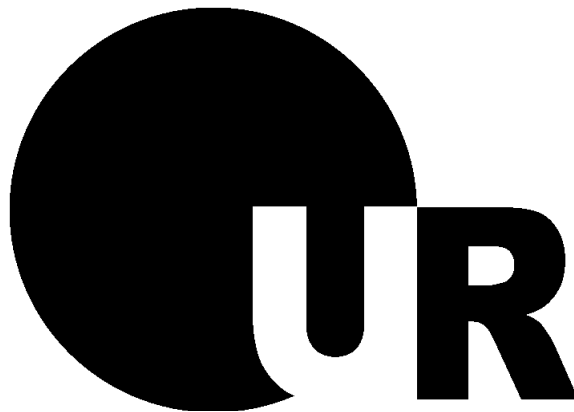


**Einfluss der Tumormetaboliten
5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin und Milchsäure
auf humane Monozyten**



**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT CHEMIE UND PHARMAZIE
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

vorgelegt von
Katrin Peter, geb. Dietl
aus Amberg
im Jahr 2011

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2007 bis März 2011 in der Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie des Klinikums der Universität Regensburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Marina Kreutz.

Promotionsgesuch eingereicht am: 11.03.2011

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Joachim Wegener

1. Gutachter: Prof. Dr. Jens Schlossmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Marina Kreutz

3. Prüfer: Prof. Dr. Reinhard Wirth

meinen Eltern

Inhaltsangabe

1 EINLEITUNG	1
1.1 Das angeborene Immunsystem	1
1.2 Monozyten als Bestandteil des angeborenen Immunsystems	1
1.2.1 Differenzierung und Lebenszyklus humaner Monozyten.....	1
1.2.2 Effektorfunktionen von Monozyten	2
1.2.2.1 Erkennung von Fremd-Antigenen.....	2
1.2.2.2 „Toll-like“-Rezeptoren als Beispiele für PRRs	3
1.2.2.3 Sekretion von Zytokinen durch Monozyten.....	6
1.2.2.4 Phagozytose von Mikroorganismen.....	7
1.2.2.5 Zytostatische/zytotoxische Eigenschaften von Monozyten.....	7
1.2.3 Der Glukosestoffwechsel aktivierter Monozyten.....	8
1.3 Die Rolle von Immunzellen im Tumor	9
1.3.1 Tumor-assoziierte Entzündungen	10
1.3.2 Die Bedeutung von NF- κ B in der Tumor-assoziierten Entzündung.....	10
1.3.3 Veränderung und Suppression von Immunzellen im Tumor	12
1.4 Der Tumormetabolismus und sein Einfluss auf Immunzellen	13
1.4.1 Der Glukosemetabolismus von Tumorzellen.....	13
1.4.1.1 Der glykolytische Phänotyp von Tumoren	13
1.4.1.2 Molekulare Veränderungen im Glukosemetabolismus	15
1.4.1.3 Einfluss von Milchsäure und Laktat auf Immunzellen	17
1.4.2 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin – ein Produkt der Polyaminsynthese.....	18
1.4.2.1 Der dysregulierte Abbau von MTA in Tumorzellen	18
1.4.2.2 Einfluss von MTA auf Immunzellen	19
2 ZIELSETZUNG	21
3 MATERIAL	22
3.1 Geräte	22
3.2 Verbrauchsmaterial	23
3.3 Chemikalien	25
3.4 Antikörper	25

3.5 Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits	25
3.6 Molekulargewichtsstandard für Proteine	26
3.7 Oligonukleotide	26
3.8 Zelllinien.....	27
3.9 Datenbanken und Software	27
4 METHODEN	28
4.1 Zellbiologische Methoden	28
4.1.1 Kultivierung von Zelllinien.....	28
4.1.1.1 Kultivierung der Tumorzelllinie Mellm.....	28
4.1.1.2 Mykoplasmentest.....	28
4.1.1.3 Bestimmung der Zellzahl	28
4.1.1.4 Einfrieren und Auftauen	29
4.1.1.5 Generierung multizellulärer Tumorsphäroide	29
4.1.2 Gewinnung und Kultivierung humaner Monozyten.....	30
4.1.2.1 Gewinnung humaner Monozyten.....	30
4.1.2.2 Kultivierung und Stimulierung humaner Monozyten	31
4.1.3 Kokultur von Monozyten und Mellm-Tumorzellen	33
4.1.4 Messung von Zytokinen im Zellkulturüberstand	33
4.1.5 Analyse des cAMP-Gehalts von Monozyten	34
4.1.6 Untersuchung des intrazellulären Kalziumgehalts.....	34
4.1.7 Durchflusszytometrische Analyse der Zell-Vitalität.....	36
4.1.8 Proliferationstest.....	36
4.1.9 Messung reaktiver Sauerstoffspezies.....	37
4.1.10 Analyse des Migrationsverhaltens von Monozyten	38
4.2 Methoden zur metabolischen Analyse	39
4.2.1 Präparation von Proben für die Massenspektrometrie	39
4.2.1.1 Gewinnung der Zellen.....	40
4.2.1.2 Präparation des Kulturüberstands	41
4.2.1.3 Lyse von Zellen zur Untersuchung intrazellulärer Laktatisotope	41
4.2.1.4 Methanolextraktion intrazellulärer Metaboliten	42
4.2.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie	42
4.2.2.1 Analyse von Aminosäurekonzentrationen in Kulturüberständen	42
4.2.2.2 Analyse von Glukose- und Laktatkonzentration in Kulturüberständen	42
4.2.3 Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie.....	43

4.2.4	Analyse des ATP-Gehalts	43
4.2.5	Analyse des Sauerstoffgehalts von Monozytenkulturen.....	44
4.2.6	Enzymatische Bestimmung von Laktatkonzentrationen	44
4.3	Molekularbiologische Methoden.....	45
4.3.1	Isolierung von RNA	45
4.3.2	Formaldehyd-Agarosegel für RNA	45
4.3.3	Polymerase-Kettenreaktion	46
4.3.3.1	Reverse Transkription.....	47
4.3.3.2	„Real-time“ quantitative PCR	47
4.3.3.2.1	Entwerfen von Primern für RT-qPCR	48
4.3.3.2.2	Reaktionsansatz von RT-qPCR-Reaktionen	48
4.3.4	Genomweite Expressionsanalyse mittels RNA-Expressionsarray	49
4.3.4.1	Markierung der RNA	50
4.3.4.2	Mikroarray-Hybridisierung.....	50
4.3.4.3	Auswertung der Mikroarray-Daten	50
4.3.4.4	Validierung der Mikroarray-Daten	51
4.4	Proteinbiochemische Methoden	51
4.4.1	Isolierung von Proteinen.....	51
4.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
4.4.3	Western-Blot.....	55
4.4.4	Immunfärbung von Western-Blots	56
4.4.5	Immunhistochemische Analyse von Oberflächenantigenen.....	57
4.5	Statistik	58
5	ERGEBNISSE	60
5.1	Einfluss von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin auf humane Monozyten.....	60
5.1.1	Einfluss von MTA auf die Zytokinsekretion und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Monozyten	60
5.1.1.1	Sekretion unterschiedlicher Zytokine in Gegenwart von MTA	60
5.1.1.2	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Gegenwart von MTA.....	61
5.1.2	Einfluss von MTA auf die Vitalität von Monozyten.....	62
5.1.3	Analysen zum Wirkmechanismus von MTA auf Monozyten.....	63
5.1.3.1	Nachweis von Adenosinrezeptoren	63
5.1.3.2	Analyse des intrazellulären cAMP-Gehalts in Gegenwart von MTA	64
5.1.3.3	Einfluss von MTA auf den intrazellulären Kalziumgehalt.....	65
5.1.3.4	Effekt von Adenosinrezeptorantagonisten auf die Zytokinsekretion	66

5.2 Einfluss von Milchsäure auf humane Monozyten	68
5.2.1 Funktion von Monozyten in Gegenwart von Milchsäure.....	68
5.2.1.1 Untersuchung der Zytokinsekretion	68
5.2.1.1.1 Sekretion verschiedener Zytokine in Gegenwart von Milchsäure	68
5.2.1.1.2 Einfluss Tumor-produzierter Milchsäure auf die TNF-Sekretion.....	69
5.2.1.1.3 Effekte von Ansäuerung und Laktat auf die Zytokinsekretion.....	71
5.2.1.1.4 Einfluss von Milchsäure auf unterschiedlich stimulierte Monozyten	73
5.2.1.1.5 Kinetik der Zytokinsekretion unter Einfluss von Milchsäure.....	74
5.2.1.2 Wirkung von Milchsäure auf die ROS-Produktion	75
5.2.1.3 Effekt von Milchsäure auf das Migrationsverhalten	76
5.2.1.4 Einfluss von Milchsäure auf die zytostatischen Eigenschaften.....	77
5.2.2 Analyse des Wirkmechanismus von Milchsäure auf Monozyten.....	79
5.2.2.1 Einfluss von Milchsäure auf die Vitalität von Monozyten	79
5.2.2.2 Metabolische Untersuchungen: Glykolyse und Respiration	80
5.2.2.2.1 Analyse der Aufnahme von Laktat.....	80
5.2.2.2.2 Messung von Glukoseaufnahme und Laktatproduktion.....	82
5.2.2.2.3 Einfluss von Milchsäure auf die Glukoseaufnahme	83
5.2.2.2.4 Analyse des glykolytischen Flusses unter Einfluss von Milchsäure	85
5.2.2.2.5 Effekt von Milchsäure auf den Sauerstoff- und Energiehaushalt.....	88
5.2.2.2.6 Einfluss von Inhibitoren von Glykolyse und Energiestoffwechsel auf die TNF-Sekretion	90
5.2.2.3 Globale Analyse mittels RNA-Expressionsarray – Modulation der LPS- Antwort durch Milchsäure	92
5.2.2.3.1 Effekte von Milchsäure auf die LPS-induzierte Genexpression.....	93
5.2.2.3.2 „Gene Ontology“-Analyse der regulierten Gene	96
5.2.2.3.3 Beispiele durch Milchsäure beeinflusster Gene.....	97
5.2.2.3.4 Analyse der Expression weiterer Gene	103
5.2.2.4 Untersuchung der Wirkung von Milchsäure auf verschiedene LPS-stimulierte Signalwege	104
6 DISKUSSION	107
6.1 Einfluss von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin auf humane Monozyten.....	107
6.1.1 Funktion und Vitalität von Monozyten unter Einfluss von MTA	107
6.1.2 Mechanismus der Wirkung von MTA.....	109
6.2 Einfluss von Milchsäure auf humane Monozyten	111
6.2.1 Funktion von Monozyten unter Einfluss von Milchsäure	111

6.2.2 Wirkmechanismus von Milchsäure auf Monozyten	114
6.2.2.1 Einfluss von Milchsäure auf den Glukosemetabolismus.....	115
6.2.2.2 Einfluss von Milchsäure auf die Genexpression	119
7 ZUSAMMENFASSUNG	125
8 LITERATURVERZEICHNIS	128
9 ANHANG	150
9.1 Gene der Arrayanalyse	150
9.2 „Gene Ontology“-Analyse	157
9.3 Publikationen.....	163
9.4 Danksagung.....	164
9.5 Eidesstattliche Erklärung	166

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Humane „Toll-like“-Rezeptoren und ihre Liganden.....	3
Abbildung 1-2: Die TLR4-Signalkaskade.....	4
Abbildung 1-3: Mit dem glykolytischen Phänotyp einhergehende metabolische Veränderungen in Tumorzellen	15
Abbildung 1-4: Synthese und Metabolismus von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin	18
Abbildung 4-1: Bestandteile und Aufbau der Chemotaxiskammer	38
Abbildung 5-1: Einfluss von MTA auf die Zytokinsekretion von Monozyten	61
Abbildung 5-2: Superoxidanionproduktion von Monozyten unter Einfluss von MTA	62
Abbildung 5-3: Einfluss von MTA auf die Vitalität von Monozyten.....	63
Abbildung 5-4: Expression von Adenosinrezeptoren auf Monozyten	64
Abbildung 5-5: Intrazellulärer cAMP-Gehalt von Monozyten nach Inkubation mit MTA ..	65
Abbildung 5-6: Einfluss von MTA auf den intrazellulären Kalziumgehalt.....	66
Abbildung 5-7: Einfluss von Adenosinrezeptorantagonisten auf die MTA-induzierte IL-6- Sekretion.....	67
Abbildung 5-8: Einfluss von Milchsäure auf die Zytokinsekretion von Monozyten	69
Abbildung 5-9: Einfluss von Tumor-produzierter Milchsäure auf die TNF-Sekretion von Monozyten	70
Abbildung 5-10: Bedeutung eines veränderten pH-Werts und von Natriumlaktat für die Milchsäure-supprimierte TNF-Sekretion	71
Abbildung 5-11: Einfluss von Milchsäure, Ansäuerung und Natriumlaktat auf die VEGF- Sekretion von Monozyten	72
Abbildung 5-12: Einfluss von Milchsäure auf unterschiedlich aktivierte Monozyten	73
Abbildung 5-13: Einfluss von Milchsäure auf die Kinetik der Zytokinsekretion.....	74
Abbildung 5-14: Produktion von Superoxidanionen unter Einfluss von Milchsäure und Ansäuerung	75
Abbildung 5-15: Migration von Monozyten unter Einfluss von Milchsäure und Ansäuerung	76
Abbildung 5-16: Einfluss von Milchsäure auf die zytostatischen Eigenschaften von Monozyten	78
Abbildung 5-17: Vitalität von Monozyten nach Inkubation mit Milchsäure oder Ansäuerung	79
Abbildung 5-18: Laktataufnahme unter neutralen und leicht sauren Bedingungen	81
Abbildung 5-19: Glukoseaufnahme und Laktatsekretion mit und ohne LPS-Stimulation ..	82
Abbildung 5-20: Kinetik der endogenen Laktatproduktion durch Monozyten	83
Abbildung 5-21: Einfluss von Milchsäure, Natriumlaktat und Ansäuerung auf die Aufnahme von Glukose durch Monozyten.....	84

Abbildung 5-22: Einfluss von Milchsäure, Natriumlaktat und Ansäuerung auf die Aminosäurekonzentrationen in Kulturüberständen von Monozyten.....	85
Abbildung 5-23: Einfluss von Milchsäure, Natriumlaktat, Ansäuerung und 2-Deoxyglukose auf den glykolytischen Fluss von LPS-stimulierten Monozyten	86
Abbildung 5-24: Sauerstoffgehalt des Kulturmediums von Monozyten während der Aktivierung mit LPS	88
Abbildung 5-25: Einfluss von Milchsäure, Ansäuerung und Natriumlaktat auf den intrazellulären ATP-Gehalt LPS-stimulierter Monozyten.....	89
Abbildung 5-26: Atmung sowie ATP-Produktion von Monozyten bei Inhibition von Glykolyse oder Atmung.....	91
Abbildung 5-27: TNF-Sekretion von Monozyten bei Inkubation mit 2-Deoxyglukose und Rotenon	92
Abbildung 5-28: Hierarchische Clusteranalyse der durch LPS und Milchsäure beeinflussten Gene	94
Abbildung 5-29: Kurzzeitiger Einfluss von Milchsäure auf die mRNA-Expression	99
Abbildung 5-30: Längerfristiger Einfluss von Milchsäure auf die mRNA-Expression	101
Abbildung 5-31: Analyse der mRNA-Expression weiterer durch Milchsäure beeinflusster Gene	103
Abbildung 5-32: Einfluss von Milchsäure, Ansäuerung und Natriumlaktat auf die LPS-abhängige Signaltransduktion	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Elutriationsparameter und damit verbundene Zelltypen	31
Tabelle 4-2: Übersicht der verwendeten massenspektrometrischen Messmethoden	40
Tabelle 4-3: Zusammensetzung von RNA-Agarosegelen	46
Tabelle 4-4: Standardprogramm für die RT-qPCR	49
Tabelle 4-5: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	54
Tabelle 4-6: Zusammensetzung der SDS-Gel-Stammlösungen.....	54
Tabelle 5-1: Zusammenfassung der Daten zur Suppression durch 20 mM Milchsäure (MS), die entsprechende Ansäuerung (pH 6,6) oder 20 mM Natriumlaktat (NaL)	90
Tabelle 5-2: Signifikant angereicherte „Gene Ontology“-Begriffe	97
Tabelle 6-1: Überblick über das zeitliche Auftreten verschiedener beobachteter Effekte von Milchsäure (MS) und deren Sensitivität.....	122
Tabelle 9-1: Im Rahmen der Arrayanalyse erhaltene Gene	150
Tabelle 9-2: In der Clusteranalyse signifikant angereicherte „Gene Ontology“-Begriffe..	157

Abkürzungsverzeichnis

$\cdot\text{OH}$	Hydroxyl-Radikal
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
2-DG	2-Deoxyglukose
^3H	Tritium
7-AAD	7-Aminoactinomycin
A	Ampere
AB-Serum	Serum von Blutspendern mit Blutgruppe AB
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
Akt	Proteinkinase B
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
APAAP	Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BP	Bisphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BSS	gepufferte Salzlösung (balanced salt solution)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic adenosine monophosphate)
CCL	Chemokin (CC-Typ)-Ligand
CCR	Chemokin (CC-Typ)-Rezeptor
CD	Differenzierungs-Cluster (cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA (copy DNA)
CO_2	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CR	Komplementrezeptor (complement receptor)
cRNA	komplementäre RNA (copy RNA)
CSC	8-(3-Chlorostyryl)-Koffein
$\text{CX}_3\text{CR1}$	Chemokin (CX_3C -Typ)-Rezeptor 1 (Fraktalkin-Rezeptor)
Da	Dalton

DAMP	Beschädigungs-assoziiertes molekulares Muster (damage-associated molecular pattern)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGR	frühe Wachstumsantwort (early growth response)
EGTA	Bis-Aminoethyl-Glykoether-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay)
ERK	durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase
FBPase-2	Fruktose-2,6-Bisphosphatase
Fc	„fragment crystallizable“
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
Fcγ-R	„fragment crystallizable“ γ-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
Fura-2-AM	Fura-2-Acetoxy-Methylester
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GEM	GTP-bindendes im Skelettmuskel überexprimiertes Protein (GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle)
GLUT	Glukosetransporter
GO	„Gene Ontology“
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
H ₂ O _{DEPC}	zweifach destilliertes, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztes Wasser
H ₂ O _{USB}	DEPC-behandeltes USB-Wasser
HCl	Salzsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor (hypoxia-inducible factor)
HK	Hexokinase

HMGB1	„high-mobility group box 1“
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
HSP	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
iPFK-2	induzierbare 6-Phosphofrukto-2-Kinase
IRF	Interferon-regulatorischer Faktor
I κ B	Inhibitor von κ B
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LC	Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography)
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography) gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LIF	Leukämie-induzierbarer Faktor
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar (mol/l)
M2-PK	M2-Isoform der Pyruvat-Kinase
MAL	MyD88-adapter-like
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MAT	Methionin-Adenosyltransferase
MBq	Megabecquerel
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (macrophage colony-stimulating factor)
MCT	Monocarboxylattransporter
MD2	myeloides Differenzierungsprotein 2
MDP	Muramylidipeptid
MDSC	aus myeloiden Zellen hervorgehende Suppressorzelle (myeloid-derived suppressor cell)
min	Minute
MNC	mononukleäre Zelle (mononuclear cell)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	„messenger“ RNA

MS	L-Milchsäure
MTA	5'-Deoxy-5'Methylthioadenosin
MTAP	5'-Deoxy-5'Methylthioadenosin-Phosphorylase
MyD88	myeloides Differenzierungsantigen 88
n.b.	nicht bestimmt
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaL	L-Natriumlaktat
NF-κB	nukleärer Faktor κB
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne
O ₂ ^{•-}	Superoxid-Anion
ODC	Ornithin-Decarboxylase
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pam ₃ Cys	Tripalmitoyl-S-Glycerylcystein
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (pathogen-associated molecular pattern)
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
PDK-1	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-1
PET	Positronenemissionstomographie
PFK-1	6-Phosphofrukto-1-Kinase
PFK-2	6-Phosphofrukto-2-Kinase
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
P _i	anorganisches (inorganic) Phosphat
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PP _i	anorganisches (inorganic) Pyrophosphat
PPR	Mustererkennungsrezeptor (pattern recognition receptor)
PTX	Pentraxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Entwicklungsort des Kulturmediums)
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
RT-qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (real-time quantitative polymerase chain reaction)
s	Sekunde
SAM	S-Adenosylmethionin
SAMDC	S-Adenosylmethionin-Decarboxylase
SCO	Synthese von Cytochrom-c-Oxidase
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts (standard error of the mean)
STAT	Signalübermittler und Aktivator der Transkription (signal transducer and activator of transcription)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (Tris-buffered saline and Tween 20)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
TIR-Domäne	Toll-Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-ähnlicher (Toll-like) Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM	TRIF-verwandtes Adapterprotein (TRIF-related adapter molecule)
TRIF	TIR-Domäne-enthaltendes, Interferon β -induzierendes Adapterprotein (TIR-domain-containing adapter protein-inducing interferon β)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
Zpm	Zerfälle pro Minute

1 Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt als phylogenetisch ältester Teil der Immunabwehr die erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Pathogene dar. Es besteht aus verschiedenen Abwehrmechanismen, die bereits von Geburt an vorhanden sind und sich nicht in Anpassung an ein Antigen verändern. Es reagiert auf spezifische Erkennungsmerkmale eingedrungener Mikroorganismen oder beschädigter Zellen, arbeitet schnell und leitet den langsameren, aber hochgradig gezielten Angriff des adaptiven Immunsystems ein [1].

