über ein DB 6000 Mikroskop (Leica, Wetzlar), an das eine CCD-Kamera (DFC 420, Leica, Wetzlar) gekoppelt war, visualisiert und photographiert werden. Die Anzahl der infiltrierenden Immunzellen wurde mit einer speziellen Software (Biomax, Erlangen) analysiert.

2.2.28 Detektion von intrazellulärem cAMP

Zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP) ist eines der wichtigsten „*Second Messenger*“-Moleküle und in zahlreiche physiologische Prozesse involviert. Die cAMP-Konzentrationen in den T-Zellen konnten mit einem cAMP-Immunoassay-Kit (Assay Designs, Michigan, USA) quantifiziert werden. Dafür wurden 3×10^6 T-Zellen in 3 ml T-Zell-Stimulationsmedium mit verschiedenen Chemikalien für 1 h inkubiert und anschließend 3x mit eiskaltem PBS gewaschen. Weiterhin erfolgte der Aufschluss der Zellen mit 500 μ l 0.1 M HCl für 15 bis 20 Minuten. Die Zellyse wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1300rpm/7 min) konnten die Überstände abgenommen und bei -20°C gelagert werden. Für die Bestimmung der cAMP-Konzentrationen wurden die Überstände auf eine (*goat anti-rabbit*) IgG-Antikörper gecoatete 96-well Platte pipettiert. Anschließend wurde für 2 h ein Konjugat aus cAMP und Alkalischer Phosphatase zugegeben, gefolgt von einer einstündigen Inkubation mit einem polyklonalen Antikörper (*rabbit*) gegen cAMP. Dieser Antikörper sollte kompetitiv an das cAMP in der Probe oder an das Konjugat aus cAMP und Alkalischer Phosphatase binden. Anschließend wurde 3x gewaschen und p-Nitrophenylphosphat zugegeben, welches als Substrat für die Alkalische Phosphatase fungiert und eine Gelbfärbung induziert. Die optische Dichte (OD) konnte bei 405nm gemessen werden. Die Berechnung erfolgte durch eine halblogarithmische Darstellung der cAMP-Konzentration gegen die OD.

2.2.29 Statistische Auswertungen

Die Daten sind als Mittelwerte + SD (Standardabweichung) dargestellt. Ausgenommen sind Rohdaten einzelner Experimente, die repräsentativen Charakter besitzen. Die statistischen Analysen wurden mit dem Student's t Test oder dem Mann-Whitney Test durchgeführt. Unterschiede von * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ bzw. *** $p < 0.001$ wurden als signifikant bezeichnet. Alle statistischen Analysen wurden mit der GraphPad Prism 5 Software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Suppression humaner T-Zellen durch Milchsäure

Ein charakteristisches Merkmal vieler Tumore ist ein deutlich gesteigerter Glukosemetabolismus. Dieser geht mit einer hohen Laktatproduktion und -konzentration in der Tumorumgebung einher. In diesem Zusammenhang konnten Walenta *et al.* intratumorale Laktatkonzentrationen bis zu 40mM messen (189, 190, 198). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass humane zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (CTLs, *cytotoxic T cells*) durch eine Behandlung mit Milchsäure in ihrer Proliferation und Zytokinproduktion stark inhibiert werden (192). Zudem zeigte sich die Zytotoxizität der Zellen gegenüber antigen-präsentierenden Zielzellen stark beeinträchtigt, was mit einer verminderten Expression der Effektormoleküle Granzyme-B und Perforin korrelierte. Durch massenspektrometrische Analysen konnte nachgewiesen werden, dass Milchsäure (das protonierte Laktat), aber nicht das Laktat(salz) in die Zellen transportiert wird.

Es ist bekannt, dass CTLs zur Ausübung ihrer Effektorfunktionen eine erhöhte Glykolyserate und eine daraus resultierende hohe Laktatproduktion aufweisen (199, 200). Mittels Blockade des Exports von Laktat aus dem Zytoplasma der CTLs konnte unsere Arbeitsgruppe ebenso wie durch eine Behandlung mit Milchsäure die Zytokinsekretion der CTLs inhibieren. Wir postulieren daher, dass die Aktivität der T-Zellen stark von einer Elimination des intrazellulären Laktats abhängig ist, und dass hohe extrazelluläre Milchsäure-Konzentrationen den Export von Laktat nach aussen inhibieren und dadurch eine metabolische Blockade induzieren.

Im Rahmen meiner Promotionsarbeit sollte nun untersucht werden, inwieweit die Glykolyse humaner T-Zellen durch Milchsäure beeinflusst wird. Für die Bestimmung des Glukose-Flux in die T-Zellen wurden die Zellen in einem glukosefreien Medium mit [1,2-¹³C₂]Glukose mit bzw. ohne 20mM Milchsäure inkubiert. Über den Abbau der Glukose im Rahmen der Glykolyse entsteht [2,3-¹³C₂]Laktat, welches extrazellulär und intrazellulär über massenspektrometrische Analysen am Lehrstuhl für Funktionelle Genomik (Klinikum der Universität Regensburg) quantifiziert wurde (**Abb. 3**).

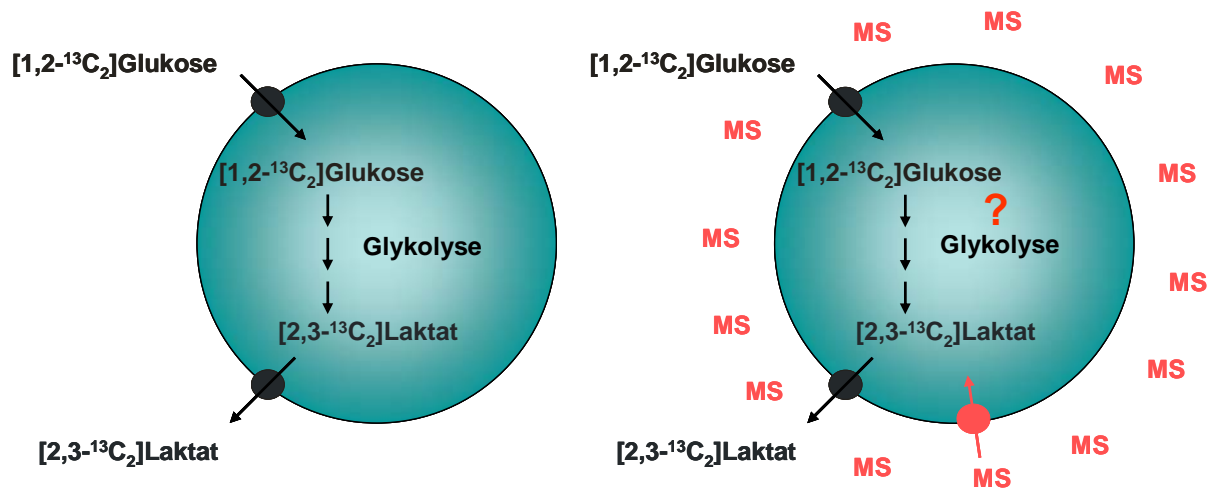


Abb. 3: Flux-Analysen zur Bestimmung des Glukosestoffwechsels in humanen T-Zellen. Um die Glykolyse von humanen T-Zellen unter dem Einfluss von Milchsäure (MS) untersuchen zu können, wurden diese in glukosefreiem Medium mit [1,2-¹³C₂]Glukose mit bzw. ohne 20mM Milchsäure (MS) inkubiert. Über massenspektrometrische Analysen konnte die Sekretion des aus der Glykolyse stammenden [2,3-¹³C₂]Laktats intrazellulär und extrazellulär quantifiziert werden.

3.1.1 Einfluss von Milchsäure auf den Energiehaushalt der CTLs

In unserer Arbeitsgruppe werden humane tumorantigen-spezifische CTLs, die spezifisch für das Antigen MART-1 sind, durch repetitive Stimulation von magnetisch isolierten CD8⁺ T-Zellen mit HLA-A2-bindenden MART-1-Peptid beladenen, dendritischen Zellen (DCs) generiert. Um den Einfluss von Milchsäure auf die Glykolyse in den hoch aktivierten spezifischen CTLs zu analysieren, wurden diese nach dritter Stimulation (d18) in den Assay eingesetzt. Die Zellen wurden für 4 Stunden mit 20mM Milchsäure oder 20mM Laktat(salz) in glukosefreiem Medium mit [1,2-¹³C₂]Glukose inkubiert. Mit Hilfe dieser Analyse kann untersucht werden, ob die [1,2-¹³C₂]Glukose über die Glykolyse zu [2,3-¹³C₂]Laktat oder über den Pentosephosphatweg zu [1,3-¹³C₂]Laktat abgebaut wird. Um auszuschließen, dass die inhibitorischen Effekte von Milchsäure auf die T-Zellen nicht über die Säure vermittelt werden, wurde als Kontrolle eine auf den der 20mM Milchsäure entsprechenden pH-Wert 6.6 eingestellte Salzsäure (HCl) eingesetzt. Anschließend wurden die T-Zellen und deren Überstände geerntet, die Metaboliten mit Methanol extrahiert und beides über Massenspektrometrie analysiert.

Wie in **Abb. 4A** gezeigt, kam es nach Inkubation der CTLs mit 20mM Milchsäure zu einem Anstieg der Konzentration des intrazellulären [2,3-¹³C₂]Laktats um etwa das Doppelte, sowohl mit als auch ohne Stimulation der T-Zellen mit PMA/Ionomycin. Im Gegensatz dazu

konnte bei den mit 20mM Milchsäure behandelten T-Zellen ein signifikanter Abfall des extrazellulären $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktats um etwa 90% beobachtet werden ($p < 0.01$). Nach Stimulation der T-Zellen mit PMA/Ionomycin ließ sich die Produktion von $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat um 50% steigern, welche durch eine Behandlung mit 20mM Milchsäure signifikant inhibiert werden konnte ($p < 0.05$). Die Menge des durch den Pentosephosphatweg produzierten, sekretierten $[1,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktats nahm bei den mit 20mM Milchsäure behandelten Zellen etwa um das 8-fache zu, wobei intrazellulär kein $[1,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

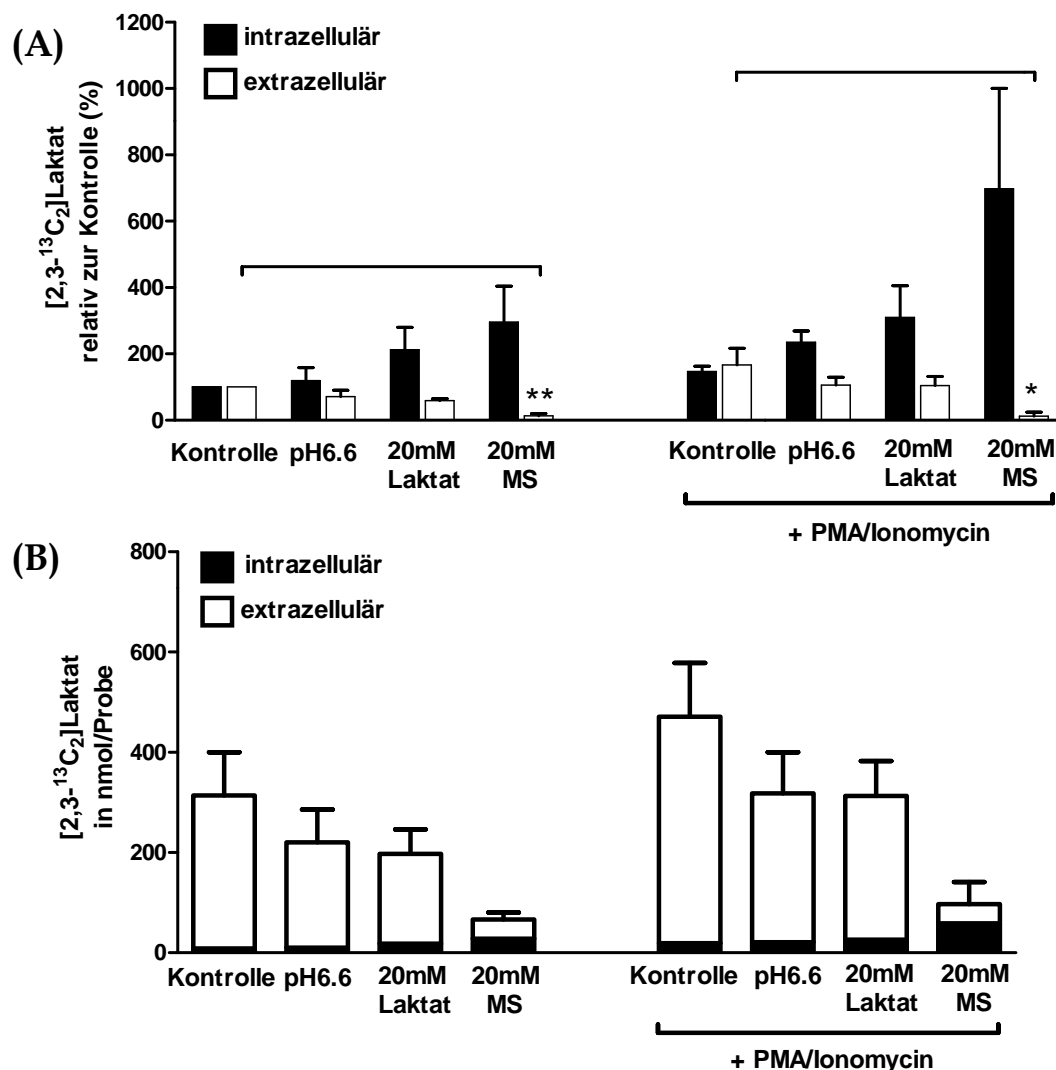


Abb. 4: Inhibition des glykolytischen Flux in CTLs durch Milchsäure. CTLs wurden für 4 Stunden \pm PMA/Ionomycin in glukosefreiem Medium mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glukose mit bzw. ohne 20mM Milchsäure (MS), HCl pH6.6 oder 20mM Laktat inkubiert. Über massenspektrometrische Analysen konnte das in der Zelle akkumulierte (schwarze Balken) und das extrazelluläre $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat (weisse Balken) detektiert werden. In (A) sind die Kontrollen ohne PMA/Ionomycin auf 100% gesetzt. Die statistischen Analysen wurden mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt. (B) Gezeigt sind hier die tatsächlichen Konzentrationen des intrazellulären und extrazellulären $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktats als Resultat der Glykolyse aufgetragen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von 4 unabhängigen Experimenten.

Aus **Abb. 4B** ist klar ersichtlich, dass in den mit Milchsäure behandelten CTLs die Summe des intra - und extrazellulären $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktats stark reduziert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die gesamte Glykolyse der CTLs inhibiert wurde. Dafür spricht auch, dass die Aufnahme der $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glukose in die T-Zellen mit und ohne 20mM Milchsäure keine Unterschiede aufwies (Daten nicht gezeigt). Eine Behandlung der T-Zellen mit 20mM Laktat oder mit dem der 20mM Milchsäure angepassten pH6.6 hatte ebenso eine schwache Verminderung der Glykolyse zur Folge. Durch eine zusätzliche Aktivierung der CTLs mit PMA/Ionomycin ließ sich die Glykolyserate leicht steigern, wohingegen die inhibitorischen Effekte gleich blieben.

Anschließend stellten wir uns die Frage, ob die CTLs die durch Milchsäure reduzierte Glykolyse durch vermehrte Atmung kompensieren können, um somit ein Energiedefizit ausgleichen zu können. Dazu wurden magnetisch isolierte CD8^+ T-Zellen und aktivierte CTLs mit oder ohne 10mM Milchsäure in speziell entwickelten OxoDishes[®] für 24 Stunden inkubiert und der Sauerstoffverbrauch gemessen. Wie in **Abb. 5** dargestellt, wiesen die mit Milchsäure behandelten CTLs einen niedrigeren Sauerstoffkonsum als die nicht behandelten CTLs auf. Ebenso verbrauchten nicht aktivierte CD8^+ T-Zellen weniger Sauerstoff als die hoch aktivierten CTLs. Einhergehend mit diesen Ergebnissen konnte in den mit Milchsäure behandelten CTLs intrazellulär weniger Adenosintriphosphat (ATP) detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der gesamte Energiehaushalt der CTLs durch eine Inkubation mit Milchsäure stark beeinträchtigt wird.

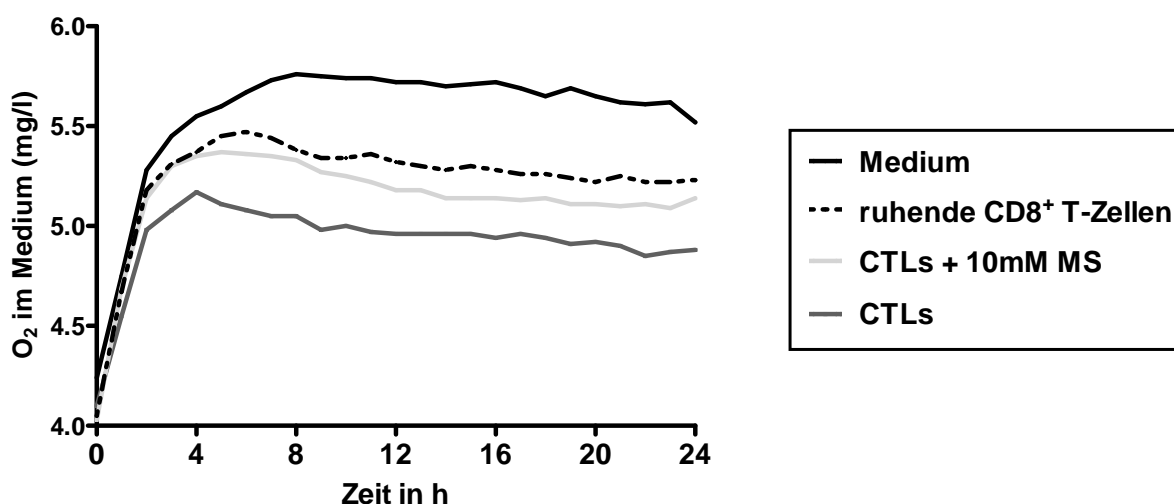


Abb. 5: Milchsäure inhibiert den Sauerstoffverbrauch in CTLs. Der O_2 -Verbrauch von frisch isolierten CD8^+ T-Zellen und CTLs mit bzw. ohne Milchsäure wurde in OxoDishes[®] über spezielle O_2 -sensible Sensoren analysiert. Die Zellen wurden dafür in RPMI-Medium mit oder ohne 10mM Milchsäure für 24 Stunden inkubiert. Ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt.

3.1.2 Sensitivität ruhender und aktivierter T-Zellen gegenüber Milchsäure

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine 24-stündige Behandlung von MART-1-spezifischen CTLs mit 20mM Milchsäure in über 60% der Zellen Apoptose induzieren kann (192). In diesem Zusammenhang sollte nun untersucht werden, ob ruhende T-Zellen gegenüber Milchsäure ebenso sensitiv wie aktivierte T-Zellen sind. Hierzu wurden aus MNCs CD8⁺ T-Zellen magnetisch isoliert und mit oder ohne anti-CD3/CD28 Beads im Verhältnis 1:1 polyklonal stimuliert und mit 20mM Milchsäure, 20mM Laktat oder HCl pH6.6 behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit Annexin-V und 7-AAD gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Wie in **Abb. 6** gezeigt, induziert Milchsäure sowohl in ruhenden als auch in aktivierten CD8⁺ T-Zellen Apoptose (Annexin-V⁺/7-AAD⁺ CD8⁺ T-Zellen). Allerdings waren bei den ruhenden CD8⁺ T-Zellen nur 24% tote T-Zellen nachweisbar, während in den aktivierten CD8⁺ T-Zellen knapp 70% tote Zellen detektiert werden konnten. Eine Inkubation ruhender und aktivierter CD8⁺ T-Zellen mit HCl pH6.6 oder 20mM Laktat hatte keinen Einfluss auf die Apoptoserate der T-Zellen.

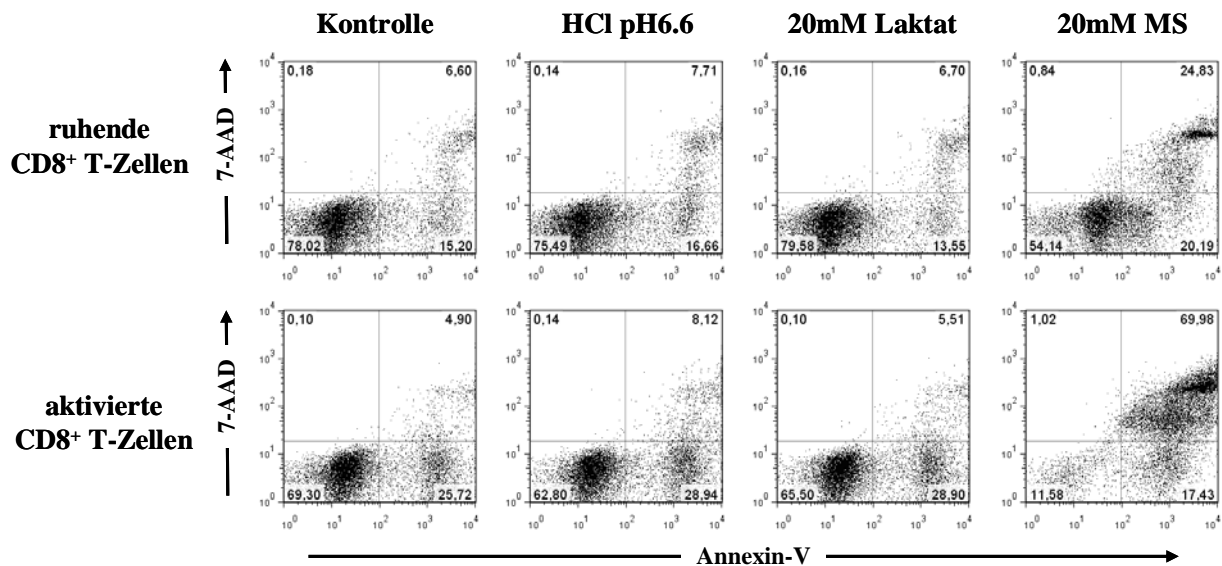


Abb. 6: Apoptoseinduktion in ruhenden und aktivierten CD8⁺ T-Zellen durch Milchsäure. Aus MNCs wurden CD8⁺ T-Zellen isoliert. Die Zellen wurden im ruhenden Zustand oder mit anti-CD3/CD28 Beads stimuliert und mit oder ohne 20mM Milchsäure (MS), 20mM Laktat oder HCl pH6.6 inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit Annexin-V und 7-AAD gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass ruhende $CD8^+$ T-Zellen weniger sensitiv gegenüber einer Behandlung mit Milchsäure als aktivierte $CD8^+$ T-Zellen sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass aktivierte T-Zellen ihre Energie hauptsächlich über Glykolyse, anstatt über oxidative Phosphorylierung gewinnen (199, 200). In diesem Zusammenhang sollte in weiteren Versuchen dargestellt werden, wie sich die Glykolyserate der T-Zellen im ruhendem und aktiviertem Zustand unterscheidet und ob sie durch eine Behandlung mit Milchsäure beeinflusst wird.

Hierzu wurde der $[1,2-^{13}C_2]$ Glukose-Flux in ruhenden im Vergleich zu 11 Tage mit anti- $CD3/CD28$ Beads (1:1) polyklonal stimulierten $CD8^+$ T-Zellen analysiert. An d11 zeigten die aktivierten $CD8^+$ T-Zellen eine um das 15-fach gesteigerte Glykolyserate im Vergleich zu den ruhenden $CD8^+$ T-Zellen an d0, was wir aus der erhöhten Sekretion von $[2,3-^{13}C_2]$ Laktat folgern konnten (**Abb. 7**). An d11 induzierte eine Behandlung der T-Zellen mit Milchsäure einen konzentrationsabhängigen Abfall der Glykolyserate. Im Gegensatz dazu wiesen die ruhenden $CD8^+$ T-Zellen (d0) nach Inkubation mit Milchsäure einen diskreten konzentrationsabhängigen Anstieg der $[2,3-^{13}C_2]$ Laktat-Konzentration auf.

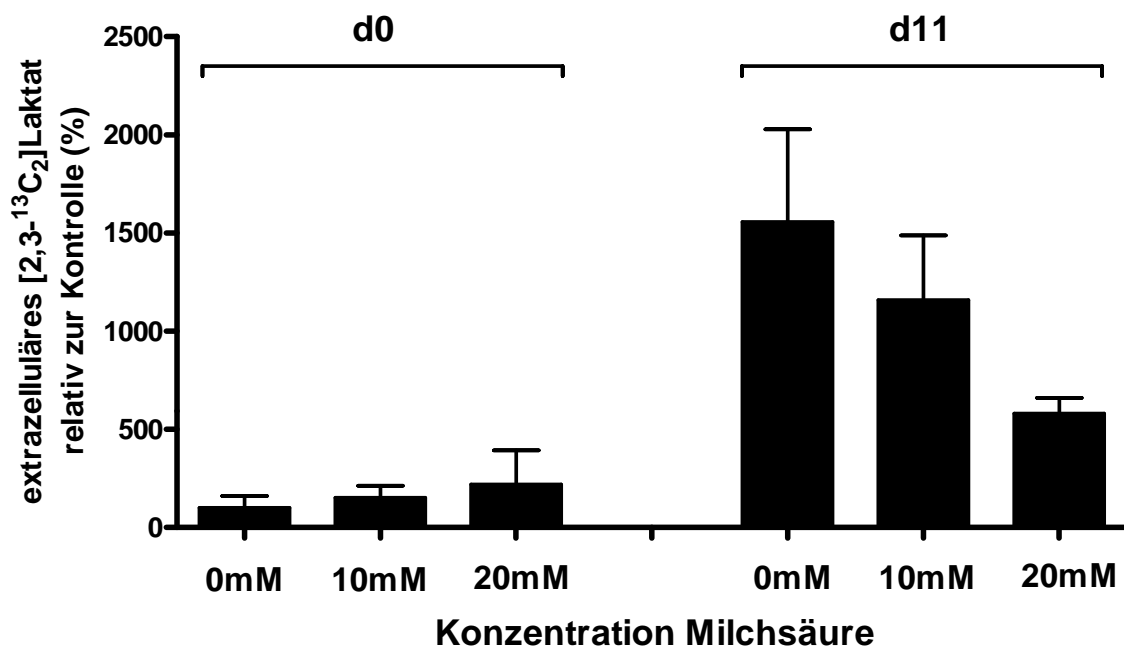


Abb. 7: Einfluss von Milchsäure auf die Glykolyserate in ruhenden und aktivierten $CD8^+$ T-Zellen. Für diesen Versuch wurden aus MNCs frisch isolierte (d0) oder über 11 Tage polyklonal stimulierte (d11) $CD8^+$ T-Zellen verwendet. Die Zellen wurden an d0 und d11 in glukosefreiem Medium mit $[1,2-^{13}C_2]$ Glukose mit bzw. ohne Milchsäure (10mM und 20mM MS) inkubiert. Über massenspektrometrische Analysen konnte die Sekretion des $[2,3-^{13}C_2]$ Laktats detektiert werden. Die Kontrollen von d0 wurden auf 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von 3 unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Einfluss von Milchsäure auf verschiedene T-Zellpopulationen

In der Arbeitsgruppe von Dr. Petra Hoffmann (Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie, Klinikum der Universität Regensburg) konnte in Vorarbeiten demonstriert werden, dass regulatorische $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen im Gegensatz zu konventionellen $CD4^+$ T-Zellen nicht durch eine Behandlung mit Milchsäure supprimiert werden (nicht publizierte Daten). Daraus ergab sich für uns die Frage, wie hoch die Glykolyserate in $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen ist und welchen Einfluss Milchsäure auf $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen im Vergleich zu $CD8^+$ und konventionellen $CD4^+$ T-Zellen hat.

Dazu wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Hoffmann die Aufnahme der $[1,2-^{13}C_2]$ Glukose in konventionelle $CD8^+$, $CD4^+$ und regulatorische $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen analysiert.

Die in **Abb. 8** zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass Milchsäure in den regulatorischen $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen keine Verminderung der Glykolyse induziert, während konventionelle $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen eine Reduktion des extrazellulären $[2,3-^{13}C_2]$ Laktats aufweisen (**Abb. 8**). Ebenso wird ersichtlich, dass konventionelle $CD4^+$ T-Zellen mehr als doppelt so viel Glykolyse betreiben wie regulatorische $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen.

Wie bereits in **Abb. 7** gezeigt zeichnen sich die stimulierten $CD8^+$ T-Zellen durch eine hohe Glykolyserate aus, die bei den mit Milchsäure behandelten Zellen um ca. 60% gesenkt wurde.

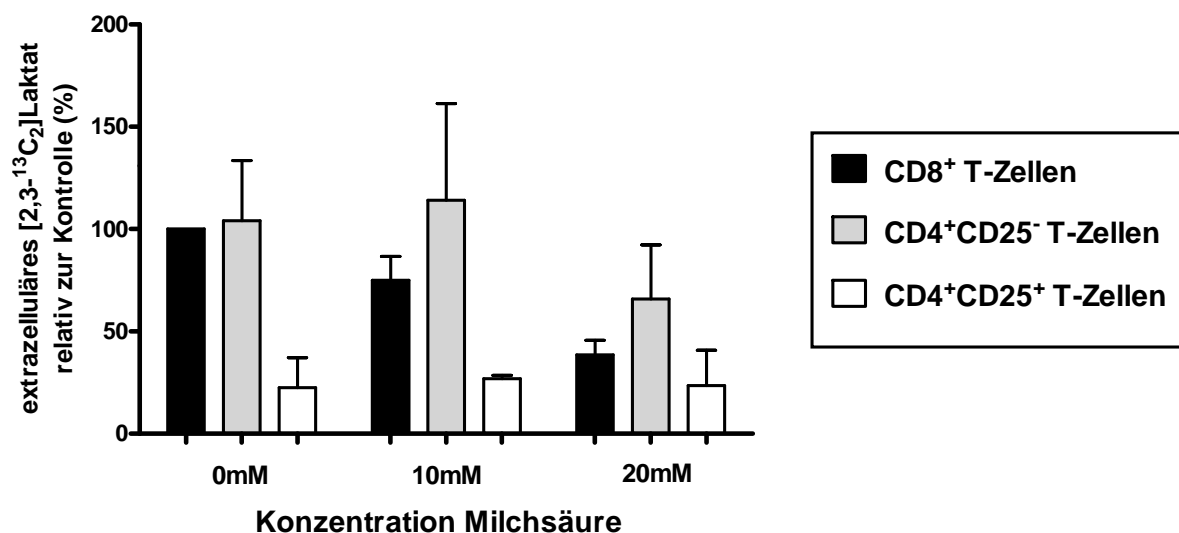


Abb. 8: Einfluss von Milchsäure auf die Glykolyse in aktivierten $CD8^+$, $CD4^+ CD25^-$ und regulatorischen $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen. Für diesen Versuch wurden aus MNCs $CD8^+$, $CD4^+$ und regulatorische $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen isoliert und über 11 Tage mit anti-CD3/CD28 Beads polyklonal stimuliert. Am d11 wurden die Zellen in glukosefreiem Medium mit $[1,2-^{13}C_2]$ Glukose mit bzw. ohne Milchsäure (10mM und 20mM MS) inkubiert. Nach 4 Stunden wurden die Zellen geerntet und das aus dem $[1,2-^{13}C_2]$ Glukose-Metabolismus resultierende $[2,3-^{13}C_2]$ Laktat über massenspektrometrische Analysen detektiert. Die $CD8^+$ Kontrollzellen wurden auf 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von 2 unabhängigen Experimenten.