Die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems bestehen aus epithelialen Barrieren, wie Haut oder Schleimhäuten, antimikrobiellen Plasmaproteinen, wie dem Komplementsystem, aber auch zellulären Komponenten. Zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems zählen Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen und Monozyten [1, 2].

1.2 Monozyten als Bestandteil des angeborenen Immunsystems

1.2.1 Differenzierung und Lebenszyklus humaner Monozyten

Humane Monozyten entstehen über mehrere Zwischenstufen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark [3]. Ausdifferenzierte Monozyten werden aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf entlassen und zirkulieren dort für mehrere Tage, bevor sie in verschiedene Gewebe einwandern [4].

Auf Basis der Expression bestimmter Oberflächenantigene, die über das „cluster of differentiation“ (CD) charakterisiert sind, wurden im Menschen zwei Hauptgruppen von Monozyten definiert. Die Einordnung der Monozyten basiert dabei auf der Expression von CD14, einer Komponente des Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptor-Komplexes, und CD16, dem Fc γ -R („fragment crystallizable“ γ -Rezeptor) III. Sogenannte „klassische Monozyten“, die ca. 80-90% der Monozyten darstellen, weisen den Phänotyp CD14⁺⁺CD16⁻ auf. Als „nicht-klassische Monozyten“ gelten CD14⁺CD16⁺⁺-Monozyten. Die Monozyten-Untergruppen unterscheiden sich unter anderem in der Expression des Chemokin (CC-Typ)-Rezeptors 2 (CCR2), der von CD14⁺⁺CD16⁻-Monozyten, nicht aber von

CD14⁺CD16⁺⁺-Monozyten exprimiert wird. Im Gegensatz dazu weisen CD14⁺CD16⁺⁺-Monozyten den Rezeptor für das Chemokin Fraktalkin (CX₃CR1) auf ihrer Oberfläche auf. Aufgrund der unterschiedlichen Expression dieser Chemokinrezeptoren reagieren CD14⁺⁺CD16⁻-Monozyten auf das Chemokin (CC-Typ)-Ligand 2 (CCL2) chemotaktisch, CD14⁺CD16⁺⁺-Monozyten werden dagegen durch Fraktalkin angelockt [5-7]. Da hohe Konzentrationen an CCL2 in Geweben durch stimulierte Immunzellen sowie Endothelzellen produziert werden [1], wandern CD14⁺⁺CD16⁻-Monozyten in entzündliche Gewebe ein [5]. Dort differenzieren sie zu proinflammatorischen Makrophagen und dendritischen Zellen. Die Bindung des auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimierten Chemokins Fraktalkin durch CD14⁺CD16⁺⁺-Monozyten scheint für die konstitutive Einwanderung dieses Monozyten-Subtyps ins Gewebe verantwortlich zu sein [8, 9]. Dort dienen CD14⁺CD16⁺⁺-Monozyten als Vorläufer für verschiedene Typen von Gewebemakrophagen oder dendritischen Zellen [5].

1.2.2 Effektorfunktionen von Monozyten

Monozyten sind einerseits Vorläufer von bestimmten Makrophagen und dendritischen Zellen [10, 11]. Andererseits stellen sie aktive Bestandteile des angeborenen Immunsystems dar und übernehmen in dieser Rolle wichtige Effektorfunktionen [3]. Als Beispiele für Effektorfunktionen von Monozyten werden im Folgenden die Erkennung von Fremd-Antigenen, die Sekretion von Zytokinen, die Phagozytose und die zytostatischen Eigenschaften von Monozyten genauer betrachtet.

1.2.2.1 Erkennung von Fremd-Antigenen

Monozyten, wie auch andere Zellen des angeborenen Immunsystems, nehmen pathogene Erreger über eine limitierte Zahl Keimbahn-kodierter „pattern-recognition“-Rezeptoren (PRRs) wahr. PRRs sind sowohl auf der Zelloberfläche, als auch in endosomalen Vesikeln und im Zytoplasma zu finden. Sie erkennen bestimmte hochkonservierte Bestandteile von Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten, sogenannte „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) [1]. Durch die Bindung von PAMPs an PRRs kommt es zur Aktivierung unterschiedlicher antimikrobieller oder immunmodulatorischer Funktionen, wie der Sekretion von Zytokinen (siehe 1.2.2.3) oder der Phagozytose (siehe 1.2.2.4). Beispiele für PRRs sind C-Typ-Lektine, „scavenger“-Rezeptoren, N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP)-Rezeptoren, Nukleotid-

bindende Oligomerisierungsdomäne (NOD)-Rezeptoren oder „Toll-like“-Rezeptoren (TLRs) [12].

1.2.2.2 „Toll-like“-Rezeptoren als Beispiele für PRRs

TLRs binden unterschiedliche PAMPs und lagern sich dabei zu Homo- oder Heterodimeren zusammen (Abbildung 1-1). Die Erkennung von PAMPs durch TLRs erfolgt durch eine Ektodomäne mit Leucin-reichen Wiederholungen. Diese steht über eine Transmembrandomäne mit der für die Signaltransduktion benötigten Toll-Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne in Verbindung [13].

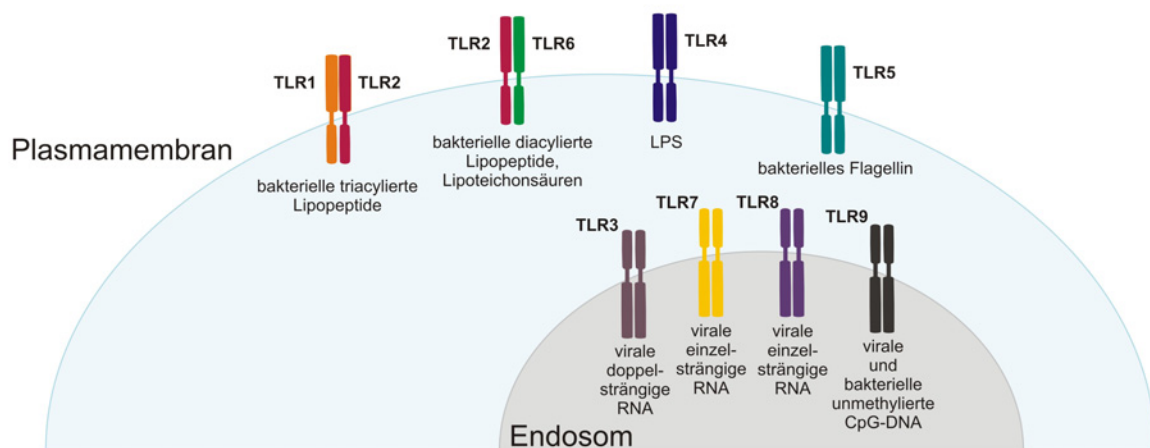


Abbildung 1-1: Humane „Toll-like“-Rezeptoren und ihre Liganden

Die identifizierten humanen „Toll-like“-Rezeptoren (TLRs) sind, je nach erkannter mikrobieller Struktur, sowohl in der Plasmamembran als auch in Membranen im Zellinneren, z.B. auf dem Endosom, zu finden. Bei Bindung eines Liganden kommt es zur Homo- oder Heterodimerisierung von TLRs [13]. Nicht abgebildet ist TLR10, der mit TLR1 bzw. TLR2 dimerisiert, dessen Liganden aber unbekannt sind [14]. Weitere Abkürzungen: LPS, Lipopolysaccharid; CpG: Cytosin-Phosphat-Guanin; DNA: Desoxyribonukleinsäure; RNA: Ribonukleinsäure. Abbildung nach [1] und [15], modifiziert.

TLRs sind sowohl in der Plasmamembran, als auch intrazellulär in der Membran von Endosomen und Lysosomen zu finden. Liganden der intrazellulären TLRs sind bakterielle und virale RNA-Varianten oder die für Bakterien und Viren typischen, unmethylierten CpG-DNA-Motive. Die an der Zelloberfläche lokalisierten TLRs erkennen mikrobielle Oberflächenstrukturen, wie zum Beispiel Lipopeptide, Lipoteichonsäuren, bakterielles Flagellin und LPS [16]. LPS ist eine Komponente der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und hat sehr starke immunstimulatorische Eigenschaften, die zum septischen

Schock führen können. Aufgrund seiner stimulatorischen Wirkung dient LPS auch *in vitro* zur Aktivierung von Immunzellen, wie Makrophagen und Monozyten [1, 17].

LPS wird zunächst durch das im Blutserum vorliegende LPS-bindende Protein (LBP) gebunden. LBP interagiert dabei mit LPS aus intakten Zellwänden gramnegativer Bakterien oder mit LPS-enhaltenden Aggregaten. In seiner Funktion als Lipid-Transferase katalysiert LBP die Extraktion von LPS aus den Zellwänden oder Aggregaten und überträgt es auf membranständiges CD14. CD14 vermittelt schließlich die Bindung von LPS an das myeloide Differenzierungsprotein (MD) 2, welches mit der extrazellulären Domäne von TLR4 assoziiert ist (Abbildung 1-2) [18, 19].

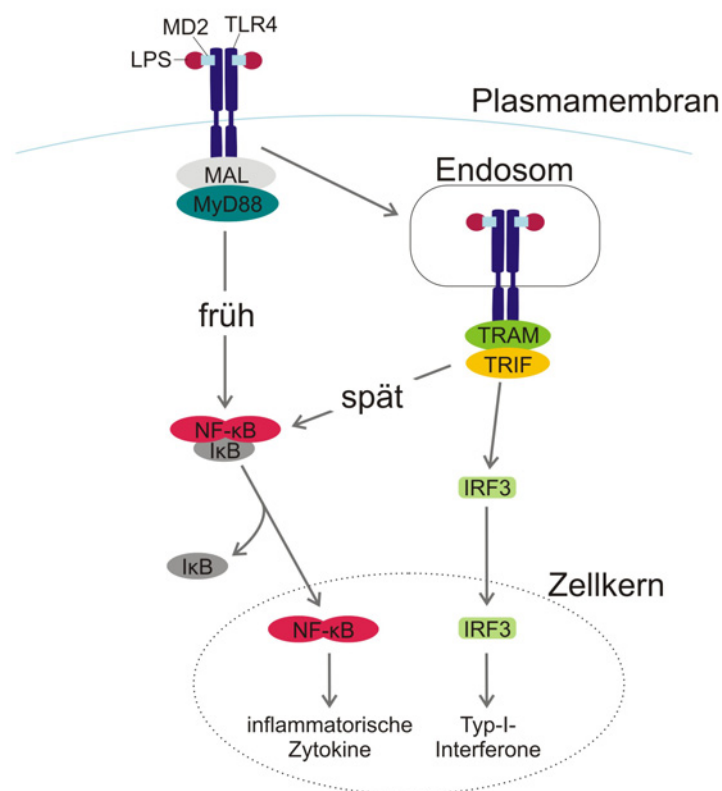


Abbildung 1-2: Die TLR4-Signalkaskade

Die Bindung von LPS über das myeloide Differenzierungsprotein (MD) 2 an das TLR4-Homodimer führt über Rekrutierung des myeloiden Differenzierungsantigens 88 (MyD88) an das an die intrazelluläre Domäne von TLR4 gebundene Adapterprotein MAL (MyD88-adapter-like) zu einer frühen Aktivierung des nukleären Faktors κ B (NF- κ B). Anschließend wird der LPS-MD2-TLR4-Komplex ins Endosom aufgenommen. Dort wird durch Bindung der Proteine „TRIF-related adapter molecule“ (TRAM) und „TIR-domain-containing adapter protein-inducing interferon β “ (TRIF) an das TLR4-Homodimer die späte Aktivierung von NF- κ B sowie die Aktivierung des Interferonregulatorischen Faktors (IRF) 3 veranlasst. Der aktivierte IRF3 wandert in den Zellkern und stimuliert dort die Expression von Typ-I-Interferonen. Sowohl die frühe, als auch die späte Aktivierung von NF- κ B führen zu dessen Translokation in den Zellkern, wo es unter anderem die Expression inflammatorischer Zytokine auslöst. Abbildung nach [1] und [13], modifiziert.

Intrazellulär führt die Bildung des TLR4-MD2-LPS-Komplexes zur Anlagerung des myeloiden Differenzierungsantigens 88 (MyD88) an das an die TIR-Domäne von TLR4 gebundene Adapterprotein MAL (MyD88-adaptor-like) [20]. Nach mehreren Zwischenschritten wird der an den nukleären Faktor κ B (NF- κ B) gebundene Inhibitor von κ B (I κ B) durch eine I κ B-Kinase (IKK) phosphoryliert, was zum Abbau von I κ B führt. Das freie NF- κ B kann nun in den Zellkern eintreten, wo es die Expression zahlreicher Gene, unter anderem für inflammatorische Zytokine, induziert [13].

Wie ebenfalls in Abbildung 1-2 zu erkennen ist, existiert neben dem MyD88-abhängigen Signalweg auch eine MyD88-unabhängige TLR4-Signalkaskade. Hier binden die Proteine „TIR-domain-containing adapter protein-inducing interferon β “ (TRIF) und „TRIF-related adapter molecule“ (TRAM) an die zytoplasmatische TIR-Domäne von TLR4 [21]. Kagan et al. zeigten, dass TLR4 nach Interaktion mit MAL und MyD88 endozytiert wird und anschließend TRAM und TRIF zum Endosom rekrutiert [22]. Ausgehend von dieser TLR4-Interaktion kommt es schließlich zu einer späten Aktivierung von NF- κ B sowie zur Aktivierung des Interferon-regulatorischen Faktors (IRF) 3. IRF3 wandert daraufhin in den Zellkern und induziert dort die Expression von Typ-I-Interferonen [13].

Die Bindung von TLRs führt außerdem zur Aktivierung verschiedener Mitogen-aktivierter Protein (MAP)-Kinasen. Dazu zählen die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2, verschiedene p38-Proteine oder c-Jun N-terminale Kinasen (JNK). Auch die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), die wiederum die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) vermittelt, wird nach Ligandbindung an TLRs aktiviert. MAP-Kinasen und der PI3K/Akt-Weg haben eine regulatorische Funktion in zahlreichen zellulären Prozessen, die unter anderem eine wichtige Rolle in der Entzündungsantwort spielen. Beispielsweise regulieren MAP-Kinasen und Akt das Überleben und die Proliferation von Zellen. Darüber hinaus ist Akt ein wichtiger Regulator des Metabolismus [23].

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass TLRs, insbesondere TLR2 und TLR4, neben Pathogen-assoziierten Strukturen auch körpereigene Moleküle erkennen. Diese Moleküle werden als DAMPs (damage associated molecular patterns) bezeichnet und werden entweder passiv durch geschädigte bzw. nekrotische Zellen oder aktiv durch stimulierte Immunzellen freigesetzt. Durch ihre Bindung an TLRs lösen DAMPs eine sogenannte „sterile Entzündung“, eine inflammatorische Reaktion in Abwesenheit mikrobieller Strukturen, aus [24, 25]. Beispiele für DAMPs, deren Interaktion mit TLRs gezeigt wurde, sind die Kalzium-bindenden S100-Proteine S100A8 und S100A9 [26, 27], das DNA-bindende Protein HMGB1 (high-mobility group box 1) [28] und die Hitzeschockproteine (HSP) 60 und 70 [29, 30].

1.2.2.3 Sekretion von Zytokinen durch Monozyten

Stimulierte Monozyten sezernieren zahlreiche immunstimulatorische Zytokine, wie Interleukin (IL)-6, IL-1 und Tumornekrosefaktor (TNF) [31, 32]. IL-1 und TNF induzieren unter anderem die Expression von Molekülen zur Adhäsion von Immunzellen auf Endothelzellen (z.B. Selektine) und die Sekretion von Chemokinen durch Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Beide Faktoren sind essentiell für die Rekrutierung von Leukozyten zum Ort einer Entzündung [1, 33]. Des Weiteren steuern IL-1 und TNF die Produktion inflammatorischer Mediatoren, wie zum Beispiel Prostaglandinen, in unterschiedlichen Zellen und Geweben [34]. Zusammen mit IL-6 stimulieren TNF und IL-1 die Produktion von Akutphasenproteinen in der Leber [1]. IL-6 fördert außerdem die Akkumulation von Monozyten und Makrophagen in inflammatorischen Umgebungen und induziert eine adaptive Immunantwort [35].

Ein weiteres von Monozyten produziertes immunstimulatorisches Zytokin ist IL-23 [36]. Zusammen mit IL-6 induziert es die Differenzierung von IL-17-sezernierenden T-Helfer 17 (T_H17)-Zellen aus CD4⁺ T-Lymphozyten [37]. IL-17 wiederum trägt zur lokalen Entzündungsantwort bei, indem es die Produktion von TNF und IL-1 durch Makrophagen induziert [38] sowie die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [39] und Monozyten [40] fördert.

Die p40-Untereinheit des heterodimeren IL-23 ist auch Bestandteil von IL-12 [41], welches ebenfalls von Monozyten produziert wird [42]. Zusammen mit IL-18 fördert es die Differenzierung von Interferon- γ -sezernierenden T-Helfer-Zellen vom Typ 1 (T_H1-Zellen) aus CD4⁺ T-Lymphozyten [43].

Darüber hinaus führt die Aktivierung bestimmter TLRs auch zur Expression von Typ-I-Interferonen (siehe 1.2.2.2). Zu den humanen Typ-I-Interferonen zählen die Interferone α , β , ϵ , κ und ω [44]. Passend zu den viralen Liganden der intrazellulären TLRs (siehe Abbildung 1-1) induzieren Typ-I-Interferone antivirale Mechanismen, wie die Inhibition der viralen Replikation [45] oder die Steigerung der Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen und Monozyten [46].

Monozyten können aber auch durch Sekretion von IL-10 aktiv zur Suppression von Immunantworten beitragen [47]. IL-10 inhibiert die Pathogen-aktivierten Funktionen aktivierter Immunzellen, wie die Sekretion von IL-12 [48] und TNF [49], und trägt so zum Abklingen einer Entzündungsantwort bei.

Bakterielle Stimuli oder die Zytokine TNF und IL-1 induzieren außerdem die Sekretion von chemotaktischen Zytokinen, den Chemokinen. Beispiele für von Monozyten produzierte Chemokine sind CCL2 und CCL7. Sie wirken chemotaktisch auf Monozyten, dendritische Zellen, T-Lymphozyten und basophile Granulozyten [50, 51].

1.2.2.4 Phagozytose von Mikroorganismen

Eine weitere wichtige Funktion von Monozyten ist die Phagozytose von Fremdkörpern oder apoptotischen Zellen. Rezeptoren, nach deren Aktivierung die Phagozytose eingeleitet wird, sind bestimmte PRRs, wie „scavenger“-Rezeptoren oder Lektine. Eine Bindung an TLRs löst jedoch keine Phagozytose aus. Darüber hinaus führt die Erkennung von Ig (Immunglobulin) G-opsonisierten Partikeln oder Zellen durch Fcγ-RI (CD64), Fcγ-RIIIA (CD32) oder Fcγ-RIIIA (CD16A) zur Phagozytose. Auch Komplementrezeptoren (CR (complement receptor) 1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18)) können nach Bindung von opsonisierenden Komplement-Proteinen die Phagozytose initiieren [1, 33].

Nach der Bindung an die Zelloberfläche kommt es im Bereich der Rezeptor-Liganden-Interaktion zu Veränderungen im Zytoskelett, woraufhin der aufzunehmende Partikel in ein Phagosom, welches im weiteren Verlauf mit Lysosomen verschmilzt, ins Innere der Zelle aufgenommen und dort zersetzt wird [52].

Durch die Phagozytose werden die Produktion immunstimulatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-6 [53] und TNF [54], sowie Mechanismen zur Abtötung und/oder Zerstörung der aufgenommenen Partikel induziert [33]. In diesem Zusammenhang bilden Phagozyten in einem als respiratorischer „Burst“ bezeichneten Vorgang reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS). Die ROS-Bildung wird maßgeblich durch den in der Membran des Phagosoms sitzenden Multienzymkomplex Nicotinadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase katalysiert. Dieses Enzym setzt unter Verwendung von NADPH als Elektronendonator Sauerstoff (O_2) zu Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$) um. Ausgehend von dem eher schwach antimikrobiell wirkenden $O_2^{\cdot-}$ kommt es in den Phagosomen zur Bildung der stark antimikrobiellen Sauerstoffspezies Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Singulett-Sauerstoff (1O_2) und Hydroxyl-Radikalen ($\cdot OH$) [55, 56].

Murine Monozyten und Makrophagen nutzen neben reaktiven Sauerstoffspezies auch Stickstoffmonoxid (NO), um eingeschlossene Mikroorganismen abzutöten [57]. Im Gegensatz zum murinen System wird die Beteiligung von NO an inflammatorischen Prozessen in humanen Monozyten und Makrophagen jedoch kontrovers diskutiert [57, 58].