Es lässt sich zusammenfassen, dass zwischen den verschiedenen T-Zellpopulationen drastische Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Milchsäure existieren, wobei sich die regulatorischen CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen am wenigsten sensitiv gegenüber einer Behandlung mit Milchsäure erweisen.

3.2 Einfluss von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) auf humane T-Zellen

3.2.1 Effekte von MTA auf humane zytotoxische CD8⁺ T-Zellen

3.2.1.1 Hemmung der Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen durch MTA

Zunächst haben wir untersucht, ob MTA einen Einfluss auf die Aktivierung von CD8⁺ CTLs hat. Dazu wurden MART-1-spezifische CTLs mit MART-1-beladenen DCs in An - bzw. Abwesenheit von 100, 250 und 500µM MTA stimuliert und nach 5, 24 bzw. 48 Stunden die Expression verschiedener Aktivierungs - und Reifungsmarker der CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

5 Stunden nach Stimulation war eine maximale Expression des Aktivierungsmarkers CD69 nachweisbar, wohingegen CD25, CD95 und CD137 ihre Maxima erst nach 24 Stunden erreichten. In **Abb. 9** ist dargestellt, dass die mit 500µM MTA behandelten Zellen eine verminderte Expression der Aktivierungsmarker CD137 und CD25 aufwiesen. Ebenso war eine geringere Expression des Aktivierungsmarker CD69, nicht aber von CD95 zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde eine Herunterregulation des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 durch MTA nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten keine Unterschiede in der Expression von TCRαβ (**Abb. 9**), CD45RA, CD8 und CD28 detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

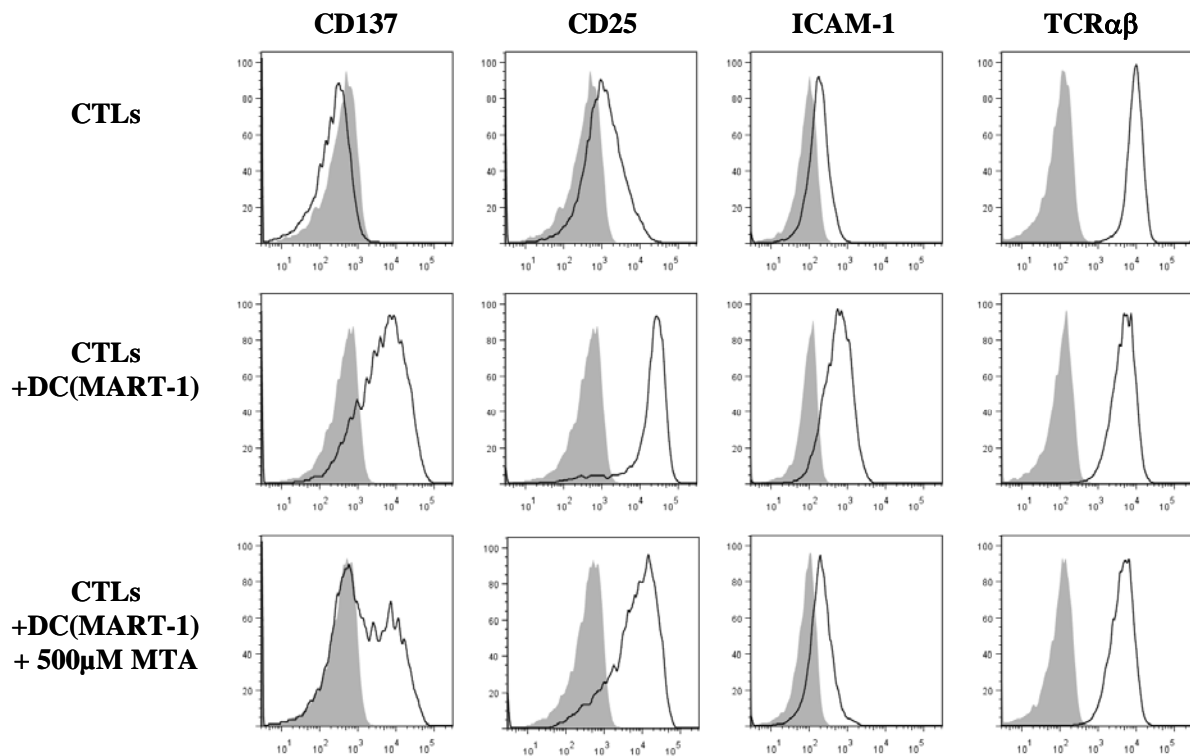


Abb. 9: Inhibition der Aktivierung von CTLs durch MTA. MART-1-spezifische CTLs wurden mit MART-1-beladenen autologen DCs mit bzw. ohne 500μM MTA kokultiviert. Nach 24h wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD137, CD25, ICAM-1 und TCRαβ gefärbt. Die jeweiligen Isotypen (graue Histogramme) dienen als Kontrollen. In den Histogrammen sind die vitalen CD8⁺ T-Zellen gezeigt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

3.2.1.2 MTA-vermittelte Suppression der antigen-spezifischen Zytokinsekretion in CTLs

Um den Einfluss von MTA auf die Funktion von antigen-spezifischen T-Zellen zu untersuchen, wurden MART-1-spezifische CTLs mit MART-1-beladenen DCs in An- oder Abwesenheit 100, 250 oder 500μM MTA inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

In **Abb. 10** ist zu erkennen, dass MTA in antigen-spezifischen T-Zellen eine konzentrationsabhängige Suppression der IFN-γ und IL-2 Sekretion induziert. Die Frequenz der IL-2 produzierenden T-Zellen konnte durch 500μM MTA um etwa 80%, die der IFN-γ sezernierenden T-Zellen um etwa 60% gesenkt werden. Ebenso konnte mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gezeigt werden, dass der suppressive Effekt von MTA auf die Zytokine bereits auf transkriptioneller Ebene erfolgt (Daten nicht gezeigt).

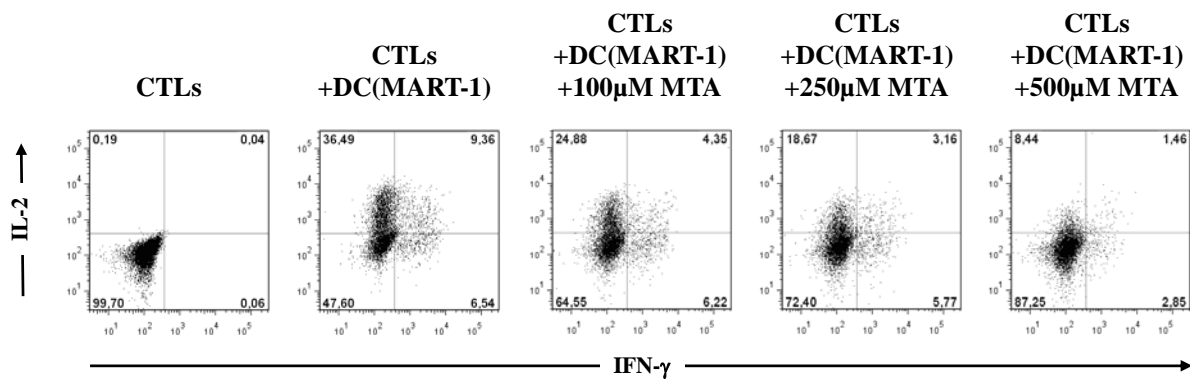


Abb. 10: Suppression der IFN- γ und IL-2 Sekretion in CTLs. MART-1-spezifische CTLs wurden mit MART-1-beladenen autologen DCs kokultiviert. Nach 5h wurden die Zellen geerntet, mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt und anschließend mit einer Fixierungs/Permeabilisierungs-Lösung fixiert. Daraufhin wurden die Zellen mit Antikörpern gegen IFN- γ und IL-2 intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. In den Dotplots wurde auf vitale CD8⁺ T-Zellen gated. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

3.2.1.3 MTA-vermittelte Suppression der Zytotoxizität von antigen-spezifischen CD8+ CTLs

Anschließend wurde untersucht, ob MTA auch einen Einfluss auf die zytotoxische Kapazität von MART-1-spezifischen CTLs hat. In **Abb. 11** ist gezeigt, dass die Zytotoxizität der mit 500 μ M MTA behandelten CTLs von 86% auf 36% herabgesetzt ist. Bei einer Konzentration von 250 μ M MTA kam es zu keiner signifikanten Suppression der Zytotoxizität bei einer Effektor : Zielzelle Ratio von 5 : 1.

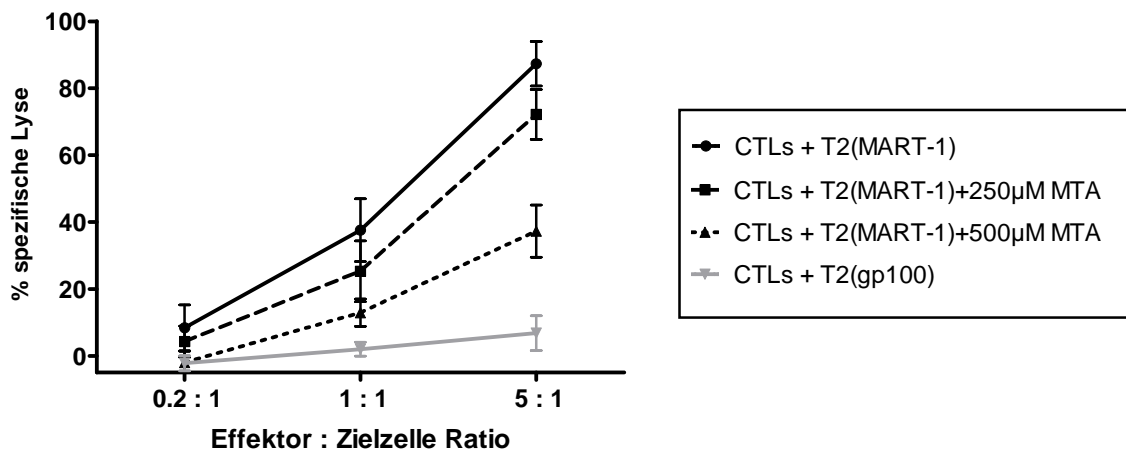


Abb. 11: Antigen-spezifische Zytotoxizität von MART-1 spezifischen CTLs unter dem Einfluss von MTA. T2 Zellen wurden exogen mit MART-1 bzw. gp100 beladen und mit ^{51}Cr markiert. Die beladenen Zellen wurden zusammen mit den MART-1-spezifischen CTLs in verschiedenen Effektor : Zielzelle - Verhältnissen in einen ^{51}Cr -Zytotoxizitätstest eingesetzt. Nach 4 Stunden wurden die Zielzellen geerntet und die ^{51}Cr -Freisetzung der Zielzellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Experimenten.

Um mögliche Ursachen für die Reduktion der zytotoxischen Eigenschaft der CTLs aufzudecken, wurde die intrazelluläre Konzentration der Effektormoleküle Granzyme-B und Perforin in den T-Zellen nach MTA-Exposition gemessen.

Wie in **Abb. 12** dargestellt, führt MTA zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Expression von Granzyme-B im Sinne einer Verminderung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von 1048 (unbehandelte Zellen) auf 508 (MTA-behandelte T-Zellen). Des Weiteren exprimierten nur noch 30% der CTLs hohe Mengen an Perforin, wenn sie mit 500 μ M MTA vorbehandelt wurden.

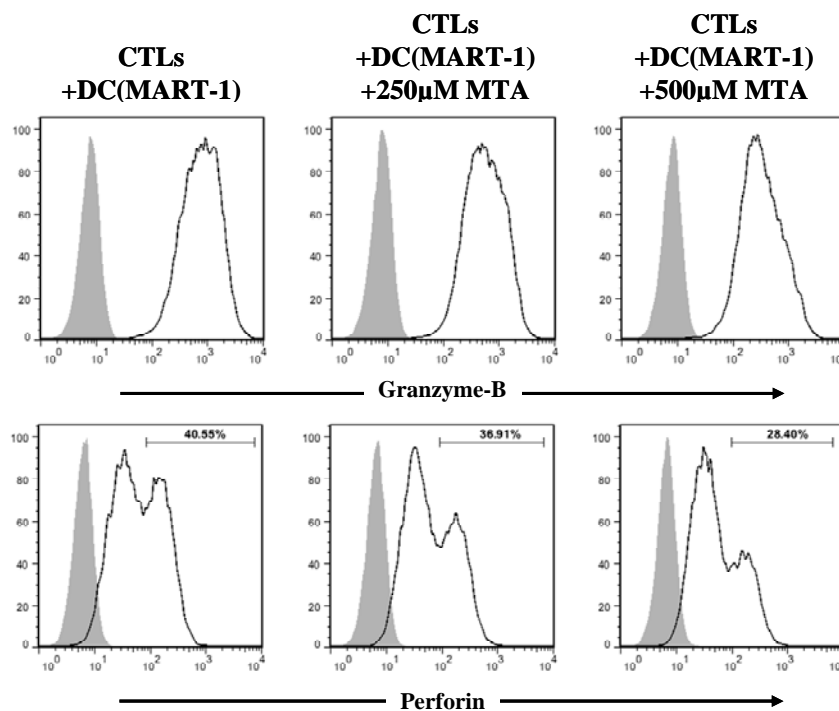


Abb. 12: Einfluss von MTA auf die Expression der Effektormoleküle Granzyme-B und Perforin. MART-1-spezifische T-Zellen wurden für 5h mit MART-1-beladenen autologen DCs kokultiviert. Nach 5h wurden die Zellen geerntet, mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt und anschließend mit einer Fixierungs/Permeabilisierungs-Lösung fixiert. Daraufhin wurden die Zellen mit Antikörpern gegen Granzyme-B und Perforin intrazellulär gefärbt und mit einem Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist jeweils die vitale CD8⁺ T-Zellpopulation. Als Negativkontrolle dienen die Isotypen (graue Histogramme). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel.

Da MTA auf die Expression der Effektormoleküle Granzyme-B und Perforin nur schwache Effekte aufwies, stellte sich die Frage, ob die lytischen Granulae nicht frei gesetzt werden konnten, wie es in manchen tumorinfiltrierenden CTLs beschrieben wurde (52). Dazu wurden MART-1-spezifische CTLs mit MART-1-beladenen DCs kokultiviert und mit 250 bzw. 500 μ M MTA behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CD8 und den Degranulationsmarker CD107a gefärbt. Eine Behandlung mit 500 μ M MTA führte zu einer Herunterregulation der CD107a-Expression in

den CTLs. So wurde eine etwa 50%-ige Reduktion der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von 3686 (unbehandelte Zellen) auf 1681 (MTA-behandelte Zellen) gemessen (**Abb. 13**).

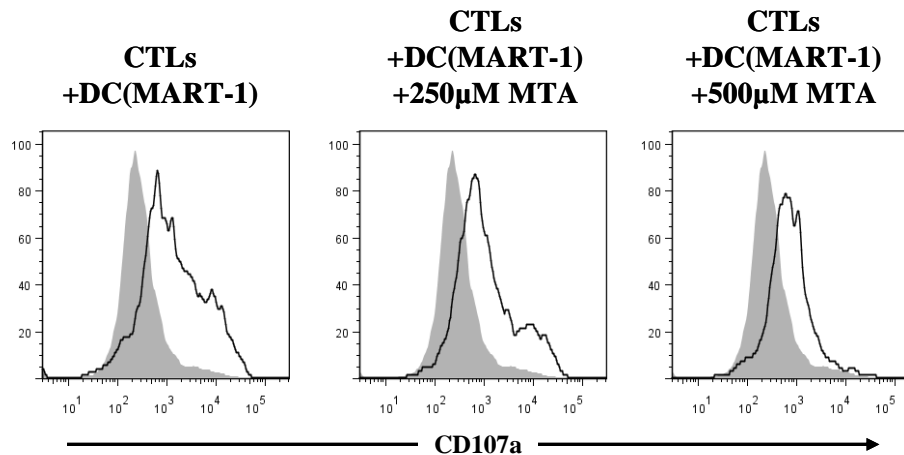


Abb. 13: Reduktion der Degranulation von CTLs. MART-1-spezifische T-Zellen wurden für 5h mit MART-1-beladenen autologen DCs kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD8 und den Degranulationsmarker CD107a gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist jeweils die vitale CD8⁺ T-Zellpopulation. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte CTLs (graue Histogramme). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

3.2.2 Einfluss von MTA auf die Viabilität und Proliferation von CD8⁺ T-Zellen

3.2.2.1 Apoptoseinduktion in CTLs durch MTA

Wir stellten uns anschließend die Frage, ob MTA neben der Suppression verschiedener Effektorfunktionen auch zum Zelltod der CTLs führen kann. Dazu wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen MTA für 5, 24 und 48 Stunden behandelt und anschließend mit Annexin-V und 7-AAD gefärbt. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass nach einer 5-stündigen Inkubation der CTLs mit MTA-Konzentrationen bis zu 500µM keine vermehrte Apoptose nachweisbar war (**Abb. 14**). Nach 48 Stunden zeigte sich bei einer Behandlung mit hohen Dosen MTA (500µM) eine Zunahme der apoptotischen T-Zellen (Annexin-V⁺/7AAD⁺) von 2.6% in den unbehandelten Zellen auf 10%, wobei auch der Anteil der frühen apoptotischen T-Zellen (Annexin-V⁺) doppelt so hoch wie in der Kontrolle war.

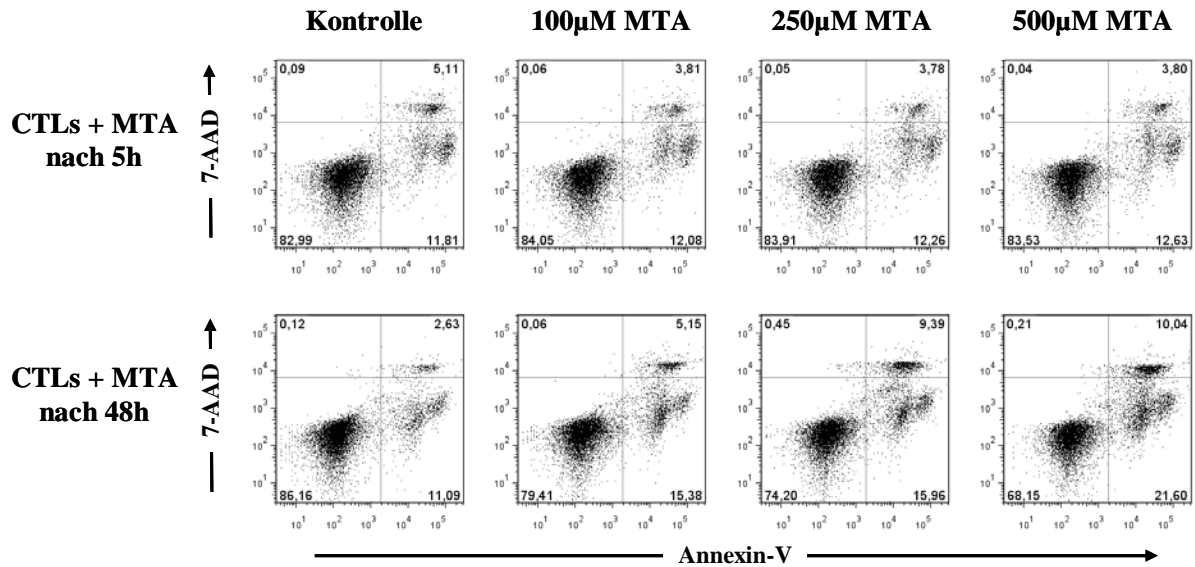


Abb. 14: Apoptoseinduktion durch MTA in CTLs. Die CTLs wurden 5h, 24h und 48h mit und ohne 100, 250 und 500µM MTA behandelt. Nach entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, mit Annexin-V und 7-AAD gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment nach 5h und 48h.

3.2.2.2 Inhibition der Proliferation von CTLs durch MTA

Anschließend wurde untersucht, ob MTA auch die Proliferation der CTLs inhibiert. Wie in **Abb. 15** dargestellt konnte bereits bei einer Exposition der CTLs mit 100µM MTA eine 90%-ige Reduktion der Proliferation nachgewiesen werden.

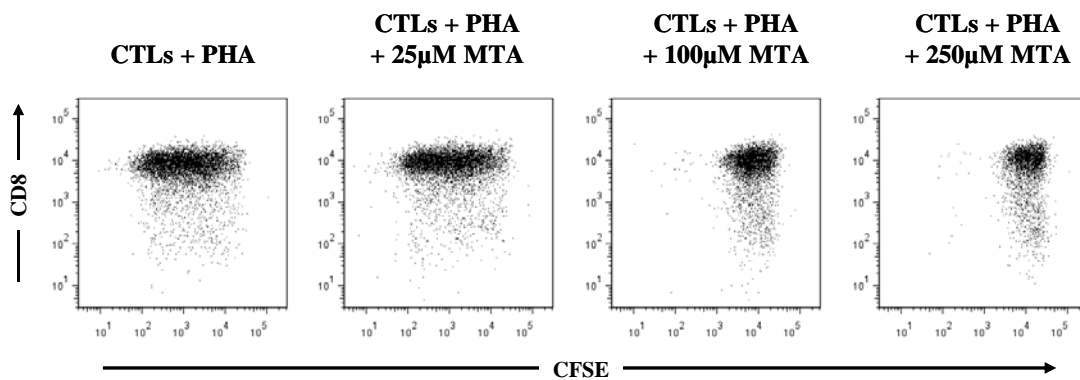


Abb. 15: Inhibition der Proliferation mitogen stimulierter CTLs durch MTA. CFSE gefärbte MART-1-spezifische T-Zellen wurden 24h mit PHA stimuliert. Am Tag 6 wurden die Zellen geerntet und mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt. Die Zellteilung ohne und mit 25, 100 und 500µM MTA konnte am Durchflusszytometer ermittelt werden. Es ist die vitale Lymphozytenpopulation gezeigt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

3.2.2.3 Suppression der Proliferation allogen oder polyklonal stimulierter CD8⁺ T-Zellen

Im Folgenden haben wir untersucht, ob MTA nicht nur CTLs, sondern auch frisch isolierte CD8⁺ T-Zellen in ihrer Aktivierung und Proliferation inhibieren kann.

Wie in **Abb. 16** dargestellt, konnten auch frisch isolierte CD8⁺ T-Zellen deutlich in ihrer Proliferation supprimiert werden. Bereits bei einer geringen Konzentration von 25µM MTA kann ein Teil der T-Zellen nicht mehr proliferieren. Weiterhin fiel auf, dass CD8⁺ T-Zellen bei einer Konzentration von 100µM MTA nicht mehr aktiviert werden und die Proliferation zu 100% inhibiert wird. In **Abb. 16A** wird deutlich, dass unbehandelte, proliferierende T-Zellen den Aktivierungsmarker CD25 auf ihrer Oberfläche exprimieren, wohingegen nach MTA-Exposition die T-Zellen weder aktiviert sind, noch proliferieren. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die mit 100µM MTA behandelten T-Zellen nicht in den Zellzyklus eintreten und in der G0-Phase verbleiben, was sich in der fehlenden Expression des G1-spezifischen Markers Ki-67 zeigte (**Abb. 16B**).

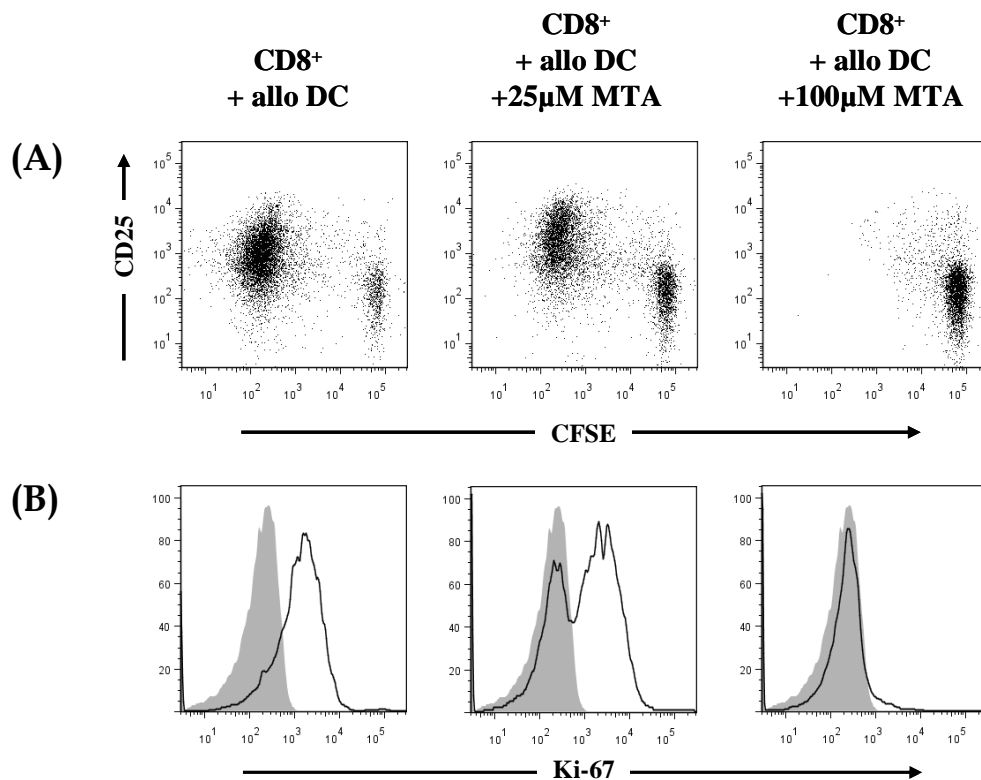


Abb. 16: Proliferation allogen stimulierter CD8⁺ T-Zellen im Einfluss von MTA. CD8⁺ T-Zellen wurden mit allo genen DCs mit bzw. ohne 25µM bzw. 100µM MTA kokultiviert. (A) CFSE gefärbte CD8⁺ T-Zellen wurden mit allo genen mDCs kokultiviert. Am Tag 6 wurden die T-Zellen geerntet und mit einem Antikörper gegen CD8 und CD25 gefärbt. (B) Nach 48h konnten die T-Zellen geerntet und mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt werden. Nach anschließender Fixierung und Permeabilisierung wurde mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki-67 gefärbt. Unstimulierte CD8⁺ T-Zellen dienten als Negativkontrolle (graue Histogramme). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Zusätzlich haben wir untersucht, ob auch polyklonal stimulierte $CD8^+$ T-Zellen in ihrer Proliferation durch MTA supprimiert werden. Dazu wurden aus MNCs $CD8^+$ T-Zellen magnetisch isoliert und in An - bzw. Abwesenheit von steigenden MTA-Konzentrationen mit anti-CD3/CD28 Beads im Verhältnis 2:1 polyklonal stimuliert.

Wie in **Abb. 17** gezeigt, wurden auch polyklonal stimulierte $CD8^+$ T-Zellen konzentrationsabhängig sehr stark in ihrer Proliferation durch MTA gehemmt. Dies spiegelt sich in einer deutlichen Abnahme der Frequenz $Ki-67^+$ $CD8^+$ T-Zellen von 33% auf bis zu 8% wieder.

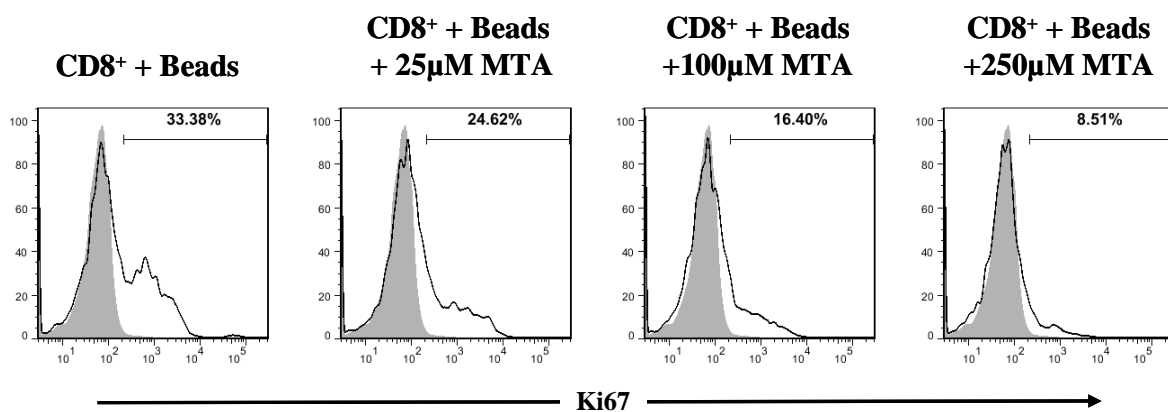


Abb. 17: Inhibition der Proliferation polyklonal stimulierter $CD8^+$ T-Zellen. $CD8^+$ T-Zellen wurden aus MNCs isoliert und mit anti-CD3/CD28 Beads im Verhältnis 2:1 mit bzw. ohne 25, 100 und 250μM MTA polyklonal stimuliert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet, mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt und anschließend mit einer Fixierungs/Permeabilisierungs-Lösung fixiert. Daraufhin konnten die Zellen mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki-67 gefärbt werden. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte $CD8^+$ T-Zellen (graue Histogramme). Gezeigt sind die vitalen $CD8^+$ T-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

3.2.3 Die MTA-induzierte Suppression von T-Zellen ist reversibel

Wir stellten uns anschließend die Frage, ob die MTA-induzierte Inhibition der Proliferation humaner $CD8^+$ T-Zellen reversibel ist. Dazu wurden aus MNCs $CD8^+$ T-Zellen magnetisch isoliert, mit CFSE gefärbt und mit allogenen DCs in An - bzw. Abwesenheit von 100μM MTA für 6 Tage kokultiviert. Ein Teil der mit 100μM MTA behandelten T-Zellen wurde am d6 gewaschen und für weitere 5 Tage mit allogenen mDCs in Abwesenheit von MTA stimuliert.