1.2.2.5 Zytostatische/zytotoxische Eigenschaften von Monozyten

Monozyten zeigen *in vitro* spontane zytostatische [59-61] oder zytotoxische [62, 63] Aktivität gegenüber Tumorzellen, die durch die Anwesenheit von bakteriellen Produkten wie LPS [64] deutlich gesteigert wird. Diese zytotoxischen/zytostatischen Effekte werden über die Sekretion von ROS [63] und Zytokinen, wie TNF, IL-1 und IL-6 [65-67], vermittelt. Des Weiteren kann Zytotoxizität auch über Antikörper ausgelöst werden. Bei der ADCC

(antibody-dependent cellular cytotoxicity) erkennen Immunzellen über ihre Fc γ -Rezeptoren mit Antikörpern opsonisierte Zellen. Dies führt zur Aktivierung der Immunzellen und zur Sekretion von Zytokinen und zytotoxischen Komponenten [1]. Im Vergleich zu Granulozyten, natürlichen Killerzellen und Makrophagen, die *in vitro* deutliche Antikörper-vermittelte Zytotoxizität zeigen, ist die ADCC von Monozyten jedoch schwächer ausgeprägt [62, 68]. Inwieweit zytostatische oder zytotoxische Eigenschaften von Monozyten *in vivo* eine Rolle spielen, ist unklar.

1.2.3 Der Glukosestoffwechsel aktivierter Monozyten

Für Monozyten, aber auch andere Immunzellen, wie Makrophagen, dendritische Zellen oder T-Zellen, scheint die Energiegewinnung durch die Glykolyse sowohl in sauerstoffarmen Umgebungen wie Wunden, als auch unter normoxischen Bedingungen eine entscheidende Rolle zu spielen [69-72]. Im Falle von Monozyten wurde gezeigt, dass die Aktivierung dieser Zellen mit einer vermehrten Aufnahme von Glukose und einer erhöhten Glykolyserate assoziiert ist [71, 73]. Aufgrund der starken glykolytischen Aktivität produzieren aktivierte Immunzellen Laktat [27, 69, 70, 74] und tragen so zur extrazellulären Akkumulation von Laktat unter inflammatorischen Bedingungen bei [75-77].

In einer Reihe von Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen der Glykolyse und verschiedenen essentiellen Funktionen der Zellen des angeborenen Immunsystems beobachtet. Beispielsweise berichteten Carruthers et al., dass eine Inhibition der Glykolyse die Motilität von Leukozyten beeinträchtigt [78]. Eine Inhibition der mitochondrialen Atmung hat dagegen keinen Einfluss auf die Motilität [79]. Auch die Phagozytose ist von der glykolytischen Energiegewinnung abhängig [80-82]. Außerdem wurde beobachtet, dass eine effektive Sekretion von IL-1 und TNF durch Monozyten nur bei ausreichender Glukoseversorgung stattfindet [73, 83].

Der Mechanismus der aktivierungsbedingten Induktion der Glykolyse in Monozyten und anderen Phagozyten ist weitgehend unbekannt [84], jedoch existieren einige interessante Hinweise: Ein Transkriptionsfaktor, der in der Regulation der Glykolyse eine wichtige Rolle spielt, ist der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF)-1 α . HIF-1 α ist neben HIF-1 β Bestandteil des Transkriptionsfaktors HIF-1. HIF-1 α wird unter normoxischen Bedingungen abgebaut und durch Hypoxie stabilisiert. Infolge der Stabilisierung kommt es zur Dimerisierung mit HIF-1 β und zur Translokation in den Zellkern. Dort reguliert HIF-1 die Transkription zahlreicher Zielgene, deren Proteinprodukte unter anderem eine wichtige Rolle in der Glykolyse spielen (z.B. Hexokinase oder Laktat-Dehydrogenase (LDH)) [85]. Die HIF-1-abhängige Transkription von Genen wird jedoch nicht nur durch Hypoxie induziert,

sondern auch unter Normoxie durch Wachstumsfaktoren und Zytokine gesteuert [86]. Außerdem führt die LPS-Stimulation von Makrophagen zu einer Aktivierung von HIF-1 [87]. Rius et al. beobachteten, dass NF- κ B die *HIF-1 α* -Expression induziert. Sie zeigten außerdem, dass NF- κ B für die Akkumulation von HIF-1 α in Makrophagen unbedingt notwendig ist [88]. HIF-1 α wiederum scheint essentiell für die aktivierungsabhängige Induktion der Glykolyse in Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen zu sein [70, 74]. Cramer et al. berichteten, dass die gezielte Abschaltung von HIF-1 α in einer drastischen Reduktion der LPS-induzierten Laktatproduktion sowie der intrazellulären ATP-Menge resultiert [74].

Ein Enzym, das im Zusammenhang mit der aktivierungsbedingten Stimulation der Glykolyse von Monozyten zu stehen scheint und in verschiedenen Isoformen existiert, ist die 6-Phosphofrukto-2-Kinase (PFK-2)/Fruktose-2,6-Bisphosphatase (FBPase-2) [71, 89]. Dieses bifunktionelle Enzym katalysiert prinzipiell den Aufbau (PFK-2) sowie den Abbau (FBPase-2) von Fruktose-2,6-Bisphosphat. Letzteres stimuliert die Glykolyse durch Aktivierung der 6-Phosphofrukto-1-Kinase (PFK-1). Die relativen Aktivitäten von PFK-2 und FBPase-2 variieren jedoch unter den verschiedenen Isoformen [90]. Chesney et al. beschrieben eine durch proinflammatorische Stimuli induzierbare Isoform, die iPFK-2/FBPase-2 [89], welche unter anderem in Monozyten nach LPS-Stimulation exprimiert wird [71]. Aufgrund der hohen Kinaseaktivität der iPFK-2 kommt es zur Nettosynthese von Fruktose-2,6-Bisphosphat und somit zur Stimulation der Glykolyse [91]. Interessanterweise ist ebenfalls gezeigt, dass die Regulation der Expression der iPFK-2 in Abhängigkeit von HIF-1 α erfolgt [92, 93].

Auch Akt gilt als wichtiger Regulator der Glykolyse. Der PI3K/Akt-Weg wird unter anderem durch Bindung von PAMPs an TLRs induziert (siehe 1.2.2.2) [23]. Akt steigert die Glukoseaufnahme von Zellen, indem es die Translokation des Glukosetransporters (GLUT)-4 zur Zytoplasmamembran induziert und die Transkription von *GLUT-1* steigert. Außerdem erhöht es die Glykolyserate durch Aktivierung der Hexokinase und Stimulation der iPFK-2 [94, 95]. Des Weiteren kann eine Aktivierung des PI3K/Akt-Weges auch zur Aktivierung der Expression von HIF-1 α führen [86]. Im Zusammenhang mit Akt wurde kürzlich von Krawczyk et al. gezeigt, dass die TLR-induzierte Stimulation der Glykolyse in dendritischen Zellen nur in Anwesenheit von Akt stattfinden kann [96].

1.3 Die Rolle von Immunzellen im Tumor

Tumore werden von zahlreichen Immunzellen infiltriert. Obwohl eine effektive antitumorale Aktivität durch verschiedene Zelltypen möglich wäre, tragen Tumor-infiltrierende

Immunzellen in vielen Fällen aktiv zur Tumorentwicklung bei [97, 98]. Ein Grund hierfür ist die durch inflammatorische Immunzellen hervorgerufene Tumor-assoziierte Entzündung die das Wachstum von Tumoren begünstigt (siehe 1.3.1 und 1.3.2). Des Weiteren erfolgt im Tumor eine Veränderung von Immunzellen zu protumoralen Phänotypen (siehe 1.3.3) [99, 100].

1.3.1 Tumor-assoziierte Entzündungen

Es wird angenommen, dass die meisten, wenn nicht sogar alle Tumore mit einer Entzündung assoziiert sind [101]. Zum einen begünstigen bestimmte chronische Entzündungen, die beispielsweise durch Infektion mit *Helicobacter pylori* [102], mit dem Hepatitis C-Virus [103] oder durch bestimmte Autoimmunerkrankungen hervorgerufen werden [104], die Entstehung von Tumoren. Aber auch Tumore, die sich ohne vorhergehende Entzündung entwickelt haben, weisen Tumor-assoziierte Entzündungen auf [101]. Ein wichtiges Merkmal der Tumor-assoziierten Entzündung ist, dass sie im Gegensatz zu vielen Pathogen-assoziierten Entzündungen nicht zur Elimination des Tumors beiträgt. Stattdessen ist sie durch eine chronische Produktion proinflammatorischer Mediatoren gekennzeichnet [99].

Inflammatorische Zelltypen, die in Tumoren gefunden werden, sind sowohl Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen, als auch Zellen des adaptiven Immunsystems, wie T-Lymphozyten [99]. Immunzellen werden zum Teil aktiv von Tumoren rekrutiert. Beispielsweise veranlasst die Produktion von CCL2 oder VEGF (vascular endothelial growth factor) durch Tumorzellen und Tumor-assoziierte Immunzellen die Einwanderung von Monozyten ins Tumorgewebe [105, 106]. Wie im folgenden Kapitel geschildert, führt die Tumor-assoziierte Entzündung zur Anreicherung zahlreicher protumoraler Faktoren.

1.3.2 Die Bedeutung von NF- κ B in der Tumor-assoziierten Entzündung

Im Zusammenhang mit Tumor-assoziierten Entzündungen und der Etablierung eines inflammatorischen Milieus im Tumor spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine wichtige Rolle [101, 107]. Die Expression von NF- κ B wird unter anderem durch die Bindung von PAMPs an TLRs induziert (siehe 1.2.2.2). TLRs werden nicht nur in Zellen des angeborenen Immunsystems [16], sondern auch in Epithelzellen [108, 109] und

Endothelzellen [110], einschließlich Tumorzellen [111-114], exprimiert. Dabei wurde mehrfach gezeigt, dass die TLRs auf Tumorzellen funktionell sind und die Bindung von bakteriellen Liganden positive Effekte auf das Tumorstadium hat [111, 113-116]. Da Bakterien beispielsweise in Biopsien von Tumoren im Kopf- und Halsbereich [111] oder Darm [117] gefunden wurden, könnte die bakteriell induzierte NF- κ B-Aktivierung vor allem in Tumoren an Grenzflächen von Bedeutung sein.

Neben PAMPs führen auch endogene TLR-Liganden, die DAMPs, zur Aktivierung von NF- κ B (siehe 1.2.2.2) [118]. DAMPs werden im Tumormilieu passiv durch Nekrose, aber auch aktiv durch Immunzellen freigesetzt [119]. Mittal et al. zeigten, dass HMGB1, ein endogener TLR4-Ligand, durch seinen positiven Effekt auf die Rekrutierung und Aktivierung von inflammatorischen Zellen die Tumor-assoziierte Entzündung initiiert [120]. Auch die Bindung der Zytokine TNF und IL-1 an ihre Rezeptoren auf Immun- und Tumorzellen aktiviert NF- κ B. Da die Produktion dieser beiden Zytokine selbst unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B steht, führt deren Sekretion durch stimulierte Immunzellen im Tumormilieu zur parakrinen Aktivierung von NF- κ B und damit zu dessen häufig in Tumorzellen auftretender konstitutiver Aktivität [107].

Viele der positiven Effekte der Entzündung in Tumoren sind auf die Aktivierung von NF- κ B-Zielgenen in Tumor- und Immunzellen zurückzuführen. Beispielsweise fördert die NF- κ B-induzierte Expression von Matrixmetalloproteasen (MMPs) und Angiogenesefaktoren, wie VEGF und IL-8, die Angiogenese und die Metastasierung von Tumoren. NF- κ B aktiviert auch die Expression der Cyclooxygenase (COX)-2 [121, 122]. Letztere katalysiert die Synthese von Prostanoiden, wie Prostaglandin E₂ (PGE₂) [123], welches zur Modulation der Immunantwort im Tumor beiträgt (siehe 1.3.3). In Tumorzellen induziert NF- κ B außerdem die Induktion der Expression von Genen für die Zellzyklusregulation oder antiapoptotischen Genen [107].

Ein wichtiger Effekt der Aktivierung von NF- κ B ist darüber hinaus die Induktion der Expression weiterer proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6 und IL-23). Durch Bindung von IL-6 und IL-23 an ihre Rezeptoren auf Immun- und Tumorzellen kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), der ebenfalls protumorale Funktionen hat. Er induziert unter anderem die Expression von IL-6, IL-23 und IL-10 (unabhängig von NF- κ B) [124]. Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Modulation der Immunantwort im Tumor.

1.3.3 Veränderung und Suppression von Immunzellen im Tumor

Im Tumor findet eine Entwicklung von Immunzellphänotypen statt, die das Tumorstadium fördern und antitumorale Aktivitäten anderer Immunzellen supprimieren [98, 125]. Ein Beispiel für die Veränderung von Immunzellen im Tumor stellen Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) dar. Makrophagen entwickeln als Reaktion auf die in ihrer Umgebung vorliegenden Zytokine und Stimuli unterschiedliche Phänotypen. Der sogenannte M1-Phänotyp von Makrophagen zeichnet sich durch die Sekretion immunstimulatorischer Zytokine, wie IL-12, TNF und IL-1, sowie durch die Produktion von ROS aus und kann zur Bekämpfung von Tumorzellen beitragen. TAM zeigen jedoch Ähnlichkeiten zu dem M2-Phänotyp von Makrophagen, der in die Reparatur von Geweben und die Regulation einer Immunantwort involviert ist. TAM gelten als protumoral, sie produzieren immunsuppressive Mediatoren, wie „transforming growth factor- β “ (TGF- β), IL-10 oder PGE₂, und fördern unter anderem durch die Sekretion von VEGF die Angiogenese im Tumor. Darüber hinaus tragen sie zur Invasion und Metastasierung von Tumorzellen bei [126-128].

Der Grund für die reduzierte Sekretion von TNF, IL-1 und IL-12 durch TAM ist unter anderem eine mit der Tumorentwicklung einhergehende Veränderung der NF- κ B-Aktivierung in diesen Zellen [128]. Im Gegensatz zu murinen Makrophagen aus frühen Stadien der Tumorentwicklung, die durch die Aktivität von NF- κ B die Entzündung im Tumor etablieren, wurde in murinen Makrophagen aus fortgeschrittenen Tumorstadien eine defekte Aktivierung von NF- κ B festgestellt [129, 130]. Auch Tumor-assoziierte humane Monozyten zeigen eine reduzierte Sekretion von IL-1 und TNF [131], wobei die zugrundeliegenden Mechanismen weitgehend unklar sind.

Immunsuppressive Faktoren, wie IL-10 und TGF- β , aber auch PGE₂, haben zum einen direkte inhibitorische Effekte auf Immunzellen [125], zum anderen fördern sie die Anreicherung suppressiver und/oder protumoraler Immunzelltypen: CD4⁺ T-Helfer-Zellen entwickeln sich unter Einfluss von TGF- β und PGE₂ vermehrt zu regulatorischen T-Zellen, die potente immunsuppressive Eigenschaften haben [97, 98]. PGE₂ sowie die Anwesenheit von IL-1, IL-6 und der Proteine S100A8 und S100A9 im Tumor führen auch zur Akkumulation einer heterogenen Population von Zellen myeloiden Ursprungs, den MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) [132-134]. MDSCs unterdrücken antitumorale Aktivitäten verschiedenster Immunzellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems [100]. TGF- β , IL-6 und IL-23 stimulieren auch die Differenzierung von CD4⁺ T-Lymphozyten zu protumoralen T_H17-Zellen. Diese reduzieren unter anderem die Zahl der zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten im Tumor [98, 100].

Unterschiedlichste, von Tumorzellen sezernierte Moleküle haben ebenfalls immunsupprimierende oder -modulierende Eigenschaften. Mehrere Tumorarten, darunter Neuro-

blastom, Retinoblastom, Melanom, Nierenzellkarzinom, Kolonkarzinom und Lymphom, geben Ganglioside, in der äußeren Plasmamembran lokalisierte Glykosphingolipide mit Sialinsäureresten [135], in das Tumormilieu ab und supprimieren dadurch Monozyten und andere Immunzellen [136-140]. Zou et al. stellten bei Monozyten eine verminderte Produktion von IL-12 und TNF sowie eine gesteigerte Produktion von IL-6 und IL-10 nach Inkubation mit Kulturüberständen humaner Glioblastomzellen fest [141]. Ferner inhibiert von Tumoren produzierte Hyaluronsäure die TNF- und IL-12-Sekretion von Monozyten und stimuliert deren IL-10-Sekretion [142]. Daneben trägt auch ein veränderter Tumormetabolismus zur Veränderung des Phänotyps Tumor-infiltrierender Immunzellen bei.

1.4 Der Tumormetabolismus und sein Einfluss auf Immunzellen

Der Metabolismus von Tumorzellen weist verschiedene Veränderungen im Vergleich zu untransformierten Zellen auf. Dabei steht fest, dass die metabolischen Besonderheiten wichtige Beiträge zum Wachstum und zur Entwicklung von Tumoren leisten und beispielsweise durch die Sekretion von Tumormetaboliten das Tumorstroma beeinflussen [143]. Die Besonderheiten des Glukosemetabolismus (siehe 1.4.1) sowie eine Veränderung im Polyaminstoffwechsel (siehe 1.4.2) von Tumorzellen und deren Auswirkungen auf Immunzellen werden im Folgenden genauer betrachtet.

1.4.1 Der Glukosemetabolismus von Tumorzellen

1.4.1.1 Der glykolytische Phänotyp von Tumoren

Normalerweise gewinnen Zellen den größten Teil ihrer Energie durch die oxidative Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu zeigen viele Tumorzellen trotz Anwesenheit von Sauerstoff eine vermehrte Glukoseaufnahme und Laktatproduktion. Diese aerobe Form der Glykolyse, die nach ihrem Entdecker Otto Warburg auch als „Warburg-Effekt“ bezeichnet wird, ist das bekannteste Beispiel für metabolische Veränderungen in Tumorzellen und stellt eine Gemeinsamkeit vieler Tumore dar [85, 144]. Die weite Verbreitung des glykolytischen Phänotyps von Tumoren ist die Basis für die Detektion der Aufnahme von ¹⁸Fluordeoxyglukose, eines nicht verstoffwechselbaren Glukoseanalogons, mittels Positronenemissionstomographie (PET) in der klinischen Diagnostik von Tumoren

[145]. Dabei korreliert die gesteigerte Aufnahme von Glukose häufig mit einer schlechteren Prognose [146, 147].

Die Beobachtung, dass auch zur Atmung befähigte Tumorzellen Glukose durch die aerobe Glykolyse verstoffwechseln [148], gab unter anderem Grund zu der Annahme, dass der glykolytische Phänotyp den Tumorzellen Vorteile verschafft [149]. Beispielsweise ermöglicht die sauerstoffunabhängige Energiegewinnung das Wachstum von Tumoren in hypoxischen Bereichen [85]. Darüber hinaus liefert die Glykolyse Intermediate für den Pentosephosphatweg, welcher Vorstufen für Nukleotide produziert. Im oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs entsteht außerdem das für anabole Prozesse benötigte Reduktionsäquivalent NADPH. Die Synthese von Makromolekülen scheint auch eine wichtige Aufgabe der Mitochondrien von Tumorzellen zu sein: Obwohl der Großteil des durch die Glykolyse produzierten Pyruvats durch die LDH zu Laktat umgesetzt und von den Zellen sezerniert wird, wird ein Teil des Pyruvats auch zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) umgewandelt, in einen verkürzten Citratzyklus eingeschleust und zur Synthese von Lipiden oder Aminosäuren genutzt [85, 149, 150].

Auch die Produktion von Laktat bietet Vorteile für die Tumorzellen [85]. Laktat, das Salz der Milchsäure, wird durch Monocarboxylattransporter (MCT) im Kotransport mit Protonen aus Zellen ausgeschleust, was dem Export von Milchsäure entspricht [151, 152]. Die sezernierte Milchsäure liegt unter physiologischen Bedingungen zu 99% zu Protonen und Laktat dissoziiert vor [151] und trägt zur Ansäuerung des Tumormilieus bei [153]. Tumorzellen, die beispielsweise durch eine Inhibition der Apoptose an niedrige extrazelluläre pH-Werte angepasst sind, bietet die Ansäuerung Vorteile für Wachstum und Entwicklung [154]. Sie fördert unter anderem den Abbau der extrazellulären Matrix und die Metastasierung [155, 156]. Auch Laktat, das in Tumoren in Konzentrationen von bis zu 40 $\mu\text{mol/g}$ gemessen wurde, beeinflusst die Metastasierung von Tumoren. Dabei korrelieren hohe Laktatkonzentrationen in Tumoren mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Metastasierung, einer größeren Malignität von Tumoren und einer schlechteren Prognose [157-159]. Laktat stimuliert beispielsweise die Produktion von Hyaluronsäure durch Fibroblasten im Tumormilieu. Hyaluronsäure erweitert aufgrund ihrer starken Hydratisierung die Zellzwischenräume und ermöglicht die für die Metastasierung benötigte Migration von Tumorzellen [160]. Darüber hinaus fördert Laktat die VEGF-Sekretion durch Endothelzellen [161]. Laktat beeinflusst aber nicht nur die Produktion protumoraler Faktoren im Tumormilieu. Koukourakis et al. zeigten, dass Laktat in ausreichend mit Sauerstoff versorgten Bereichen des Tumors durch Fibroblasten aufgenommen, zu Pyruvat umgewandelt und aerob verstoffwechselt werden kann [162]. Laktat und Milchsäure haben darüber hinaus auch Effekte auf Immunzellen, die verschiedene Vorteile für das Tumorstadium bieten (siehe 1.4.1.3).