Am d6 war in den mit MTA exponierten T-Zellkulturen eine komplette Inhibition der Proliferation von CD8⁺ T-Zellen zu beobachten. Wurde MTA am d6 aus der Kultur eliminiert, konnten die supprimierten T-Zellen aktiviert werden und zeigten am d11 eine deutliche Proliferation (**Abb. 18**).

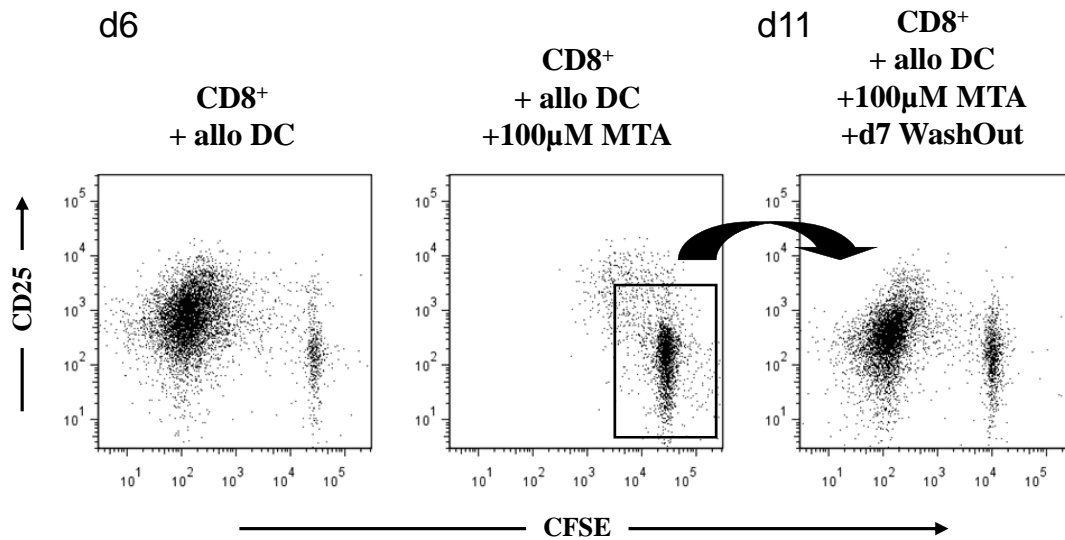


Abb. 18: Reversibilität der MTA-vermittelten Proliferationsinhibition. CFSE gefärbte CD8⁺ T-Zellen wurden mit allo genen DCs kokultiviert. Am Tag 6 wurden die Zellen geerntet und mit einem Antikörper gegen CD8 und CD25 gefärbt. Ein Teil der mit 100µM MTA behandelten Zellen wurde bis d11 erneut mit allo genen DCs kokultiviert. Gezeigt sind vitale CD8⁺ T-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

3.2.4 Das *in vitro* Priming antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen wird durch MTA inhibiert

Wir stellten uns anschließend die Frage, ob MTA auch einen Einfluss auf die *in vitro* Induktion einer antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort hat. Dazu wurden aus MNCs CD8⁺ T-Zellen magnetisch isoliert und mit MART-1-beladenen DCs stimuliert. Die CD8⁺ T-Zellen wurden anschließend für 18 Tage in An- bzw. Abwesenheit von steigenden Konzentrationen MTA kultiviert, wobei eine Restimulation mit MART-1-beladenen DCs an d7 und d14 erfolgte.

In **Abb. 19** wird deutlich, dass MTA konzentrationsabhängig die Expansion der MART-1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen inhibiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bereits 25 bzw. 50µM MTA ausreichen, um die Frequenz MART-1-spezifischer CD8⁺ T-Zellen von 55% (unbehandelt) auf 20% (25µM MTA) bzw. 0.15% (50µM MTA) zu reduzieren (**Abb. 20**,

obere Reihe). Darüber hinaus fiel auf, dass die supprimierten $CD8^+$ T-Zellen nach einer 3-wöchigen Kultur einen naiven Phänotyp ($CD45RA^+ CD62L^+$ und $CD28^+ CD27^+$) aufweisen.

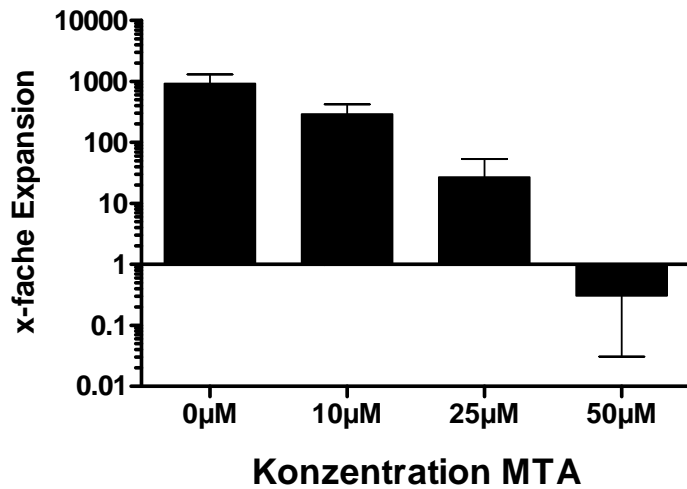


Abb. 19: MTA inhibiert die Expansion von $CD8^+$ T-Zellen. Am d0 wurden aus MNCs $CD8^+$ T-Zellen isoliert und mit autologen MART-1-beladenen mDCs mit und ohne 10, 25 und $50\mu\text{M}$ MTA kokultiviert und an d7 und d14 restimuliert. An d0, d7, d14 und d18 wurden die Zellen gezählt und die Anzahl der MART-1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen ermittelt. Der Graph zeigt die Mittelwerte + SD von 3 unabhängigen Experimenten nach 18 Tagen.

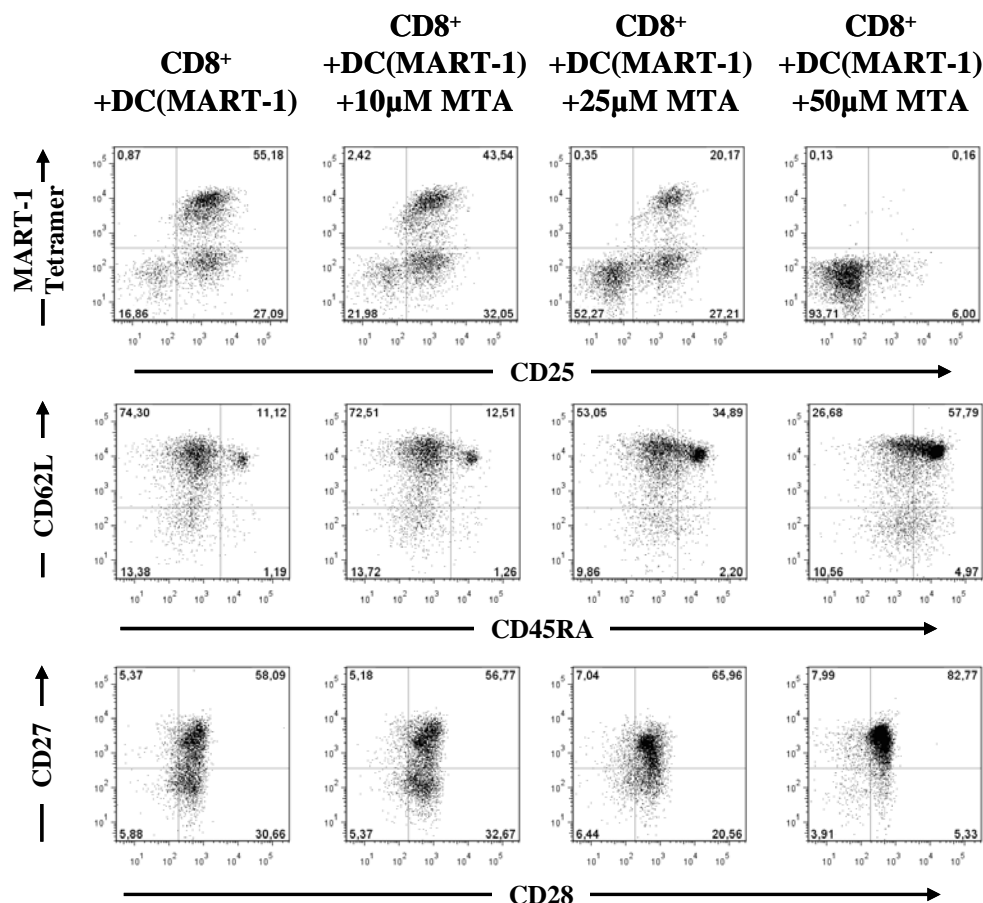


Abb. 20: Phänotypische Analyse der MART-1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen nach antigen-spezifischer Stimulation in Anwesenheit von MTA. Am d0 wurden aus MNCs $CD8^+$ T-Zellen isoliert und mit autologen MART-1 beladenen DCs mit und ohne 10, 25 und $50\mu\text{M}$ MTA kokultiviert und an d7 und d14 restimuliert. An d11 wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern gegen CD8, CD45RA, CD62L, CD27, CD25, CD28 und dem MART-1-spezifischen MHC-Tetramer gefärbt. Im Dotplot sind die $CD8^+$ T-Zellen gezeigt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

3.2.5 Effekte von MTA auf dendritische Zellen

Um ausschließen zu können, dass die beobachteten Effekte von MTA auf T-Zellen indirekt über eine Modulation von DCs induziert werden, wurden DCs mit und ohne 100 μ M MTA inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Wie in **Abb. 21** gezeigt, führt die Exposition von DCs mit MTA zu keiner Reduktion der Expression von HLA-A2 oder der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86. Außerdem konnte keine gesteigerte Expression der inhibitorischen Oberflächenmoleküle PD-L1 und B7-H3 gezeigt werden. Zusätzlich konnte keine veränderte Expression von CD1a, Fas-L und B7-H4 detektiert werden.

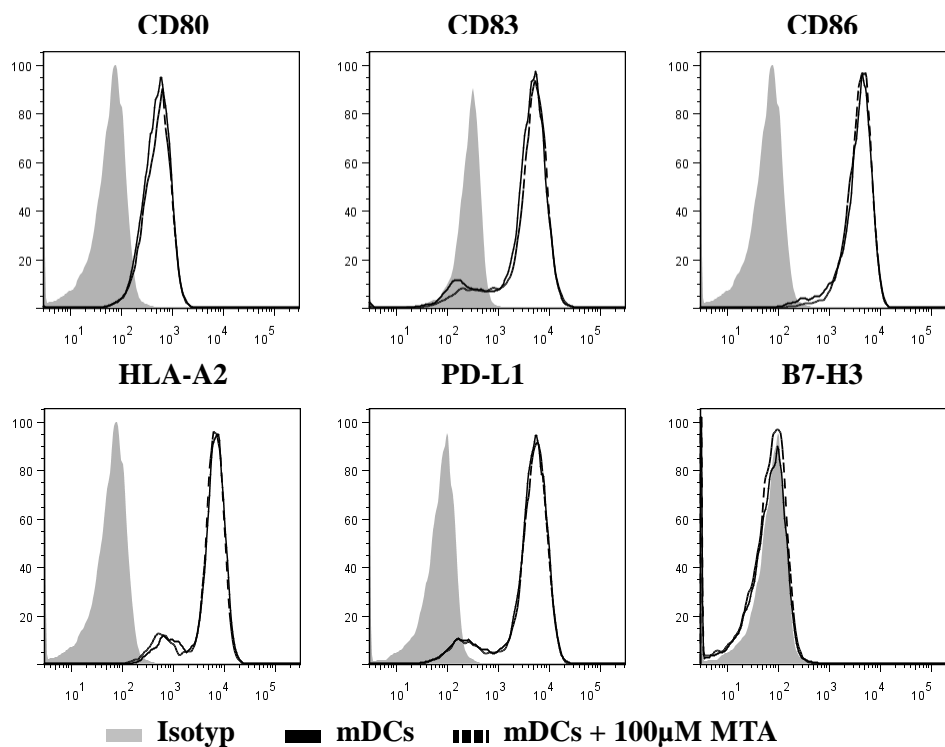


Abb. 21: Phänotyp von reifen dendritischen Zellen (mDCs) unter dem Einfluss von 100 μ M MTA. mDCs wurden mit oder ohne 100 μ M MTA behandelt. Nach 24h wurden die Zellen geerntet und mit Antikörper gegen CD80, CD83, CD86, HLA-A2, PD-L1 und B7-H3 gefärbt. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Auch unsere Kooperationspartner aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Marina Kreutz (Hämatologie und Internistische Onkologie, Klinikum der Universität Regensburg) beschäftigen sich intensiv mit der Wirkung von MTA auf humane DCs. Bei ihren Untersuchungen stellte sich heraus, dass es bis zu einer MTA-Konzentration von 500 μ M zu keiner Veränderung der Sekretion von IL-6, TNF oder IL-10 in DCs kommt.

3.2.6 Mechanismus der MTA-vermittelten Immunsuppression von humanen T-Zellen

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, über welche Mechanismen MTA die inhibitorischen Einflüsse auf verschiedene Zellpopulationen ausübt (117). Bereits in den 80er Jahren wurde in Tiermodellen für die Wirkung von MTA eine Hemmung der Phosphodiesterase und eine daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) - Konzentration in den T-Zellen verantwortlich gemacht (131, Riscoe, 1984 #201). Ausgehend von diesen Beobachtungen konnte in Bindungsstudien gezeigt werden, dass MTA an die Adenosinrezeptoren A1 und A2 bindet. Dabei fungiert MTA als Agonist beider Rezeptoren, was letztendlich eine Aktivierung der an die Rezeptoren gekoppelten Adenylatcyclase auslöst (132). Aus der Literatur ist bekannt, dass eine hohe intrazelluläre Konzentration von cAMP immunsuppressive Effekte in T-Zellen hervorrufen kann (201).

Zunächst konnten wir sowohl auf ruhenden als auch auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen die Adenosinrezeptoren A2A und A2B über immunohistochemische Färbungen nachweisen (Daten nicht gezeigt). Anschließend sollte untersucht werden, ob MTA auch in humanen CD8⁺ T-Zellen einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration induzieren kann.

3.2.6.1 Wirkung von Adenosin, NECA und Forskolin auf die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass Adenosin und N-Ethylcarboxamidadenosin (NECA) Agonisten für den Adenosinrezeptor-A2 sind und über intrazelluläres cAMP T-Zellen supprimieren können. Als direkter Aktivator der Adenylatcyclase führt auch Forskolin zu einer intrazellulären cAMP-Akkumulation (202).

Um die Wirkung von MTA mit der von Adenosin, NECA und Forskolin auf T-Zellen vergleichen zu können, wurden aus MNCs CD8⁺ T-Zellen magnetisch frisch isoliert und mit anti-CD3/CD28 Beads im Verhältnis 2:1 polyklonal stimuliert. Dabei wurden die T-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an MTA, Adenosin, NECA und Forskolin inkubiert.

Abb. 22 zeigt für alle Metaboliten eine konzentrationsabhängige Verminderung der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 auf anti-CD3/CD28 stimulierten CD8⁺ T-Zellen. Forskolin erwies sich dabei als sehr effektiv und führte bereits bei einer Konzentration von 50µM zu einer Inhibition der Proliferation um etwa 75%.

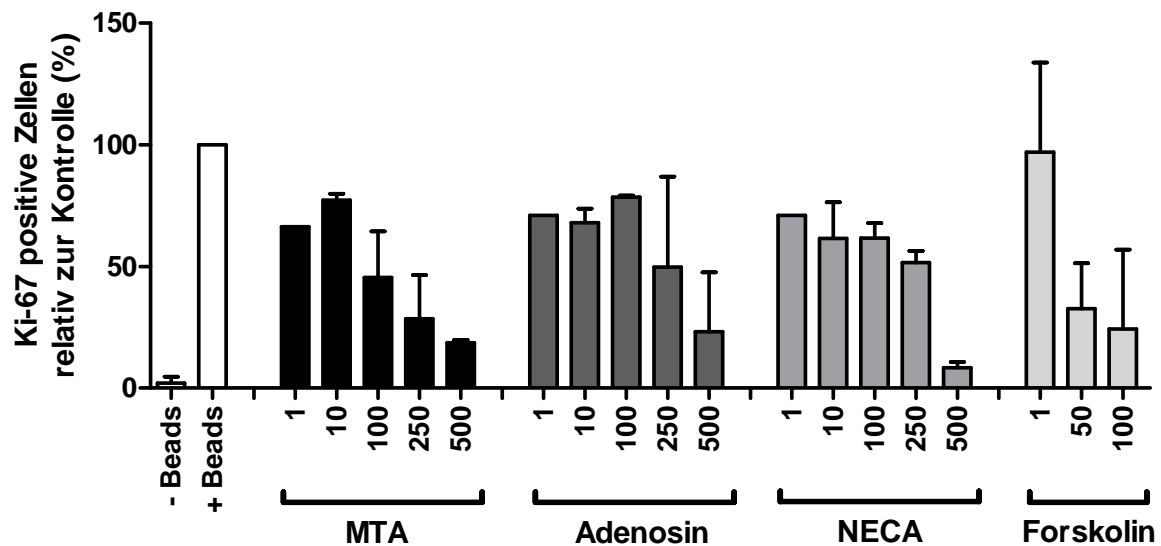


Abb. 22: Einfluss von MTA, Adenosin, NECA und Forskolin auf die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen. CD8⁺ T-Zellen wurden aus MNCs isoliert und mit anti-CD3/CD28 Beads im Verhältnis 2:1 ohne bzw. mit verschiedenen Konzentrationen an MTA, Adenosin, NECA und Forskolin polyklonal stimuliert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet, mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt und anschließend mit einer Fixierungs/Permeabilisierungslösung fixiert. Daraufhin konnten die Zellen mit einem Antikörper gegen den Proliferationsmarker Ki-67 gefärbt werden. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte CD8⁺ T-Zellen. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SD von 2 unabhängigen Experimenten.

3.2.6.2 Einfluss von MTA auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration in CD8⁺ T-Zellen

Anschließend wurden die intrazellulären cAMP-Konzentrationen von CD8⁺ T-Zellen nach Exposition mit 500µM MTA, 500µM Adenosin, 500µM NECA und 100µM Forskolin untersucht.

In **Abb. 23** ist dargestellt, dass Adenosin einen leichten, NECA bzw. Forskolin einen signifikanten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in den CD8⁺ T-Zellen induzieren. Durch 500µM MTA kommt es in den T-Zellen zu einer Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration um circa 50%. Einhergehend mit diesen Ergebnissen konnte durch eine Behandlung der CD8⁺ T-Zellen mit den Adenosinrezeptor-A2A- und A2B-Antagonisten Caffein und Alloxazin die T-Zellsuppression nicht aufgehoben werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die MTA-induzierte T-

Zellsuppression durch MTA nicht über eine Bindung an deren Adenosinrezeptoren vermittelt wird.

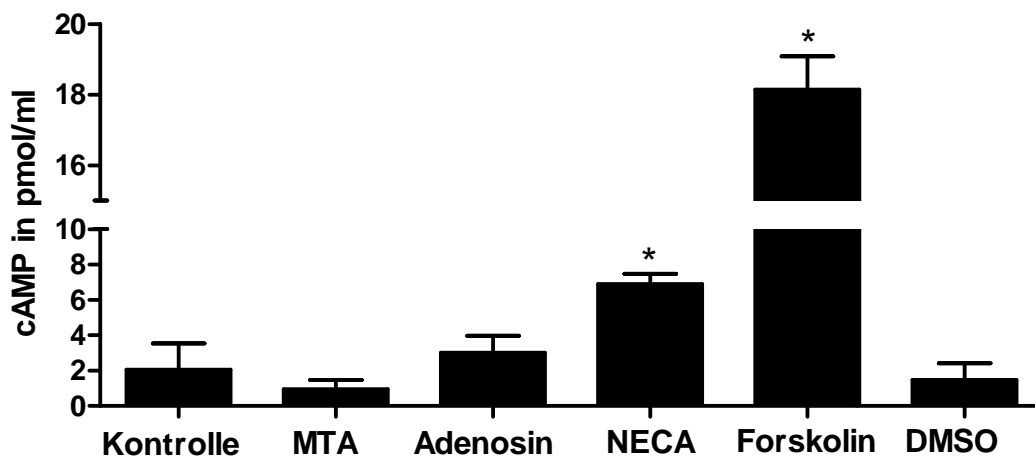


Abb. 23: Intrazelluläre cAMP-Konzentration in CD8⁺ T-Zellen nach Exposition mit Adenosinanaloga. CD8⁺ T-Zellen wurden aus MNCs isoliert und ohne bzw. mit 500µM MTA, 500µM Adenosin, 500µM NECA bzw. 100µM Forskolin inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen geerntet, mit 0.1M HCl lysiert und die Überstände der lysierten Zellen in einen cAMP-Test eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD von 4 unabhängigen Experimenten. Die statistischen Analysen wurden mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt.

3.2.6.3 Einfluss von Dipyridamol auf die MTA-induzierte T-Zellsuppression

Die Tatsache, dass MTA nicht an die Adenosinrezeptoren bindet, ließ vermuten, dass das Molekül entweder passiv oder aktiv über Transporter in die Zelle gelangt. Daher wurde untersucht, ob Dipyridamol, ein spezifischer Inhibitor des Adenosintransports, den Transport von MTA in die Zelle verhindern und somit die Inhibition der CD8⁺ T-Zellen unterbinden kann.

Hierzu wurden aus MNCs CD8⁺ T-Zellen magnetisch aufgereinigt und mit 250µM MTA oder Adenosin in An- oder Abwesenheit von 10µM Dipyridamol inkubiert. Eine Behandlung der CD8⁺ T-Zellen mit 250µM Adenosin führte zu einer reduzierten T-Zellaktivierung; auch nach Inkubation mit 250µM MTA konnte nur noch ein Anteil von 31% aktivierter T-Zellen detektiert werden (**Abb. 24**). Während durch eine Vorbehandlung der T-Zellen mit Dipyridamol die Frequenz der CD25⁺ CD8⁺ T-Zellen trotz Inkubation mit Adenosin auf 68% und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von 938 (ohne Dipyridamol) auf 2818 gesteigert werden konnte, war kein Einfluss von Dipyridamol auf MTA-behandelte CD8⁺ T-Zellen nachweisbar. Daraus lässt sich schließen, dass MTA nicht über spezifische

Adenosintransporter in die Zelle gelangt, sondern der Transport entweder über unbekannte Transporter vermittelt wird oder das hydrophobe Molekül frei in die Zelle diffundiert.

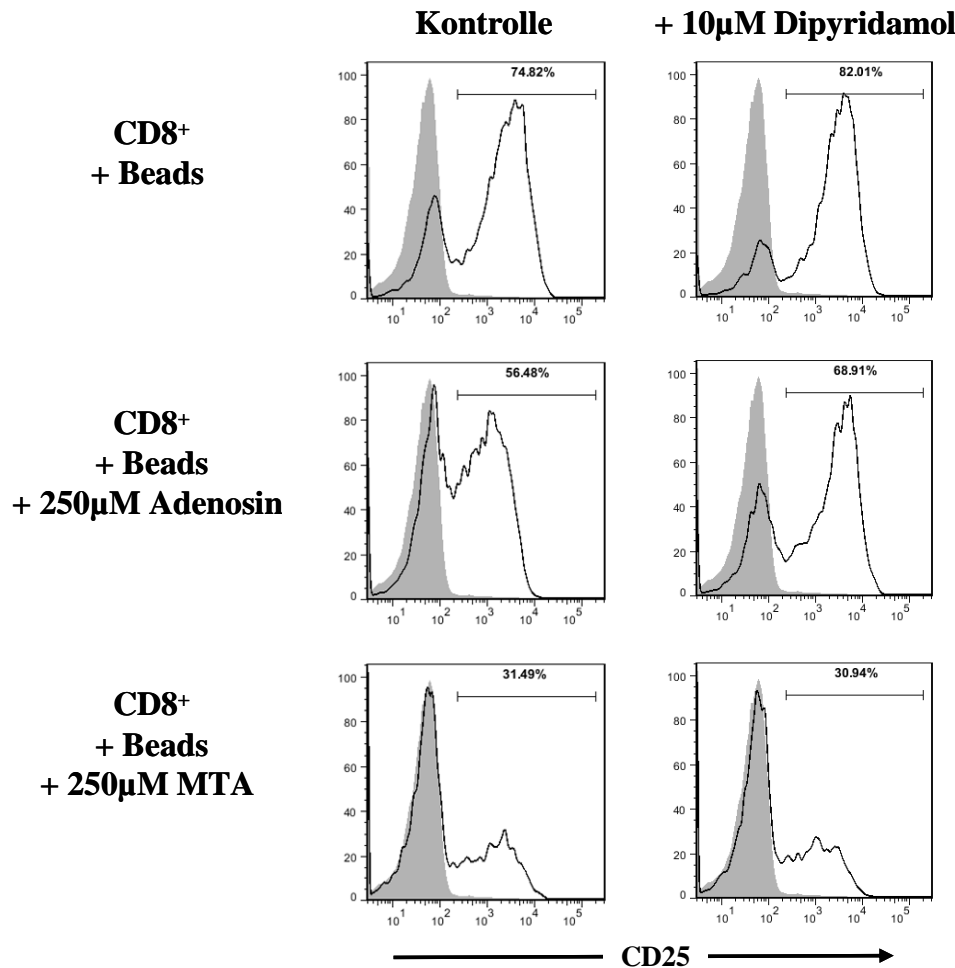


Abb. 24: Einfluss von Dipyridamol auf die MTA-vermittelte T-Zellsuppression. CD8⁺ T-Zellen wurden aus MNCs frisch isoliert und 5 Minuten mit 10µM Dipyridamol vorinkubiert. Anschließend wurden die CD8⁺ T-Zellen mit anti-CD3/CD28 Beads im Verhältnis 2:1 ohne bzw. mit 250µM MTA oder Adenosin polyklonal stimuliert. Nach 48h wurden die Zellen gerettet, mit einem Antikörper gegen CD8 und CD25 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte CD8⁺ T-Zellen (graue Histogramme). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel.

3.2.6.4 Einfluss des Adenosindeaminase-Inhibitions EHNA auf die MTA-vermittelte T-Zellsuppression

Nun stellen wir uns die Frage, ob die Inhibition der CD8⁺ T-Zellen nicht direkt durch MTA, sondern durch ein Abbauprodukt von MTA hervorgerufen wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass Adenosin in der Zelle sehr schnell über die Adenosindeaminase (ADA) abgebaut werden kann (203). In diesem Zusammenhang wurde auch berichtet, dass eine ADA-Defizienz erhebliche Defekte in B- und T-Zellen induzieren kann (204).

Es wurde untersucht, ob MTA ebenso wie Adenosin über ADA abgebaut werden kann. Hierzu wurden aus MNCs $CD8^+$ T-Zellen magnetisch isoliert und mit $250\mu\text{M}$ MTA oder Adenosin in An- bzw. Abwesenheit von $10\mu\text{M}$ EHNA [Erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)-adenin Hydrochlorid], einem ADA-Inhibitor, inkubiert. Wie in **Abb. 25** gezeigt, führte eine Vorbehandlung der $CD8^+$ T-Zellen mit EHNA zu einer gesteigerten Adenosin-vermittelten Suppression, was sich in einer Abnahme der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von CD25 von 2303 auf 654 zeigte. Im Gegensatz dazu hatte eine Behandlung der Zellen mit EHNA kaum Effekte auf die inhibitorische Wirkung von MTA.

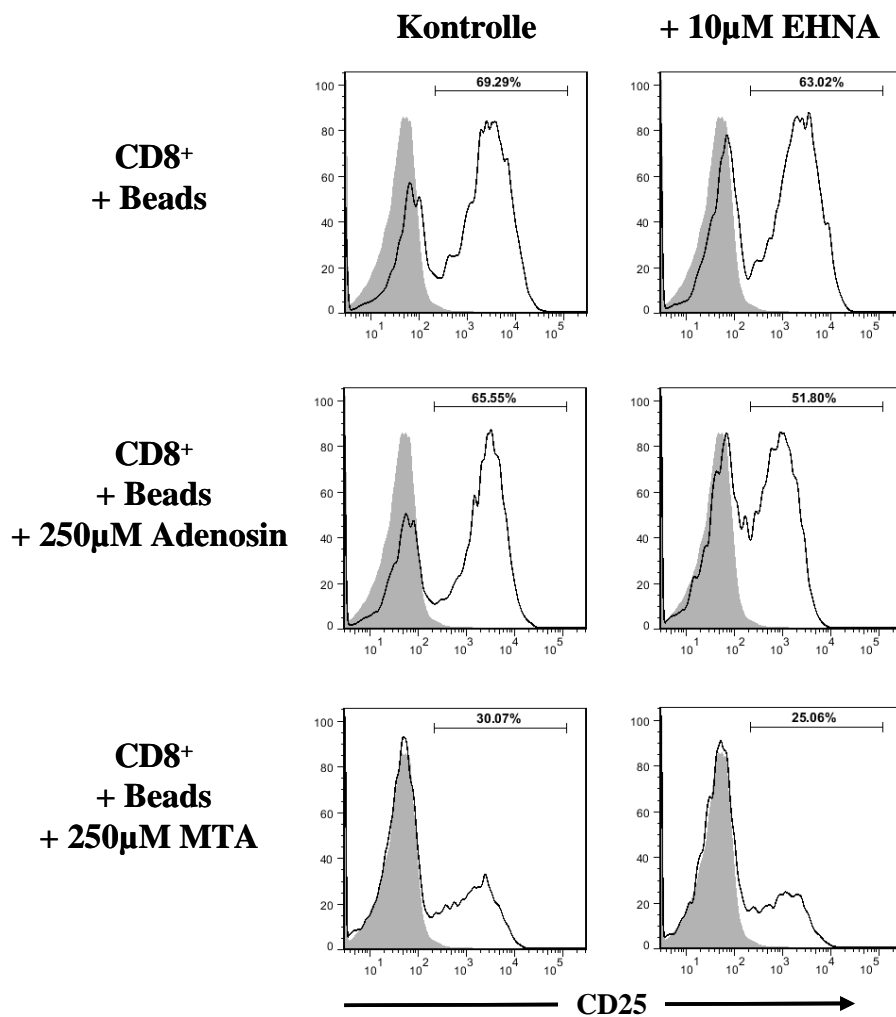


Abb. 25: Einfluss von EHNA auf die MTA-vermittelte T-Zellsuppression. $CD8^+$ T-Zellen wurden aus MNCs frisch isoliert und 5 Minuten mit $10\mu\text{M}$ EHNA vorinkubiert. Anschließend wurden die $CD8^+$ T-Zellen mit anti-CD3/CD28 Beads im Verhältnis 2:1 ohne bzw. mit $250\mu\text{M}$ MTA oder Adenosin polykonal stimuliert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet, mit einem Antikörper gegen CD8 und CD25 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Negativkontrolle dienten $CD8^+$ T-Zellen ohne Stimulation (graue Histogramme). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel.