1.4.1.2 Molekulare Veränderungen im Glukosemetabolismus

Der glykolytische Phänotyp von Tumorzellen ist durch die verstärkte Expression verschiedener Transporter und Enzyme des Glukosestoffwechsels gekennzeichnet (Abbildung 1-3).

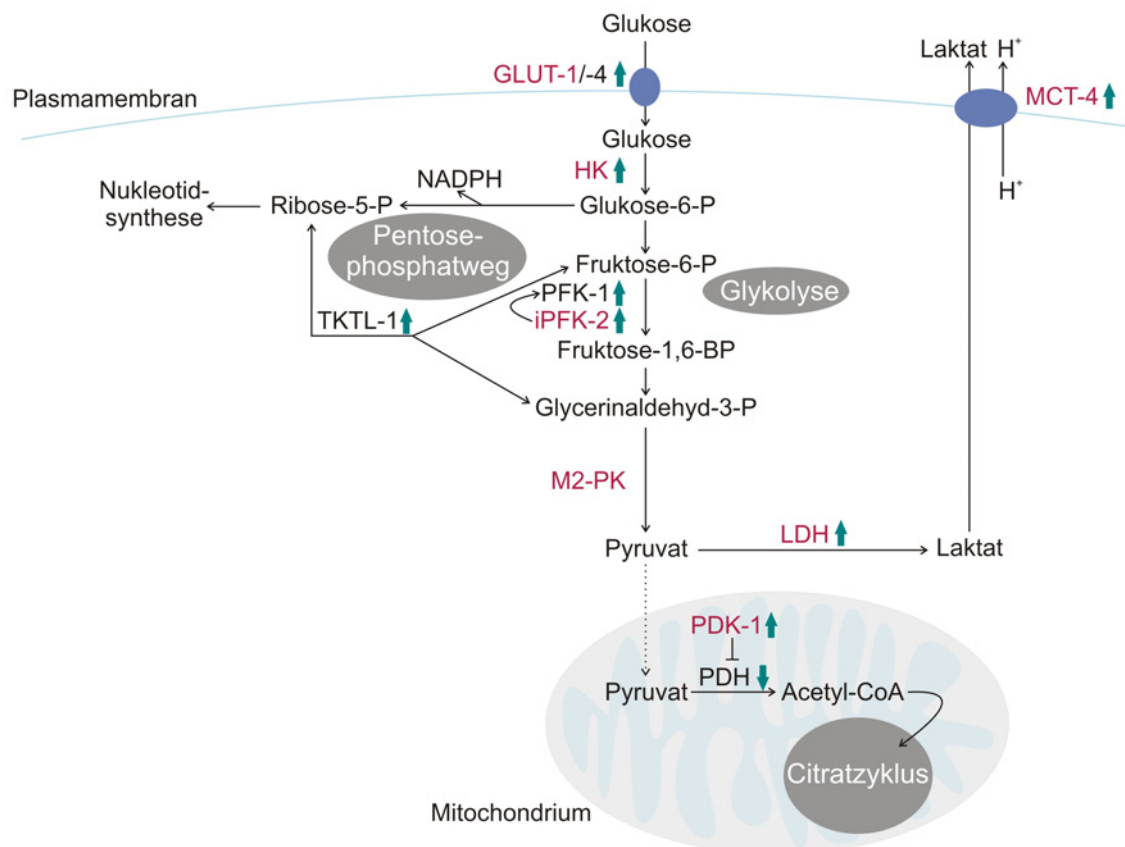


Abbildung 1-3: Mit dem glykolytischen Phänotyp einhergehende metabolische Veränderungen in Tumorzellen

Tumorzellen zeigen eine erhöhte Glykolyserate, gekennzeichnet durch die gesteigerte Expression der Glukosetransporter (GLUT)-1 und -4, der Hexokinase (HK), der 6-Phosphofrukto-1-Kinase (PFK-1), der 6-Phosphofrukto-2-Kinase (PFK-2), der Laktat-Dehydrogenase und des Monocarboxylattransporters (MCT)-4. Darüber hinaus exprimieren sie die dimere M2-Form der Pyruvat-Kinase (M2-PK). Diese setzt Phosphoenolpyruvat nur langsam zu Pyruvat um, wodurch Intermediate der Glykolyse vermehrt für anabole Stoffwechselwege, wie den Pentosephosphatweg, bereitgestellt werden. Letzter weist in vielen Tumoren eine Überexpression des Enzyms "transketolase-like-1" (TKTL-1) auf. Die gesteigerte Expression der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-1 (PDK-1) senkt die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH), wodurch geringere Mengen von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) für den Citratzyklus zur Verfügung stehen. Die Expression rot markierter Enzyme oder Transporter wird unter anderem in Abhängigkeit des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF)-1 induziert. Die grünen Pfeile weisen auf eine vermehrte oder verringerte Expression der genannten Transporter oder Enzyme in Tumorzellen hin. Weitere Abkürzungen: -P, Phosphat; -BP, Bisphosphat; NADPH: Nicotinamadenindinukleotidphosphat. Abbildung nach [85] und [149], modifiziert.

Beispiele hierfür sind verschiedene Formen von GLUTs, die Hexokinase und die LDH [85, 146, 163-165]. Die Bedeutung der LDH für das Tumorwachstum zeigt sich bei Inhibition dieses Enzyms, welche einerseits in einer Stimulation der mitochondrialen Atmung, aber andererseits in einer verminderten Proliferation der Tumorzellen resultiert [166].

Eine wichtige Rolle in der Glykolyse von Tumoren kommt auch der Pyruvat-Kinase (PK) zu, welche die Dephosphorylierung von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat katalysiert: Tumorzellen exprimieren hauptsächlich die M2-Isoform der PK (M2-PK), welche in proliferierenden Zellen mit starker Nukleinsäuresyntheserate auftritt. Die M2-PK existiert in zwei Formen, der tetrameren, stark aktiven Form sowie der normalerweise in Tumorzellen vorliegenden dimeren, weniger aktiven Form. Die dimere Form der M2-PK liefert Vorteile für das Tumorwachstum, denn ihre geringere Kapazität, Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat umzusetzen, führt zur Anreicherung von glykolytischen Intermediaten, die für synthetische Prozesse zur Verfügung stehen [167].

Auch Stoffwechselwege, die mit der Glykolyse assoziiert sind, weisen Abweichungen auf. So zeigen viele Tumore eine Überexpression des Enzyms „transketolase-like-1“ (TKTL-1), welches im nicht-oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs die Übertragung von Kohlenstoffeinheiten katalysiert [168, 169].

Den Veränderungen im Glukosestoffwechsel liegen unterschiedliche molekulare Mechanismen zu Grunde. Wie in Abbildung 1-3 zu sehen, spielt der unter hypoxischen Bedingungen aktivierte Transkriptionsfaktor HIF-1 eine wichtige Rolle in der Stimulation der aeroben Glykolyse in Tumorzellen (siehe auch 1.2.3). HIF-1 stimuliert die Expression der für GLUT-1, Hexokinase, LDH und MCT-4 kodierenden Gene [85, 170]. Auch die Expression des in verschiedenen Tumoren konstitutiv exprimierten *iPFK-2*-Gens wird durch HIF-1 verstärkt [89, 93]. Die *iPFK-2* steigert durch Synthese von Fruktose-2,6-Bisphosphat die Aktivität der PFK-1 (siehe 1.2.3). Ferner steuert HIF-1 die Expression des für die Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-1 (PDK-1) kodierenden Gens. PDK-1 inhibiert die Pyruvat-Dehydrogenase, welche die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert und supprimiert somit den Abbau von Pyruvat über den Citratzyklus [171, 172]. Die Aktivierung von HIF-1 tritt jedoch nicht nur unter hypoxischen Bedingungen auf: HIF-1 wird beispielsweise auch in Tumorzellen in Abhängigkeit von NF- κ B [173] oder durch aktivierte Onkogene bzw. inaktivierte Tumor-Suppressorgene aktiviert [170].

Tumor-Suppressorgene oder Onkogene beeinflussen die Glykolyse auch unabhängig von HIF-1. Der häufig in Tumoren konstitutiv aktivierte PI3K/Akt-Weg stimuliert unter anderem die Transkription von *GLUT-1*, die Aktivierung der Hexokinase und die Aktivität der *iPFK-2* [94, 95]. Ein weiteres Beispiel ist der Transkriptionsfaktor c-MYC, der unter anderem die Expression des *LDHA*-Gens induziert [174].

Obwohl auch respiratorisch aktive Tumore eine erhöhte Glykolyserate zeigen, können Fehlfunktionen von Mitochondrien zum glykolytischen Phänotyp beitragen [148]. Beispielsweise induziert der Tumor-Suppressor p53 die Expression des Gens *Synthese von Cytochrom-c-Oxidase (SCO) 2*. SCO2 ist zusammen mit SCO1 für den korrekten Aufbau der Cytochrom-c-Oxidase verantwortlich. Tumorzellen mit mutiertem p53 zeigen aufgrund einer Cytochrom-c-Oxidase-Defizienz eine verminderte mitochondriale Atmung sowie eine vermehrte Laktatproduktion [175].

1.4.1.3 Einfluss von Milchsäure und Laktat auf Immunzellen

Die starke Sekretion von Milchsäure durch Tumore führt zur Anreicherung von Protonen und Laktat im Tumormilieu [151]. Auch in Wunden wurden im Vergleich zu normalen Blutlaktatkonzentrationen (ca. 1,3 mM [176]) deutlich erhöhte Laktatkonzentrationen von bis zu 15 mM gemessen. Die Anreicherung von Laktat in Wunden ist überwiegend das Ergebnis der erhöhten Glykolyserate aktivierter Immunzellen und eines verminderten Abtransports von Laktat aufgrund der schlechten Vaskularisierung vieler Wunden [77].

Verschiedene Arbeiten zeigten, dass Laktat und Milchsäure immunmodulatorische Effekte haben. Laktat stimuliert die Sekretion der proangiogenen und immunsuppressiven Wachstumsfaktoren VEGF und TGF- β durch Makrophagen [77, 177]. Hohe Konzentrationen an Laktat inhibieren außerdem die Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen [178]. Samuvel et al. berichteten dagegen von immunstimulatorischen Effekten durch Laktat. Die Vorinkubation mit Laktat steigerte sowohl die LPS-induzierte Genexpression (IL-6, IL-8, TNF, IL-1), als auch die Sekretion von IL-6 durch humane Makrophagen [179].

Shime et al. beobachteten, dass Milchsäure eine verstärkende Wirkung auf die TLR-stimulierte mRNA-Expression und Sekretion von IL-6 und IL-23 durch humane Monozyten und murine Makrophagen hat [36]. Wie die gleiche Gruppe vor kurzem zeigte, aktiviert auch Milchsäure alleine die IL-23-Sekretion dieser Zellen [180]. Witkin et al. demonstrierten ebenfalls, dass Milchsäure die LPS-induzierte Sekretion von IL-23 in mononukleären Zellen steigert. Jedoch stellten sie keine Effekte auf die Sekretion anderer Zytokine fest [181]. Im Gegensatz dazu berichteten Kellum et al. von einer Inhibition der LPS-stimulierten IL-6- und IL-10-Sekretion durch Milchsäure [182].

Wie Douvdevani et al. zeigten, führen Peritonealdialyseflüssigkeiten, welche durch hohe Laktatkonzentrationen und saure pH-Werte gekennzeichnet sind, zu einer Inhibition der LPS-stimulierten TNF-Sekretion humaner Makrophagen [183, 184]. Auch anhand der humanen monozytären Zelllinie THP-1 wurde demonstriert, dass Milchsäure eine Inhibition der LPS-stimulierten TNF-Sekretion bedingt [185]. Jensen et al. fanden dagegen

eine Induktion der TNF-Sekretion durch Milchsäure in Ratten-Makrophagen [186]. Darüber hinaus moduliert Milchsäure die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen [187] und inhibiert die Aktivierung von T-Zellen [188].

1.4.2 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin – ein Produkt der Polyaminsynthese

1.4.2.1 Der dysregulierte Abbau von MTA in Tumorzellen

Polyamine, wie Putrescin, Spermin und Spermidin, sind natürlich vorkommende organische Kationen mit essentiellen Funktionen für Wachstum und Differenzierung von eukaryotischen Zellen [189, 190]. Die Synthese von Polyaminen findet ubiquitär statt. Sie verläuft ausgehend von der nicht-proteinogenen Aminosäure Ornithin über mehrere Schritte und erfordert die Umsetzung von decarboxyliertem S-Adenosylmethionin (SAM) zu 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) (Abbildung 1-4).

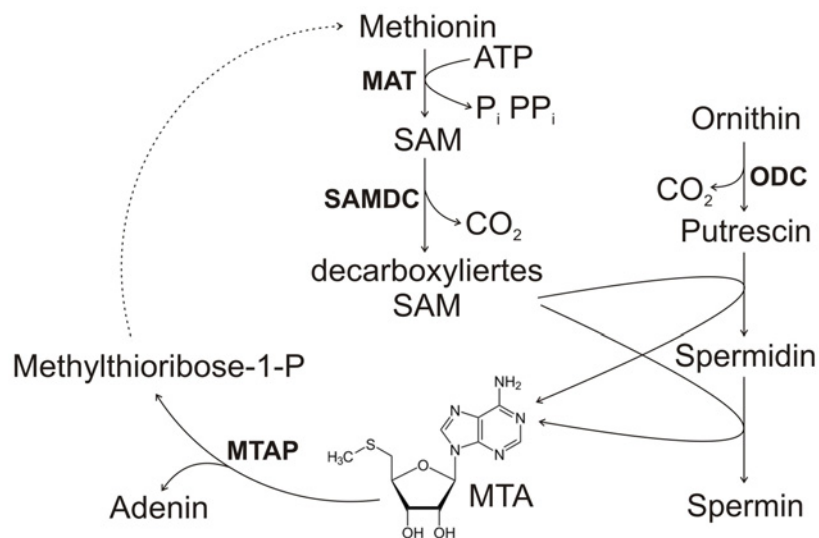


Abbildung 1-4: Synthese und Metabolismus von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin

Die Methionin-Adenosyltransferase (MAT) katalysiert die Bildung von S-Adenosylmethionin (SAM), welches anschließend durch die SAM-Decarboxylase (SAMDC) decarboxyliert wird. Decarboxyliertes SAM wird in der Polyaminsynthese eingesetzt, deren ersten Schritt die Ornithin-Decarboxylase (ODC) katalysiert. Als Produkt der Reaktion mit Putrescin und Spermidin entsteht 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA), welches durch die Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) zu Adenin und Methylthioribose-1-Phosphat (P) gespalten wird. Methylthioribose-1-P dient schließlich der Rückgewinnung von Methionin. Weitere Abkürzungen: ATP: Adenosintriphosphat; P_i: anorganisches Phosphat; PP_i: anorganisches Pyrophosphat; CO₂: Kohlendioxid. Abbildung nach [191] und [192], modifiziert.

MTA wird anschließend unter Gewinnung von Adenin zu Methionin rückgebildet. Methionin kann schließlich wiederum zur Synthese von SAM genutzt werden [191, 192]. Der erste Schritt dieses Rückgewinnungswegs wird durch die Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) katalysiert [193].

Verschiedene Tumore, wie malignes Melanom, Osteosarkom, endometriales Adenokarzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom und Mammakarzinom weisen eine Defizienz der MTAP auf [194-198]. Da MTA in MTAP-defizienten Tumorzellen nicht abgebaut werden kann, es aber die Polyaminsynthese inhibiert [199], wird es ins Tumormilieu sezerniert [200, 201]. Die Ursachen für die fehlende MTAP-Expression liegen in einer DNA-Hypermethylierung des Promotorbereichs oder in der Deletion des *MTAP*-Gens [195, 198, 202]. Im Falle des malignen Melanoms wurde gezeigt, dass der Verlust der MTAP-Expression mit verstärkter Invasivität verbunden ist. Dies gab Anlass zu der Hypothese, dass der Verlust der MTAP-Expression zur Metastasierung des malignen Melanoms beitragen könnte [202].

Der Verlust der MTAP-Expression wurde mit protumoralen Effekten in Verbindung gebracht. Das Enzym Ornithin-Decarboxylase (ODC) katalysiert den ersten Schritt der Polyaminsynthese. Die ODC zeigt in Tumoren häufig gesteigerte Aktivität und trägt so zu einer erhöhten Polyaminsynthese von Tumoren bei [189]. Subhi et al. zeigten, dass aufgrund der MTAP-Defizienz die Synthese eines Inhibitors der ODC ausbleibt, was ebenfalls zur gesteigerten Polyaminsynthese von Tumoren beitragen kann [203]. Obwohl MTA durch die Tumorzellen sezerniert wird, wurde beobachtet, dass es sich in geringen Mengen in den Zellen anreichert und dadurch intrazelluläre Effekte hat [191]. Beispielsweise inhibiert MTA die Aktivität von Methyltransferasen [204] und reduziert die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT1 [205, 206]. Mowen et al. vermuteten, die MTA-induzierte Inhibition der Methylierung sei der Grund für die reduzierte Aktivität von STAT1 [205]. Meissner et al. konnten dies jedoch nicht bestätigen [206]. Die Aktivierung von STAT1 durch Interferon α ist die Basis für dessen wachstumshemmende Wirkung im Rahmen der Therapie des malignen Melanoms. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die immunhistochemische Analyse der MTAP-Expression von Melanomzellen eine Aussage über das Ansprechen von Patienten auf die Interferon-Therapie zulässt [207, 208].

1.4.2.2 Einfluss von MTA auf Immunzellen

Aufgrund der Sekretion von MTA durch MTAP-defiziente Tumorzellen kommt es zu einer Anreicherung von MTA im Tumormilieu [201]. Über den Einfluss von MTA auf Tumorinfiltrierende Immunzellen existieren jedoch nur relativ wenige Arbeiten. In LPS-

stimulierten Makrophagen steigert MTA die Sekretion von IL-10 und inhibiert die TNF-Sekretion [209, 210]. Letzteres scheint zum einen durch eine Interaktion von MTA mit der TLR-abhängigen Signaltransduktion zu erfolgen [210, 211]. Zum anderen wurde gezeigt, dass MTA die LPS-induzierte Transkription von TNF aufgrund einer veränderten Histon-Methylierung im Promotorbereich des *TNF*-Gens verhindert [212, 213]. Ferner supprimiert MTA die Aktivierung von T-Zellen und führt auch hier zu einer Inhibition der Expression proinflammatorischer Zytokine sowie der Induktion von IL-10 [214]. Darüber hinaus inhibiert MTA die Proliferation von Lymphozyten, deren lytische Eigenschaften, die Sekretion von Antikörpern durch B-Zellen und die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen [215-218].

2 Zielsetzung

Tumorzellen weisen im Vergleich zu untransformierten Zellen häufig Veränderungen in verschiedenen Stoffwechselwegen auf. Das wohl bekannteste Beispiel dafür ist der in vielen Tumoren veränderte Glukosestoffwechsel. Die erhöhte Glykolyserate von Tumorzellen führt zur gesteigerten Produktion von Laktat und dessen Sekretion im Kotransport mit Protonen, also in Form von Milchsäure, ins Tumormilieu. Da bekannt ist, dass Milchsäure unterschiedliche Tumor-infiltrierende Immunzellen beeinflusst, sollte in dieser Arbeit der Einfluss von Milchsäure auf humane Monozyten und deren Effektorfunktionen charakterisiert werden. Weiterhin galt es, den Mechanismus der Wirkung von Milchsäure auf Monozyten zu analysieren.

Ein weiteres Beispiel für einen veränderten Stoffwechselweg findet sich im Rahmen der Synthese von Polyaminen durch Tumorzellen. Aufgrund einer Defizienz der Methylthioadenosin-Phosphorylase, welche den Abbau von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA), einem Nebenprodukt der Polyaminsynthese, katalysiert, kommt es zur Akkumulation von MTA im Tumormilieu. Da über den Effekt von MTA auf Immunzellen relativ wenig bekannt ist, sollten der Einfluss von MTA auf humane Monozyten und mögliche Mechanismen der Wirkung dieses Nukleosids untersucht werden.