3.3 Assoziation zwischen Immuzellinfiltration im Tumor und Glykolyse bzw. MTA-Stoffwechsel beim Nierenzellkarzinom

3.3.1 MTA-Metabolismus im RCC

3.3.1.1 MTAP-Expression und MTA in RCC-Zelllinien

Zunächst wurde mit Hilfe der quantitativen PCR die Transkription des MTAP-Gens in RCC-Zelllinien untersucht. Wie in **Abb. 26A** ersichtlich, ist MTAP in den RCC-Zelllinien RC11503 und RH556 nicht bzw. nur marginal exprimiert, während die Linien RW41 bzw. RJ494 eine normale MTAP-Expression zeigen. Passend dazu konnten in Zellkultur-Überständen von RC11503 und RH556 hohe Mengen an MTA detektiert werden, die um das 150-fache über den MTA-Konzentrationen der MTAP-exprimierenden RCC-Zelllinien RW41 und RJ494 lagen (**Abb. 26B**). Die MTA-Sekretion in den RCC-Linien korrelierte dabei invers mit der MTAP-Expression. Die intrazellulären MTA-Konzentrationen waren sehr gering und erreichten Werte bis zu 130pM. Dabei war zwischen den MTAP-intakten und -defizienten Zelllinien kein Unterschied ersichtlich (Daten nicht gezeigt).

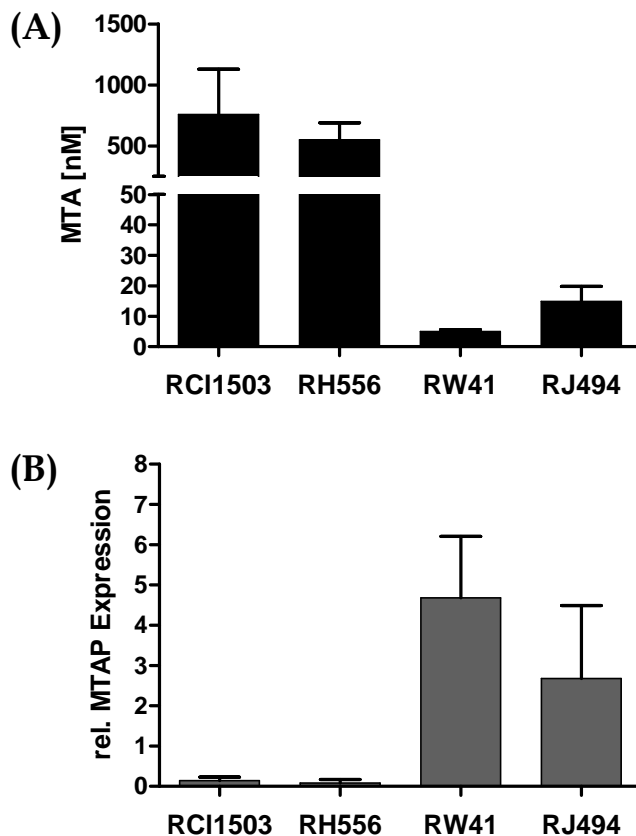


Abb. 26: MTAP mRNA Expression und MTA-Sekretion in RCC-Zelllinien. (A) Die Gesamt-RNA der Zellen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte an einem LightCycler und wurde auf die 18S mRNA bezogen. (B) Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation geerntet und die Überstände sterilfiltriert, schockgefroren und bei -80°C gelagert. Anschließend erfolgte die massenspektrometrische Analyse von MTA in den Überständen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Experimenten.

3.3.1.2 MTAP Expression im RCC auf Proteinebene

Anschließend wurde die MTAP-Expression in primären Nierenzell-Karzinomen auf Proteinebene untersucht. Hierfür wurden uns von Prof. Dr. Hartmann (Lehrstuhl für Pathologie, Klinikum der Universität Erlangen) Tissuemicroarrays (TMAs) von Patienten mit verschiedenen RCC-Subtypen mit korrespondierendem Normalgewebe zur Verfügung gestellt (**Tabelle 1**).

RCC-Subtyp	Hellzellig	Papillär	Chromophob	Onkozytom
Patienten (n)	80	66	73	30
Alter in Jahren (Durchschnitt)	63	63	64	65
Alter in Jahren (Intervall)	19 - 88	37 - 84	38 - 87	26 - 79
Geschlecht:				
männlich (n)	51	49	35	11
weiblich (n)	25	16	34	7
unbekannt (n)	4	1	3	12
WHO Klassifikation:				
WHO I (n)	36	41	16	
WHO II (n)	10	9	6	
WHO III (n)	14	13	4	
WHO IV (n)	3	2	3	
unbekannt (n)	17	1	44	

Tabelle 1: Klinische und pathologische Charakteristika der RCC-Patienten, deren Tumore bzw. Normalgewebe für die Herstellung der TMAs verwendet wurden.

Die TMAs wurden immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen MTAP gefärbt und anschließend analysiert. Die Expression von MTAP wurde nach einem Scoring-System ermittelt. Dabei wurde zunächst der Anteil der MTAP-positiven Zellen analysiert und folgendermaßen eingeteilt: 1-5 % Score 1; 6–25% Score 2; 26–50% Score 3; 51–75 % Score 4; >75 % Score 5. Die Intensität der MTAP-Färbung wurde ebenfalls nach einer 4-Stufen-Skala eingeteilt in keine (0), niedrige (1), mittelmäßige (2) und starke Expression (3). Der endgültige Score wurde aus der Summe des Prozentanteils und der Intensität ermittelt und konnte von 0 bis 8 variieren. Auf die gleiche Weise wurde auch die MTAP-Expression im Normalgewebe bestimmt. In **Abb. 27** sind beispielhaft ein Tumor mit fehlender MTAP-

Expression **(A)** und ein Tumor mit starker zytoplasmatischer MTAP-Expression **(B)** dargestellt.

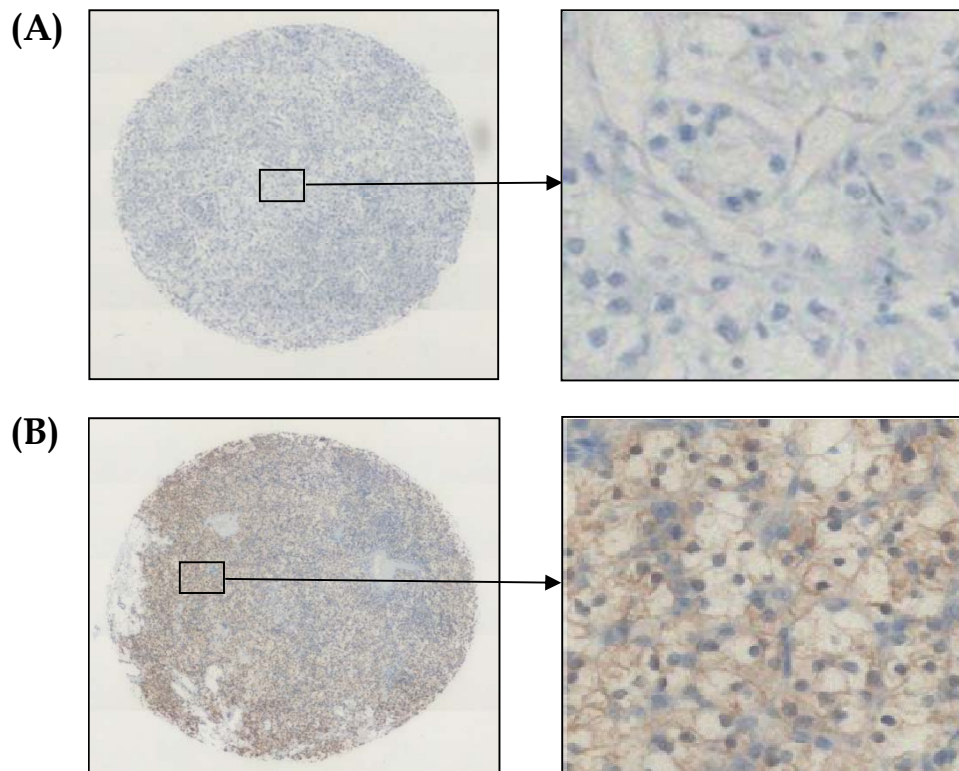


Abb. 27: Zytoplasmatische MTAP-Expression im primären RCC. Es sind zwei repräsentative Beispiele für **(A)** eine fehlende (Score 0) und **(B)** eine starke (Score 8) MTAP-Expression gezeigt.

Die Gesamtanalysen zur MTAP-Expression im primären RCC ergaben, dass in allen RCC-Subtypen die MTAP-Expression verglichen mit den korrespondierenden Normalgeweben signifikant vermindert ist ($p < 0.001$) (**Abb. 28**). Wie in **Abb. 28B** zusammengefasst, wurde in 62% der hellzelligen, 46% der papillären, 60% der chromophoben Nierenzellkarzinome und 52% der Onkozytome keine MTAP-Expression detektiert, im Gegensatz dazu war nur in 7% der normalen Nierengewebe ein MTAP-Verlust nachweisbar.

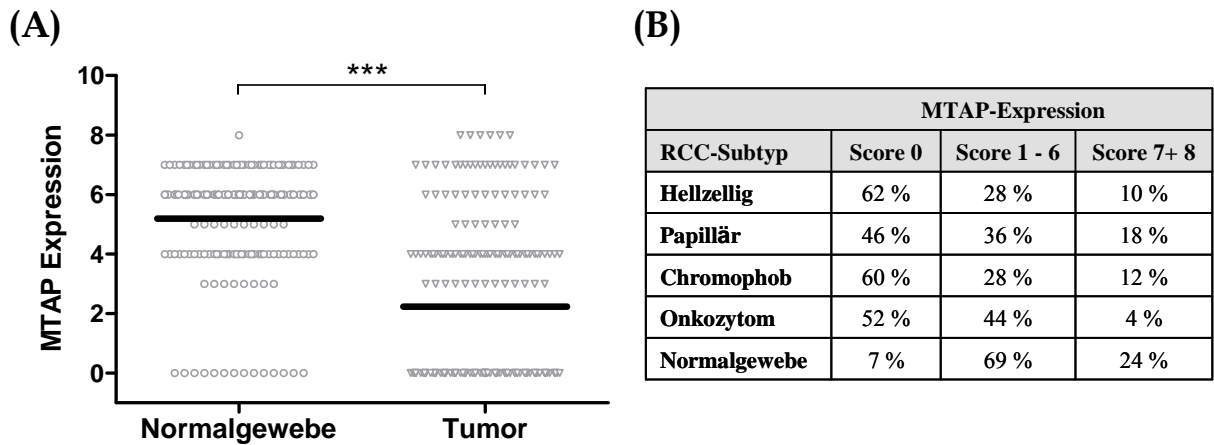


Abb. 28: Zytoplasmatische MTAP-Expression in primären Nierenzell-Karzinomen. 249 TMA's mit 85 hellzelligem, 66 papillärem, 80 chromophoben Nierenzellkarzinomen und 37 Onkozytomen sowie dem korrespondierenden Normalgewebe wurden mit einem Antikörper gegen MTAP gefärbt. Die Expression von MTAP wurde nach einem Scoring-System von 0 (keine Expression) bis 8 (hohe Expression) ermittelt. **(A)** Dargestellt ist die MTAP-Expression in allen Normal- und Tumorgeweben. Die statistische Analyse wurde mit dem Student's t Test durchgeführt. **(B)** % - Anteile der jeweiligen RCC-Subtypen ohne (Score 0), mit mittelmäßiger (Score 1 - 6) und starker (Score 7 + 8) MTAP-Expression.

3.3.2 LDHA, GLUT-1 und Laktat im RCC

3.3.2.1 LDHA und Laktat in RCC-Zelllinien

Wir stellten uns anschließend die Frage, ob in RCC-Zelllinien zwischen der Expression der Laktatdehydrogenase A (LDHA) und der Sekretion des Glukosestoffwechsel-Endprodukts Laktat besteht. Dazu wurde mit Hilfe der quantitativen PCR die Transkription des LDHA-Gens in RCC-Zelllinien untersucht. In **Abb. 29A** ist ersichtlich, dass alle RCC-Zelllinien LDHA um das 6- bis 13-fache höher exprimieren als die Kontrolle (ruhende T-Zellen). Analog dazu sezernieren Tumorzellen bis zu 16-fach mehr Laktat als ruhende T-Zellen (**Abb. 29B**).

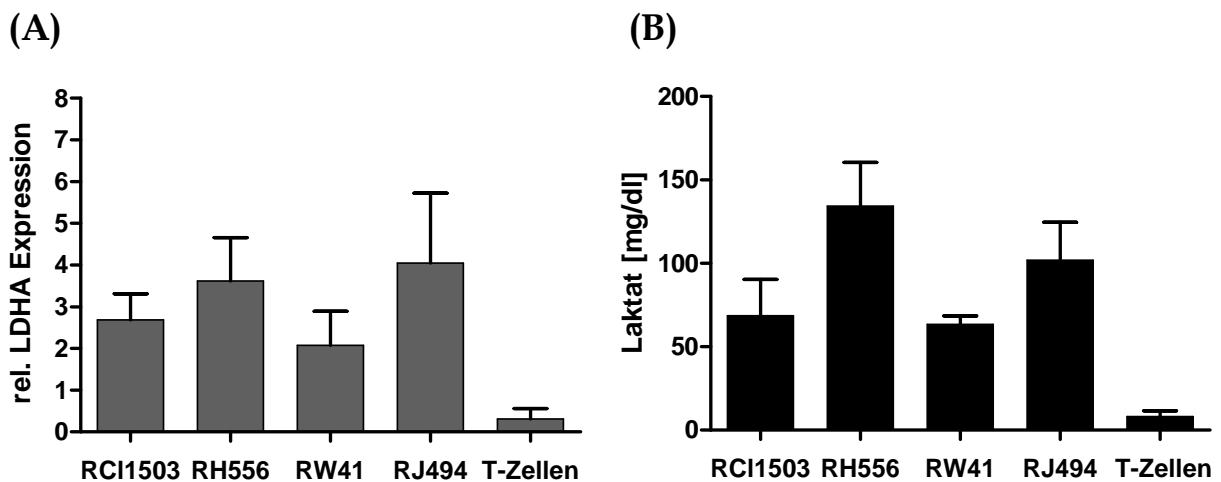


Abb. 29: LDHA mRNA Expression und Laktat-Sekretion in RCC-Zelllinien. **(A)** Die Gesamt-RNA der Zellen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte an einem LightCycler und wurde auf die 18S mRNA als „house-keeping“ Gen bezogen. **(B)** Die Tumorzellen bzw. T-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation geerntet und die Überstände sterilfiltriert, schockgefroren und bei -80°C gelagert. Anschließend erfolgte die Laktat-Analyse von in den Überständen. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Experimenten.

3.3.2.2 mRNA-Expression von Glykolyse-assoziierten Genen in primärem RCC

Basierend auf den *in vitro* Daten stellten wir uns nun die Frage, wie LDHA und andere Glykolyse-assoziierte Gene im primären RCC exprimiert sind.

Aus primären Nierentumoren und dem korrespondierende nicht-malignen Nierengewebe von 30 Patienten mit RCC (22 = hellzellig; 7 = papillär; 1 = unbekannt; siehe unter 2.2.25) wurde

RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und über quantitative PCR analysiert. In den Tumoren konnte im Vergleich zum Normalgewebe eine signifikante Hochregulation der LDHA ($p < 0.01$), des Glukosetransporters GLUT-1 ($p < 0.001$) und des Monocarboxylattransporters MCT-1 ($p < 0.05$) detektiert werden (**Abb. 30A, C und D**). Zudem konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz dazu die Expression der Laktatdehydrogenase-B (LDHB), welche die Oxidation von Laktat zu Pyruvat katalysiert, im Tumorgewebe signifikant vermindert ist (**Abb. 30B**; $p < 0.01$). Diese Daten demonstrieren, dass die Tumorzellen auf einen hohen Glukosetransport in die Zellen angewiesen sind und hauptsächlich Pyruvat zu Laktat reduzieren.

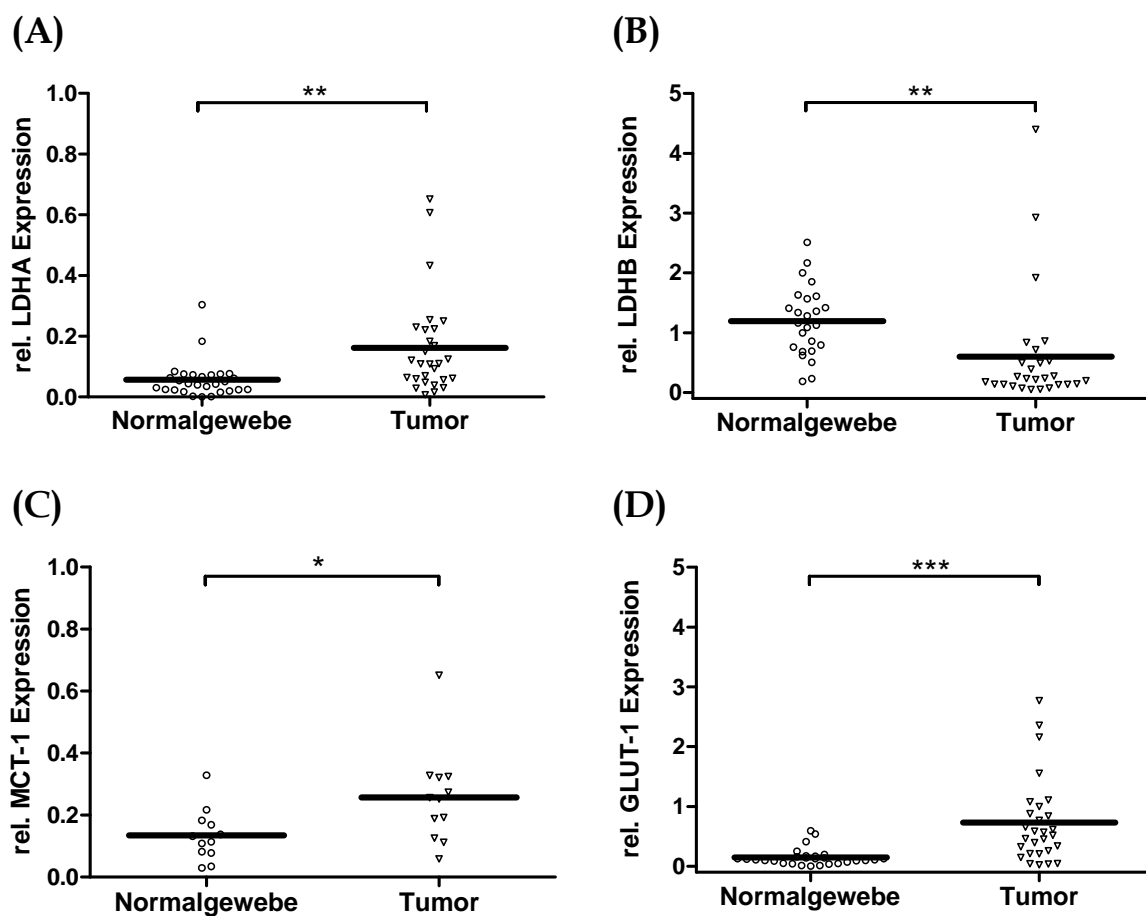


Abb. 30: Hochregulation von LDHA, GLUT-1 und MCT-1 im RCC. Aus Tumor- und korrespondierendem Normalgewebe von 30 Patienten mit RCC wurde Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und über qPCR analysiert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte relativ zur 18S RNA Expression. Dargestellt sind die Expression von (A) LDHA, (B) LDHB, (C) MCT-1 und (D) GLUT-1 in den Tumoren und dem entsprechendem Normalgewebe. Die statistischen Analysen wurden mit dem Student's t Test durchgeführt.

3.3.2.3 Immunhistochemische Analysen zur Expression von GLUT-1 und LDH5 im primären RCC

Um die RNA-Daten auf Proteinebene bestätigen zu können, wurden immunhistochemische Färbungen an Tissuemicroarrays von 249 RCC-Patienten durchgeführt (Patientencharakteristik siehe **Tabelle 1**). Dabei wurden Tumor- und entsprechendes Normalgewebe mit Antikörpern gegen GLUT-1 und LDH5 gefärbt und anschließend analysiert. LDH5 ist ein Isoenzym der Laktatdehydrogenase und besteht aus 4 LDHA-Untereinheiten. Die Expression von GLUT-1 und LDH5 wurde nach einem Scoring-System ermittelt, wie es bereits unter 3.3.1.2 beschrieben worden ist, und wurde von 0 (keine Expression) bis 8 (starke Expression) unterteilt.

In **Abb. 31A** ist dargestellt, dass GLUT-1 in den verschiedenen RCC-Subtypen sehr heterogen exprimiert wird. Es ist deutlich zu erkennen, dass GLUT-1 im Vergleich zum Normalgewebe im hellzelligen Subtyp am stärksten exprimiert wird ($p < 0.001$). Auch im chromophoben Subtyp zeigte sich im Vergleich zum Normalgewebe eine signifikant gesteigerte Expression von GLUT-1 ($p < 0.01$). Im Gegensatz dazu war im papillären RCC und im Onkozytom GLUT-1 nicht signifikant überexprimiert. Es ist zu erwähnen, dass GLUT-1 im hellzelligen RCC in 34/79 Patienten (44.7%) sehr stark (Score 6 – 8) exprimiert war, wohingegen 21/79 (26.5%) Patienten eine mittelmäßige und 27% der Patienten keine GLUT-1-Expression aufwiesen. Im Gegensatz dazu war bei 59/66 (75.8%) Patienten mit papillärem und 52/73 (71.5%) Patienten mit chromophobem RCC keine GLUT-1-Expression nachweisbar. In allen RCC-Subtypen korrelierte die zytoplasmatische mit der membranösen GLUT-1-Expression ($p < 0.001$, Daten nicht gezeigt). So kann man in **Abb. 31B** erkennen, dass im hellzelligen Subtyp GLUT-1 sowohl membranös als auch zytoplasmatisch höher als im korrespondierenden Normalgewebe exprimiert wird. Im gesunden Nierengewebe dagegen wird GLUT-1 hauptsächlich zytoplasmatisch und nicht membranös exprimiert.

Anschließend wurde die Expression von LDH5 in allen RCC-Subtypen analysiert. Wie in **Abb. 32** gezeigt wurde LDH5 im hellzelligen RCC im Vergleich zum Normalgewebe signifikant höher exprimiert ($p < 0.001$), nicht aber in den anderen RCC-Subtypen. LDH5 konnte ausschließlich im Zytoplasma detektiert werden, nicht aber in den Zellkernen (205). Im angrenzenden Nierengewebe konnte LDH5 in den proximalen und distalen Tubuli LDH5 werden, wobei interessanterweise die Glomeruli (Parenchym) komplett negativ für LDH5 waren.

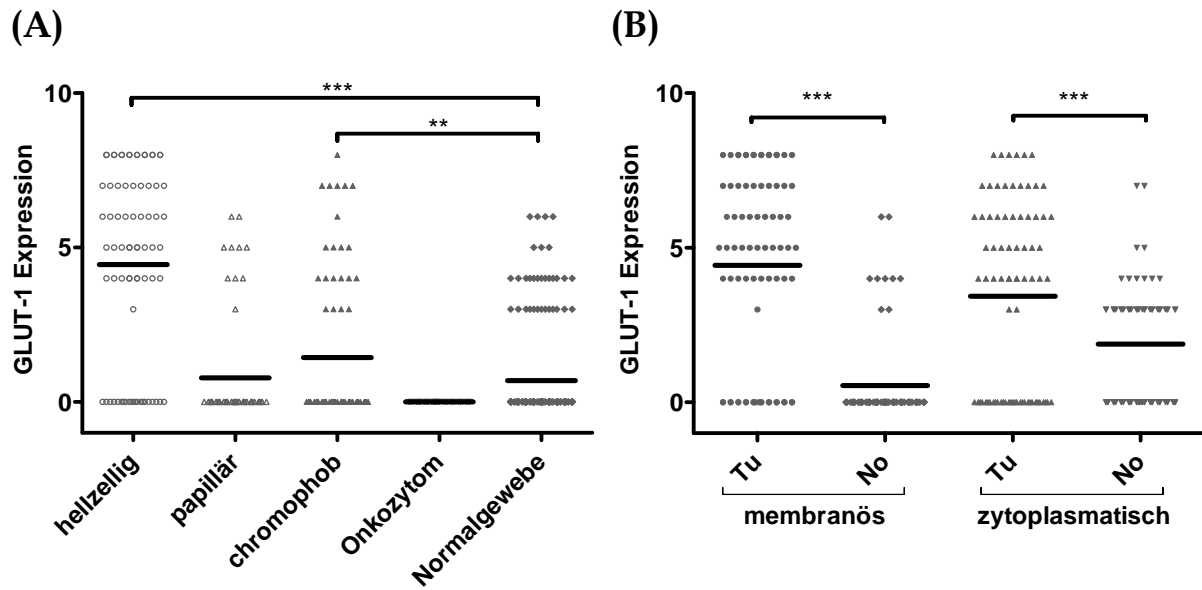


Abb. 31: GLUT-1 ist im hellzelligen RCC-Subtyp im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert. Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen GLUT-1 wurden an 85 hellzelligen, 66 papillären, 80 chromophoben Nierenzellkarzinoma und an 37 Onkozytomen durchgeführt. Die Expression von GLUT-1 wurde nach einem Scoring-System von 0 (keine Expression) bis 8 (hohe Expression) ermittelt. **(A)** Membranöse GLUT-1 Expression in allen RCC-Subtypen und entsprechendem Normalgewebe. **(B)** Membranöse und zytoplasmatische Expression von GLUT-1 im hellzelligen Subtyp und dazu gehöriem Normalgewebe. Die statistischen Analysen wurden mit dem Student's t Test durchgeführt.

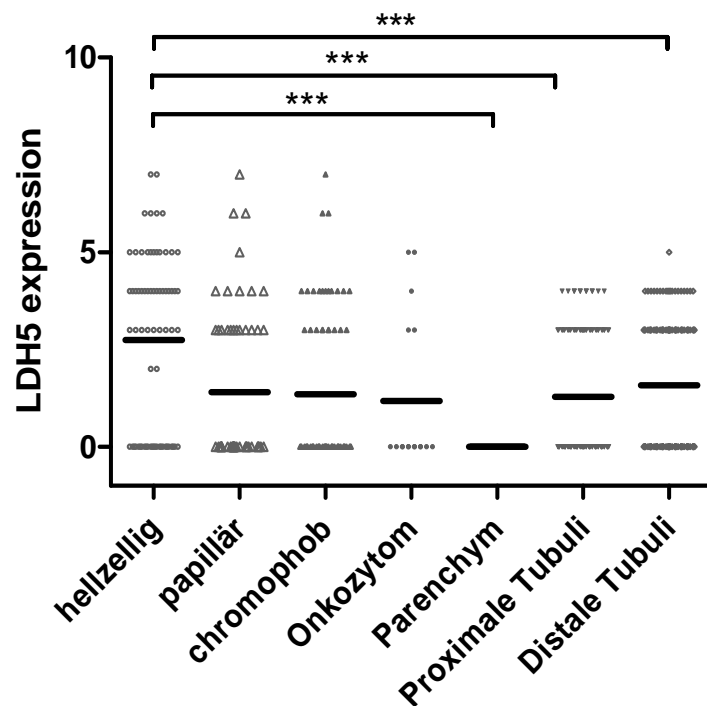


Abb. 32: Überexpression von LDH5 im hellzelligen RCC. Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen LDH5 wurden an 85 hellzelligen, 66 papillären, 80 chromophoben Nierenzellkarzinoma und an 37 Onkozytomen durchgeführt. Die Expression von LDH5 wurde nach einem Scoring-System von 0 (keine Expression) bis 8 (hohe Expression) ermittelt. Gezeigt ist hier die zytoplasmatische Expression von LDH5 in allen RCC-Subtypen und entsprechenden Normalgeweben. Die statistischen Analysen wurden mit dem Student's t Test durchgeführt.

3.3.3 Immunzellinfiltration im RCC

Um eine mögliche Verbindung zwischen der Expression von Glukose assoziierten Proteinen und zellulären Immunantworten im RCC herstellen zu können, untersuchten wir anschließend die Immunzellinfiltration im primären RCC im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe. Zwar war in verschiedenen Publikationen bereits eine hohe Immuninfiltration im RCC beschrieben worden, doch wurde bisher kaum zwischen den verschiedenen RCC-Subtypen unterschieden (46, 47).