3 Material

3.1 Geräte

4000 QTrap Triple-Quadrupol-Massenspektrometer	Applied Biosystems, Darmstadt
Agilent 1200 SL HPLC-System	Agilent Technologies, Böblingen
Autoklav	Walter, Greislingen
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Böblingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
CASY Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
Chemotaxiskammer (48 Vertiefungen)	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD, Heidelberg
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen
Elutriator Avanti J-20XP	Beckmann Coulter, Krefeld
Entwicklungsanlage	AGFA, Köln
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Gaschromatograph Agilent 6890 GC	Agilent Technologies, Böblingen
Gummiwischer für Chemotaxisanalyse	Neuro Probe, Gaithersburg, USA
Inkubatoren BBD 6220	Heraeus, Osterode
Kamera AxioCam HRc	Zeiss, Jena
klinisches Analysegerät ADVIA 1650	Bayer, Tarrytown, USA
Kreisschüttler Vibrax-VXR	IKA, Staufen
Luminometer Sirius	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph, Schwabach
Mikroarray-Glasträger	Agilent Technologies, Böblingen
Mikroarray-Hybridisierungskammern SureHyb	Agilent Technologies, Böblingen
Mikroarray-Hybridisierungsöfen	Agilent Technologies, Böblingen
Mikroarray-Scanner	Agilent Technologies, Böblingen
Mikroskope	Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten-Waschgerät	Thermo Electron Corporation
Mikrowelle Privileg 8020	Privileg, Fürth
Multipipette Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop ND1000	PeqLab, Erlangen
Netzgeräte	Biometra, Göttingen

Neubauerzählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Thermocycler Modell PTC-200	MJ-Research/Biometra, Göttingen
pH-Meter	Knick, Berlin
pH-Meter, tragbar	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Photometer	MWG-Biotech, Ebersberg
Picofuge	Heraeus, Osterode
Plattenleser GENios Pro (mit Injektorsystem)	Tecan, Crailsheim
Quadrupol-Massenspektrometer 5975C InertXL	Agilent Technologies, Böblingen
Realplex Mastercycler epGradient S	Eppendorf, Hamburg
Sauerstoff-Messgerät SensorDish-Reader	PreSens, Regensburg
Schweißgerät für PCR-Platten Fermant 400	Josten & Kettenbaum, Bensberg
Sterilbank Lamin Air HA 2472	Heraeus, Osterode
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Trennkammer für Gegenstromzentrifugation	Beckmann, München
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus HC2200	Brandelin, Berlin
Vakuum-Evaporator Hettich Combi-Dancer	Zinsser Analytic, Frankfurt
Vortexer	Scientific Industries, New York, USA
Waage LP1200S	Sartorius, Göttingen
Wallac-Betaplattenzähler	PerkinElmer, Rodgau
Wallac-Erntegerät	PerkinElmer, Rodgau
Wasseraufbereitungsanlage	Milipore, Eschborn
Wasserbäder	Julabo, Seelstadt
Western-Blot-Kammer	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Avanti J-20XP; Rotor JE 5.0	Beckmann, München
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Zentrifuge J6M-E	Beckmann, München
Zentrifuge Megafuge 3,0 R	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Sigma 2	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Sorvall RC 6 plus	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

3.2 Verbrauchsmaterial

Adhäsionsobjektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen

dickwandige Reaktionsgefäße (0,1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Dispenserspitzen für Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Einmalkanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalpipetten	Costar, Cambridge, USA
Einmalspritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Filterpapier 3MM	Whatman, Dassel
Filterröhrchen Vivaspin 4 (5 kDa)	Sartorius, Göttingen
Fotofilm Hyperfilm™ ECL	Amersham, Braunschweig
Glasröhrchen für Methanolextraktion	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Immobilon-P PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach
Kryogefäß für Kryoröhrchen	Nalgene, Roskilde, Dänemark
Kryoröhrchen	Nunc, Langenselbold
Mikroarray-Glasträger	Agilent Technologies, Böblingen
Mikrotiterplatten (6, 12, 96 Vertiefungen)	Falcon, Heidelberg
Mikrotiterplatten für ELISA	Costar, Cambridge, USA
Mikrotiterplatten für Kalziummessungen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objektträger	Roth, Karlsruhe
OxoDishes (24 Vertiefungen)	PreSens, Regensburg
PCR-Platten Twin.tec (96 Vertiefungen)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
PVDF-Membran für Chemotaxis (5 µm)	GE Osmonics, Minnetonka, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Siegelfolie	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Teflonbeutel Biofolie 25	Heraeus Sepatech, Hanau
UniFilterplatten	Perkin-Elmer, Rodgau
Whole Human Genome Microarray (4 x 44 K)	Agilent Technologies, Böblingen
Zellkulturflaschen	Costar, Cambridge, USA
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg

3.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern in Kapitel 4 nicht anders erwähnt, von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

3.4 Antikörper

Antikörper für Immunhistologie

anti-CD45 (human)	Maus (IgG)	Diatec, Oslo, Norwegen
anti-Adenosin A ₁ Rezeptor (human)	Kaninchen (IgG)	Chemicon, Billerica, USA
anti-Adenosin A _{2A} Rezeptor (human)	Kaninchen (IgG)	Chemicon, Billerica, USA
anti-Adenosin A _{2B} Rezeptor (human)	Kaninchen (IgG)	Chemicon, Billerica, USA
anti-Adenosin A ₃ Rezeptor (human)	Kaninchen (IgG)	Chemicon, Billerica, USA
Isotyp-Kontrolle	Kaninchen (IgG)	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK
anti-IgG (Kaninchen)	Maus (IgG)	Dako, Hamburg
anti-IgG (Maus)	Kaninchen (IgG)	Dako, Hamburg
APAAP-Komplex		Dako, Hamburg

Antikörper für Western-Blot

anti-β-Aktin (human)	Kaninchen (IgG)	Sigma, Deisenhofen
anti-IκBα (human)	Maus (IgG)	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-phospho-p38 MAP-Kinase (human)	Kaninchen (IgG)	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-phospho-Akt (human)	Kaninchen (IgG)	Cell Signaling, Danvers, USA
anti-IgG (Kaninchen) (HRP-konjugiert)	Ziege (IgG)	Dako, Hamburg
anti-IgG (Maus) (HRP-konjugiert)	Ziege (IgG)	Dako, Hamburg

3.5 Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits

cAMP Direct Immunoassay-Kit	BioVision, Mountain View, USA
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability-Assay	Promega, Mannheim
Coomassie Plus Protein-Test	Thermo Fisher Scientific, Bonn
dNTPs	NEB, Frankfurt
DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden

ECL-Detection-Kit	Amersham, Braunschweig
Gene Expression Hybridization-Kit	Agilent Technologies, Böblingen
Hemacolor-Färbeset	Merck, Darmstadt
MycoAlert Mycoplasma Detection-Assay	Cambrex, Rockland, USA
One Color Low RNA INput Linear Amplification-Kit	Agilent Technologies, Böblingen
One Color RNA Spike-In-Kit	Agilent Technologies, Böblingen
QuantiFast SYBR-Green	Qiagen, Hilden
Random-Decamer-Primer	Ambion, Darmstadt
reverse Transkriptase M-MLV	Promega, Mannheim
RNA Spike-in-Kit	Agilent Technologies, Böblingen
RNeasy Midi- und Mini-Kit	Qiagen, Hilden
TNF Quantitect Primer-Assay	Qiagen, Hilden

3.6 Molekulargewichtsstandard für Proteine

Kaleidoscope Prestained Standard	BioRad, München
----------------------------------	-----------------

3.7 Oligonukleotide

Unmodifizierte, mittels HPLC aufgereinigte Oligonukleotide für die „real-time“ quantitative PCR (RT-qPCR) wurden entsprechend Kapitel 4.3.3.2.1 entworfen und von den Firmen Metabion (Planegg-Martinsried) bzw. Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Die Primer für TNF wurden in Form des „TNF-QuantiTect Primer-Assays“ bei Qiagen (Hilden) bestellt (siehe 3.5).

<i>CCL2</i>	vorwärts: 5' GCGAGCTATAGAAGAATCACCAGCA 3' rückwärts: 5' CATGGAATCCTGAACCCACTTCTG 3'
<i>CCL7</i>	vorwärts: 5' TACAGAAGGACCACCAGTAGCCAC 3' rückwärts: 5' GTCAGCACAGATCTCCTTGCCAG 3'
<i>EGR2</i>	vorwärts: 5' CACGTCCGGTGACCATCTTCCC 3' rückwärts: 5' CCAGTCATGTCAATGTTGATCATGCC 3'
<i>GEM</i>	vorwärts: 5' CGAGCTTCGAGAAGGCATCTG 3' rückwärts: 5' AACACCACTGCACAGGCTCTC 3'
<i>IL-23A</i>	vorwärts: 5' CCAAGGACTCAGGGACAACAG 3' rückwärts: 5' AGTAGGGAGGCATGAAGCTGG 3'

<i>IL-7</i>	vorwärts: 5' CTCCCGCAGACCATGGTTCCA 3' rückwärts: 5' TCGATGCTGACCATTAGAACAACCTCCTC 3'
<i>IL-8</i>	vorwärts: 5' CAAAGAACTGAGAGTGATTGAGAGTGG 3' rückwärts: 5' TTCTCCACAACCCTCTGCACC 3'
<i>LIF</i>	vorwärts: 5' CACAACAACCTCATGAACCAGATCAG 3' rückwärts: 5' GAGGTGCCAAGGTACACGAC 3'
<i>PTX3</i>	vorwärts: 5' TGGACAACGAAATAGACAATGGACTC 3' rückwärts: 5' ACTCTCACTCTCCTCCGC 3'
<i>STAT3</i>	vorwärts: 5' GTGTCTCCACTGGTCTATCTCTATCCT 3' rückwärts: 5' CACAGATAAACTTGGTCTTCAGGTATGG 3'
<i>VEGF-A</i>	vorwärts: 5' CACCCATGGCAGAAGGAGGA 3' rückwärts: 5' GGATGGCTTGAAGATGTACTCGATCT 3'

3.8 Zelllinien

Mellm

humane Melanomzelllinie^a

3.9 Datenbanken und Software

Agilent feature extraction 9.5.1	Agilent Technologies, Böblingen
CellQuestPro	BD, Heidelberg
Ensembl Genome Browser	www.ensembl.org
Gene ontology	www.geneontology.org
Genespring 10.0.2	Agilent Technologies, Böblingen
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office 2003 und 2007	Microsoft Redmond, USA
Perlprimer Version 1.1.19	http://perlprimer.sourceforge.net/
PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez
SensorDish-Reader-Software	PreSens, Regensburg
UCSC Genome-Browser (BLAT, <i>in silico</i> -PCR)	www.genome.ucsc.edu

^aFreundlicherweise von Prof. Dr. Anja Bosserhoff (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt.

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

Soweit nicht anders erwähnt, wurden Zellen zum Waschen und Ernten für 8 Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert.

4.1.1 Kultivierung von Zelllinien

4.1.1.1 Kultivierung der Tumorzelllinie Melm

Die humane Melanom-Zelllinie Melm wurde in RPMI 1640 (Life Technologies, Darmstadt), versetzt mit 2 mmol/l L-Glutamin (Biochrom, Berlin), 50 U/ml Penicillin sowie 50 mg/ml Streptomycin (beide Gibco, Darmstadt), kultiviert. Zusätzlich wurde dem Medium 10% fötales Kälberserum (FCS) (BioWhittaker, Walkersville, USA), welches zuvor für 30 Minuten bei 56°C inaktiviert worden war, zugegeben. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen und mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA für 3-5 Minuten bei 37°C trypsiniert (Trypsin: PAN Biotech, Aidenbach). Anschließend wurden die Zellen in Medium, welches zur Inaktivierung von Trypsin 10% FCS enthielt, im Verhältnis 1:10 aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen eingesät.

4.1.1.2 Mykoplasmentest

Die verwendete Zelllinie wurde regelmäßig routinemäßig mit Hilfe des „MycoAlert Mycoplasma Detection-Assays“ entsprechend den Angaben des Herstellers (Cambrex, Rockland, USA) auf Mycoplasmenkontamination getestet.

4.1.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Falls nicht anders beschrieben, wurden Zellzahl und Vitalität der kultivierten Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer im Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Hierfür wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an 0,2% Trypanblaulösung verdünnt. Die

Konzentration der ungefärbten lebenden und blau gefärbten toten Zellen konnte anschließend über die Auszählung mehrerer Großquadrate (16 Kleinquadrate pro Großquadrat) im Phasenkontrastmikroskop nach folgender Formel bestimmt werden:

$$n[\text{Zellen/ml}] = N \times V \times 10^4$$

n = Zellzahl

N = Mittelwert der ungefärbten oder gefärbten Zellen pro Großquadrat

V = Verdünnungsfaktor

benötigte Lösungen:

Trypanblaulösung:	0,2% (w/v) (0,2g) ad 100 ml	Trypanblau NaCl-Lösung (0,9%)
-------------------	--------------------------------	----------------------------------

4.1.1.4 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren wurden die Zellen vor Erreichen der Konfluenz geerntet. Anschließend wurden $2-3 \times 10^6$ Zellen in 800 μl eiskaltem RPMI 1640, welches 10% FCS enthielt, aufgenommen. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen überführt, mit 160 μl DMSO (Endkonzentration 10%) und 640 μl FCS (Endkonzentration 40%) versetzt und sofort sorgfältig gemischt. Für einen stufenweisen Einfrierprozess ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) wurden die Zellen in einem mit Isopropanol gefüllten Kryogeäß erst für zwei Stunden bei -20°C , dann für 48 Stunden bei -80°C gelagert. Die dauerhafte Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff (-196°C).

Zum Auftauen wurden die Zellen direkt aus dem Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad überführt, sofort nach dem Auftauen in warmes, serumhaltiges RPMI 1640 aufgenommen, abzentrifugiert und in einer mittleren Zellkulturflasche ausgesät.

4.1.1.5 Generierung multizellulärer Tumorsphäroide

Zur Generierung multizellulärer Tumorsphäroide mit Hilfe der von Carlsson et al. [219] entwickelten Methode wurden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit einer 1%igen Agaroselösung beschichtet. Nachdem die Agaroseschicht polymerisiert und abgekühlt war, wurden Melm-Melanomzellen in die Kulturplatte pipettiert. Dazu wurden pro Vertiefung 5×10^3 Zellen aus einer exponentiellen Kultur in einem Volumen von 200 μl

RPMI 1640, versetzt mit 10% FCS, in die Platten gesät und bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Da die Agaroseschicht die Adhärenz der Zellen an die Kulturplatte verhindert, wurde die Bildung von festen Zellaggregaten nach zwei bis drei Tagen lichtmikroskopisch festgestellt.

benötigte Lösungen:

Agarose-Lösung:	1%	(1g)	Agarose
	ad 100 ml		PBS

4.1.2 Gewinnung und Kultivierung humaner Monozyten

4.1.2.1 Gewinnung humaner Monozyten

Zur Gewinnung humaner Monozyten wurden gesunden Spendern durch Leukapherese periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) entnommen [220]. Mit Hilfe einer nachfolgenden Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll/Hypaque (PAN Biotech, Aidenbach) [221] wurden anschließend mononukleäre Blutzellen (mononuclear cells, MNCs) isoliert und dreimal mit PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen. Durch die folgende Gegenstromzentrifugation wurden die MNCs in einer 50 ml-Trennkammer entsprechend ihrer Größe, Dichte und Form in verschiedene Fraktionen getrennt [222]. Dazu wurden zunächst die mit der Kammer verbundenen Schläuche sowie die Kammer selbst 20 Minuten mit 6% H₂O₂ sterilisiert, mit PBS gespült und von Luftblasen befreit. Nach Eichung des Systems bei 600 g und 4°C mit Hanks BSS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) wurden die MNCs bei einer Flussrate von 52 ml pro Minute in das System gepumpt. Entsprechend Tabelle 4-1 wurden anschließend verschiedene Zellfraktionen gesammelt, wobei die Flussrate des Systems nach und nach erhöht wurde.

Da Monozyten die größten Zellen innerhalb der MNCs darstellen, wurden sie hauptsächlich in der letzten Fraktion aus dem System gespült.

Tabelle 4-1: Elutriationsparameter und damit verbundene Zelltypen

Fraktion	Volumen (ml)	Flussrate (ml/min)	vorwiegend enthaltener Zelltyp
Ia	1000	52	Thrombozyten
Ib	1000	57	B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen
IIb	500	74	
IIc	400	82	
IId	400	92	
III	800	130	Monozyten

Die erhaltenen Monozyten wurden anschließend zentrifugiert, in RPMI 1640 resuspendiert und gezählt. Bezogen auf die eingesetzte Menge an MNCs betrug die Ausbeute an Monozyten typischerweise 10-20% und war spenderabhängig. Die Reinheit der erhaltenen Monozytenfraktion war $\geq 85\%$, was sowohl unter dem Mikroskop, als auch durch die Analyse der CD (cluster of differentiation) 14-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometer überprüft wurde. Um sicherzugehen, dass nur unstimulierte Monozyten in die nachfolgenden Experimente eingesetzt wurden, wurde routinemäßig der Stimulierungsgrad der Monozyten durch die Bestimmung der IL-6-Konzentration in Zellkulturüberständen (1×10^6 Monozyten/2 ml RPMI 1640, 2% humanes AB-Serum) nach Übernachtinkubation kontrolliert.

4.1.2.2 Kultivierung und Stimulierung humaner Monozyten

Isolierte Monozyten wurden, für 5 min bis 48 h in RPMI 1640 (Life Technologies, Darmstadt) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte kultiviert. Dem Medium wurden 2% humanes AB-Serum (PAN Biotech, Aidenbach), 2 mmol/l L-Glutamin (Biochrom, Berlin), 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin (beide Gibco, Darmstadt) zugesetzt.

Die Stimulierung von Monozyten erfolgte, falls nicht anders beschrieben, mit Lipopolysaccharid (LPS) (aus *Salmonella abortus equi*; Alexis, Grünberg). Zur Analyse des Einflusses unterschiedlicher bakterieller Stimuli (siehe 5.2.1.1.4) wurden Monozyten außerdem mit Flagellin (aus *Salmonella typhimurium*; Invivogen, Toulouse, Frankreich),

Muramyl-dipeptid (MDP) (aus *Staphylococcus aureus*) oder Tripalmitoyl-S-Glycerylcystein (Pam₃Cys) (Invivogen, Toulouse, Frankreich)^b stimuliert.

Zur Kultivierung von Monozyten wurden Mikrotiterplatten mit 6 oder 12 Vertiefungen bzw. hydrophobe Teflonbeutel verwendet. Anders als die Kultivierung von Monozyten in Teflonbeuteln, woraus die Monozyten wieder ablösbar sind, führt die Kultivierung von Monozyten in Zellkulturplatten zu einer adhärennten Monozytenpopulation.

Kultivierung von Monozyten in Kulturplatten

Zur späteren Bestimmung von Zytokinen mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) und der enzymatischen Bestimmung von Laktat im Kulturüberstand von Monozyten wurden Mikrotiterplatten mit 12 Vertiefungen verwendet (siehe 4.1.4 und 4.2.6). Hierfür wurden 1×10^6 Monozyten in 2 ml RPMI 1640 inkubiert. Nach 18-20 Stunden wurde der Kulturüberstand mit einer Spritze abgenommen, mit Hilfe eines 0,2-µm-Sterilfilters filtriert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

Zur Messung des Sauerstoffgehalts von Monozytenkulturen wurden 5×10^6 Monozyten in 1 ml RPMI 1640 in mit optischen Sauerstoffsensoren ausgestatteten Mikrotiterplatten inkubiert (siehe 4.2.5). Sowohl für massenspektrometrische Untersuchungen (siehe 4.2), als auch zur Bestimmung des ATP-Gehalts (siehe 4.2.4) sowie zur späteren Isolierung von RNA (siehe 4.3.1) oder Proteinen (siehe 4.4.1) wurden 1×10^7 Monozyten in 6 ml RPMI 1640 in Mikrotiterplatten mit 6 Vertiefungen kultiviert.

Kultivierung von Monozyten in Teflon-Beuteln

Zur nachfolgenden Analyse der Vitalität von Monozyten wurden hydrophobe Teflonbeutel verwendet (siehe 4.1.7). Hierfür wurden Monozyten mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml RPMI 1640 in Teflonbeutel eingesät und inkubiert.

Messung des pH-Werts in Monozytenkulturen

Im Zuge der Experimente zur Wirkung von Milchsäure auf Monozyten (siehe 5.2) wurde der pH-Wert von Monozytenkulturen mit Hilfe eines tragbaren pH-Meters routinemäßig unmittelbar nach dem Ende der Inkubation im Zellkulturüberstand gemessen. Zur

^bFreundlicherweise von Prof. Dr. Werner Falk (Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt.

Untersuchung von Effekten der Ansäuerung wurden Zellen in Medium, dessen pH-Wert mit 1% Salzsäure (HCl) auf den pH-Wert des Milchsäure-enthaltenden Mediums titriert wurde, inkubiert. Dazu wurde der pH-Wert mit 30 µl HCl pro ml RPMI 1640 für pH 7,1 (entsprechend 10 mM MS) und 60 µl HCl pro ml RPMI 1640 für pH 6,6 (entsprechend 20 mM MS) eingestellt und bei der Durchführung der Experimente kontrolliert.