Zunächst wurde die Anzahl infiltrierender $CD3^+$ T-Zellen in den Tumoren und den korrespondierenden Normalgeweben bestimmt. Dazu wurden TMAs von 249 RCC-Patienten mit einem Antikörper gegen CD3 gefärbt und ausgewertet. Zunächst fiel auf, dass die tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) entweder sehr diffus über den Tumor verstreut waren oder als Zellhaufen auftraten. Des Weiteren konnten die TILs entweder direkt im Tumor oder in engem Kontakt zu den Tumorzellen im Stroma nachgewiesen werden.

Im hellzelligem RCC konnten verglichen mit dem papillären und chromophoben RCC, Onkozytom und nicht-malignem Gewebe die meisten $CD3^+$ T-Zellen detektiert werden (**Abb. 33**).

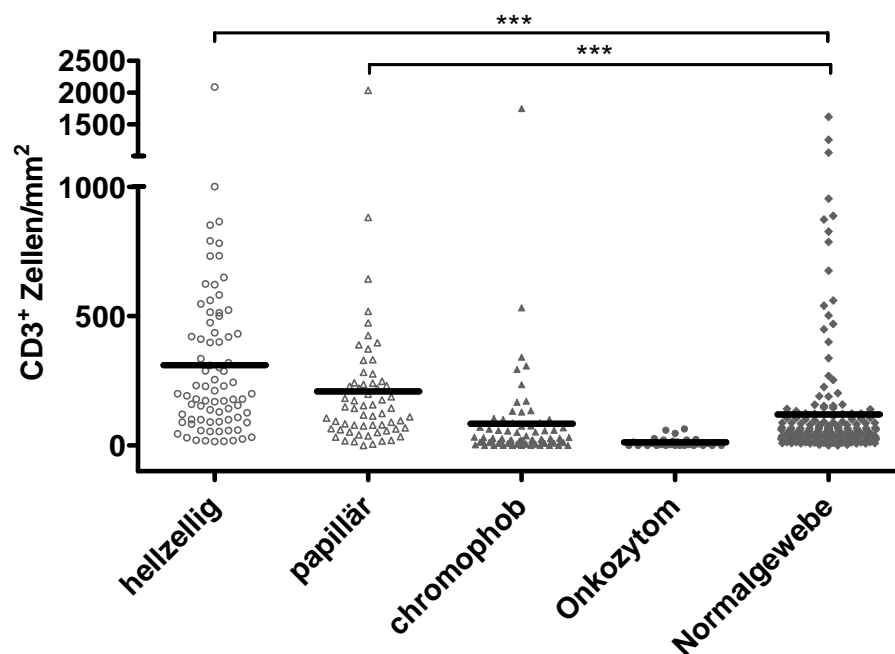
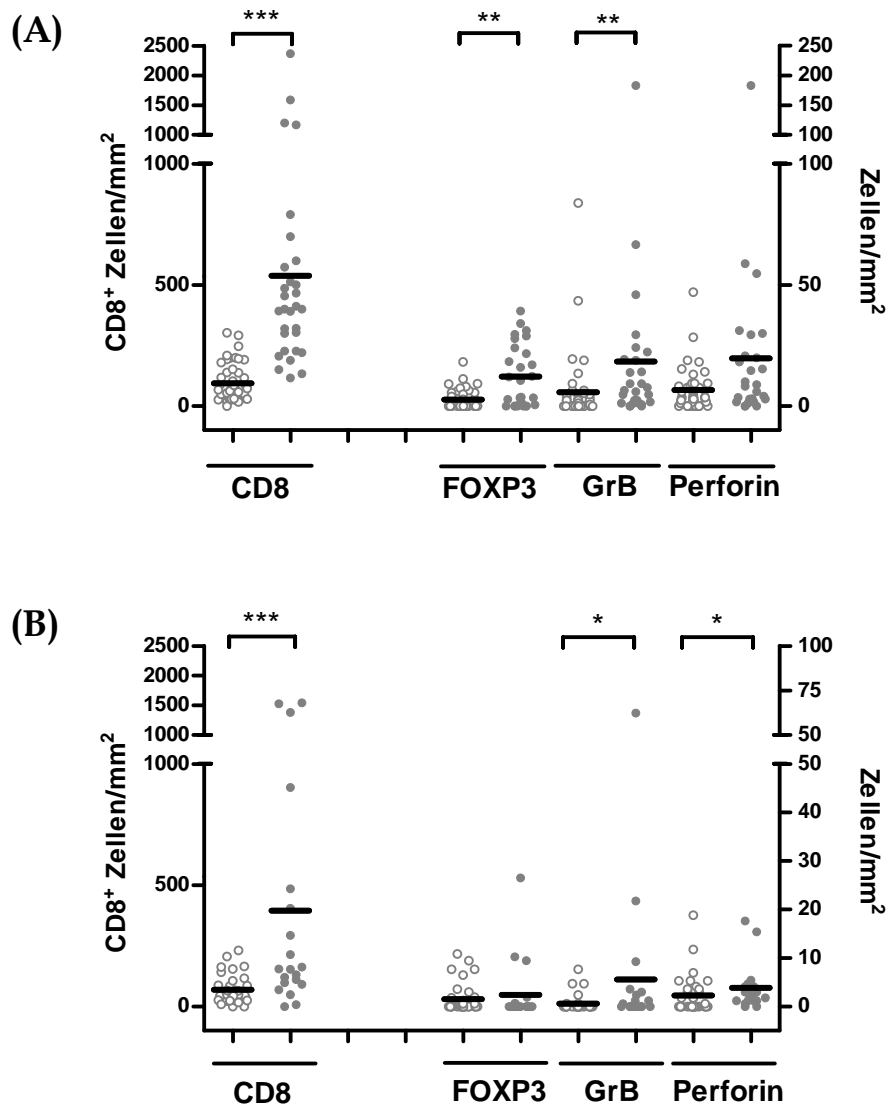


Abb. 33: Hohe $CD3^+$ T-Zellinfiltration im hellzelligem RCC. Immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen CD3 wurden an 85 hellzelligem, 66 papillären, 80 chromophoben Nierenzellkarzinoma und an 37 Onkozytomen durchgeführt. Es wurde der Prozentanteil der $CD3^+$ T-Zellen an allen Zellen (Tumor - und Immunzellen) ermittelt. Gezeigt ist hier die $CD3^+$ Infiltration in allen RCC-Subtypen und entsprechenden Normalgeweben. Die statistischen Analysen wurden mit dem Student's t Test durchgeführt.

Um die Zusammensetzung des CD3⁺ T-Zellinfiltrats im RCC genauer charakterisieren zu können, wurden die Tumore und entsprechende Normalgewebe mit Antikörpern gegen CD8, FOXP3, Granzyme-B und Perforin gefärbt. Die Tumore wurden nach ihrer Immuninfiltrationsdichte in „CD3⁺ niedrig“ (< Mittelwert) und „CD3⁺ hoch“ (> Mittelwert) infiltrierende Tumore eingeteilt. Die Tumore mit hoher CD3⁺ Infiltration wiesen ebenso eine hohe CD8⁺-Infiltrationsdichte auf. Im hellzelligen und papillären RCC war die hohe CD8⁺-T-Zellinfiltration auch mit einer hohen Anzahl an Granzyme-B⁺ Zellen assoziiert. Im Gegensatz dazu war das Effektormolekül Perforin nur im papillären Subtyp signifikant hochreguliert (Abb. 34 A - C). Ferner war die Frequenz der FOXP3⁺ T-Zellen im hellzelligen und chromophoben Subtyp erhöht, nicht aber im papillären Subtyp.



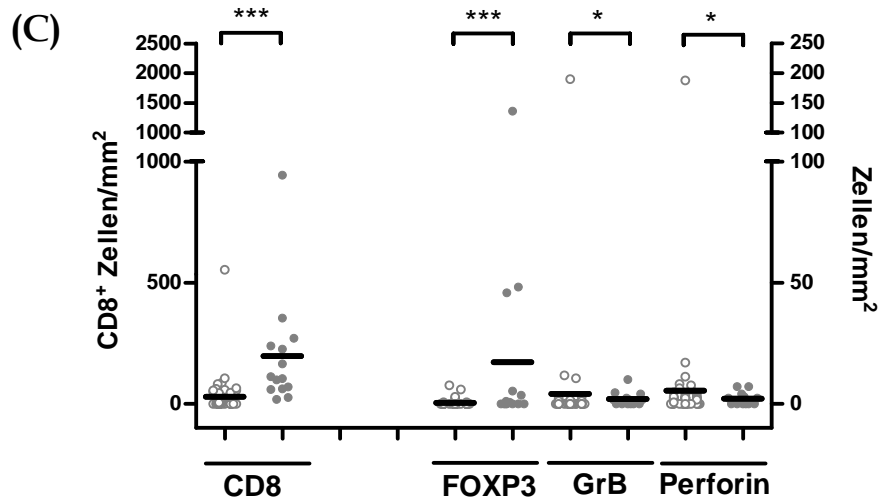


Abb. 34: Charakterisierung des Immunzellinfiltrats im RCC. (A) Die Tumore wurden in CD3⁺ hoch (CD3⁺ > 310 Zellen/mm², schwarze Kreise) und CD3⁺ niedrig (CD3⁺ < 310 Zellen/mm², offene Kreise) infiltrierende Tumore unterteilt. In beiden Subgruppen wurde die Frequenz der CD8⁺, FOXP3⁺, Granzyme-B⁺ und Perforin⁺ Zellen ermittelt. Auch im (B) papillären Subtyp (offene Kreise < 209 Zellen/mm²; schwarze Kreise > 209 Zellen/mm²) und (C) dem chromophoben Subtyp (offene Kreise < 83 Zellen/mm²; schwarze Kreise > 83 Zellen/mm²) wurde die Infiltration der CD8⁺, FOXP3⁺, Granzyme-B⁺ und Perforin⁺ Zellen analysiert. Die statistischen Analysen wurden mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt.

Ferner war in allen RCC-Subtypen der Anteil der Granzyme-B bzw. Perforin exprimierenden CD8⁺ T-Zellen höher als in den dazu gehörigen nicht-malignen Nierengewebe. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass sich das Verhältnis der FOXP3⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen im Tumor und im Normalgewebe nicht unterscheidet (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass im RCC zelluläre und/oder humorale Mechanismen existieren, die das Überleben und die Aktivierung der TILs regulieren.

3.3.4 Korrelation zwischen Immunzellinfiltration und dem MTA - bzw. Glukosestoffwechsel

3.3.4.1 Zusammenhang zwischen MTAP-Expression und Immunzellinfiltration im primären RCC

In 3.3.1 haben wir gezeigt, dass die Expression von MTAP in allen RCC-Subtypen im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgeweben signifikant vermindert ist. In weiteren Analysen konnte jedoch in allen RCC-Subtypen keine Korrelation zwischen der MTAP-Expression im Tumor und der Immunzellinfiltration beobachtet werden.

3.3.4.2 Assoziation zwischen GLUT-1 bzw. LDH5 Expression und Immunzellinfiltration im RCC

Nun stellen wir uns die Frage, ob die Immunzellinfiltration beim RCC mit der Expression von GLUT-1 und/oder LDH5 korreliert. Beispielhaft ist in **Abb. 35A** ein TMA mit hoher GLUT-1-Expression und niedriger CD8⁺ Infiltration und in **Abb. 35B** ein TMA mit fehlender GLUT-1-Expression und hoher CD8⁺ T-Zellinfiltration gezeigt.

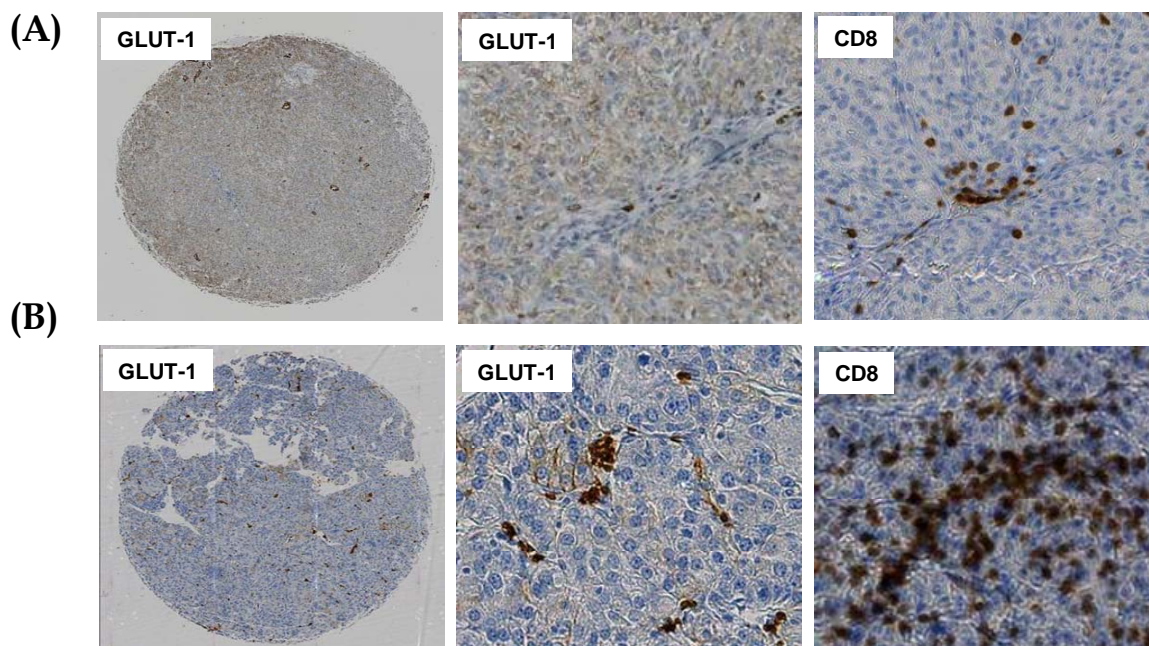


Abb. 35: Expression von GLUT-1 und Immuninfiltration im hellzelligen RCC. Hier sind repräsentative TMAs mit (A) hoher GLUT-1-Expression und geringer CD8⁺ T-Zellinfiltration und (B) keiner GLUT-1-Expression und hoher CD8⁺ T-Zellinfiltration gezeigt.

Wir konnten für das hellzellige RCC zeigen, dass zwischen der Frequenz der $CD3^+/CD8^+$ TILs und der GLUT-1-Expression eine inverse Korrelation besteht (**Abb. 36A**). Diese Korrelation konnte für die anderen RCC-Subtypen nicht hergestellt werden. In den Tumoren, die kein GLUT-1 exprimierten, war eine signifikant höhere Infiltration von $CD3^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen als in GLUT-1 hoch exprimierenden Tumoren nachweisbar (GLUT-1 Score 6 – 8; $p < 0.05$). Weiterhin war ein negativer Zusammenhang zwischen der GLUT-1 Expression auf den Tumorzellen und der Anzahl der Granzyme-B⁺ und Perforin⁺ T-Zellen (**Abb. 36A und B**), nicht aber mit der Anzahl der FOXP3⁺ T-Zellen zu sehen (Daten nicht gezeigt).

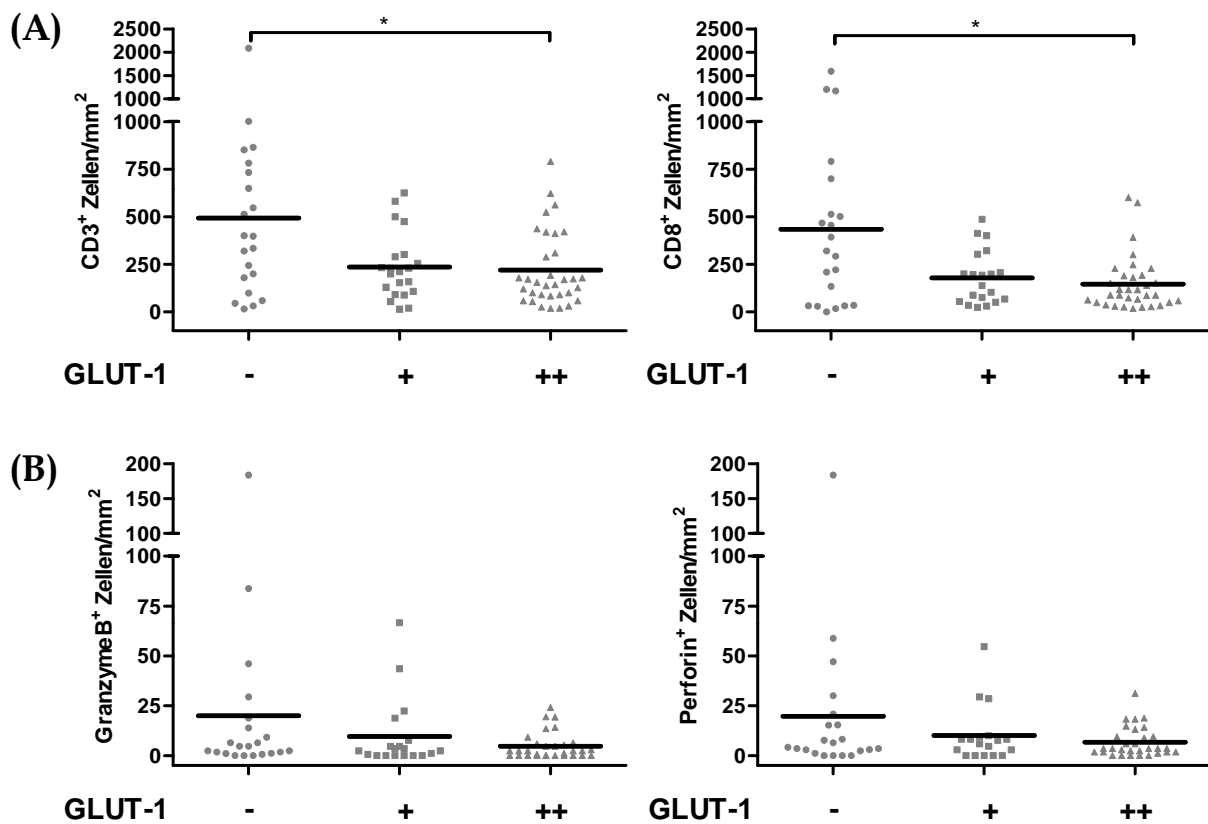


Abb. 36: Inverse Korrelation zwischen GLUT-1 Expression und der Anzahl $CD3^+/CD8^+$ tumor-infiltrierender T-Zellen im hellzelligen RCC. Die membranöse Expression von GLUT-1 wurde im hellzelligen RCC immunhistochemisch analysiert. Die Tumore wurden in nicht (-, Score 0), mittelmäßig (+, Score 1 - 5) und hoch (++ , Score 6 - 8) GLUT-1-exprimierende Tumore eingeteilt. Die Anzahl der TILs wurde pro mm^2 ermittelt. Gezeigt sind (A) $CD3^+$ T-Zellen (linker Graph) bzw. $CD8^+$ T-Zellen (rechter Graph) sowie (B) Granzyme-B⁺ T-Zellen (linker Graph) und Perforin⁺ T-Zellen (rechter Graph). Die statistischen Analysen wurden mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt.

Auch die Expression von LDH5 hatte einen negativen Einfluss auf die Infiltration von CD3⁺ T-Zellen, nicht aber auf die Anzahl der CD8⁺, Granzyme-B⁺ oder FOXP3⁺ T-Zellen (**Abb. 37 A und B**).

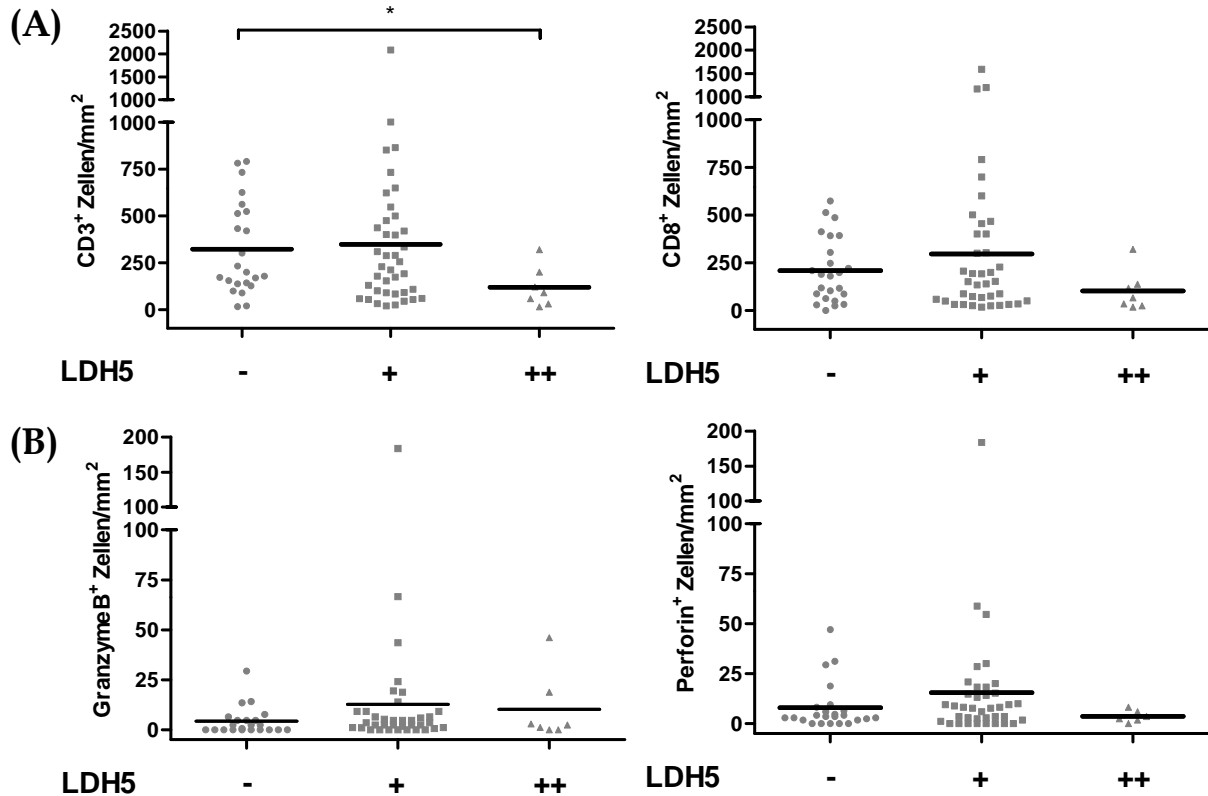


Abb. 37: Inverse Korrelation zwischen LDH5-Expression und der Anzahl der CD3⁺ T-Zellen im hellzelligen RCC. Die zytoplasmatische Expression von LDH5 wurde im hellzelligen RCC immunohistochemisch analysiert. Die Tumore wurden in nicht (-, Score 0), mittelmäßig (+, Score 1 - 5) und hoch (++, Score 6 - 8) LDH5-exprimierende Tumore eingeteilt. Die Anzahl der TILs wurde pro mm² ermittelt. Gezeigt sind (A) CD3⁺ T-Zellen (linke Graphik) bzw. CD8⁺ T-Zellen (rechte Graphik) sowie (B) Granzyme-B⁺ T-Zellen (linker Graphik) und Perforin⁺ T-Zellen (rechte Graphik). Die statistischen Analysen wurden mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Expression von GLUT-1 und LDH5 im hellzelligen RCC einen negativen Einfluss auf die Immunzellinfiltration in die Tumore haben könnte.

4. Diskussion

4.1 Suppression humaner T-Zellen durch Milchsäure

In der Tumorimmunologie stellt die Koexistenz von Tumorzellen und Tumor-infiltrierenden Immunzellen ein großes Paradoxon dar (206, 207). Dabei wird über zahlreiche Mechanismen spekuliert, die zu funktionellen Defekten in Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) führen. Hier ist zunächst das immunsuppressive Tumormikromilieu zu nennen, welches unter anderem durch einen dysregulierten Tumormetabolismus hervorgerufen werden kann (51, 206, 208).

So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression derIDO bzw. Arginase in Tumoren zu einer Depletion der für die T-Zellen essentiellen Aminosäuren Tryptophan bzw. Arginin führt und somit eine Suppression der anti-tumoralen T-Zellantwort induziert wird (95, 104). Die meisten Tumore sind auch durch einen erhöhten aeroben Glukosestoffwechsel charakterisiert (135), welcher mit einer hohen Laktatkonzentration in der Tumorumgebung einher geht (189, 190, 198).

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Milchsäure (das protonierte Laktat) humane CD8⁺ CTLs sowohl in ihrer Proliferation, als auch in ihrer Zytokinproduktion und zytotoxischen Kapazität supprimiert (192). Massenspektrometrische Analysen haben gezeigt, dass Milchsäure, nicht aber das Laktat(salz) in die Zellen transportiert wird.

Es ist bekannt, dass CTLs zur Ausübung ihrer Effektorfunktionen eine erhöhte Glykolyserate und eine daraus resultierende hohe Laktatproduktion und -sekretion aufweisen (200, 209). Durch Blockade des Laktat-Exports aus dem Zytoplasma der CTLs sowie durch Exposition mit Milchsäure konnte die Zytokinsekretion in den CTLs inhibiert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die T-Zellfunktion stark von der Entfernung des intrazellulären Laktats abhängig ist und hohe extrazelluläre Milchsäure-Konzentrationen diesen Export inhibieren.

Wir stellten uns nun die Frage, ob eine Behandlung mit Milchsäure zu einer metabolischen Blockade in den T-Zellen führt. Hierzu wurden Flux-Experimente mit [1,2-¹³C₂]Glukose durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass hohe extrazelluläre Milchsäure-Konzentrationen in CTLs zu einer Akkumulation der intrazellulären Laktatkonzentration führen. Diese Akkumulation von intrazellulärem Laktat resultierte zum einen aus einem Influx von extrazellulärer Milchsäure und einer Blockade des Efflux des über die Glykolyse produzierten [2,3-¹³C₂]Laktats. Für den Transport des Laktats sind protonenabhängige

Monocarboxylattransporter (MCTs) notwendig. Diese werden auf verschiedenen Immunzellen wie Monozyten und aktivierten T-Zellen exprimiert (192, 210). Eine intrazelluläre Akkumulation von Laktat resultierte in einer Inhibition der Glykolyse in CTLs. So konnte ein signifikanter Abfall des extrazellulären [2,3-¹³C₂]Laktats in den mit Milchsäure behandelten Zellen detektiert werden. Dieselben Beobachtungen konnten auch in humanen Monozyten gemacht werden (193). Durch die Inhibition der Glykolyse in den CTLs kommt es zu einer verminderten Ausführung der Effektorfunktionen. In der Literatur ist beschrieben, dass aktivierte CD8⁺ T-Zellen vermehrt aerobe Glykolyse betreiben, um ausreichend Energie für Zellwachstum, Proliferation und Effektorfunktionen zu generieren (200). Dies konnten wir in eigenen Experimenten bestätigen. So konnten wir beobachten, dass polyklonal stimulierte CD8⁺ T-Zellen eine um das 15-fache gesteigerte [2,3-¹³C₂]Laktatproduktion aufweisen als ruhende CD8⁺ T-Zellen. Interessanterweise konnten Cham *et al.* im Mausmodell auch zeigen, dass 2-Deoxyglukose, ein Inhibitor der Glykolyse, die Sekretion von IFN- γ in aktivierten T-Zellen supprimieren kann (211). Weiterhin hat diese Arbeitsgruppe berichtet, dass auch die Verfügbarkeit von Glukose für die Produktion von IFN- γ und somit für die Funktion und das Überleben der T-Zellen entscheidend ist (199). Ebenfalls wurde beschrieben, dass Laktat die Phosphofruktokinase-1 (PFK-1), ein in aktivierten T-Zellen hochreguliertes Schlüsselenzym der Glykolyse, inhibiert und die Dissoziation des aktiven PFK-1-Tetramers in das weniger aktive PFK-1-Dimer fördert (212).

Trotz der Tatsache, dass Milchsäure eine Ansäuerung des Mediums induziert und eine pH-Reduktion bekanntlich NK-Zellen und polymorphonukleäre Leukozyten inhibieren kann, konnte durch Ansäuerung des Mediums auf pH6.6 ausgeschlossen werden, dass die Inhibition der Glykolyse durch eine erhöhte Anzahl an Protonen induziert wurde (213, 214). Hierbei zeigte sich eine schwache Inhibition der Zytotoxizität in den CTLs, einhergehend mit einem leichten Abfall der Glykolyserate. Ebenso war eine leichte Reduktion der Glykolyse durch Laktat zu beobachten, die aber keine weiteren Auswirkungen auf die Effektorfunktionen in den CTLs hatte (192).

In weiteren Untersuchungen konnten wir beobachten, dass nach Exposition mit Milchsäure der Pentosephosphatweg in den CTLs vermehrt beschritten wird. Dieser Stoffwechselweg dient der Generation von Pentosen für die Nukleotidsynthese, ist Hauptquelle für NADPH und wird in T-Zellen nach Aktivierung angeschaltet (215). Dies spricht klar dafür, dass es durch Milchsäure zu einer selektiven Inhibition der Glykolyse kommt. Auch die Respiration der CTLs wurde durch Milchsäure inhibiert. Im Gegensatz dazu wurde in Monozyten gezeigt, dass eine Exposition mit Milchsäure zur vermehrten Respiration der Zellen führt (193). Das

bedeutet, dass der gesamte Energiehaushalt der CTLs durch Milchsäure zusammenbricht, und würde erklären, warum T-Zellen im Gegensatz zu Monozyten so extrem sensitiv gegenüber Milchsäure reagieren.

In weiteren Experimenten konnten wir zeigen, dass in ruhenden $CD8^+$ T-Zellen durch eine Exposition mit Milchsäure weniger Apoptose induziert werden kann als in polyklonal stimulierten $CD8^+$ T-Zellen. Als Grund hierfür vermuteten wir die niedrige Glykolyserate der ruhenden $CD8^+$ T-Zellen, welche durch Milchsäure nicht beeinflusst wurde. Nach Exposition mit Milchsäure wiesen die ruhenden $CD8^+$ T-Zellen sogar einen konzentrationsabhängigen Anstieg der $[2,3-^{13}C_2]$ Laktat-Konzentration auf. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die ruhenden $CD8^+$ T-Zellen keinen gesteigerten Glukosemetabolismus aufweisen und somit weniger durch Milchsäure angreifbar sind (200). Eine weitere Möglichkeit für die verringerte Sensitivität könnte die verminderte Expression des Monocarboxylattransporters-1 (MCT-1) auf ruhenden $CD8^+$ T-Zellen sein (192). Über MCT-1 kann Laktat im Kotransport mit Protonen in und aus den T-Zellen transportiert werden. In diesem Zusammenhang wurde nicht analysiert, ob die Milchsäure auch tatsächlich in die ruhenden $CD8^+$ T-Zellen importiert werden konnte.

Tumore werden jedoch nicht nur von $CD8^+$ T-Zellen, sondern auch von $CD4^+$ T-Helferzellen und regulatorischen $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ T-Zellen infiltriert (31, 61, 63, 64). So stellte sich die Frage, ob $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ T-Zellen, die bekanntermaßen tumorspezifische T-Zellantworten supprimieren können, weniger sensitiv auf Milchsäure reagieren. Unsere Experimente zeigten, dass in $CD4^+ CD25^+$ Treg-Zellen durch Milchsäure keine Verminderung der Glykolyse induziert werden kann, wohingegen die $CD4^+$ T-Helferzellen eine Reduktion des extrazellulären $[2,3-^{13}C_2]$ Laktats aufwiesen, vergleichbar mit $CD8^+$ T-Zellen. Dies geht einher mit der Beobachtung, dass Treg-Zellen auch in ihren suppressiven Eigenschaften wenig von hohen Dosen extrazellulären Laktats beeinflusst werden. Ein Grund hierfür könnte nach unseren Ergebnissen ein niedriger Glukoseverbrauch sein bzw. eine mangelnde Expression des Monocarboxylattransporters MCT-1, der einen Import von Laktat/ H^+ in die Zellen ermöglicht.

4.2 Einfluss von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) auf humane T-Zellen

In verschiedenen Tumoren, wie dem malignen Melanom, findet man im Vergleich zum Normalgewebe eine reduzierte Expression der Methylthioadenosin Phosphorylase (MTAP), wodurch es intratumoral zu einer Anreicherung des Tumormetaboliten 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) kommen kann (110). Im malignen Melanom konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von MTAP zu einer gesteigerten Invasivität und Metastasierung führt (120). In aktuellen Studien wird berichtet, dass MTA die Expression von Metalloproteinasen sowohl in Tumorzellen als auch in Tumor-assoziierten Fibroblasten induziert, und somit die Tumorprogression fördern kann (125). Des Weiteren belegen Untersuchungen im Tiermodell, dass MTA die Proliferation von Lymphozyten und eine inflammatorische Antwort in der Leber supprimieren kann (128, 216). Die immunsuppressiven Einflüsse von MTA auf humane T-Zellen sind noch weitgehend unbekannt.

4.2.1 Effekte von MTA auf humane CD8⁺ T-Zellen

In ersten Experimenten, die den *in vitro* Einfluss von MTA auf CTLs untersuchen sollten, konnten wir zeigen, dass die Aktivierung von MART-1 spezifischen CTLs durch MTA inhibiert wird. Doch wiesen die MTA-behandelten T-Zellen keine Unterschiede in der Expression von CD45RA, CD8, CD28 und TCR $\alpha\beta$ auf, was dafür spricht, dass MTA zum einen keine Änderungen in der Reifung der CD8⁺ T-Zellen induziert und zum anderen die antigen-spezifische Erkennung über den T-Zellrezeptor (TCR, *T cell receptor*) normal verläuft. Eine antigen-spezifische Erkennung über den TCR hat eine Internalisierung des Rezeptors zur Folge. Diese Internalisierung des Komplexes wird mit der Signaltransduktion ins Zellinnere nach Aktivierung der Proteinkinasen in Verbindung gebracht. Die Tatsache, dass MTA keinen Effekt auf die Internalisierung des TCR hat, weist darauf hin, dass die CTLs zwar aktiviert werden, aber wahrscheinlich weitere Schritte in der Signaltransduktion, die beispielsweise zur Expression von CD25 führen, inhibiert werden. Darüber hinaus führt MTA zur Beeinträchtigung der Effektorfunktionen der CTLs, die die Synthese von Zytokinen und Effektormolekülen betreffen. Weiterhin war die zytotoxische Kapazität der MART-1-spezifischen CTLs stark herabgesetzt. Dies war weniger auf eine verminderte Expression der

Effektormoleküle Granzyme-B und Perforin zurück zu führen, sondern auf eine reduzierte Expression des Degranulationsmarkers CD107a (LAMP-1, *lysosome associated membrane protein*). CD107a kann nur auf der Oberfläche detektiert werden, wenn die sekretorischen Lysosomen mit Granzyme-B und Perforin nach Aktivierung zur Zellmembran transportiert werden (217). Die Beobachtung, dass MTA zu einer reduzierten Degranulation führt, stimmt mit Berichten aus der Literatur überein, dass die lytische Kapazität der TILs in den Tumoren oft defizient ist und dies einhergehen kann mit der Unfähigkeit der TILs, die lytischen Granulae frei zu setzen (50, 52). Ebenso ist aus der Literatur bekannt, dass MTA humane NK-Zellen in ihrer Zytotoxizität inhibieren kann und B-Zellen daran hindert, Immunglobuline zu synthetisieren (128, 129). Die Suppression der Effektorfunktionen von humanen und murinen tumorantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen konnte auch unter dem Einfluss von anderen Tumormetaboliten, wie Milchsäure, Adenosin und Kynureninderivaten gezeigt werden (192, 218, 219). Im Gegensatz zu Milchsäure, welche bereits bei geringer Konzentration zur Apoptose der T-Zellen führt, wurde in den MTA-behandelten T-Zellen kaum Apoptose nachgewiesen. Die nicht-toxische Wirkung von MTA auf humane T-Zellen wurde bereits von Wolford *et al.* beschrieben (220). Auch im Fall von Kynureninderivaten konnte *in vitro* eine vermehrte Apoptose von über 40% in murinen mit einer Th1-Antwort assoziierten T-Zellen detektiert werden, nicht aber in Th2-Zellen (221). Weiterhin ist aus der Literatur bekannt, dass Milchsäure, Adenosin und Kynureninderivate die Proliferation von humanen und murinen T-Zellen sowohl nach mitogener als auch nach antigener Stimulation inhibieren können (94, 192, 204). Unsere Daten zeigen, dass MTA bereits bei einer Konzentration von 100µM die Proliferation sowohl von mitogen stimulierten als auch von allogenen und polyklonal aktivierten CD8⁺ T-Zellen inhibiert. Durch die Verwendung des Proliferationsmarkers Ki-67, der nur in der G1-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, konnte deutlich veranschaulicht werden, dass die CD8⁺ T-Zellen in der G0-Phase arretiert bleiben. Ebenso konnten wir beobachten, dass zu einer Proliferationshemmung polyklonal stimulierter CD8⁺ T-Zellen höhere Konzentrationen an MTA nötig waren als für allogene stimulierte CD8⁺ T-Zellen. Wir führten dies auf den enorm starken polyklonalen Stimulus zurück. Diese Ergebnisse konnten die Beobachtungen aus anderen Arbeitsgruppen bestätigen. Demzufolge konnten Wolford *et al.* (220) beobachten, dass MTA murine T- und B-Zellen in ihrer Proliferation inhibierte, was von anderen Arbeitsgruppen im Fall von Lymphozyten aus der Ratte und dem Menschen bestätigt werden konnte (128, 131). In diesem Zusammenhang konnten Christa *et al.* (131) im Tiermodell zeigen, dass die Inhibition durch MTA am stärksten war, wenn MTA parallel mit dem Stimulator Concanavalin A zu den Lymphozyten

zugegeben wurde. Ebenso war nur eine Inhibition der T-Zellproliferation durch Kynureninderivate zu beobachten, wenn diese innerhalb von 36 Stunden nach Aktivierung mit PHA zugegeben wurden (94). Wir konnten ebenso in ersten Versuchen beobachten, dass die MTA-Suppression stark vom Aktivierungsstatus der T-Zellen abhängig ist. Dies würde bedeuten, dass die Inhibition durch MTA nur in einer frühen Phase der T-Zellaktivierung geschehen kann.

In weiteren Experimenten konnten wir zeigen, dass die MTA-induzierte T-Zellsuppression reversibel ist. Durch einfaches Auswaschen des Metaboliten und erneuter Aktivierung konnten die CD8⁺ T-Zellen wieder zur Proliferation angeregt werden. Diese Beobachtung stimmt mit publizierten Daten überein (127, 222). Hier ist besonders die Arbeit von Ferro *et al.* (127) zu erwähnen, die zeigen konnten, dass die Hemmung durch MTA in Lymphozyten reversibel ist, nicht aber die Hemmung durch das Analogon 5'-Methylthiotubercidin, einem Inhibitor der MTAP. Diese Beobachtung ist im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Ansatz zur Rekonstitution der T-Zellaktivität durch Modulation des MTA-Metabolismus von großer Bedeutung. Die Reversibilität der Metaboliten-vermittelten T-Zellsuppression würde auch erklären, dass TILs die Tumorzellen *in vivo* zwar nicht eliminieren können, nach *ex vivo* Aufreinigung aber hohe lytische Aktivitäten aufweisen (223). Ferner konnten unsere Versuche zeigen, dass die *in vitro* Induktion einer tumorantigen-spezifischen Immunantwort bereits durch geringe Konzentrationen an MTA komplett inhibiert werden kann. Dabei wiesen die MTA-supprimierten CD8⁺ T-Zellen nach einer mehrwöchigen Stimulation weiterhin einen naiven Phänotyp (CD45RA⁺ CD62L⁺ und CD28⁺ CD27⁺) auf. Im Tumorstroma ist die Interaktion zwischen Tumor-assoziierten DCs und CD8⁺ T-Zellen häufig gestört (224). Dort sind dann unreife CD1a⁺ DCs nachzuweisen, welche aufgrund fehlender kostimulatorischer Moleküle T-Zellen nicht aktivieren können. Im Gegensatz dazu konnten wir zeigen, dass die MTA-vermittelte Suppression tumorantigen-spezifischer T-Zellen nicht indirekt durch DCs moduliert wird, da diese auch nach Exposition mit MTA einen reifen Phänotyp mit einer ausreichenden Expression kostimulatorischer Moleküle, wie CD80, CD83 und CD86 aufwiesen. Außerdem war nach Inkubation mit MTA keine erhöhte Expression inhibitorischer Moleküle wie PD-L1, Fas-L oder B7-H3 nachweisbar.

4.2.2 Mechanismus der MTA-vermittelten Immunsuppression

Eine Wiederherstellung der antitumoralen T-Zellantwort konnte im Fall der toxischen Kynureninderivate durch eine Inhibition der im Tumor überexprimierten Indolamin-2,3-

Dioxygenase erzielt werden (95). Eine Akkumulation von MTA im Tumor resultiert aus einer Defizienz des Enzyms MTAP. Somit stehen theoretisch zwei Ansätze zur Rekonstitution der MTA-induzierten T-Zellsuppression zur Verfügung: entweder die Wiederherstellung der MTAP-Expression in den Tumorzellen oder eine Modulation der T-Zellen, sodass diese gegenüber einer Behandlung mit MTA unempfindlich werden.

Es wird kontrovers diskutiert, über welche Mechanismen MTA die inhibitorischen Einflüsse auf verschiedene Zellpopulationen ausübt (117). Die Arbeitsgruppe um Daly *et al.* (132) konnte über Bindungsstudien zeigen, dass MTA als Agonist der Adenosinrezeptoren A1 und A2 wirkt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Adenosin und dessen Analoga wie beispielsweise N-Ethylcarboxamidadenosin (NECA) humane und murine T-Zellen durch eine Bindung an Adenosinrezeptoren A2A und A2B und einer dadurch induzierten intrazellulären cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) - Erhöhung supprimieren können (204). Hohen intrazellulären cAMP-Konzentrationen werden immunsuppressive Effekte in T-Zellen zugeschrieben (201).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Adenosin, NECA, Forskolin sowie MTA konzentrationsabhängig die Proliferation von polyklonal stimulierten CD8⁺ T-Zellen inhibieren. Dabei führte Forskolin, ein direkter Aktivator der Adenylatcyclase, bereits bei einer Konzentration von 50µM zu einer über 75%-igen Inhibition der T-Zellproliferation, während die 5- bis 10-fach höhere Konzentration an MTA, Adenosin und NECA nötig waren. Wie bereits aus der Literatur bekannt induziert Forskolin und NECA einen signifikanten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in CD8⁺ T-Zellen. Durch MTA kam es zu einer 50%-igen Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration in den CD8⁺ T-Zellen. Dieser Befund stimmt mit den publizierten Daten nicht überein, dass MTA die Phosphodiesterase hemmt und somit in einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration resultiert (130, 131). Da in diesen Publikationen zum einen Lymphozyten aus der Ratte und zum anderen Lymphomzellen aus der Maus verwendet wurden, spekulieren wir, dass die MTA-vermittelte Suppression in verschiedenen Spezies unterschiedlich reguliert wird. Dass die MTA-vermittelte Suppression nicht über einen cAMP-abhängigen Mechanismus induziert wird, wurde erstmals von Fredholm *et al.* (129) beschrieben. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die zytotoxische Aktivität von humanen NK-Zellen *in vitro* stark durch MTA inhibiert wird. Sie führten die beobachteten Effekte von MTA auf eine Inhibition der Adenosylhomocystein Hydrolase und einer dadurch resultierenden Hemmung von Methyltransferasen zurück. Dieser Wirkmechanismus von MTA wurde auch von anderen

Arbeitsgruppen aufgegriffen (134, 225) und wird aktuell auch in unserer Arbeitsgruppe untersucht.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die MTA-vermittelte T-Zellsuppression nicht über eine Bindung von MTA an Adenosinrezeptoren, sondern durch einen Transport des Nucleosids in die T-Zellen induziert wird. Wir haben beobachtet, dass durch Inhibition des Nucleosidtransports über Dipyridamol die Adenosin-vermittelte T-Zellsuppression aufgehoben werden kann, nicht aber die MTA-vermittelte Inhibition von T-Zellen. Dies bedeutet, dass MTA nicht über Nucleosidtransporter in die Zelle gelangt. Alternativ könnten entweder unbekannte Transporter MTA in die Zelle bringen oder das hydrophobe Molekül diffundiert frei in die Zelle. Diese Ergebnisse gehen mit Daten von Iizasa *et al.* (226) einher, dass die Nucleosidtransport-Inhibitoren Nitrobenzylthioinosin und Dipyridamol die Aufnahme und Sekretion von MTA in WI-L2 Lymphoblasten und DHL-9 Lymphomzellen *in vitro* nicht beeinflussen. Im Gegensatz dazu konnten jedoch Stöckler *et al.* (227) zeigen, dass der Influx von MTA in humane HL-60 Leukämiezellen durch Dipyridamol inhibiert wird, aber der Großteil des Transports von MTA in die Zellen passiv durch Diffusion geschieht. Diese Daten weisen darauf hin, dass der Transport von MTA in die Zellen Zelltyp-spezifisch reguliert wird. In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob weitere Nucleosidtransport-Inhibitoren den Transport von MTA in die Zelle reduzieren und somit die T-Zellsuppression verhindern können.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass eine Behandlung der T-Zellen mit EHNA [Erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)adenin Hydrochlorid], einem Inhibitor der Adenosindeaminase (ADA), keinen additiven Effekt auf die MTA-vermittelte T-Zellsuppression hat. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Suppression der T-Zellen durch MTA selbst und nicht durch dessen Abbauprodukt Adenin induziert wird. Diese Resultate stimmen mit den publizierten Daten mit Maus-Fibroblasten überein und deuten darauf hin, dass die Immunsuppression allein auf eine Modulation der T-Zellen durch MTA zurückzuführen ist (228). Im Gegensatz dazu konnten wir durch eine Behandlung mit EHNA die Adenosin-vermittelte T-Zellsuppression steigern. EHNA kann die Degradation von Adenosin durch ADA verhindern. Eine genetische Defizienz dieses Enzyms kann mit einer B- und T-Zell-Immundefizienz in Verbindung gebracht werden, da die Zellen nicht in der Lage sind, das immunsuppressive Adenosin abzubauen (204, 229).

Die Tatsache, dass MTA nicht nur die Proliferation der T-Zellen sondern auch deren Effektorfunktionen stark beeinträchtigt, spricht dafür, dass MTA die Signaltransduktion in T-Zellen beeinflusst. Bei der T-Zellaktivierung spielen nicht nur Proteinphosphorylierungen,

sondern auch andere post-translationale Modifikationen eine wesentliche Rolle. In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass eine Kostimulation über CD28 Argininmethylierungen induziert, die für eine vollständige T-Zellantwort zwingend notwendig sind (230). Dabei konnte gezeigt werden, dass MTA die Proteinmethylierung nach Aktivierung verhindert. Dies geht mit früheren Daten von Williams-Ashman und Fredholm (116, 129) einher, dass MTA über eine Hemmung der S-Adenosylhomocystein Hydrolase Proteinmethylierungen supprimiert. Ein weiterer möglicher Wirkmechanismus von MTA könnte eine Inhibition der Polyaminsynthese sein, doch konnte hier die MTA-Suppression der Proliferation von Fibroblasten durch externe Zugabe von Spermidin nicht kompensiert werden (116, 228). Inwieweit die diskutierten Mechanismen zur Suppression der humanen CD8⁺ T-Zell-Antwort beitragen, muss in weiteren Versuchen gezeigt werden.

4.3 Zusammenhang zwischen Immunzellinfiltration und Glykolyse im Nierenzellkarzinom

Die Ergebnisse intensiver Forschung der letzten Jahre sprechen dafür, dass der dysregulierte Glukosestoffwechsel nicht nur die Proliferation und Metastasierung der Tumorzellen steigert, sondern dass Tumorzellen auch Selektionsvorteile unter hypoxischen Bedingungen haben, was eine Voraussetzung für die Karzinogenese darstellt (137, 231). Strukturelle Änderungen und/oder eine erhöhte Expression von Onkogenen wie c-myc, KRAS/BRAF oder Mutationen im Tumorsuppressorgen VHL (von Hippel-Lindau), die im Zellwachstum und in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen, stellen die molekulare Basis des Warburg-Effektes dar und führen zur Hochregulation von Genen, die am Glukosemetabolismus beteiligt sind.

Eines dieser Gene kodiert für die Laktatdehydrogenase A (LDHA), welche die Reduktion von Pyruvat zu Laktat katalysiert. In dieser Arbeit konnte zunächst in verschiedenen RCC-Zelllinien eine erhöhte Expression von LDHA auf mRNA-Ebene gezeigt und diese mit vermehrter Laktatsekretion assoziiert werden. Darüber hinaus war die mRNA-Expression der LDHA, des Glukosetransporters GLUT-1 und des Monocarboxylattransporters MCT-1 auch in Biopsien von primären RCC-Tumoren im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe erhöht. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Tumoren eine reduzierte Expression der LDHB, dem Isoenzym der LDHA, welches die Oxidation von Laktat zu

Pyruvat katalysiert. Diese Resultate stimmen mit den Daten von Suganuma *et al.* (232) überein, die ebenso über qPCR eine Hochregulation von LDHA im hellzelligen RCC detektieren konnten, während im chromophoben RCC die Expression von GLUT-4 erhöht war. Dabei konnte im Gegensatz dazu im papillären Subtyp und im Onkozytom keine gesteigerte Expression von GLUT-1 beobachtet werden.

In weiteren Analysen konnten wir mittels immunhistochemischer Färbungen an Tissuemicroarrays von 249 RCC-Patienten beobachten, dass GLUT-1 im hellzelligen und im chromophoben RCC-Subtyp im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe signifikant höher exprimiert war. Diese Resultate gehen einher mit den Daten aus der Literatur, wobei in diesen Analysen die GLUT-1 Expression im Tumor nicht mit der im normalen Nierengewebe verglichen wurde (158, 233). Dennoch konnten Lidgren *et al.* (233) darlegen, dass die Expression von GLUT-1 signifikant mit HIF-1 α im hellzelligen RCC korrelierte. Dies kann dadurch erklärt werden, dass HIF-1 α über das Tumorsuppressorprotein pVHL reguliert wird, welches im hellzelligen RCC zumeist defizient ist. HIF-1 α reguliert aber nicht nur GLUT-1, sondern auch andere Gene, die an der aeroben Glykolyse beteiligt sind wie beispielsweise die LDHA.

Um die RNA-Daten der LDHA-Expression auf Proteinebene zu bestätigen, wurden die TMAs mit einem Antikörper gegen LDH5 gefärbt. LDH5 besteht aus 4 LDHA-Untereinheiten. Auch hier zeigte sich eine deutliche Überexpression des Enzyms im hellzelligen RCC im Vergleich zu den anderen RCC-Subtypen und dem korrespondierenden Normalgewebe, bestehend aus Parenchym, proximalen und distalen Tubuli. In diesem Zusammenhang konnten bereits Unwin *et al.* (167) in proteomischen Analysen eine Hochregulation von LDHA und anderer Glykolyse-assoziiierter Enzyme wie Aldolase, Pyruvatkinase M2 oder Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase im RCC beobachten. Diese Daten sprechen dafür, dass im hellzelligen RCC der Energiehaushalt der Tumorzellen hauptsächlich über aerobe Glykolyse und nicht über oxidative Phosphorylierung gewonnen wird. Dementsprechend konnten Gao *et al.* (234) eine Erhöhung der LDH mit erhöhten Laktatkonzentrationen im Serum von RCC-Patienten assoziieren.

Wir konnten zeigen, dass Milchsäure, das Endprodukt der Glykolyse, die Aktivierung und Proliferation humaner CD8⁺ T-Zellen inhibiert, wobei Milchsäure in hoher Dosis Apoptose in den CD8⁺ T-Zellen induziert (192). Um zu untersuchen, ob der glykolytische Phänotyp im RCC möglicherweise einen Einfluss auf die Immunezellinfiltration und/oder -aktivierung hat, wurde die Frequenz der CD3⁺, CD8⁺ und FOXP3⁺ T-Zellen in den TMAs mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht.

Aus der Literatur ist bekannt, dass das Nierenzellkarzinom, vor allem der hellzellige Subtyp, ein hoch immunogener Tumor ist. Es wird spekuliert, dass die hohe T-Zell-Infiltration ein Grund für das zum Teil gute Ansprechen auf Zytokintherapien bzw. die relativ hohe Rate an spontanen Regressionen ist. Dennoch konnte im RCC die hohe Immunzellinfiltration nicht mit einem besseren Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht werden (46, 47), so wie es für andere Tumorentitäten wie dem Kolonkarzinom, beschrieben wurde (39, 42). Daraus kann man schließen, dass im RCC *Immune Escape* Mechanismen eine sehr wichtige Rolle spielen (235).

Wir konnten im hellzelligen und papillären RCC-Subtyp eine signifikant höhere CD3⁺ Infiltration ausmachen als in den korrespondierenden normalen Nierengewebe. Bei genauerer Betrachtung des T-Zellinfiltrats stellte sich heraus, dass es sich hauptsächlich um CD8⁺ T-Zellen handelte, wobei aber auch FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen in allen Subtypen detektiert werden konnten. Dieser Befund stimmt mit publizierten Daten überein, wonach im RCC eine gleichzeitige Infiltration von Effektor - und regulatorischen T-Zellen beobachtet wird (236). Weiterhin haben wir beobachtet, dass die Effektormoleküle Granzyme-B und Perforin in den intratumoralen CD8⁺ T-Zellen geringer als in den entsprechenden Normalgewebe exprimiert werden. Dies würde dafür sprechen, dass es sich bei den TILs um funktionell inaktive CTLs handelt.

Wir stellten uns nun die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Immunzellinfiltration und dem veränderten Metabolismus in den Tumoren besteht. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Expression von GLUT-1 invers mit der Anzahl der CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen im hellzelligen RCC korrelierte. Ebenso konnten zwischen der tumoralen GLUT-1 Expression und der Anzahl der Tumor-infiltrierenden Granzyme-B⁺ bzw. Perforin⁺ T-Zellen, aber nicht der FOXP3⁺ T-Zellen, im Tumor ein nicht-signifikanter Zusammenhang hergestellt werden. Auch die Expression von LDH5 im Tumor konnte mit einer geringeren CD3⁺ T-Zellinfiltration assoziiert werden. Diese Daten demonstrieren zum ersten Mal, dass der dysregulierte Glukosemetabolismus im hellzelligen RCC die Anzahl der infiltrierenden T-Zellen und deren Aktivierung moduliert.

Nicht nur hoch proliferierende Tumorzellen haben einen erhöhten Bedarf an Nährstoffen, sondern auch aktivierte, proliferierende T-Zellen weisen eine gesteigerte Glukoseaufnahme und Glykolyse auf (199). Durch eine Kompetition um Glukose zwischen den Tumorzellen und den TILs kann ein Entzug des Nährstoffes eine Suppression der Effektorfunktionen von CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen induzieren. Wie bereits unter 3.1.3 beschrieben, weisen regulatorische FOXP3⁺ T-Zellen eine niedrigere Glykolyserate im Gegensatz zu aktivierten CD8⁺ T-Zellen

auf, wodurch sie für einen Glukoseentzug weniger empfänglich wären. Zusätzlich konnte eine erhöhte LDH5-Expression im Tumor mit einer verminderten CD3⁺ Infiltration in Verbindung gebracht werden, was dafür spricht, dass auch das Endprodukt der Glykolyse, das Laktat, die T-Zellen in der Tumorumgebung moduliert.

Wenn man davon ausgeht, dass eine gesteigerte Glykolyserate in den Tumorzellen eine Gemeinsamkeit vieler Tumore darstellt, kann daraus gefolgert werden, dass der „glykolytische Phänotyp“ einen wichtigen Parameter in der Regulation der Immunzellinfiltration darstellt. Eine erhöhte Abhängigkeit der Tumorzellen von der Glykolyse bietet natürlich auch neue Therapieoptionen (175). Zusammenfassend kann man sagen, dass eine pharmakologische Modulation des Glukosemetabolismus nicht nur die direkt Tumorzellen betreffen würde, sondern auch eine gesteigerte T-Zellantwort gegen den Tumor induzieren könnte.

4.4 Die Rolle des MTA-Metabolismus im RCC

Die Bedeutung der Methylthioadenosin Phosphorylase (MTAP) - Defizienz und dessen prognostische Relevanz wurde sowohl in soliden Tumoren als auch in hämatologischen Neoplasien beschrieben (110-112). MTAP nimmt im Methionin - und Polyaminstoffwechsel eine Schlüsselposition ein: so katalysiert es die Spaltung von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) zu Adenin und Methylthioribose-1-Phosphat. In dieser Arbeit konnte zunächst auf mRNA-Ebene in verschiedenen RCC-Zelllinien eine reduzierte Expression von MTAP gezeigt und diese mit vermehrter MTA-Sekretion assoziiert werden. Diese Resultate gehen einher mit den Daten von Strefford *et al.* (237), die in zytogenetischen Analysen in 11 von 19 (58%) RCC-Zelllinien einen Verlust von MTAP detektieren konnten. Darüber hinaus konnte bereits in den 80er Jahren eine Assoziation zwischen MTAP-Defizienz und MTA-Sekretion in leukämischen Zelllinien und in aktuellen Studien in malignen Melanomzellen beschrieben werden (124, 125). So weisen unsere und die bereits publizierten Ergebnisse darauf hin, dass in MTAP-defizienten Zellen MTA nicht intrazellulär akkumuliert, sondern nach aussen sekretiert wird.

In weiteren Analysen konnten wir durch immunhistochemische Färbungen an Tissuemicroarrays von 249 RCC-Patienten nachweisen, dass die MTAP-Expression im RCC im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe signifikant herunterreguliert ist. Die MTAP-Expression war in den malignen Zellen entweder nicht vorhanden oder reduziert,

während in den Nierentubuli und -glomeruli eine starke zytoplasmatische MTAP-Expression beobachtet werden konnte. Darüber hinaus konnte zwischen den verschiedenen RCC-Subtypen kein Unterschied in der MTAP-Expression detektiert werden. Das Gen für MTAP liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zu Genen für die Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p16^{INK4a} und p15^{INK4b}, die in Tumoren sehr oft deletiert sind (114). So konnten Ikuerowo *et al.* (238) im RCC beschreiben, dass es aufgrund einer Hypermethylierung des Promotors oder homozygoten Deletionen bzw. Mutationen zur Defizienz von p16^{INK4a} kommt. Eine Abwesenheit von p16^{INK4a} konnte mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert werden. In diesem Kontext soll in weiteren Versuchen geklärt werden, ob die im RCC beobachtete MTAP-Defizienz ebenso aus einer Hypermethylierung oder aus einer genomischen Defizienz resultiert.

In weiteren Untersuchungen konnten wir keine Zusammenhänge zwischen MTAP-Expression und der Frequenz bzw. dem Aktivierungsstatus der infiltrierenden Lymphozyten beobachten. Es wäre sicherlich von großem Interesse, zu untersuchen, ob die MTAP-Defizienz im RCC mit einer reduzierten Expression von IFN-induzierbaren APM-Komponenten wie z.B. der Immunoproteasom-Komponenten LMP-2, -7 und -10 oder MHC-Klasse-I-Molekülen in Verbindung gebracht werden kann (68). Dies würde auch die Tatsache erklären, dass kein Zusammenhang zwischen Immuninfiltration und MTAP-Defizienz beobachtet werden konnte, aber doch keine Tumorantigen-spezifische Immunantwort existiert. Ebenso wäre von Interesse, ob sich auch im RCC, wie im Melanom oder hepatozellulären Karzinom eine verminderte MTAP-Expression *in vitro* mit gesteigerter Invasivität der Tumorzellen in Verbindung bringen lässt (125, 239). Deshalb sollte in weiteren Experimenten geklärt werden, ob in MTAP-intakten und -defizienten RCC-Tumorzelllinien Unterschiede in der Expression von progressionsfördernden Faktoren existieren.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Rolle von Tumormetaboliten bei der adaptiven Immunantwort gegen Tumore ist in den letzten Jahren zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Maligne entartete Zellen sind in der Lage, sich durch Modulation ihres Metabolismus gegenüber dem umgebenden Gewebe Wachstumsvorteile zu verschaffen. So kommt es beispielsweise durch Überexpression von Enzymen im Aminosäure - oder Lipidstoffwechsel zur Depletion

essentieller Moleküle für die Immunzellen oder zur Akkumulation toxischer Zwischenprodukte.