4.1.3 Kokultur von Monozyten und Mellm-Tumorzellen

Kokultur aus Monozyten und Mellm-Tumorzellen

Zur Kultivierung von Monozyten zusammen mit suspendierten Mellm-Tumorzellen (siehe 4.1.8) wurden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet. Pro Vertiefung wurden jeweils $0,3 \times 10^5$ Mellm-Melanomzellen aus einer exponentiellen Kultur und 1×10^5 Monozyten in einem Endvolumen von 200 µl RPMI 1640, versetzt mit 10% FCS, ausgesät und für 18-20 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Kokultur aus Monozyten und Mellm-Tumorsphäroiden

Fünf Tage nachdem Mellm-Melanomzellen zur Generierung von Tumorsphäroiden in Kultur genommen worden waren (siehe 4.1.1.1), wurde die Hälfte des Kulturmediums durch eine Suspension aus 4×10^4 frisch isolierten humanen Monozyten pro Mikrotiterplatten-Vertiefung ersetzt. Das zur Herstellung der Monozytensuspension verwendete RPMI 1640 wurde mit FCS (Endkonzentration 5%) und AB-Serum (Endkonzentration 2%) versetzt. Nach 18-20 Stunden wurde der Kulturüberstand mit einer Spritze abgenommen, mit Hilfe eines 0,2 µm-Sterilfilters filtriert und bis zur Messung von Zytokinen (siehe 4.1.4) und der enzymatischen Bestimmung von Laktat (siehe 4.2.6) bei -20°C eingefroren.

4.1.4 Messung von Zytokinen im Zellkulturüberstand

Die Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen erfolgte mittels „sandwich-ELISA“. Bei dieser Art ELISA bindet das zu analysierende Antigen an einen Antikörper, der an eine feste Phase (z.B. eine Mikrotiterplatte) gekoppelt ist. Durch einen Detektionsantikörper, welcher zum einen spezifisch für das gesuchte Antigen und zum anderen mit einem Marker, beispielsweise einem Enzym, versehen ist, wird das Antigen erneut gebunden. Im Falle der Kopplung des Detektionsantikörpers mit einem Enzym

entsteht bei der Umsetzung eines geeigneten Substrates ein Farbstoff. Die Intensität der entstehenden Färbung lässt Rückschlüsse auf die Konzentration des gesuchten Antigens zu [176].

Zur Analyse von Zytokinen mittels ELISA wurde zunächst der Überstand einer Monozytenkultur (siehe 4.1.2.2) bzw. einer Kokultur aus Monozyten und Melli-Tumorsphäroiden (siehe 4.1.3), mit einer Spritze abgenommen, mit Hilfe eines 0,2- μ m-Sterilfilters filtriert und bis zur Bestimmung der Zytokine bei -20°C eingefroren. Die Analyse erfolgte mittels „DuoSet ELISA“ nach Angaben des Herstellers (R&D Systems, Wiesbaden).

4.1.5 Analyse des cAMP-Gehalts von Monozyten

Zur Analyse des zyklischen (cyclic) Adenosinmonophosphat (cAMP)-Gehalts von Monozyten wurden die zu untersuchenden Ansätze in einem Volumen von 800 μl RPMI 1640, versetzt mit 2% humanem AB-Serum, in Polystyrolröhrchen vorgelegt und für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 vorinkubiert. Anschließend wurde eine Suspension aus 6×10^6 frisch isolierten Monozyten in 200 μl RPMI 1640 (2% humanes AB-Serum) zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen in den Polystyrolröhrchen abzentrifugiert, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dabei in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Zur Lyse wurden die pelletierten Zellen in 200 μl eiskalter 0,1 M HCl aufgenommen, für 20 Minuten auf Eis inkubiert und dabei alle 5 Minuten kräftig gevortext. Anschließend wurde das Lysat scharf abzentrifugiert. Der Überstand, welcher nach der Lyse der Zellen das zuvor intrazelluläre cAMP enthielt, wurde in frische 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und sofort bei -80°C eingefroren. Alle weiteren Schritte zur Bestimmung des cAMP-Gehalts von Monozyten erfolgten mit Hilfe des „cAMP Direct Immunoassay-Kits“ nach Angaben des Herstellers (BioVision, Mountain View, USA).

4.1.6 Untersuchung des intrazellulären Kalziumgehalts

Die Untersuchung des intrazellulären Kalziumgehalts von Monozyten erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2, der zunächst als membrangängiger Fura-2-Acetoxy-Methylester (Fura-2-AM) auf die Zellen gegeben wird. Die Abspaltung des Esterrestes durch intrazelluläre Esterasen führt zur Bildung des Farbstoffes Fura-2, der nicht mehr aus den Zellen diffundieren kann. Fura-2 bindet intrazelluläres Kalzium. Dabei kommt es

zu einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums des Farbstoffes. Im Gegensatz zu Kalzium-freiem Fura-2, das bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 380 nm maximal fluoresziert, führt die Anregung bei 340 nm zur maximalen Fluoreszenz von Kalzium-gebundenem Fura-2. Außerdem verändert sich die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration. Mit zunehmender Kalziumkonzentration steigt sie bei Anregung mit 340 nm an und nimmt bei Anregung mit 380 nm ab. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit 340 und 380 nm lässt Aussagen über den zytosolischen Kalziumgehalt von Zellen zu [176, 223].

Zur Analyse des Kalziumgehalts wurden frisch isolierte Monozyten in einer Konzentration von je $0,4 \times 10^6$ Zellen/200 μ l RPMI 1640 in eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) eingesät und für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die nach dieser Inkubationszeit adhären Zellen wurden zweimal mit Tyrode-Puffer gewaschen und für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ mit der Fura-2-AM-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Tyrode-Puffer gewaschen, mit je 100 μ l Tyrode-Puffer überschichtet und erneut für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern, wurde die Mikrotiterplatte während der Vorbereitung, dem anschließenden Transport zum Messgerät sowie zwischen den Messungen abgedunkelt. Die Messung von Kalziumsignalen wurde an einem mit einem Injektorsystem ausgestatteten Plattenleser durchgeführt. Dieser war zuvor auf eine Betriebstemperatur von 37°C eingestellt worden. Die Messungen erfolgten über jeweils 80 Sekunden. Während dieser Zeit fand in 120 Messzyklen (je 660 ms) eine sequentielle Anregung der Zellen mit Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm statt. Die Lichtemission wurde bei 535 nm gemessen. Nach den ersten vier Messzyklen wurden je 100 μ l der zu untersuchenden Substanz (verdünnt in Tyrode-Puffer) mit einer Geschwindigkeit von 100 μ l/s automatisch injiziert. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurden die zu analysierenden Substanzen und die Positivkontrolle über unterschiedliche Injektoren zugegeben. Die Veränderungen des intrazellulären Kalziumgehalts wurden anschließend durch das Verhältnis der bei 535 nm gemessenen Fluoreszenzintensität nach Anregung bei 340 und 380 nm (Verhältnis (F 340/380 nm)) dargestellt.

benötigte Lösungen:

Tyrode-Puffer:	140 mM	(8,18 g)	NaCl
(pH 7,4; modifiziert)	5 mM	(0,37 g)	KCl
	2 mM	(0,29 g)	CaCl ₂
	1,2 mM	(0,3 g)	MgSO ₄
	26,6 ml		Bicarbonat-Puffer (7,5%)
	ad 1000 ml		H ₂ O _{bidest}
	10 mM		Glukose-Lösung (100 mM) vor jeder Anwendung zugeben.

Fura-2-AM-Lösung:	15 µl	Pluronic F-127 (10%) (AAT Bioquest, Sunnyvale, USA)
	3 µM (3 µl)	Fura-2-AM (Calbiochem, San Diego, USA)
	30% (33,3 µl)	„Bovine serum albumin“ (BSA) (20%)
	ad 1000 µl	Tyrode-Puffer
	In der angegebenen Reihenfolge ansetzen, jeweils kräftig vortexen.	
	Vor jeder Anwendung frisch herstellen.	

4.1.7 Durchflusszytometrische Analyse der Zell-Vitalität

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Zell-Vitalität erfolgte mit Hilfe der Farbstoffe Annexin-V-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und 20 µl 7-Aminoactinomycin (7-AAD). Annexin-V-FITC bindet an die in der Plasmamembran lokalisierten Phosphatidylserinreste, die typischerweise von apoptotischen Zellen exponiert werden. Die Plasmamembran vitaler Zellen ist für 7-AAD nicht permeabel. Bei beschädigten oder toten Zellen dringt 7-AAD in die Zelle ein und interkaliert in die DNA. Somit können mit Hilfe von Annexin-V-FITC und 7-AAD apoptotische, tote oder vitale Zellen unterschieden werden [224, 225].

Für Untersuchungen der Zell-Vitalität wurden frisch isolierte Monozyten entsprechend Kapitel 4.1.2.2 für 18-20 bzw. 48 Stunden in hydrophoben Teflonbeuteln kultiviert. Zur Ernte wurde der Beutel zunächst für 20 Minuten auf 4°C gestellt, was ein leichteres Ablösen der adhärenen Zellen von den Innenwänden des Beutels ermöglichte. Nachdem die Zellen durch vorsichtiges Reiben des Beutels von den Wänden gelöst worden waren, wurden sie dem Beutel entnommen und zweimal mit PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden nach Herstellerangaben je 250000 Zellen in 200 µl Annexin-Bindepuffer (BD Biosciences, Heidelberg) aufgenommen und mit 5 µl Annexin-V-FITC und 20 µl 7-AAD (beide von BD Biosciences, Heidelberg) für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Als Kontrollen dienten je 250000 Zellen ohne Färbung, bzw. gefärbt mit Annexin-V-FITC oder 7-AAD. Unmittelbar nach der Färbung wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software „CellQuestPro“.

4.1.8 Proliferationstest

Zur Bestimmung der Zellproliferation von Mclm-Melanomzellen in Gegenwart von Monozyten wurden die Zellen entsprechend Kapitel 4.1.3 kultiviert. Nachdem die Zellen 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert worden waren, wurden pro Vertiefung 0,0185

MBq [Methyl-³H]Thymidin (Amersham Pharmacia, Braunschweig) zugegeben. Nach einer Inkubation von 18-20 Stunden wurden die Zellen mit Hilfe eines Wallac-Erntegeräts auf UniFilterplatten übertragen. Der Einbau von [³H]Thymidin in die neusynthetisierte DNA, welcher als Maß für die Proliferationsrate der Zellen gilt [226], wurde anschließend mit einem Wallac-Betaplattenzähler bestimmt.

4.1.9 Messung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Messung der Produktion von reaktiven Sauerstoffarten, sogenannten „reactive oxygen species“ (ROS), durch Monozyten erfolgte mit Hilfe Lucigenin-amplifizierter Chemilumineszenz. Hierbei wird die Menge an Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), welches die im Verlauf der ROS-Produktion durch Phagozyten initial gebildete reaktive Sauerstoffspezies darstellt, mit Hilfe von Lucigenin detektiert [227]. Das in den Test eingesetzte Lucigenin wird dabei zunächst zu seinem Kationradikal reduziert. Dieses reagiert anschließend mit Superoxidanion zu einem instabilen Dioxetan-Intermediat, welches im nächsten Schritt zu einem energetisch angeregten N-Methylacridon zerfällt. N-Methylacridon kehrt schließlich unter Emission eines Photons in den Grundzustand zurück [228]. Die Intensität der Emission, welche mit Hilfe eines Luminometers gemessen wird, ist der Reaktion des Lucigenin-Kationradikals mit $O_2^{\cdot-}$ proportional und steht somit in direktem Verhältnis zu dem durch die Zellen gebildeten $O_2^{\cdot-}$.

Zur Messung der Superoxidanionen wurden die zu testenden Ansätze in 250 μ l phenolrotfreiem RPMI 1640 (Biochrom, Berlin), versetzt mit 2% humanem AB-Serum und 0,1 mg/ml Lucigenin, in Polystyrolröhrchen vorgelegt. Zur Stimulation der Superoxidanionproduktion der Monozyten wurden dabei 0,1 μ M Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) eingesetzt. Nachdem die Ansätze für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 vorinkubiert worden waren, wurden pro Ansatz 1×10^6 frisch isolierte Monozyten in 100 μ l phenolrotfreiem RPMI zugegeben und unmittelbar nach Zugabe der Zellen die erste Messung der Superoxidanionen an einem Luminometer durchgeführt. Anschließend wurden die Ansätze wieder bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Exakt 30 und 60 Minuten nach der ersten Messung eines Ansatzes wurde in dem jeweiligen Ansatz die Menge an Superoxidanionen in den Überständen erneut bestimmt.

4.1.10 Analyse des Migrationsverhaltens von Monozyten

Das chemotaktische Verhalten von Monozyten wurde mit Hilfe einer Chemotaxiskammer mit 48 Vertiefungen untersucht. Wie in Abbildung 4-1A/B zu sehen, besteht die Kammer aus zwei Kunststoffplatten, die, durch eine Silikondichtung (und eine poröse Membran) voneinander getrennt, aufeinander geschraubt werden.

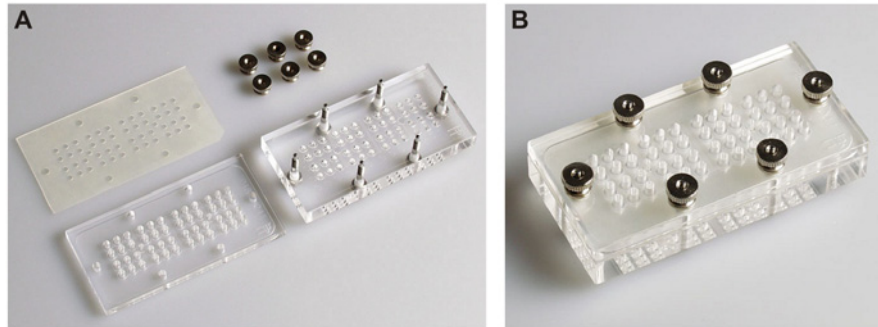


Abbildung 4-1: Bestandteile und Aufbau der Chemotaxiskammer

(A) Die verwendete Chemotaxiskammer besteht aus einer Bodenplatte mit 48 Vertiefungen, einer Silikondichtung, einer Deckplatte mit 48 Löchern sowie sechs Schrauben. **(B)** Die Abbildung zeigt eine fertig zusammengesetzte Chemotaxiskammer. Zur Versuchsdurchführung wird die Bodenplatte mit einer bezüglich des chemotaktischen Verhaltens zu untersuchenden Substanz befüllt. Anschließend wird eine poröse Membran auf die Bodenplatte gelegt, mit der Silikondichtung bedeckt und die Deckplatte aufgeschraubt. Die zu untersuchenden Zellen werden daraufhin in die Vertiefungen der Deckplatte pipettiert. Bildquelle: <http://www.neuroprobe.com/products/ap48.html>

Jeweils 29,5 µl einer bezüglich des chemotaktischen Verhaltens von Monozyten zu testenden Lösung wurden, verdünnt in serumhaltigem RPMI 1640 (2% AB), im unteren Teil der Kammer vorgelegt. Als Positivkontrolle für die Migration der Zellen diente N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP). Um die Zahl der spontan wandernden Zellen zu dokumentieren, wurde als Negativkontrolle RPMI 1640, versetzt mit 2% AB-Serum, verwendet. Anschließend wurde eine 25 x 80 mm große PVDF-Membran mit Porengröße 5 µm luftblasenfrei auf die untere Kammer gelegt und mit der Silikondichtung bedeckt. Durch festes Aufschrauben der oberen Platte wurde die Membran zwischen den Platten und der Dichtung fixiert. Die vorbereitete Kammer wurde nun für eine Stunde im Brutschrank temperiert.

Anschließend wurden die Vertiefungen in der oberen Platte mit je 50 µl einer Suspension aus $0,5 \times 10^6$ Monozyten/ml RPMI, welches mit 2% humanem AB-Serum versetzt war, befüllt und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Kammer aufgeschraubt und die Membran vorsichtig entnommen. Die Oberseite der Membran, auf welcher die Zellen nur aufgelegt hatten, nicht aber durch die Membran gewandert waren, wurde von Zellen befreit, indem sie dreimal über einen Gummiwischer

gezogen und jeweils vorsichtig mit PBS gewaschen wurde. Die auf der Unterseite der Membran sitzenden Zellen, welche in der Kammer durch die Membran gewandert waren, wurden mit Hilfe des Hemacolor-Färbesets nach Anleitung des Herstellers (Merck, Darmstadt) auf der Membran fixiert und gefärbt. Die fertig gefärbte Membran wurde nach dem Trocknen auf einen Objektträger aufgelegt, mit Immersionsöl (Zeiss, Jena) benetzt und mit einem Deckglas versehen. Die Zahl der Zellen, die auf die Lösung im unteren Teil der Kammer zugewandert war, wurde nun bei 40-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop bestimmt. Pro Experiment wurde jede zu testende Lösung in sechs Parallelansätzen in die Chemotaxiskammer eingesetzt. Zur Auswertung wurden drei Gesichtsfelder jedes Ansatzes ausgezählt und der Mittelwert aller gezählten Gesichtsfelder pro Lockstoff errechnet.

4.2 Methoden zur metabolischen Analyse

Bis auf die Analyse des Sauerstoffgehaltes (siehe 4.2.5) von Monozytenkulturen und die enzymatische Bestimmung der Laktatkonzentration (siehe 4.2.6) fanden alle metabolischen Analysen am Institut für Funktionelle Genomik der Universität Regensburg statt. Die Quantifizierung von Metaboliten mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wurde von Mitarbeitern des Instituts für Funktionelle Genomik (Universitätsklinikum Regensburg) übernommen.

4.2.1 Präparation von Proben für die Massenspektrometrie

Für nachfolgende massenspektrometrische Analysen wurden Monozyten analog Kapitel 4.1.2.2 für 18 Stunden inkubiert. Tabelle 4-2 zeigt eine Übersicht der massenspektrometrisch gemessenen Metaboliten sowie der dafür angewandten Messmethoden und Präparationsschritte. Wie in Tabelle 4-2 weiterhin erläutert, wurde Natrium-[3-¹³C]Laktat (Euriso-top, Saint-Aubin Cedex, Frankreich) verwendet, um die Aufnahme von Laktat in Monozyten zu untersuchen.

Tabelle 4-2: Übersicht der verwendeten massenspektrometrischen Messmethoden

gemessener Metabolit	Messmethode	Präparations-schritte	verwendetes Kulturmedium	zugegebenes Isotop
extrazelluläre Glukose	GC-MS	Gewinnung der Zellen, Präparation des Kulturüberstands	RPMI 1640	-
extrazelluläres Laktat	GC-MS	Gewinnung der Zellen, Präparation des Kulturüberstands	RPMI 1640	-
extrazelluläre Aminosäuren	GC-MS	Gewinnung der Zellen, Präparation des Kulturüberstands	RPMI 1640	-
intrazelluläres [3- ¹³ C]Laktat	LC-MS/MS	Gewinnung und Lyse der Zellen, Extraktion intrazellulärer Metaboliten	RPMI 1640	Natrium-[3- ¹³ C]Laktat
intrazelluläres [¹² C]Laktat, [2,3- ¹³ C ₂]Laktat, [3- ¹³ C]Laktat, [1,3- ¹³ C ₂]Laktat	LC-MS/MS	Gewinnung und Lyse der Zellen, Extraktion intrazellulärer Metaboliten	glukosefreies RPMI 1640	[1,2- ¹³ C ₂]Glukose
extrazelluläres [3- ¹³ C]Laktat, [1,3- ¹³ C ₂]Laktat, [2,3- ¹³ C ₂]Laktat	LC-MS/MS	Gewinnung der Zellen, Präparation des Kulturüberstands	glukosefreies RPMI 1640	[1,2- ¹³ C ₂]Glukose

Zur Analyse von Laktatisotopen, die durch die Glykolyse produziert wurden, wurde glukosefreies RPMI 1640 (Biochrom, Berlin) verwendet und mit 2 mg/ml [1,2-¹³C₂]Glukose (Euriso-top, Saint-Aubin Cedex, Frankreich) versetzt. Um eine präparationsbedingte Veränderung der Konzentrationen an intra- und extrazellulären Metaboliten zu verhindern, wurden sämtliche Schritte der Probenvorbereitung auf Eis durchgeführt.

4.2.1.1 Gewinnung der Zellen

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen auf Eis gestellt, mit einem Zellschaber vorsichtig aus den Kulturplatten entfernt, in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, mit Hilfe eines Zellzählgeräts gezählt und abzentrifugiert.

4.2.1.2 Präparation des Kulturüberstands

Zur späteren Analyse von Metaboliten in Kulturüberständen (siehe 4.2.2 und 4.2.3) wurden je 2 ml des aus der Ernte der Zellen resultierenden Überstandes in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Bevor die Proben massenspektrometrisch analysiert wurden (siehe 4.2.2 und 4.2.3), wurden die darin enthaltenen Proteine durch Zentrifugation der Proben in Filtrerröhrchen (Massenausschlussgrenze 5 kDa) entfernt.

4.2.1.3 Lyse von Zellen zur Untersuchung intrazellulärer Laktatisotope

Für nachfolgende Analysen intrazellulärer Laktatisotope wurde das bei der Ernte der Zellen erhaltene Zellpellet dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dabei in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 300 µl eiskaltem destilliertem Wasser aufgenommen. Unmittelbar nach Zugabe des Wassers erfolgte die Bestimmung der Zellzahl. Anschließend wurde das resuspendierte Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Präparation bei -80°C gelagert.

Im nächsten Schritt wurde das Pellet langsam auf Eis aufgetaut und in einer zweimaligen Folge von Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen auf Eis sowie durch Sonifizieren (2 x 10 s) lysiert.

Zur Bestimmung der im Zelllysats enthaltenen Proteinkonzentration wurden 50 µl des Zelllysats abgenommen, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, mit 2 µl Proteaseinhibitor-Cocktail versetzt und bis zur Messung der Proteinmenge bei -80°C gelagert.

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mit Hilfe des auf der Bradford-Methode basierenden „Coomassie Plus Protein-Tests“ nach Angaben des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, Bonn). Dabei führt die Bindung des Farbstoffs „Coomassie brilliant blue G-250“ an Proteine zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes (465 nm ohne Protein, 595 nm mit Protein) [229]. Mit Hilfe von Eichlösungen bekannter Proteinkonzentration (BSA-Lösungen) wurden durch Messung der Absorption bei 595 nm die Proteinkonzentrationen in den Zelllysaten ermittelt. Um die im Lysat erhaltene Gesamtmenge an Protein errechnen zu können, wurde zusätzlich das Volumen des Zelllysats bestimmt. Die Ermittlung der Zellzahl im Pellet nach dem Waschen der Zellen sowie die Protein- und Volumenbestimmung der Probe dienten der späteren Normalisierung der mittels Massenspektrometrie ermittelten Konzentrationen intrazellulärer Metaboliten.

4.2.1.4 Methanolextraktion intrazellulärer Metaboliten

Um den präparationsbedingten Verlust von Metaboliten im Zellysate errechnen zu können, wurden die Proben vor Methanolextraktion der Metaboliten mit 100 µM stabilem [U-¹³C]Pyruvat (Euriso-top, Saint-Aubin Cedex, Frankreich) versetzt. Anschließend wurden die Proben mit eiskaltem 100%igem Methanol (Merck, Darmstadt) entsprechend dem Volumen der Probe zu einer Endkonzentration von 80% (v/v) Methanol verdünnt und zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein Glasröhrchen überführt. In einem zweiten Extraktionsschritt wurde das erhaltene Pellet in 300 µl 100% Methanol resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mit dem Überstand der ersten Zentrifugation vereint. Im Anschluss daran wurde das Methanol mit einem Vakuum-Evaporator abgedampft und die Probe bis zur massenspektrometrischen Analyse (siehe 4.2.3) bei -80°C gelagert.

4.2.2 Gaschromatographie-Massenspektrometrie

4.2.2.1 Analyse von Aminosäurekonzentrationen in Kulturüberständen

Die Analyse der Aminosäuren Alanin, Glutamin, Glutamat, Asparagin, Aspartat, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin in Kulturüberständen mittels GC-MS wurde freundlicherweise von Dr. rer. nat. Katja Dettmer-Wilde (Institut für Funktionelle Genomik, Universitätsklinikum Regensburg) übernommen und erfolgte wie beschrieben [230]. Für die GC-MS-Analysen wurden dabei ein Gaschromatograph vom Modell Agilent 6890 GC und ein Quadrupol-Massenspektrometer vom Modell Agilent 5975C Inert XL verwendet.

4.2.2.2 Analyse von Glukose- und Laktatkonzentration in Kulturüberständen

Die Analysen von Glukose- und Laktatkonzentrationen in Kulturüberständen mittels GC-MS wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Katja Dettmer-Wilde, Dr. rer. nat. Birgit Timischl, bzw. Dipl.-Biol. Karin Eberhart (Institut für Funktionelle Genomik, Universitätsklinikum Regensburg) übernommen und erfolgten wie zuvor beschrieben [231]. Wie auch schon für die Analyse von Aminosäuren (siehe 4.2.2.1) wurden ein Gaschromatograph vom Modell Agilent 6890 GC und ein Quadrupol-Massenspektrometer vom Modell Agilent 5975C Inert XL verwendet.

4.2.3 Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie

Intra- und extrazelluläre Mengen von Laktatisotopen wurden mittels LC-MS/MS analysiert (siehe Tabelle 4-2). Mit dieser Methode ist es möglich, unterschiedliche Isotope einer Substanz zu detektieren. Die LC-MS/MS-Methode wurde eingesetzt, um den Fluss von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glukose durch die Glykolyse oder den Pentosephosphatweg zu bestimmen. Dazu wurden die Zellen mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glukose inkubiert (siehe 4.2.1) und anschließend die Menge an intra- und extrazellulärem $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat, welches durch Abbau der Glukose in der Glykolyse entsteht, gemessen. Um zu bestimmen, welcher Anteil der Glukose in den Pentosephosphatweg eingeschleust worden war, wurden außerdem die Mengen an $[3-^{13}\text{C}]$ Laktat und $[1,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat analysiert. Weiterhin wurde mittels LC-MS/MS die intrazelluläre Menge an unmarkiertem $[^{12}\text{C}]$ Laktat analysiert. Auch die intrazellulären Mengen von $[3-^{13}\text{C}]$ Laktat, mit welchem die Zellen zuvor inkubiert worden waren (siehe 4.2.1), wurden mittels LC-MS/MS bestimmt.

Die massenspektrometrischen Analysen wurden nach der in Kapitel 4.2.1 geschilderten Präparation der Kulturüberstände bzw. der intrazellulären Metaboliten freundlicherweise von Dr. rer. nat. Katja Dettmer-Wilde und Dr. rer. nat. Birgit Timischl (Institut für Funktionelle Genomik, Universitätsklinikum Regensburg) übernommen. Die Analyse erfolgte wie beschrieben [231]. Zur Auftrennung der Proben wurde dabei ein Agilent 1200 SL HPLC-System eingesetzt. Die Identifikation und Quantifizierung der aufgetrennten Isotope erfolgte an einem 4000 QTrap Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle.

4.2.4 Analyse des ATP-Gehalts

Zur Analyse des ATP-Gehalts wurden Monozyten entsprechend Kapitel 4.1.2.2 inkubiert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen mit einem Zellschaber aus den Kulturplatten geerntet, in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellzahl mit Hilfe eines Zellzählgerätes bestimmt. Der ATP-Gehalt der Probe wurde mit Hilfe des Luciferase-basierten Tests „CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay“ nach Anleitung des Herstellers (Promega, Mannheim) ermittelt. In dem Test wird zunächst die Lyse der Zellen herbeigeführt. Das Enzym Luciferase katalysiert anschließend in Gegenwart von Mg^{2+} die Umsetzung von Luciferin, ATP und molekularem Sauerstoff zu Oxyluciferin, Pyrophosphat, Adenosinmonophosphat (AMP), CO_2 und Licht. Die Menge an entstandenem Licht wurde mit Hilfe eines Luminometers detektiert. Durch Messung der Lichtmenge bekannter ATP-

Konzentrationen wurde eine Standardgerade erstellt, mit deren Hilfe die ATP-Menge in der Probe errechnet werden konnte.

4.2.5 Analyse des Sauerstoffgehalts von Monozytenkulturen

Die Analyse des Sauerstoffgehalts von Monozytenkulturen erfolgte mit Hilfe des „SensorDish-Reader“-Systems (PreSens, Regensburg). Dieses System ermöglicht eine nicht-invasive Messung des Sauerstoffgehalts in speziellen Mikrotiterplatten mit 24 Vertiefungen (OxoDishes). Auf dem Boden jeder Vertiefung befindet sich ein Sauerstoffsensor, der aus einem in ein sauerstoffsensitives Polymer eingebetteten fluoreszierenden Farbstoff besteht. Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf den Farbstoff wird mit dem „SensorDish-Reader“, einer mit einem Computer verbundenen Messeinheit, auf der die Mikrotiterplatten während der Inkubation im Brutschrank stehen, ermittelt. Der „SensorDish-Reader“ enthält pro Vertiefung der Mikrotiterplatte eine Leuchtdiode, die als Anregungsquelle für den Farbstoff dient sowie eine Photodiode, welche das vom Farbstoff emittierte Licht detektiert. Das resultierende Signal wird auf den angeschlossenen Computer übertragen und von der „SensorDish-Reader“-Software mit Hilfe von gespeicherten Kalibrierungsdaten in die Einheit mg/l Sauerstoff umgerechnet. Zur Analyse des Sauerstoffgehalts von Monozytenkulturen wurden pro Vertiefung der Mikrotiterplatte 5×10^6 Monozyten in 1 ml RPMI 1640, versetzt mit 2% AB-Serum, eingesät (siehe 4.1.2.2). Während der Inkubationszeit von 16 Stunden wurde der Sauerstoffgehalt in den Monozytenkulturen alle 30 Sekunden bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden anschließend in „Microsoft Excel 2003“ importiert und ausgewertet.

4.2.6 Enzymatische Bestimmung von Laktatkonzentrationen

Die enzymatische Bestimmung der Laktatkonzentration erfolgte in Kulturüberständen von Monozyten, die für 1, 2, 3, 4, 17, 24, oder 48 Stunden inkubiert worden waren (siehe 4.1.2.2). Die Bestimmung der Laktatkonzentration in Zellkulturüberständen fand mit Hilfe eines ADVIA 1650 Analysegerätes im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg statt. Bei dieser Methode wird die Laktatkonzentration mit Hilfe eines enzymatischen Tests ermittelt. Dabei wird Laktat durch das Enzym Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid oxidiert. In Gegenwart einer Peroxidase reagiert Wasserstoffperoxid mit einem Chromogen und bildet einen Farbstoff, der mittels Spektrophotometrie gemessen werden kann.

4.3 Molekularbiologische Methoden

Für alle Arbeiten mit RNA ist es besonders wichtig, eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Es wurde strikt mit Handschuhen, RNase-freien Gefäßen und Pipetten gearbeitet. Alle Lösungen wurden ausschließlich mit RNase-freiem Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem H_2O ($\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$) hergestellt. Dafür wurde zweifach destilliertes Millipore-Wasser mit 0,1% DEPC versetzt, mehrmals durchgeschüttelt und über Nacht inkubiert. Durch zweifaches Autoklavieren wurde DEPC anschließend inaktiviert. RNA-Pellets wurden in DEPC-behandeltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{USB}}$ von der Firma Amersham (Braunschweig) resuspendiert.

4.3.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden 1×10^7 Monozyten in 6 ml RPMI, versetzt mit 2% AB-Serum, in Mikrotiterplatten mit 6 Vertiefungen inkubiert (siehe 4.1.2.2). Nach 1-17 Stunden wurden die Mikrotiterplatten auf Eis gestellt und der Überstand der Monozytenkultur, welcher nicht-adhärenente Monozyten enthielt, in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert. Anschließend wurden sowohl die in der Kulturplatte adhärenenten Zellen, als auch die abzentrifugierten Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, wobei die abzentrifugierten Zellen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt wurden. Bei der Lyse der Zellen, die mit Hilfe des „RNeasy Mini-Kits“ oder des „RNeasy Midi-Kits“ nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) erfolgte, wurde die adhärenente Zellfraktion mit der pelletierten Zellfraktion in den 1,5 ml Reaktionsgefäßen vereint. Nachdem die RNA nach Herstellerangaben aus den Lysaten isoliert worden war, wurde die Konzentration der isolierten RNA photometrisch mit Hilfe des Spektralphotometers NanoDrop ND1000 bestimmt. Die Analyse der RNA-Qualität erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.3.2) oder mit Hilfe des Bioanalyzers gemäß den Angaben des Herstellers.

4.3.2 Formaldehyd-Agarosegel für RNA

Laut Tabelle 4-3 wurde Agarose in den entsprechenden Mengen von $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ und MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)-Puffer (20x) durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde unter einem Abzug Formaldehyd unter Rühren zugegeben und das Gel in die vorbereitete Form gegossen.

Tabelle 4-3: Zusammensetzung von RNA-Agarosegelen

Agarose	H ₂ O _{DEPC}	MOPS (20x)	Formaldehyd	Endvolumen
0,3 g	22,8 ml	1,5 ml	5,3 ml	30 ml
0,5 g	38 ml	2,5 ml	8,8 ml	50 ml
1,5 g	115 ml	7,5 ml	26,5 ml	150 ml
2,5 g	190 ml	12,5 ml	44 ml	250 ml

Die RNA-Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit RNA-Ladepuffer verdünnt, 20 Minuten bei 65°C denaturiert, anschließend auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und in die mit 1x MOPS-Laufpuffer überschichteten Probestaschen gefüllt. Zur Überprüfung der RNA auf Kontamination mit RNasen wurden die Proben zusätzlich für eine Stunde bei 37°C vorinkubiert und im Vergleich mit der nicht-inkubierten Probe aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 40 V für 4-6 Stunden.

benötigte Lösungen:

MOPS-Puffer (20x):	0,4 M	(42 g)	MOPS/NaOH (pH 7,0)
	100 mM	(4,1 g)	Natriumacetat
	20 mM	(3,7 g)	EDTA
	ad 500 ml		H ₂ O _{DEPC}
	Im Dunkeln lagern.		
RNA-Ladepuffer:	50%	(10 ml)	Formamid, deionisiert
	2,2 M	(3,5 ml)	Formaldehyd, (37%)
	1x	(1 ml)	MOPS (20x)
	0,04%	(0,8 ml)	Bromphenolblau (1% in H ₂ O)
	1%	(0,2 g)	Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) (in 2 ml H ₂ O gelöst)
	ad 20 ml		H ₂ O _{DEPC}
	1 ml-Aliquots bei -20°C lagern. 5 µl/ml Ethidiumbromid (10 mg/ml) vor Gebrauch zugeben.		

4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur *in-vitro*-Amplifikation sequenzspezifischer DNA-Fragmente. Benötigt werden hierfür prinzipiell eine DNA-Vorlage (Template), eine thermostabile DNA-Polymerase und

sequenzspezifische Oligonukleotid-Primer, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren [232].

Um die Expressionsstärke von Genen zu quantifizieren, wurde in dieser Arbeit eine spezielle Form der PCR, die „real-time“ quantitative PCR (RT-qPCR), verwendet. Da die bei der PCR eingesetzten DNA-Polymerasen keine RNA amplifizieren, musste RNA zunächst durch reverse Transkription (RT) in komplementäre (copy) DNA (cDNA) umgeschrieben werden (siehe 4.3.3.1).

4.3.3.1 Reverse Transkription

Zur nachfolgenden Quantifizierung von cDNA (siehe 4.3.3.2) wurde zunächst isolierte Gesamt-RNA mit Hilfe von Reverser Transkriptase aus einem murinen Leukämie-Virus (Stamm Moloney) (M-MLV), Dekanukleotid-Primern mit zufälliger Sequenz („Random-Decamer“-Primer) und 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphaten (dNTPs) in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde in dickwandigen Reaktionsgefäßen angesetzt und in einem PCR-Thermocycler inkubiert.

RT-Reaktion:

0,5 µg	Gesamt-RNA
1 µl	„Random-Decamer“-Primer
1 µl	dNTPs (je 10 µM)
ad 15 µl	H ₂ O _{USB}
5 min bei 65°C inkubieren, auf Eis stellen, abzentrifugieren.	
4 µl	M-MLV-Puffer (5x)
2 min bei 42°C inkubieren.	
1 µl	M-MLV Reverse Transkriptase
50 min bei 42°C, anschließend 15 min bei 70°C inkubieren.	

4.3.3.2 „Real-time“ quantitative PCR

Die RT-qPCR wurde zur Bestimmung der relativen cDNA-Menge nach der reversen Transkription (siehe 4.3.3.1) eingesetzt. Basierend auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion wird bei der RT-qPCR ein Farbstoff (z.B. „SYBR-Green“) eingesetzt, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und in gebundener Form fluoresziert. Die Menge an Fluoreszenz, die nach jedem PCR-Zyklus vom PCR-Gerät bestimmt wird, ist proportional zur Menge an amplifizierter DNA. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt in der

frühen und zugleich exponentiellen Phase der PCR-Reaktion: Das PCR-Gerät bestimmt für jede gemessene Probe einen "cycle threshold" (ct)-Wert, welcher den PCR-Zyklus beschreibt, in dem die Fluoreszenz in einer Probe erstmalig signifikant den Wert der Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Mit Hilfe einer Standardgeraden, welche durch Amplifikation bekannter cDNA-Mengen und den daraus ermittelten ct-Werten erstellt wird, kann dem ct-Wert der Proben eine relative cDNA-Menge zugeordnet werden.

4.3.3.2.1 Entwerfen von Primern für RT-qPCR

Die genomischen DNA-Sequenzen für das Entwerfen von RT-qPCR-Primern wurden aus der Datenbank „Ensembl Genome Browser“ bezogen. Die Primer wurden mit der Software „Perlprimer“ konstruiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotidsequenzen einen GC-Gehalt von ca. 40-60% enthielten. Für die Primer galten folgende Kriterien:

Schmelztemperatur: 65-68°C

Länge: 18-28 bp

Länge des Amplifikats: 70-200 bp

Um die Amplifikation genomischer DNA zu verhindern, wurden RT-qPCR- auf zwei verschiedene, ein Intron begrenzende, Exons gelegt. Zur Vermeidung der Amplifikation unspezifischer Nebenprodukte, wurde die Spezifität der Primer mittels „BLAT“ und „*in silico*-PCR“ (beide auf den Seiten des „UCSC Genome Browsers“) kontrolliert.

4.3.3.2.2 Reaktionsansatz von RT-qPCR-Reaktionen

Für die RT-qPCR wurde der „QuantiFast SYBR Green-Kit“ verwendet. Die Reaktionen wurden in PCR-Platten mit 96 Vertiefungen in einem Volumen von 10 µl angesetzt. Die verwendete cDNA wurde 1:5 bzw. 1:10 in H₂O_{USB} verdünnt.

<u>RT-qPCR-Reaktion:</u>	5 µl	QuantiFast SYBR Green-Mischung (2x)
	1 µl	cDNA (1:5 oder 1:10 verdünnt)
	0,5 µl	Sense-Primer (10 µM)
	0,5 µl	Antisense-Primer (10 µM)
	3 µl	H ₂ O _{USB}

Nachdem die Platte mit einer Siegelfolie verschweißt und kurz abzentrifugiert worden war, wurde die RT-qPCR am Realplex Mastercycler EpGradient S nach dem in Tabelle 4-4 beschriebenen Programm durchgeführt.

Tabelle 4-4: Standardprogramm für die RT-qPCR

PCR-Schritt		Parameter
Initiales Aufschmelzen		95°C, 5 min
45 Zyklen	Aufschmelzen	95°C, 8 s
	Hybridisierung, Elongation	60°C, 20 s
Schmelzkurve		95°C, 15 s
		65°C, 15 s
		65-95°C, 10 min

Zur Bildung der Standardgeraden wurde bei jeder RT-qPCR-Messung neben den zu analysierenden Proben eine Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000) mit einer für das zu untersuchende Gen positiven Probe mitgeführt. Mit Hilfe der Steigung der Standardgeraden (slope) und des Schnittpunkts der Standardgeraden mit dem y-Achsenabschnitt (y-intercept) berechnete die Realplex-Software die relative Menge an cDNA in den analysierten Proben.

Die spezifische Amplifikation des gewünschten PCR-Produkts wurde anhand des Verlaufs der Schmelzkurve kontrolliert. Alle Proben wurden in Triplikaten gemessen. Die erhaltenen Daten wurden in „Microsoft Excel 2003“ importiert und auf die jeweilige Menge von 18S-rRNA, welche ebenfalls mittels RT-qPCR ermittelt wurde, normalisiert.

4.3.4 Genomweite Expressionsanalyse mittels RNA-Expressionsarray

Die genomweite Expressionsanalyse von Monozyten erfolgte mittels „Whole Human Genome Microarrays“ der Firma Agilent. Das Prinzip der Mikroarrayanalyse besteht in der Hybridisierung von unbekanntem, mit einem Farbstoff markierten Nukleinsäuresequenzen mit bekannten Nukleinsäuresequenzen (Sonden), die an definierten Positionen auf einem festen Trägermaterial aufgebracht sind. Nach dem Wegwaschen unspezifischer Bindungen können spezifisch gebundene markierte Nukleinsäuresequenzen mit Hilfe

eines Fluoreszenzscanners durch den Ort der Hybridisierung auf dem Trägermaterial identifiziert werden. Darüber hinaus gibt die Stärke der Fluoreszenz Auskunft über die Menge der gebundenen markierten Nukleinsäuren [233].

Vor der Mikroarrayanalyse wurde zunächst Gesamt-RNA aus Monozyten isoliert. Durch die Kontrolle der Qualität der verwendeten RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese und mit Hilfe des Agilent Bioanalyzers wurde sichergestellt, dass nur intakte RNA-Proben für die Mikroarrayanalyse verwendet wurde (siehe 4.3.1 und 4.3.2).

Sowohl die Präparation der Mikroarrays, als auch die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michael Rehli (Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie, Universitätsklinikum Regensburg).

4.3.4.1 Markierung der RNA

Die Markierung der isolierten RNA erfolgte mit Hilfe des „One Color Low RNA Input Linear Amplification-Kits“ nach Angaben des Herstellers (Agilent Technologies, Böblingen). Dazu wurden 200-1000 ng RNA in komplementäre (copy) RNA (cRNA) umgeschrieben, amplifiziert und dabei mit dem Farbstoff Cyanin 3-CTP markiert. Nach Aufreinigung der amplifizierten cRNA wurde die Effizienz des Farbstoffeinbaus mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND1000 überprüft.