Seit Warburg ist bekannt, dass solide Tumore vermehrt aerobe Glykolyse betreiben, das heißt, dass ihre Energie hauptsächlich aus der Reduktion von Pyruvat zu Laktat über die Laktatdehydrogenase gewonnen wird. Dadurch kommt es in der Tumorumgebung zur Akkumulation des Stoffwechselmetaboliten Laktat. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Milchsäure (das protonierte Laktat) die Funktion humaner CTLs stark beeinträchtigt. Massenspektrometrische Analysen haben ergeben, dass Milchsäure, aber nicht das Laktat(salz) in die Zellen transportiert werden kann. Da aktivierte T-Zellen eine erhöhte Glykolyserate aufweisen und somit vermehrt Laktat produzieren, wird postuliert, dass hohe extrazelluläre Milchsäure-Konzentrationen den Export von Laktat nach aussen inhibieren und dadurch eine metabolische Blockade induzieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, über massenspektrometrische Untersuchungen zu analysieren, inwieweit die Glykolyse in aktivierten T-Zellen in Anwesenheit von Milchsäure beeinflusst wird und ob eine Aktivierung alternativer Stoffwechselwege erfolgt. Wir konnten zeigen, dass eine Exposition von T-Zellen mit Milchsäure zu einer Akkumulation von intrazellulärem Laktat führt. Zudem kommt es zu einer signifikanten Reduktion des nach aussen sekretierten Laktats. So kann man daraus folgern, dass Milchsäure die Glykolyse in T-Zellen stark inhibiert, wobei der Pentosephosphatweg aktiviert wird. Weitere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der gesamte Energiehaushalt der Zellen herunterreguliert wird, was in einer verminderten Respiration und niedrigeren intrazellulären ATP-Konzentrationen zum Ausdruck kommt. Zudem gelang der Nachweis, dass ruhende $CD8^+$ T-Zellen und regulatorische $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen weniger sensitiv gegenüber Milchsäure als aktivierte antigen-spezifische oder polyklonal stimulierte $CD8^+$ T-Zellen sind. Wir führen dies auf eine geringere Glykolyserate in ruhenden $CD8^+$ und regulatorischen $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen zurück.

Tumorzellen können auch einen dysregulierten Aminosäure - und Nukleotidstoffwechsel aufweisen. So wurde in vielen Tumoren eine Defizienz der Methylthioadenosin Phosphorylase (MTAP) nachgewiesen, was mit einer extrazellulären Akkumulation von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) einhergeht. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass durch MTA die Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität von humanen zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen stark supprimiert wird. Dabei konnte die inhibitorische Wirkung von MTA auf T-Zellen sowohl nach mitogener, polyklonaler als auch nach antigen-spezifischer Stimulation beobachtet werden. Darüber hinaus ist der suppressive Effekt von

MTA gegenüber T-Zellen nicht durch eine direkte toxische Wirkung bedingt und ist nach Entzug von MTA reversibel. Außerdem konnte ausgeschlossen werden, dass die MTA-vermittelte Suppression nicht indirekt über Modulation von dendritischen Zellen induziert wird. Wir haben anschließend den Mechanismus der MTA-vermittelten Suppression untersucht. So konnten wir zeigen, dass die T-Zellantwort durch MTA über einen cAMP-unabhängigen Mechanismus supprimiert wird. Des Weiteren konnten wir demonstrieren, dass MTA seine inhibitorische Wirkung nicht über einen Abbau zu Adenin erreicht. Mögliche Angriffspunkte wie der Transport von MTA in die T-Zellen über Nukleosidtransporter konnten ausgeschlossen werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Relevanz der *in vitro* beobachteten inhibitorischen Effekte von Milchsäure und MTA auf humane T-Lymphozyten *in vivo* untersucht. Als Modell diente das Nierenzellkarzinom (RCC, *renal cell carcinoma*), das durch eine sehr hohe Immunzellinfiltration und eine hohe Glykolyserate charakterisiert ist. Zunächst konnte in RCC-Zelllinien eine vermehrte Expression der Laktatdehydrogenase A (LDHA) mit einer gesteigerten Laktatsekretion assoziiert werden. Ferner konnten wir über qPCR-Analysen zeigen, dass die Expression der LDHA, des Glukosetransporters GLUT-1 und des Monocarboxylattransporters MCT-1 auch in Biopsien von primären Nierenzellkarzinomen im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe erhöht war. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Tumoren eine reduzierte Expression der LDHB, dem Isoenzym der LDHA, welches die Oxidation von Laktat zu Pyruvat katalysiert. In weiteren Analysen konnten wir an Tissuemicroarrays (TMAs) von 249 RCC-Patienten immunhistochemisch nachweisen, dass GLUT-1 und LDH5 im hellzelligen RCC-Subtyp im Vergleich zum Normalgewebe signifikant überexprimiert waren. Weiterhin konnte in dieser Arbeit erstmals eine inverse Korrelation zwischen der Expression von GLUT-1/LDH5 und der Frequenz der CD3⁺ T-Zellen dargestellt werden. Eine mögliche Ursache für eine geringere Immunzellinfiltration in GLUT-1/LDH5-stark exprimierenden Tumoren wäre zum einen eine Konkurrenz um Glukose, zum anderen die Akkumulation des Endprodukts der Glykolyse, des Laktats, welches die Proliferation von T-Zellen inhibiert.

Außerdem konnte in RCC-Zelllinien eine verminderte MTAP-Expression mit vermehrter MTA-Sekretion assoziiert werden. Immunhistochemische Analysen an TMAs zeigten, dass die MTAP-Expression in allen RCC-Subtypen im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe signifikant erniedrigt war. Eine Korrelation mit der Frequenz und/oder Aktivierungsstatus der tumorinfiltrierenden Immunzellen mit der MTAP-Expression konnte nicht hergestellt werden.

Der Metabolismus von Tumorzellen unterscheidet sich zum Teil deutlich von den entsprechenden nicht-malignen Zellen. So ermöglicht beispielsweise die verstärkte Glykolyse in vielen Tumoren eine Anpassung an tumorale Veränderungen und führt zu uneingeschränkter Proliferation. Zudem verändern tumorspezifische Metabolite das Tumorstroma, führen zu einer Suppression der Immunantwort und fördern so die Progression der Tumore. Außerdem weisen Tumore mit einem veränderten Metabolismus ein geringeres Ansprechen auf Zytostatika bzw. Immuntherapien auf. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, kommt es im Tumor zur Hochregulation von Schlüsselenzymen wie LDHA. Eine erhöhte Abhängigkeit der Tumorzellen von der Glykolyse und anderen Stoffwechselwegen bietet aber auch Zielstrukturen für neue Therapien. So konnte das Tumorwachstum in präklinischen Studien durch eine Inhibition der LDHA gehemmt werden. Ein weiterer viel versprechender Ansatz stellt die Hemmung der Pyruvatdehydrogenase Kinase 1 durch Dichloracetat dar. Hier laufen bereits erste klinische Studien. Darüber hinaus befinden sich zahlreiche Substanzen, die in andere dysregulierte Stoffwechselforgänge wie den Aminosäure-, Nukleotid- oder Lipidmetabolismus eingreifen, in (prä-)klinischen Studien.

Zusammenfassend stellt die Erforschung des Tumormetabolismus und dessen Wirkung auf das humane Immunsystem eine wichtige Voraussetzung für neue innovative Therapiekonzepte dar. Eine pharmakologische Modulation des Tumormetabolismus würde nicht nur eine direkte antiproliferative Wirkung gegen Tumorzellen auslösen, sondern auch zu einer Reaktivierung tumor-spezifischer Immunantworten führen. Eine weitere Erforschung von Tumormetaboliten und deren pleiotrope Effekte auf das Immunsystem und das Tumorstroma ist wünschenswert, da das Verständnis verschiedener Mechanismen für eine erfolgreiche Anitumortherapie essentiell ist.

5. Literaturverzeichnis

1. Appleman, L.J., and V.A. Boussiotis. 2003. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 192:161-180.
2. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
3. Maffei, A., K. Papadopoulos, and P.E. Harris. 1997. MHC class I antigen processing pathways. *Hum Immunol* 54:91-103.
4. Trapani, J.A., and M.J. Smyth. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2:735-747.
5. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6:24-37.
6. Coussens, L.M., and Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867.
7. Pollard, J.W. 2004. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4:71-78.
8. Pardoll, D. 2001. T cells and tumours. *Nature* 411:1010-1012.
9. Burnet, F.M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1-27.
10. Thomas, L. 1982. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 55:329-333.
11. Kaplan, D.H., V. Shankaran, A.S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7556-7561.
12. Smyth, M.J., K.Y. Thia, S.E. Street, D. MacGregor, D.I. Godfrey, and J.A. Trapani. 2000. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192:755-760.
13. Shankaran, V., H. Ikeda, A.T. Bruce, J.M. White, P.E. Swanson, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111.
14. Shinkai, Y., G. Rathbun, K.P. Lam, E.M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A.M. Stall, and et al. 1992. RAG-2-deficient mice lack

- mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-867.
15. Dunn, G.P., A.T. Bruce, H. Ikeda, L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-998.
 16. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber. 2004. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22:329-360.
 17. Roithmaier, S., A.M. Haydon, S. Loi, D. Esmore, A. Griffiths, P. Bergin, T.J. Williams, and M.A. Schwarz. 2007. Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience. *J Heart Lung Transplant* 26:845-849.
 18. Boshoff, C., and R. Weiss. 2002. AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer* 2:373-382.
 19. Gatti, R.A., and R.A. Good. 1971. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 28:89-98.
 20. Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
 21. Vogelstein, B., and K.W. Kinzler. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138-141.
 22. Bhowmick, N.A., and H.L. Moses. 2005. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 15:97-101.
 23. Pardoll, D. 2003. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol* 21:807-839.
 24. Armstrong, A.C., D. Eaton, and J.C. Ewing. 2001. Science, medicine, and the future: Cellular immunotherapy for cancer. *Bmj* 323:1289-1293.
 25. Finn, O.J. 2003. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* 3:630-641.
 26. Van den Eynde, B.J., and P. van der Bruggen. 1997. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9:684-693.
 27. June, C.H. 2007. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *J Clin Invest* 117:1204-1212.
 28. Yee, C., J.A. Thompson, D. Byrd, S.R. Riddell, P. Roche, E. Celis, and P.D. Greenberg. 2002. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16168-16173.

29. Mackensen, A., N. Meidenbauer, S. Vogl, M. Laumer, J. Berger, and R. Andreesen. 2006. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 24:5060-5069.
30. Morgan, R.A., M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, M.S. Hughes, J.C. Yang, R.M. Sherry, R.E. Royal, S.L. Topalian, U.S. Kammula, N.P. Restifo, Z. Zheng, A. Nahvi, C.R. de Vries, L.J. Rogers-Freezer, S.A. Mavroukakis, and S.A. Rosenberg. 2006. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126-129.
31. Ioannides, C.G., and T.L. Whiteside. 1993. T cell recognition of human tumors: implications for molecular immunotherapy of cancer. *Clin Immunol Immunopathol* 66:91-106.
32. Mihm, M.C., Jr., C.G. Clemente, and N. Cascinelli. 1996. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest* 74:43-47.
33. Albers, A.E., R.L. Ferris, G.G. Kim, K. Chikamatsu, A.B. DeLeo, and T.L. Whiteside. 2005. Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer⁺ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites. *Cancer Immunol Immunother* 54:1072-1081.
34. Meidenbauer, N., A. Zippelius, M.J. Pittet, M. Laumer, S. Vogl, J. Heymann, M. Rehli, B. Seliger, S. Schwarz, F.A. Le Gal, P.Y. Dietrich, R. Andreesen, P. Romero, and A. Mackensen. 2004. High frequency of functionally active Melan-a-specific T cells in a patient with progressive immunoproteasome-deficient melanoma. *Cancer Res* 64:6319-6326.
35. Xiang, R., H.N. Lode, S.D. Gillies, and R.A. Reisfeld. 1999. T cell memory against colon carcinoma is long-lived in the absence of antigen. *J Immunol* 163:3676-3683.
36. Clemente, C.G., M.C. Mihm, Jr., R. Bufalino, S. Zurrada, P. Collini, and N. Cascinelli. 1996. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77:1303-1310.
37. Kohrt, H.E., N. Nouri, K. Nowels, D. Johnson, S. Holmes, and P.P. Lee. 2005. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Med* 2:e284.
38. Kornstein, M.J., J.S. Brooks, and D.E. Elder. 1983. Immunoperoxidase localization of lymphocyte subsets in the host response to melanoma and nevi. *Cancer Res* 43:2749-2753.

39. Naito, Y., K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura, and H. Ohtani. 1998. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58:3491-3494.
40. Sharma, P., Y. Shen, S. Wen, S. Yamada, A.A. Jungbluth, S. Gnjatic, D.F. Bajorin, V.E. Reuter, H. Herr, L.J. Old, and E. Sato. 2007. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3967-3972.
41. Zhang, L., J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P.A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M.N. Liebman, S.C. Rubin, and G. Coukos. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348:203-213.
42. Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, and F. Pages. 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960-1964.
43. Galon, J., W.H. Fridman, and F. Pages. 2007. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Cancer Res* 67:1883-1886.
44. Pages, F., A. Berger, M. Camus, F. Sanchez-Cabo, A. Costes, R. Molidor, B. Mlecnik, A. Kirilovsky, M. Nilsson, D. Damotte, T. Meatchi, P. Bruneval, P.H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, and J. Galon. 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353:2654-2666.
45. Kondo, T., H. Nakazawa, F. Ito, Y. Hashimoto, Y. Osaka, K. Futatsuyama, H. Toma, and K. Tanabe. 2006. Favorable prognosis of renal cell carcinoma with increased expression of chemokines associated with a Th1-type immune response. *Cancer Sci* 97:780-786.
46. Bromwich, E.J., P.A. McArdle, K. Canna, D.C. McMillan, A.M. McNicol, M. Brown, and M. Aitchison. 2003. The relationship between T-lymphocyte infiltration, stage, tumour grade and survival in patients undergoing curative surgery for renal cell cancer. *Br J Cancer* 89:1906-1908.
47. Webster, W.S., C.M. Lohse, R.H. Thompson, H. Dong, X. Frigola, D.L. Dicks, S. Sengupta, I. Frank, B.C. Leibovich, M.L. Blute, J.C. Cheville, and E.D. Kwon. 2006.

- Mononuclear cell infiltration in clear-cell renal cell carcinoma independently predicts patient survival. *Cancer* 107:46-53.
48. Van den Hove, L.E., S.W. Van Gool, H. Van Poppel, L. Baert, L. Coorevits, B. Van Damme, and J.L. Ceuppens. 1997. Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 109:501-509.
 49. Blohm, U., E. Roth, K. Brommer, T. Dumrese, F.M. Rosenthal, and H. Pircher. 2002. Lack of effector cell function and altered tetramer binding of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 169:5522-5530.
 50. Whiteside, T.L. 1999. Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy. *Cancer Immunol Immunother* 48:346-352.
 51. Zippelius, A., P. Batard, V. Rubio-Godoy, G. Bioley, D. Lienard, F. Lejeune, D. Rimoldi, P. Guillaume, N. Meidenbauer, A. Mackensen, N. Rufer, N. Lubenow, D. Speiser, J.C. Cerottini, P. Romero, and M.J. Pittet. 2004. Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res* 64:2865-2873.
 52. Radoja, S., M. Saio, D. Schaer, M. Koneru, S. Vukmanovic, and A.B. Frey. 2001. CD8(+) tumor-infiltrating T cells are deficient in perforin-mediated cytolytic activity due to defective microtubule-organizing center mobilization and lytic granule exocytosis. *J Immunol* 167:5042-5051.
 53. Finke, J.H., A.H. Zea, J. Stanley, D.L. Longo, H. Mizoguchi, R.R. Tubbs, R.H. Wiltrott, J.J. O'Shea, S. Kudoh, E. Klein, and et al. 1993. Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res* 53:5613-5616.
 54. Rabinowich, H., M. Banks, T.E. Reichert, T.F. Logan, J.M. Kirkwood, and T.L. Whiteside. 1996. Expression and activity of signaling molecules in T lymphocytes obtained from patients with metastatic melanoma before and after interleukin 2 therapy. *Clin Cancer Res* 2:1263-1274.
 55. Reichert, T.E., R. Day, E.M. Wagner, and T.L. Whiteside. 1998. Absent or low expression of the zeta chain in T cells at the tumor site correlates with poor survival in patients with oral carcinoma. *Cancer Res* 58:5344-5347.
 56. Saito, T., G. Dworacki, W. Gooding, M.T. Lotze, and T.L. Whiteside. 2000. Spontaneous apoptosis of CD8+ T lymphocytes in peripheral blood of patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 6:1351-1364.

57. Sakaguchi, S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 101:455-458.
58. Curiel, T.J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J.R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M.L. Disis, K.L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949.
59. Sojka, D.K., Y.H. Huang, and D.J. Fowell. 2008. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 124:13-22.
60. Chikamatsu, K., K. Sakakura, T.L. Whiteside, and N. Furuya. 2007. Relationships between regulatory T cells and CD8⁺ effector populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 29:120-127.
61. Fecci, P.E., D.A. Mitchell, J.F. Whitesides, W. Xie, A.H. Friedman, G.E. Archer, J.E. Herndon, 2nd, D.D. Bigner, G. Dranoff, and J.H. Sampson. 2006. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res* 66:3294-3302.
62. Liyanage, U.K., T.T. Moore, H.G. Joo, Y. Tanaka, V. Herrmann, G. Doherty, J.A. Drebin, S.M. Strasberg, T.J. Eberlein, P.S. Goedegebuure, and D.C. Linehan. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169:2756-2761.
63. Somasundaram, R., L. Jacob, R. Swoboda, L. Caputo, H. Song, S. Basak, D. Monos, D. Peritt, F. Marincola, D. Cai, B. Birebent, E. Bloome, J. Kim, K. Berencsi, M. Mastrangelo, and D. Herlyn. 2002. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer Res* 62:5267-5272.
64. Viguier, M., F. Lemaître, O. Verola, M.S. Cho, G. Gorochov, L. Dubertret, H. Bachelez, P. Kourilsky, and L. Ferradini. 2004. Foxp3 expressing CD4⁺CD25^(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173:1444-1453.
65. Barnett, B., I. Kryczek, P. Cheng, W. Zou, and T.J. Curiel. 2005. Regulatory T cells in ovarian cancer: biology and therapeutic potential. *Am J Reprod Immunol* 54:369-377.

66. Bronte, V., E. Apolloni, A. Cabrelle, R. Ronca, P. Serafini, P. Zamboni, N.P. Restifo, and P. Zanovello. 2000. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96:3838-3846.
67. Zea, A.H., P.C. Rodriguez, M.B. Atkins, C. Hernandez, S. Signoretti, J. Zabaleta, D. McDermott, D. Quiceno, A. Youmans, A. O'Neill, J. Mier, and A.C. Ochoa. 2005. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* 65:3044-3048.
68. Seliger, B. 2008. Molecular mechanisms of MHC class I abnormalities and APM components in human tumors. *Cancer Immunol Immunother* 57:1719-1726.
69. Seliger, B., T. Cabrera, F. Garrido, and S. Ferrone. 2002. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 12:3-13.
70. Marincola, F.M., E.M. Jaffee, D.J. Hicklin, and S. Ferrone. 2000. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74:181-273.
71. Hoves, S., M. Aigner, C. Pfeiffer, M. Laumer, E.C. Obermann, and A. Mackensen. 2009. In situ analysis of the antigen-processing machinery in acute myeloid leukaemic blasts by tissue microarray. *Leukemia* 23:877-885.
72. Koopman, L.A., W.E. Corver, A.R. van der Slik, M.J. Giphart, and G.J. Fleuren. 2000. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 191:961-976.
73. Seliger, B., A. Hohne, A. Knuth, H. Bernhard, B. Ehring, R. Tampe, and C. Huber. 1996. Reduced membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression. *Clin Cancer Res* 2:1427-1433.
74. Seliger, B., R. Stoehr, D. Handke, A. Mueller, S. Ferrone, B. Wullich, A. Tannapfel, F. Hofstaedter, and A. Hartmann. Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 59:529-540.
75. Murakami, Y., K. Kanda, K. Yokota, H. Kanayama, and S. Kagawa. 2001. Prognostic significance of immuno-proteasome subunit expression in patients with renal-cell carcinoma: a preliminary study. *Mol Urol* 5:113-119.
76. Garcia-Lora, A., I. Algarra, and F. Garrido. 2003. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 195:346-355.

77. Garrido, F., F. Ruiz-Cabello, T. Cabrera, J.J. Perez-Villar, M. Lopez-Botet, M. Duggan-Keen, and P.L. Stern. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18:89-95.
78. Meissner, M., T.E. Reichert, M. Kunkel, W. Gooding, T.L. Whiteside, S. Ferrone, and B. Seliger. 2005. Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 11:2552-2560.
79. Ritz, U., F. Momburg, H. Pilch, C. Huber, M.J. Maeurer, and B. Seliger. 2001. Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol* 19:1211-1220.
80. Dong, H., S.E. Strome, D.R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D.B. Flies, P.C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V.A. Lennon, E. Celis, and L. Chen. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8:793-800.
81. Zou, W., and L. Chen. 2008. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8:467-477.
82. Agata, Y., A. Kawasaki, H. Nishimura, Y. Ishida, T. Tsubata, H. Yagita, and T. Honjo. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8:765-772.
83. Thompson, R.H., M.D. Gillett, J.C. Cheville, C.M. Lohse, H. Dong, W.S. Webster, L. Chen, H. Zincke, M.L. Blute, B.C. Leibovich, and E.D. Kwon. 2005. Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 104:2084-2091.
84. Thompson, R.H., S.M. Kuntz, B.C. Leibovich, H. Dong, C.M. Lohse, W.S. Webster, S. Sengupta, I. Frank, A.S. Parker, H. Zincke, M.L. Blute, T.J. Sebo, J.C. Cheville, and E.D. Kwon. 2006. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res* 66:3381-3385.
85. Blank, C., J. Kuball, S. Voelkl, H. Wiendl, B. Becker, B. Walter, O. Majdic, T.F. Gajewski, M. Theobald, R. Andreesen, and A. Mackensen. 2006. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer* 119:317-327.
86. Rabinowich, H., T.E. Reichert, Y. Kashii, B.R. Gastman, M.C. Bell, and T.L. Whiteside. 1998. Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand- expressing ovarian

- carcinoma cells. Implications for altered expression of T cell receptor in tumor-associated lymphocytes. *J Clin Invest* 101:2579-2588.
87. Sharma, K., R.X. Wang, L.Y. Zhang, D.L. Yin, X.Y. Luo, J.C. Solomon, R.F. Jiang, K. Markos, W. Davidson, D.W. Scott, and Y.F. Shi. 2000. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther* 88:333-347.
88. Llanes-Fernandez, L., R.I. Alvarez-Goyanes, C. Arango-Prado Mdel, J.M. Alcocer-Gonzalez, J.C. Mojarrieta, X.E. Perez, M.O. Lopez, S.F. Odio, R. Camacho-Rodriguez, M.E. Guerra-Yi, V. Madrid-Marina, R. Tamez-Guerra, and C. Rodriguez-Padilla. 2006. Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients. *Breast* 15:482-489.
89. Mocellin, S., M.C. Panelli, E. Wang, D. Nagorsen, and F.M. Marincola. 2003. The dual role of IL-10. *Trends Immunol* 24:36-43.
90. De Vita, F., M. Orditura, G. Galizia, C. Romano, E. Lieto, P. Iodice, C. Tuccillo, and G. Catalano. 2000. Serum interleukin-10 is an independent prognostic factor in advanced solid tumors. *Oncol Rep* 7:357-361.
91. Elliott, R.L., and G.C. Blobe. 2005. Role of transforming growth factor Beta in human cancer. *J Clin Oncol* 23:2078-2093.
92. Thomas, D.A., and J. Massague. 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8:369-380.
93. Zhong, Z., K.D. Carroll, D. Policarpio, C. Osborn, M. Gregory, R. Bassi, X. Jimenez, M. Prewett, G. Liebisch, K. Persaud, D. Burtrum, S. Wang, D. Surguladze, S. Ng, H. Griffith, P. Balderes, J. Doody, J.D. Schwartz, H. Youssoufian, E.K. Rowinsky, D.L. Ludwig, L. Witte, Z. Zhu, and Y. Wu. Anti-transforming growth factor beta receptor II antibody has therapeutic efficacy against primary tumor growth and metastasis through multieffects on cancer, stroma, and immune cells. *Clin Cancer Res* 16:1191-1205.
94. Frumento, G., R. Rotondo, M. Tonetti, G. Damonte, U. Benatti, and G.B. Ferrara. 2002. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 196:459-468.
95. Uyttenhove, C., L. Pilotte, I. Theate, V. Stroobant, D. Colau, N. Parmentier, T. Boon, and B.J. Van den Eynde. 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9:1269-1274.

96. Zheng, X., J. Koropatnick, M. Li, X. Zhang, F. Ling, X. Ren, X. Hao, H. Sun, C. Vladau, J.A. Franek, B. Feng, B.L. Urquhart, R. Zhong, D.J. Freeman, B. Garcia, and W.P. Min. 2006. Reinstalling antitumor immunity by inhibiting tumor-derived immunosuppressive molecule IDO through RNA interference. *J Immunol* 177:5639-5646.
97. Katz, J.B., A.J. Muller, and G.C. Prendergast. 2008. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev* 222:206-221.
98. Brandacher, G., A. Perathoner, R. Ladurner, S. Schneeberger, P. Obrist, C. Winkler, E.R. Werner, G. Werner-Felmayer, H.G. Weiss, G. Gobel, R. Margreiter, A. Konigsrainer, D. Fuchs, and A. Amberger. 2006. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Res* 12:1144-1151.
99. Ino, K., E. Yamamoto, K. Shibata, H. Kajiyama, N. Yoshida, M. Terauchi, A. Nawa, T. Nagasaka, O. Takikawa, and F. Kikkawa. 2008. Inverse correlation between tumoral indoleamine 2,3-dioxygenase expression and tumor-infiltrating lymphocytes in endometrial cancer: its association with disease progression and survival. *Clin Cancer Res* 14:2310-2317.
100. Huang, A., D. Fuchs, B. Widner, C. Glover, D.C. Henderson, and T.G. Allen-Mersh. 2002. Serum tryptophan decrease correlates with immune activation and impaired quality of life in colorectal cancer. *Br J Cancer* 86:1691-1696.
101. Cederbaum, S.D., H. Yu, W.W. Grody, R.M. Kern, P. Yoo, and R.K. Iyer. 2004. Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab* 81 Suppl 1:S38-44.
102. Xu, W., L.Z. Liu, M. Loizidou, M. Ahmed, and I.G. Charles. 2002. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 12:311-320.
103. Aaltoma, S.H., P.K. Lipponen, and V.M. Kosma. 2001. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and its prognostic value in prostate cancer. *Anticancer Res* 21:3101-3106.
104. Rodriguez, P.C., D.G. Quiceno, J. Zabaleta, B. Ortiz, A.H. Zea, M.B. Piazuelo, A. Delgado, P. Correa, J. Brayer, E.M. Sotomayor, S. Antonia, J.B. Ochoa, and A.C. Ochoa. 2004. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* 64:5839-5849.

105. Serafini, P., I. Borrello, and V. Bronte. 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 16:53-65.
106. Bronte, V., T. Kasic, G. Gri, K. Gallana, G. Borsellino, I. Marigo, L. Battistini, M. Iafrate, T. Prayer-Galetti, F. Pagano, and A. Viola. 2005. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J Exp Med* 201:1257-1268.
107. Bronte, V., P. Serafini, A. Mazzoni, D.M. Segal, and P. Zanovello. 2003. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol* 24:302-306.
108. Ohta, A., E. Gorelik, S.J. Prasad, F. Ronchese, D. Lukashev, M.K. Wong, X. Huang, S. Caldwell, K. Liu, P. Smith, J.F. Chen, E.K. Jackson, S. Apasov, S. Abrams, and M. Sitkovsky. 2006. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13132-13137.
109. Sitkovsky, M.V., J. Kjaergaard, D. Lukashev, and A. Ohta. 2008. Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin Cancer Res* 14:5947-5952.
110. Christopher, S.A., P. Diegelman, C.W. Porter, and W.D. Kruger. 2002. Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16(cdkN2a/ARF), acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line. *Cancer Res* 62:6639-6644.
111. Garcia-Castellano, J.M., A. Villanueva, J.H. Healey, R. Sowers, C. Cordon-Cardo, A. Huvos, J.R. Bertino, P. Meyers, and R. Gorlick. 2002. Methylthioadenosine phosphorylase gene deletions are common in osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 8:782-787.
112. Hori, Y., H. Hori, Y. Yamada, C.J. Carrera, M. Tomonaga, S. Kamihira, D.A. Carson, and T. Nobori. 1998. The methylthioadenosine phosphorylase gene is frequently codeleted with the p16INK4a gene in acute type adult T-cell leukemia. *Int J Cancer* 75:51-56.
113. Jen, J., J.W. Harper, S.H. Bigner, D.D. Bigner, N. Papadopoulos, S. Markowitz, J.K. Willson, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1994. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 54:6353-6358.

114. Nobori, T., K. Miura, D.J. Wu, A. Lois, K. Takabayashi, and D.A. Carson. 1994. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368:753-756.
115. Seidenfeld, J., J. Wilson, and H.G. Williams-Ashman. 1980. Androgenic regulation of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine concentrations and methylthioadenosine phosphorylase activity in relation to polyamine metabolism of rat prostate. *Biochem Biophys Res Commun* 95:1861-1868.
116. Williams-Ashman, H.G., J. Seidenfeld, and P. Galletti. 1982. Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Biochem Pharmacol* 31:277-288.
117. Avila, M.A., E.R. Garcia-Trevijano, S.C. Lu, F.J. Corrales, and J.M. Mato. 2004. Methylthioadenosine. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2125-2130.
118. Auvinen, M., A. Paasinen, L.C. Andersson, and E. Holtta. 1992. Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 360:355-358.
119. Subhi, A.L., P. Diegelman, C.W. Porter, B. Tang, Z.J. Lu, G.D. Markham, and W.D. Kruger. 2003. Methylthioadenosine phosphorylase regulates ornithine decarboxylase by production of downstream metabolites. *J Biol Chem* 278:49868-49873.
120. Behrmann, I., S. Wallner, W. Komyod, P.C. Heinrich, M. Schuierer, R. Buettner, and A.K. Bosserhoff. 2003. Characterization of methylthioadenosin phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma. *Am J Pathol* 163:683-690.
121. Wild, P.J., S. Meyer, M. Landthaler, F. Hofstaedter, and A.K. Bosserhoff. 2007. A potential predictive marker for response to interferon in malignant melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges* 5:456-459.
122. Mowen, K.A., and M. David. 2001. Analysis of protein arginine methylation and protein arginine-methyltransferase activity. *Sci STKE* 2001:pl1.
123. Mowen, K.A., J. Tang, W. Zhu, B.T. Schurter, K. Shuai, H.R. Herschman, and M. David. 2001. Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription. *Cell* 104:731-741.
124. Kamatani, N., and D.A. Carson. 1980. Abnormal regulation of methylthioadenosine and polyamine metabolism in methylthioadenosine phosphorylase-deficient human leukemic cell lines. *Cancer Res* 40:4178-4182.
125. Stevens, A.P., B. Spangler, S. Wallner, M. Kreutz, K. Dettmer, P.J. Oefner, and A.K. Bosserhoff. 2009. Direct and tumor microenvironment mediated influences of 5'-

- deoxy-5'-(methylthio)adenosine on tumor progression of malignant melanoma. *J Cell Biochem* 106:210-219.
126. Wolford, R.W., M.K. Riscoe, L. Johnson, A.J. Ferro, and J.H. Fitch. 1984. Effect of 5'-methylthioadenosine (a naturally occurring nucleoside) on murine hematopoiesis. *Exp Hematol* 12:867-871.
127. Ferro, A.J., A.A. Vandenbark, and K. Marchitto. 1979. The role of 5'-methylthioadenosine phosphorylase in 5'-methylthioadenosine-mediated inhibition of lymphocyte transformation. *Biochim Biophys Acta* 588:294-301.
128. Di Padova, F., C. Di Padova, G. Stramentinoli, and R. Tritapepe. 1985. Inhibition of lymphocyte function by a naturally occurring nucleoside: 5'-methylthioadenosine (MTA). *Int J Immunopharmacol* 7:193-198.
129. Fredholm, B.B., M. Jondal, F. Lanefelt, and J. Ng. 1984. Effect of 5'-methylthioadenosine, 3-deazaadenosine, and related compounds on human natural killer cell activity. Relation to cyclic AMP and methylation potential. *Scand J Immunol* 20:511-518.
130. Riscoe, M.K., P.A. Tower, and A.J. Ferro. 1984. Mechanism of action of 5'-methylthioadenosine in S49 cells. *Biochem Pharmacol* 33:3639-3643.
131. Christa, L., L. Thuillier, and J.L. Perignon. 1983. 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine inhibition of rat T lymphocyte phosphodiesterase: correlation with inhibition of Con A induced proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 113:425-432.
132. Daly, J.W., and W.L. Padgett. 1992. Agonist activity of 2- and 5'-substituted adenosine analogs and their N6-cycloalkyl derivatives at A1- and A2-adenosine receptors coupled to adenylate cyclase. *Biochem Pharmacol* 43:1089-1093.
133. Pegg, A.E. 1988. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res* 48:759-774.
134. Ferro, A.J., A.A. Vandenbark, and M.R. MacDonald. 1981. Inactivation of S-adenosylhomocysteine hydrolase by 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *Biochem Biophys Res Commun* 100:523-531.
135. Warburg, O. 1961. [On the facultative anaerobiosis of cancer cells and its use in chemotherapy.]. *Munch Med Wochenschr* 103:2504-2506.
136. Graeber, T.G., C. Osmanian, T. Jacks, D.E. Housman, C.J. Koch, S.W. Lowe, and A.J. Giaccia. 1996. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379:88-91.

137. Gatenby, R.A., and R.J. Gillies. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4:891-899.
138. Mazurek, S., C.B. Boschek, F. Hugo, and E. Eigenbrodt. 2005. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Semin Cancer Biol* 15:300-308.
139. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029-1033.
140. Bardos, J.I., and M. Ashcroft. 2004. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays* 26:262-269.
141. Dang, C.V., J.W. Kim, P. Gao, and J. Yustein. 2008. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat Rev Cancer* 8:51-56.
142. Dang, C.V., and G.L. Semenza. 1999. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 24:68-72.
143. Yun, J., C. Rago, I. Cheong, R. Pagliarini, P. Angenendt, H. Rajagopalan, K. Schmidt, J.K. Willson, S. Markowitz, S. Zhou, L.A. Diaz, Jr., V.E. Velculescu, C. Lengauer, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, and N. Papadopoulos. 2009. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science* 325:1555-1559.
144. Osthus, R.C., H. Shim, S. Kim, Q. Li, R. Reddy, M. Mukherjee, Y. Xu, D. Wonsey, L.A. Lee, and C.V. Dang. 2000. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* 275:21797-21800.
145. Shim, H., C. Dolde, B.C. Lewis, C.S. Wu, G. Dang, R.A. Jungmann, R. Dalla-Favera, and C.V. Dang. 1997. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6658-6663.
146. Gnarr, J.R., K. Tory, Y. Weng, L. Schmidt, M.H. Wei, H. Li, F. Latif, S. Liu, F. Chen, F.M. Duh, and et al. 1994. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 7:85-90.
147. Iliopoulos, O., A. Kibel, S. Gray, and W.G. Kaelin, Jr. 1995. Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med* 1:822-826.
148. Kawauchi, K., K. Araki, K. Tobiume, and N. Tanaka. 2008. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol* 10:611-618.

149. Matoba, S., J.G. Kang, W.D. Patino, A. Wragg, M. Boehm, O. Gavrilova, P.J. Hurley, F. Bunz, and P.M. Hwang. 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312:1650-1653.
150. Maxwell, P.H., M.S. Wiesener, G.W. Chang, S.C. Clifford, E.C. Vaux, M.E. Cockman, C.C. Wykoff, C.W. Pugh, E.R. Maher, and P.J. Ratcliffe. 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399:271-275.
151. Talks, K.L., H. Turley, K.C. Gatter, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, and A.L. Harris. 2000. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157:411-421.
152. Zhong, H., A.M. De Marzo, E. Laughner, M. Lim, D.A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W.B. Isaacs, G.L. Semenza, and J.W. Simons. 1999. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59:5830-5835.
153. Maxwell, P.H., C.W. Pugh, and P.J. Ratcliffe. 2001. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 11:293-299.
154. Weber, W.A. 2006. Positron emission tomography as an imaging biomarker. *J Clin Oncol* 24:3282-3292.
155. Maxwell, P.H., G.U. Dachs, J.M. Gleadle, L.G. Nicholls, A.L. Harris, I.J. Stratford, O. Hankinson, C.W. Pugh, and P.J. Ratcliffe. 1997. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8104-8109.
156. Zhao, F.Q., and A.F. Keating. 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics* 8:113-128.
157. Amann, T., U. Maegdefrau, A. Hartmann, A. Agaimy, J. Marienhagen, T.S. Weiss, O. Stoeltzing, C. Warnecke, J. Scholmerich, P.J. Oefner, M. Kreutz, A.K. Bosserhoff, and C. Hellerbrand. 2009. GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *Am J Pathol* 174:1544-1552.
158. Nagase, Y., K. Takata, N. Moriyama, Y. Aso, T. Murakami, and H. Hirano. 1995. Immunohistochemical localization of glucose transporters in human renal cell carcinoma. *J Urol* 153:798-801.

159. Wang, B.Y., T. Kalir, E. Sabo, D.E. Sherman, C. Cohen, and D.E. Burstein. 2000. Immunohistochemical staining of GLUT1 in benign, hyperplastic, and malignant endometrial epithelia. *Cancer* 88:2774-2781.
160. Younes, M., R.W. Brown, M. Stephenson, M. Gondo, and P.T. Cagle. 1997. Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* 80:1046-1051.
161. Elstrom, R.L., D.E. Bauer, M. Buzzai, R. Karnauskas, M.H. Harris, D.R. Plas, H. Zhuang, R.M. Cinalli, A. Alavi, C.M. Rudin, and C.B. Thompson. 2004. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64:3892-3899.
162. Gottlob, K., N. Majewski, S. Kennedy, E. Kandel, R.B. Robey, and N. Hay. 2001. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev* 15:1406-1418.
163. Harris, A.L. 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2:38-47.
164. Plas, D.R., and C.B. Thompson. 2005. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 24:7435-7442.
165. Mathupala, S.P., Y.H. Ko, and P.L. Pedersen. 2009. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol* 19:17-24.
166. Brahimi-Horn, M.C., J. Chiche, and J. Pouyssegur. 2007. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol* 19:223-229.
167. Unwin, R.D., R.A. Craven, P. Harnden, S. Hanrahan, N. Totty, M. Knowles, I. Eardley, P.J. Selby, and R.E. Banks. 2003. Proteomic changes in renal cancer and coordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics* 3:1620-1632.
168. Seliger, B., S.P. Dressler, R. Lichtenfels, and R. Kellner. 2007. Candidate biomarkers in renal cell carcinoma. *Proteomics* 7:4601-4612.
169. Kroemer, G., and J. Pouyssegur. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13:472-482.
170. Kim, J.W., I. Tchernyshyov, G.L. Semenza, and C.V. Dang. 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3:177-185.
171. Koukourakis, M.I., A. Giatromanolaki, E. Sivridis, G. Bougioukas, V. Didilis, K.C. Gatter, and A.L. Harris. 2003. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in

- non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer* 89:877-885.
172. Koukourakis, M.I., A. Giatromanolaki, E. Sivridis, K.C. Gatter, and A.L. Harris. 2006. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway--a report of the Tumour Angiogenesis Research Group. *J Clin Oncol* 24:4301-4308.
173. Koukourakis, M.I., A. Giatromanolaki, S. Winter, R. Leek, E. Sivridis, and A.L. Harris. 2009. Lactate dehydrogenase 5 expression in squamous cell head and neck cancer relates to prognosis following radical or postoperative radiotherapy. *Oncology* 77:285-292.
174. Semenza, G.L., B.H. Jiang, S.W. Leung, R. Passantino, J.P. Concorde, P. Maire, and A. Giallongo. 1996. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271:32529-32537.
175. Pelicano, H., D.S. Martin, R.H. Xu, and P. Huang. 2006. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25:4633-4646.
176. Le, A., C.R. Cooper, A.M. Gouw, R. Dinavahi, A. Maitra, L.M. Deck, R.E. Royer, D.L. Vander Jagt, G.L. Semenza, and C.V. Dang. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2037-2042.
177. Fantin, V.R., J. St-Pierre, and P. Leder. 2006. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9:425-434.
178. Gillies, R.J., N. Raghunand, G.S. Karczmar, and Z.M. Bhujwala. 2002. MRI of the tumor microenvironment. *J Magn Reson Imaging* 16:430-450.
179. Counillon, L., and J. Pouyssegur. 2000. The expanding family of eucaryotic Na(+)/H(+) exchangers. *J Biol Chem* 275:1-4.
180. Pouyssegur, J., F. Dayan, and N.M. Mazure. 2006. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441:437-443.
181. Gatenby, R.A., E.T. Gawlinski, A.F. Gmitro, B. Kaylor, and R.J. Gillies. 2006. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res* 66:5216-5223.
182. Swietach, P., R.D. Vaughan-Jones, and A.L. Harris. 2007. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev* 26:299-310.

183. Martinez-Zaguilan, R., E.A. Seftor, R.E. Seftor, Y.W. Chu, R.J. Gillies, and M.J. Hendrix. 1996. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 14:176-186.
184. Schlappack, O.K., A. Zimmermann, and R.P. Hill. 1991. Glucose starvation and acidosis: effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumour cells. *Br J Cancer* 64:663-670.
185. Kunz-Schughart, L.A., and R. Knuechel. 2002. Tumor-associated fibroblasts (part II): Functional impact on tumor tissue. *Histol Histopathol* 17:623-637.
186. Stern, R., S. Shuster, B.A. Neudecker, and B. Formby. 2002. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res* 276:24-31.
187. Baumann, F., P. Leukel, A. Doerfelt, C.P. Beier, K. Dettmer, P.J. Oefner, M. Kastenberger, M. Kreutz, T. Nickl-Jockschat, U. Bogdahn, A.K. Bosserhoff, and P. Hau. 2009. Lactate promotes glioma migration by TGF-beta2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. *Neuro Oncol* 11:368-380.
188. Schwickert, G., S. Walenta, K. Sundfor, E.K. Rofstad, and W. Mueller-Klieser. 1995. Correlation of high lactate levels in human cervical cancer with incidence of metastasis. *Cancer Res* 55:4757-4759.
189. Walenta, S., A. Salameh, H. Lyng, J.F. Evensen, M. Mitze, E.K. Rofstad, and W. Mueller-Klieser. 1997. Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol* 150:409-415.
190. Walenta, S., M. Wetterling, M. Lehrke, G. Schwickert, K. Sundfor, E.K. Rofstad, and W. Mueller-Klieser. 2000. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60:916-921.
191. Condeelis, J., and J.W. Pollard. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124:263-266.
192. Fischer, K., P. Hoffmann, S. Voelkl, N. Meidenbauer, J. Ammer, M. Edinger, E. Gottfried, S. Schwarz, G. Rothe, S. Hoves, K. Renner, B. Timischl, A. Mackensen, L. Kunz-Schughart, R. Andreesen, S.W. Krause, and M. Kreutz. 2007. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood* 109:3812-3819.
193. Dietl, K., K. Renner, K. Dettmer, B. Timischl, K. Eberhart, C. Dorn, C. Hellerbrand, M. Kastenberger, L.A. Kunz-Schughart, P.J. Oefner, R. Andreesen, E. Gottfried, and

- M.P. Kreutz. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J Immunol* 184:1200-1209.
194. Gottfried, E., L.A. Kunz-Schughart, S. Ebner, W. Mueller-Klieser, S. Hoves, R. Andreesen, A. Mackensen, and M. Kreutz. 2006. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 107:2013-2021.
195. Salter, R.D., D.N. Howell, and P. Cresswell. 1985. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics* 21:235-246.
196. Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop, and A.H. Enk. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27:3135-3142.
197. Bubendorf, L. 2001. High-throughput microarray technologies: from genomics to clinics. *Eur Urol* 40:231-238.
198. Walenta, S., T. Schroeder, and W. Mueller-Klieser. 2004. Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem* 11:2195-2204.
199. Cham, C.M., and T.F. Gajewski. 2005. Glucose availability regulates IFN-gamma production and p70S6 kinase activation in CD8⁺ effector T cells. *J Immunol* 174:4670-4677.
200. Frauwirth, K.A., and C.B. Thompson. 2004. Regulation of T lymphocyte metabolism. *J Immunol* 172:4661-4665.
201. Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257-1265.
202. Fredholm, B.B. 2007. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 14:1315-1323.
203. Apasov, S.G., M.R. Blackburn, R.E. Kellems, P.T. Smith, and M.V. Sitkovsky. 2001. Adenosine deaminase deficiency increases thymic apoptosis and causes defective T cell receptor signaling. *J Clin Invest* 108:131-141.
204. Huang, S., S. Apasov, M. Koshiba, and M. Sitkovsky. 1997. Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood* 90:1600-1610.

205. Koukourakis, M.I., A. Giatromanolaki, C. Simopoulos, A. Polychronidis, and E. Sivridis. 2005. Lactate dehydrogenase 5 (LDH5) relates to up-regulated hypoxia inducible factor pathway and metastasis in colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis* 22:25-30.
206. Lee, K.H., E. Wang, M.B. Nielsen, J. Wunderlich, S. Migueles, M. Connors, S.M. Steinberg, S.A. Rosenberg, and F.M. Marincola. 1999. Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression. *J Immunol* 163:6292-6300.
207. Nielsen, M.B., and F.M. Marincola. 2000. Melanoma vaccines: the paradox of T cell activation without clinical response. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 Suppl:S62-66.
208. Nakagomi, H., M. Petersson, I. Magnusson, C. Juhlin, M. Matsuda, H. Mellstedt, J.L. Taupin, E. Vivier, P. Anderson, and R. Kiessling. 1993. Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res* 53:5610-5612.
209. Cham, C.M., and T.F. Gajewski. 2005. Metabolic mechanisms of tumor resistance to T cell effector function. *Immunol Res* 31:107-118.
210. Poole, R.C., and A.P. Halestrap. 1993. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 264:C761-782.
211. Cham, C.M., G. Driessens, J.P. O'Keefe, and T.F. Gajewski. 2008. Glucose deprivation inhibits multiple key gene expression events and effector functions in CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 38:2438-2450.
212. Costa Leite, T., D. Da Silva, R. Guimaraes Coelho, P. Zancan, and M. Sola-Penna. 2007. Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochem J* 408:123-130.
213. Loeffler, D.A., P.L. Juneau, and S. Masserant. 1992. Influence of tumour physico-chemical conditions on interleukin-2-stimulated lymphocyte proliferation. *Br J Cancer* 66:619-622.
214. Lardner, A. 2001. The effects of extracellular pH on immune function. *J Leukoc Biol* 69:522-530.
215. Sagone, A.L., Jr., A.F. LoBuglio, and S.P. Balcerzak. 1974. Alterations in hexose monophosphate shunt during lymphoblastic transformation. *Cell Immunol* 14:443-452.

216. Hevia, H., M. Varela-Rey, F.J. Corrales, C. Berasain, M.L. Martinez-Chantar, M.U. Latasa, S.C. Lu, J.M. Mato, E.R. Garcia-Trevijano, and M.A. Avila. 2004. 5'-methylthioadenosine modulates the inflammatory response to endotoxin in mice and in rat hepatocytes. *Hepatology* 39:1088-1098.
217. Aktas, E., U.C. Kucuksezer, S. Bilgic, G. Erten, and G. Deniz. 2009. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol* 254:149-154.
218. Weber, W.P., C. Feder-Mengus, A. Chiarugi, R. Rosenthal, A. Reschner, R. Schumacher, P. Zajac, H. Misteli, D.M. Frey, D. Oertli, M. Heberer, and G.C. Spagnoli. 2006. Differential effects of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid on the proliferation of human CD8+ T cells induced by TCR triggering or homeostatic cytokines. *Eur J Immunol* 36:296-304.
219. Raskovalova, T., A. Lokshin, X. Huang, Y. Su, M. Mandic, H.M. Zarour, E.K. Jackson, and E. Gorelik. 2007. Inhibition of cytokine production and cytotoxic activity of human antimelanoma specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by adenosine-protein kinase A type I signaling. *Cancer Res* 67:5949-5956.
220. Wolford, R.W., M.R. MacDonald, B. Zehfus, T.J. Rogers, and A.J. Ferro. 1981. Effect of 5'-methylthioadenosine and its analogs on murine lymphoid cell proliferation. *Cancer Res* 41:3035-3039.
221. Fallarino, F., U. Grohmann, C. Vacca, R. Bianchi, C. Orabona, A. Spreca, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 9:1069-1077.
222. White, M.W., A.A. Vandenbark, C.L. Barney, and A.J. Ferro. 1982. Structural analogs of 5'-methylthioadenosine as substrates and inhibitors of 5'-methylthioadenosine phosphorylase and as inhibitors of human lymphocyte transformation. *Biochem Pharmacol* 31:503-507.
223. Prevost-Blondel, A., C. Zimmermann, C. Stemmer, P. Kulmburg, F.M. Rosenthal, and H. Pircher. 1998. Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth in vivo. *J Immunol* 161:2187-2194.
224. Gabrilovich, D. 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* 4:941-952.
225. Fox, I.H., T.D. Palella, D. Thompson, and C. Herring. 1982. Adenosine metabolism: modification by S-adenosylhomocysteine and 5'-methylthioadenosine. *Arch Biochem Biophys* 215:302-308.

226. Iizasa, T., M. Kubota, and D.A. Carson. 1984. Modulation of adenine nucleoside excretion and incorporation in adenosine deaminase deficient human lymphoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 121:514-520.
227. Stoeckler, J.D., and S.Y. Li. 1987. Influx of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine into HL-60 human leukemia cells and erythrocytes. *J Biol Chem* 262:9542-9546.
228. Pegg, A.E., R.T. Borchardt, and J.K. Coward. 1981. Effects of inhibitors of spermidine and spermine synthesis on polyamine concentrations and growth of transformed mouse fibroblasts. *Biochem J* 194:79-89.
229. Hershfield, M.S. 2005. New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. *Eur J Immunol* 35:25-30.
230. Blanchet, F., A. Cardona, F.A. Letimier, M.S. Hershfield, and O. Acuto. 2005. CD28 costimulatory signal induces protein arginine methylation in T cells. *J Exp Med* 202:371-377.
231. Ashrafian, H. 2006. Cancer's sweet tooth: the Janus effect of glucose metabolism in tumorigenesis. *Lancet* 367:618-621.
232. Suganuma, N., F. Segade, K. Matsuzu, and D.W. Bowden. 2007. Differential expression of facilitative glucose transporters in normal and tumour kidney tissues. *BJU Int* 99:1143-1149.
233. Lidgren, A., A. Bergh, K. Grankvist, T. Rasmuson, and B. Ljungberg. 2008. Glucose transporter-1 expression in renal cell carcinoma and its correlation with hypoxia inducible factor-1 alpha. *BJU Int* 101:480-484.
234. Gao, H., B. Dong, X. Liu, H. Xuan, Y. Huang, and D. Lin. 2008. Metabonomic profiling of renal cell carcinoma: high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of human serum with multivariate data analysis. *Anal Chim Acta* 624:269-277.
235. Frankenberger, B., E. Noessner, and D.J. Schendel. 2007. Immune suppression in renal cell carcinoma. *Semin Cancer Biol* 17:330-343.
236. Attig, S., J. Hennenlotter, G. Pawelec, G. Klein, S.D. Koch, H. Pircher, S. Feyerabend, D. Wernet, A. Stenzl, H.G. Rammensee, and C. Gouttefangeas. 2009. Simultaneous infiltration of polyfunctional effector and suppressor T cells into renal cell carcinomas. *Cancer Res* 69:8412-8419.

237. Strefford, J.C., I. Stasevich, T.M. Lane, Y.J. Lu, T. Oliver, and B.D. Young. 2005. A combination of molecular cytogenetic analyses reveals complex genetic alterations in conventional renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 159:1-9.
238. Ikuerowo, S.O., M.A. Kuczyk, R. von Wasielewski, O.B. Shittu, U. Jonas, S. Machtens, and J. Serth. 2007. p16INK4a expression and clinicopathologic parameters in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 51:732-737; discussion 738.
239. Hellerbrand, C., M. Muhlbauer, S. Wallner, M. Schuierer, I. Behrmann, F. Bataille, T. Weiss, J. Scholmerich, and A.K. Bosserhoff. 2006. Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 27:64-72.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsliste

ADA	Adenosindeaminase
Ag	Antigen
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
APC	<i>antigen presenting cell</i> (Antigen-präsentierende Zelle)
ARA2	Adenosinrezeptor A2
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat; wichtiges „ <i>second messenger</i> “ - Molekül
CCR7	Chemokinrezeptor Typ 7
CD	<i>cluster of differentiation</i> ; Oberflächenmerkmale von Zellen
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i> (zytotoxische T-Zelle)
DC	dendritische Zelle
EHNA	Erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)Adeninhydrochlorid; Inhibitor der Adenosindeaminase
FACS	" <i>fluorescence activated cell scanning</i> "; Durchflusszytometrische Messmethode
FasL	fas-Ligand (Ligand des fas-Rezeptors)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
FOXP3	<i>forkhead box P3</i> ; Transkriptionsfaktor
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>) im Durchflusszytometer
gp100	Glycoprotein 100; überexprimiert auf Melanomzellen
GLUT-1	Glukosetransporter-1
HCl	Salzsäure
HIF-1	<i>Hypoxia inducible factor 1</i> ; O ₂ -sensitiver Transkriptionsfaktor

HLA-A2	<i>human leukocyte antigen A2</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- α	Interferon- α ; Zytokin
IFN- γ	Interferon- γ ; Zytokin
IgG	Immunglobulin G; häufigster Isotyp im Blut; Verwendung für Kontrollfärbungen zur Ermittlung der unspezifischen Bindung mAK
IL-2	Interleukin-2; klassisches Th1 Zytokin
IL-10	Interleukin-10; immunsupprimierendes Zytokin
ILT	<i>immunoglobulin-like transcript</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LMP	<i>low molecular mass protein</i> ; Immunoproteasom-Komponenten
MART-1	Melan-A; Selbstantigen auf Melanocyten; Überexprimiert auf Melanomzellen
MCT-1	Monocarboxylattransporter-1
MDSC	<i>myeloid derived suppressor cells</i> ; myeloide Suppressorzellen
MHC	Haupthistokompatibilitätsantigene
MHC-I	MHC-Klasse I Komplex; Bindungspartner von CD8 ⁺ Killerzellen
MLR	<i>mixed-lymphocyte-reaction</i> ; allogene Immunantwort
MNCs	mononukleäre Zellen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Milchsäure
MTA	5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin
MTAP	Methylthioadenosin Phosphorylase; katalysiert Phosphorylierung von MTA
ODC	Ornithin Decarboxylase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>Programmed death-1</i> ; Mitglied der B7-CD28 Familie
PE	Phycoerythrin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PHA	Phytohämagglutinin; starkes T-Zell-Stimulans

PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
pMHC	Genprodukt des Major-Histokompatibilitäts-Komplexes mit gebundenem Peptid
pVHL	
RCC	<i>renal cell carcinoma</i> (Nierenzellkarzinom)
SSC	Seitwärtssteulicht (side scatter) im Durchflusszytometer
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAP	<i>transporter associated with antigen-presentation</i> ; wichtiges Peptidtransport-Protein für die MHC-Präsentation
TCGF	T-cell growth factor (Zytokin-Cocktail aus einem Zellüberstand)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCR $\alpha\beta$	T-Zell-Rezeptor mit einer α und β Kette
TCR-CD3- ζ	Zeta-Kette des TCR-CD3-Komplexes
TGF- β	Transforming-growth-factor- β (Zytokin)
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TM	MHC-Tetramer
TMA	Tissuemicroarray
TNF	Tumornekrosefaktor; inflammatorisches Zytokin
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Weltgesundheitsorganisation

6.2 Veröffentlichungen

Eberhart K, Renner K, Ritter I, Kastenberger M, **Singer K**, Hellerbrand C, Kreutz M, Kofler R, Oefner PJ. Low doses of 2-deoxy-glucose sensitize acute lymphoblastic leukemia cells to glucocorticoid-induced apoptosis. *Leukemia* 2009; 23:2167-2170.

Singer K, Kastenberger M, Gottfried E, Hammerschmied C, Büttner M, Aigner M, Seliger B, Walter B, Schlösser H, Hartmann A, Andreesen R, Mackensen A, Kreutz M. Warburg phenotype in renal cell carcinoma: High expression of glucose-transporter 1 (GLUT-1) correlates with low CD8⁺ T-cell infiltrate in the tumor. akzeptiert bei *Int J Cancer*

6.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt vor allem Prof. Dr. Andreas Mackensen für das in mich gesetzte Vertrauen und die Betreuung dieser Arbeit. Er förderte mich auf allen Ebenen und begeisterte mich immer wieder aufs Neue für die Forschung. Sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seine freundschaftliche Art haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Richard Warth für die Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen.

Ferner danke ich Prof. Dr. Reinhard Andreesen für die Möglichkeit, einen Teil dieser Arbeit in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie, Universitätsklinikum Regensburg, anfertigen zu können.

Prof. Dr. Marina Kreutz danke ich für den konstruktiven Ideenaustausch und die enge Zusammenarbeit. Danke sagen möchte ich natürlich auch Eva, Kaste (Mister RT-PCR), Katrin, Alice und Gabi.

Prof. Dr. Arndt Hartmann möchte ich für die Bereitstellung und die Analyse der Tissuemicroarrays danken. Ebenso danke ich Dr. Christine Hammerschmied und Dr. Maike Büttner für die stete Hilfsbereitschaft - und natürlich Rudi Jung für sein Engagement und die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Dr. Bernhard Walter möchte ich für die Bereitstellung der RCC-Biopsien danken.

Für die Durchführung der massenspektrometrischen Messungen an seinem Lehrstuhl danke ich Prof. Dr. Peter Oefner. Dabei möchte ich mich besonders bei Dr. Katja Dettmer, Birgit Timischl und Axel Stevens bedanken.

Dr. Petra Hoffmann danke ich für die gute Zusammenarbeit bei den Glukose-Flux-Experimenten.

Dr. Michael Aigner und Dr. Simon (Sam) Völkl danke ich sehr für ihre fachliche Unterstützung, dass sie mir bei Problemen (Computer etc.) immer weiter halfen und für ihre ganz eigene Art, jemanden psychisch aufzubauen! Danke! Es lebe der Hirsch!

Steffi Moi (Schwaffi) und Kerstin Poller möchte ich besonders für ihre motivierte Zusammenarbeit bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Regina Gary - für all die gemeinsam erlebten Zugfahrten (Wagon 4), für die zahlreichen Übernachtungen im „Hotel Regina“ und natürlich für die Freundschaft. Hoffentlich gehen wir wieder mal auf ein Ben „Quäler“ Konzert!

Mein herzlicher Dank gebührt den „Regensburger Mädels“ Sandra, Annegret, Jana und Monika. Danke für all die guten Ratschläge, für die gute Atmosphäre im Labor, die tollen Grillabende in Annegrets Schrebergarten und die Freundschaft.

Ebenso geht mein herzlicher Dank an die „Erlanger Mädels“ Barbara, Kerstin, Steff, Steffi und Thea. Auch hier möchte ich mich für die stetige Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre im Labor (und ausserhalb des Labors) bedanken! Auch bedanken möchte ich mich natürlich bei Alex, Co, Irena, Jonas, Julian, Kathrin, Sabine und Stefan, die auch wesentlich zur guten Atmosphäre im Labor/Büro beitrugen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie und meine Freunde. Dafür dass sie immer für mich da sind und ich immer auf sie zählen kann. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die das Studium und die Promotion nie möglich gewesen wäre.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Mann Christian bedanken. Dafür dass er mich in jeder Hinsicht unterstützte und immer fest an mich glaubte.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Daten und Konzepte sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den _____

(Katrin Singer, Dipl. Biol.)