4.3.4.2 Mikroarray-Hybridisierung

Anschließend wurden 1,65 µg markierte cRNA mit Hilfe des „Gene Expression Hybridization-Kits“ (Agilent Technologies, Böblingen) fragmentiert und in einer Mikroarray-Hybridisierungskammer auf einem „Whole Human Genome-Mikroarray“ (4 x 44 K) für 17 Stunden bei 65°C in einem Hybridisierungsöfen hybridisiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Mikroarray gewaschen und in einem Mikroarray-Scanner analysiert.

4.3.4.3 Auswertung der Mikroarray-Daten

Die Extraktion der Mikroarray-Daten erfolgte mit Hilfe der Software "Feature Extraction 9.5.1" (verwendetes Protokoll: GE1v5_95_Feb07). Nachdem die durch die Extraktion erhaltenen Text-Dateien in die „GeneSpring GX 10.0.2“-Software importiert worden waren, wurden die Genexpressionsprofile unterschiedlich inkubierter Monozyten miteinander verglichen.

Hierzu wurden die Genexpressionsprofile der entsprechenden Donoren gemittelt. Für den Fall, dass ein Gen durch mehrere Sonden auf dem Array repräsentiert wurde, wurden die Ergebnisse der verschiedenen Sonden zusammengefasst. Die Expressionsdaten eines bestimmten Gens wurden auf den Median der minimalen Expression dieses Gens in allen Sonden normalisiert. Gene, die in keiner der Proben detektierbar waren (Fluoreszenzintensität von 50 in zwei von 32 Proben), wurden aus der Genliste entfernt.

Die erhaltene Liste an exprimierten Genen wurde dem experimentellen Kontext (siehe 5.2.2.3) entsprechend gefiltert und durch eine einseitige Analyse der Varianz (analysis of variance, ANOVA) mit asymptotischer P-Wert-Berechnung und Benjamin-Hochberg-Korrektur auf signifikant regulierte Gene eingeschränkt. Das Ergebnis der Analyse wurde schließlich durch ein hierarchisches „Clustering“ dargestellt.

Darüber hinaus wurde mit Hilfe der „GeneSpring GX 10.0.2“-Software unter Verwendung einer Benjamini-Yekutieli-Korrektur [234] nach einer signifikanten Anreicherung von „Gene Ontology“-Begriffen innerhalb der geclusterten Gene gesucht.

4.3.4.4 Validierung der Mikroarray-Daten

Zur Validierung der Mikroarray-Daten wurden verschiedene Gene ausgewählt und die Expression dieser Gene mittels RT-qPCR (siehe 4.3.3.2) überprüft.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Isolierung von Proteinen

Zur Proteinisolierung wurden Monozyten entsprechend Kapitel 4.1.2.2 inkubiert. Nach 5, 15 oder 30 Minuten wurden die Mikrotiterplatten auf Eis gestellt und der Überstand der Monozytenkultur, welcher nicht-adhärenente Monozyten enthielt, in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert. Anschließend wurden sowohl die in der Kulturplatte adhärenenten Zellen, als auch die abzentrifugierten Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, wobei die abzentrifugierten Zellen in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt wurden. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in den 1,5 ml-Reaktionsgefäßen in 500 µl Puffer B resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Während der Zentrifugationszeit wurden auch die adhärenenten Zellen mit 500 µl Puffer B überschichtet. Die Behandlung der Zellen mit Puffer B, der hauptsächlich Protease- und Phosphataseinhibitoren enthielt, diente der Vorbereitung der Zellen auf die nachfolgende

Lyse mit Puffer C. Nachdem Puffer B von beiden Zellpopulationen abgenommen worden war, wurden 150 µl Puffer C auf die adhärenen Zellen pipettiert, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers aus den Mikrotiterplatten gelöst, mit der abzentrifugierten Zellfraktion vereint und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden 150 µl Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate, SDS)-Probenpuffer (2x) zugegeben, die Proben für 10 Minuten bei 95°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Das stark negativ geladene Detergens SDS des Probenpuffers lagert sich an die Proteine des Lysats an, was zur Entfaltung der Proteine führt. Gleichzeitig werden Disulfidbrücken, welche einzelne Polypeptidketten miteinander verbinden, durch das ebenfalls in dem Puffer enthaltene 2-Mercaptoethanol reduziert. Die Bindung von SDS an Proteine erfolgt in einem konstanten Masse-zu-Ladungsverhältnis und überlagert die Eigenladung der Proteine. Die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe unterschiedlicher Proteine unterscheiden sich damit für viele Messmethoden nur noch in ihrer Größe und können so in der SDS-Gelelektrophorese (siehe 4.4.2) aufgetrennt werden [176].

benötigte Lösungen:

Puffer A:

10 mM	(1 ml)	Tris/HCl (pH 7,9) (1M)
60 mM	(447 mg)	KCl
1 mM	(37 mg)	EDTA
ad 100 ml		H ₂ O _{bidest}

Mehrere Monate bei 4°C haltbar.

Puffer B:

1,5 mM	(3 µl)	EDTA (pH 8,0) (500 mM)
1 mM	(10 µl)	Dithiothreitol (100 mM)
1 mM	(5 µl)	EGTA (200 mM)
50 mM	(50 µl)	β-Glycerophosphat (1M)
50 mM	(50 µl)	Natriumfluorid (1M)
25 mM	(100 µl)	Natriumpyrophosphat (250 mM)
1 mM	(5 µl)	Natriumorthovanadat (200 mM)
2 µg/ml	(2 µl)	Leupeptin (1 mg/ml) (Roche, Mannheim)
2 µg/ml	(2 µl)	Pepstatin A (1 mg/ml) (Roche, Mannheim)
2 µg/ml	(1 µl)	Aprotinin (2 mg/ml) (Roche, Mannheim)
ad 1 ml		Puffer A

Vor jeder Anwendung frisch herstellen.

Puffer C (Lysepuffer):	0,4%	(40 µl)	Nonidet P40 (10%) (Boehringer, Ingelheim)
	100 µg/ml	(5 µl)	Chymostatin (20 mg/ml) (Roche, Mannheim)
	10 µg/ml	(2 µl)	Bestatin (5 mg/ml) (Roche, Mannheim)
	3 µg/ml	(1 µl)	E64 (3 mg/ml) (Roche, Mannheim)
	1 mM	(1 µl)	1,10-Phenanthrolin (0,1 mg/ml)
	ad 1ml		Puffer B

Vor jeder Anwendung frisch herstellen.

SDS-Probenpuffer (2x):	20%	(10 ml)	Glycerin
	125 mM	(5 ml)	Tris/HCl (pH 6,8) (1,25 M)
	4%	(2 g)	SDS
	10%	(5 ml)	2-Mercaptoethanol
	0,02%	(10 mg)	Bromphenolblau
	ad 50 ml		H ₂ O _{bidest}

4.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine 1970 von U.K. Laemmli entwickelte Methode zur Auftrennung von Proteinen in einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen [235].

Das Trenngel der in dieser Arbeit verwendeten SDS-Gele hatte eine Acrylamidkonzentration von 12,5% (v/v), das Sammelgel hatte eine Konzentration von 5% (v/v). Um eine vollständige Polymerisation zu erreichen, erfolgte die Herstellung der SDS-Gele am Vortag. Hierzu wurde entsprechend Tabelle 4-5 die Trenngelstammlösung mit Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter und N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Polymerisierungskatalysator vermischt, sofort in die vorbereiteten Gelkammern gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 30 Minuten wurde das Isopropanol abgegossen. Anschließend wurde das Sammelgel entsprechend Tabelle 4-5 gemischt, luftblasenfrei auf das Trenngel gegossen und zur Aussparung von Probenaschen ein Kamm in das Gel gedrückt. Das auspolymerisierte Gel wurde, eingeschlagen in ein feuchtes Papierhandtuch, im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Elektrophorese wurde das SDS-Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit Laemmli-Elektrodenpuffer (1x) überschichtet. Nachdem der Kamm vorsichtig entfernt worden war, wurden die Probenaschen mit einer Spritze mit Laemmli-Elektrodenpuffer gespült. Die Proteinlysate (siehe 4.4.1) wurden aufgetaut, für 10 Minuten bei 95°C erhitzt, kurz auf Eis gestellt, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Tasche mit 5 µl „Kaleidoscope Prestained Standard“ als Molekulargewichtsstandard beladen. Die Proben liefen bei einer Spannung von 80 V in das Gel ein und bei 100 V

durch das Sammelgel. Sobald das Trenngel erreicht wurde, wurde die Spannung auf 120-130 V erhöht. Hatte die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht, wurde die Elektrophorese beendet.

Tabelle 4-5: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

zugegebene Lösung	12% Trenngel	5% Sammelgel
Sammelgelstammlösung	-	10 ml
Trenngelstammlösung	18 ml	-
TEMED	18 µl	10 µl
APS (10%)	90 µl	80 µl

Tabelle 4-6: Zusammensetzung der SDS-Gel-Stammlösungen

zugegebene Lösung	Trenngelstammlösung (12%)	Sammelgelstammlösung (5%)
Sammelgelpuffer	-	25 ml
Trenngelpuffer	25 ml	-
SDS (10%)	1 ml	1 ml
Acrylamid (30%)	40 ml	16,65 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml	ad 100 ml

benötigte Lösungen:

Sammelgelpuffer: 0,5 M (30 g) Tris/HCl (pH 8,8)
ad 500 ml H₂O_{bidest}

Trenngelpuffer: 1,5 M (90,83 g) Tris/HCl (pH 8,8)
ad 500 ml H₂O_{bidest}

SDS (10%): 10% (10 g) SDS
ad 100 ml H₂O_{bidest}

APS (10%): 10% (100 mg) APS
ad 1 ml H₂O_{bidest}

Vor jeder Anwendung frisch herstellen.

Laemmli-Elektrodenpuffer (5x):	40 mM	(15 g)	Tris
	0,95 M	216 g	Glycin
	0,5%	(15 g)	SDS
	ad 3000 ml		H ₂ O _{bidest}

4.4.3 Western-Blot

Um bestimmte Proteine in dem mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteingemisch (siehe 4.4.2) nachzuweisen, wurden die Proteine aus dem SDS-Gel elektrophoretisch mittels Halbtrockenverfahren [236] auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Hierzu wurde die PVDF-Membran auf Größe des SDS-Gels zugeschnitten, für 2 Minuten in Methanol hydrophylisiert und anschließend in Puffer B äquilibriert. Das SDS-Gel wurde aus den Glasplatten entfernt und ebenfalls in Puffer B gelegt. Währenddessen wurden drei Lagen von in Puffer A getränktem Filterpapier, gefolgt von drei Lagen von in Puffer B getränktem Filterpapier luftblasenfrei auf den unteren Teil einer Halbtrockenzelle, welcher der Anode entspricht, gelegt. Auf das in Puffer getränkte Filterpapier wurde die angefeuchtete Membran gelegt und das SDS-Gel luftblasenfrei auf die Membran gebettet. Das Gel wurde mit drei in Puffer C getränkten Lagen Filterpapier bedeckt und mit dem oberen Teil der Halbtrockenzelle, der Kathode, verschlossen. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte für 30-45 Minuten bei 0,8 mA/cm² Gelfläche.

benötigte Lösungen:

Puffer A:	0,3 M	(36,3 g)	Tris/HCl (pH 10,4)
	20%	(200 ml)	Methanol
	ad 1000 ml		H ₂ O _{bidest}
Puffer B:	25 mM	(3,03 g)	Tris/HCl (pH 10,4)
	20%	(200 ml)	Methanol
	ad 1000 ml		H ₂ O _{bidest}
Puffer C:	4 mM	(5,2 g)	Capronsäure (pH 7,6)
	20%	(200 ml)	Methanol
	ad 1000 ml		H ₂ O _{bidest}

4.4.4 Immunfärbung von Western-Blots

Nach dem elektrophoretischen Transfer von Proteinen (siehe 4.4.3) wurde die PVDF-Membran über Nacht bei 4°C in 5%iger Magermilchlösung inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper mit 5%iger Magermilchlösung verdünnt^c und die Membran darin für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt. Antikörper, der nach Ablauf dieser Zeit nicht gebunden hatte, wurde gewaschen, indem die Membran dreimal für 10 Minuten in „Tris-buffered saline (TBS) and Tween 20“ (TBST)-Puffer geschwenkt wurde. Im nächsten Schritt wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem für den Isotyp des primären Antikörpers spezifischen Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (Verdünnung 1:2500 in 5%iger Magermilchlösung) inkubiert. Während drei weiteren Waschschritten (je 10 Minuten mit TBST-Puffer) wurde die „enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Arbeitslösung gemischt und die Position der aneinander gebundenen Antikörper auf der Membran mit Hilfe einer ECL-Färbung ermittelt. Dabei katalysiert die an den sekundären Antikörper gebundene Peroxidase die Oxidation von Luminol, was eine Chemilumineszenz auslöst. Das entstehende Licht wurde durch Auflegen eines Fotofilms, je nach Signalstärke für 2 Sekunden bis 10 Minuten^d, detektiert.

benötigte Lösungen:

TBS-Puffer (2x):	20 mM	(9,16 g)	Tris/HCl (pH 7,4)
	150 mM	(35,1 g)	NaCl
	ad 2000 ml		H ₂ O _{bidest}
TBST-Puffer:	1x	(500 ml)	TBS (2x)
	0,1%	(1 ml)	Tween 20
	ad 1000 ml		H ₂ O _{bidest}
5% Magermilchpulver:	5%	(5 g)	Magermilchpulver
	ad 100 ml		TBST-Puffer
ECL-Lösung A:	250 mM	(100 mg)	Luminol
	ad 2 ml		H ₂ O _{bidest}

^cVerdünnungen der primären Antikörper: anti-β-Aktin: 1:2000; anti-IκBα: 1:1000; anti-phospho-p38 MAP-Kinase: 1:2000; anti-phospho-Akt: 1:1000;

^dDetektionszeiten: anti-β-Aktin: 2 s; anti-phospho-p38 MAP-Kinase: 40 s; anti-phospho-Akt: 10 min; anti-IκBα: 2 s;

ECL-Lösung B:	90 mM	(14,8 mg) p-Coumarin-Säure
	ad 1 ml	DMSO
ECL-Mix:	2 ml	ECL-Lösung A
	0,89 ml	ECL-Lösung B
	20 ml	Tris/HCl (pH 8,5) (1M)
	ad 200 ml	H ₂ O _{bidest}
	Lichtgeschützt lagern.	
ECL-Arbeitslösung:	5 ml	ECL-Mix
	1,5 µl	30% H ₂ O ₂

4.4.5 Immunhistochemische Analyse von Oberflächenantigenen

Die immunhistochemische Analyse von Oberflächenantigenen auf humanen Monozyten erfolgte mit Hilfe der Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode. Bei dieser Methode bindet zunächst ein Primärantikörper an das zu untersuchende Antigen. Anschließend wird die Fc (fragment crystallizable)-Region des Primärantikörpers durch einen Brückenantikörper gebunden. Dieser Brückenantikörper ist darüber hinaus auch spezifisch für die Fc-Region eines gegen die alkalische Phosphatase gerichteten Antikörpers. Dieser gegen die alkalische Phosphatase gerichtete Antikörper wird zuvor mit der alkalischen Phosphatase komplexiert. Durch Zugabe des Substrates der alkalischen Phosphatase, Naphthol-As-Bi-Phosphat, wird ein Spaltprodukt erzeugt, das mit dem ebenfalls zugegebenen Chromogen Neufuchsin einen roten Farbniederschlag bildet [237].

Zur immunhistochemischen Analyse der Oberflächenmoleküle wurden Adhäsionsobjektträger verwendet. Um zu verhindern, dass die Objektträger während der Inkubationsschritte austrocknen, wurden diese in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Sämtliche Inkubationsschritte erfolgten unter Schwenken bei Raumtemperatur. Zunächst wurden 1×10^6 frisch isolierte Monozyten in 1 ml PBS aufgenommen, die Objektträger mit dieser Suspension überschichtet und für 1-2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden nicht adhärenente Zellen mit PBS von den Objektträgern gespült und die adhärenente Zellen mit 0,05%iger Glutaraldehydlösung fixiert. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die mit Monozyten beladenen Objektträger zunächst für 10 Minuten mit TBS/BSA-Puffer überschichtet. Nach dem Absaugen des

Puffers folgte die Inkubation mit dem mit TBS-Puffer verdünnten Primärantikörper^e für 90 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit TBS-Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem 1:50 in TBS/BSA-Puffer Brückenantikörper. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer wurde der 1:50 mit TBS/BSA-Puffer verdünnte APAAP-Komplex zugegeben. Da der den APAAP-Komplex erkennende Brückenantikörper spezifisch für murine Primärantikörper war, musste, falls der Primärantikörper nicht aus Mäusen stammte, vor der Inkubation mit dem Brückenantikörper ein Inkubationsschritt mit einem in Mäusen generierten Antikörper gegen den Primärantikörper zwischengeschaltet werden. Nach 30-minütiger Inkubation mit dem APAAP-Komplex wurden die Objektträger schließlich dreimal mit TBS-Puffer gewaschen. Die Inkubationsschritte mit Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex wurden daraufhin für jeweils 15 Minuten wiederholt. Anschließend wurde Substratlösung (Fast Red; Biogenex, Fremont, USA) auf die Objektträger pipettiert und das Ganze für 10-20 Minuten unter mikroskopischer Beobachtung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-Puffer erfolgte eine Gegenfärbung mit gebrauchsfertiger Hämalaun-Lösung.

benötigte Lösungen:

Glutaraldehyd (0,05%):	0,05%	(5 µl)	Glutaraldehyd
	ad 10 ml		PBS
TBS-Puffer:	10 mM	(1,21 g)	Tris/HCl (pH 7,4)
	150 mM	(8,78 g)	NaCl
	ad 1000 ml		H ₂ O _{bidest}
TBS/BSA-Puffer:	1%	(1 g)	BSA
	ad 100 ml		TBS-Puffer
	Bei -20°C lagern.		

4.5 Statistik

Die erhaltenen Messwerte wurden gemittelt, außerdem wurde die Standardabweichung des Mittelwerts (standard error of the mean, SEM) errechnet. Signifikanzen zwischen zwei

^eVerdünnungen der primären Antikörper: anti-CD45: 1:25; Isotyp-Kontrolle: 1:100; Anti-Adenosin A₁/A_{2A}/A_{2B}/A₃-Rezeptor: 1:100;

verschiedenen Ansätzen wurden mit Hilfe der Software „GraphPad Prism 5“ unter Anwendung des ungepaarten Student's t-Test bestimmt. Ein P-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant (*), $<0,01$ als sehr signifikant (**) und $<0,001$ als hoch signifikant betrachtet. P-Werte von $>0,05$ galten als nicht signifikant (n.s.).

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin auf humane Monozyten

Aufgrund einer Defizienz der Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) kann 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) in Tumoren häufig nicht abgebaut werden, was zum Export von MTA aus den Zellen und zu einer Anreicherung dieses Nukleosids im Tumormilieu führt [191, 201]. Da nur wenig über den Einfluss von MTA auf Immunzellen bekannt ist, wurde in dieser Arbeit der Effekt von MTA auf humane Monozyten untersucht.

5.1.1 Einfluss von MTA auf die Zytokinsekretion und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Monozyten

5.1.1.1 Sekretion unterschiedlicher Zytokine in Gegenwart von MTA

Um den Effekt von MTA auf die Zytokinsekretion von Monozyten zu analysieren, wurden Monozyten für 18 bis 20 Stunden mit oder ohne Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation und verschiedenen Konzentrationen an MTA inkubiert. Anschließend wurden die Mengen an Interleukin (IL)-6, Tumornekrosefaktor (TNF) und IL-10 im Kulturüberstand mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt.

Wie Abbildung 5-1A zeigt, wurde die IL-6-Sekretion der Monozyten durch MTA induziert. Auch die Sekretion von IL-10 nahm durch MTA zu. Im Gegensatz dazu wurde die spontane TNF-Sekretion durch MTA supprimiert.

Zur Stimulation von „Toll-like“-Rezeptor (TLR) 4, einem Rezeptor, der auch im Tumormilieu verschiedene Liganden bindet [119], diente LPS. Letzteres stellt unter anderem im Zusammenhang mit Tumoren ein etabliertes Modell der Aktivierung von Monozyten dar [36, 129]. In Gegenwart hoher LPS-Konzentrationen (100 ng/ml) hatte MTA keinen modulierenden Effekt auf die Zytokinsekretion der Monozyten (Daten nicht gezeigt). Wie schon bei unstimulierten Monozyten induzierte MTA auch bei suboptimaler LPS-Stimulation (10 pg/ml) die IL-6-Sekretion (Abbildung 5-1B). Die Sekretion von IL-10 wurde in Gegenwart von 10 pg/ml LPS ebenfalls durch MTA gesteigert. Darüber hinaus war bei suboptimaler LPS-Stimulation eine durch 10 und 100 μ M MTA erhöhte TNF-Sekretion detektierbar.

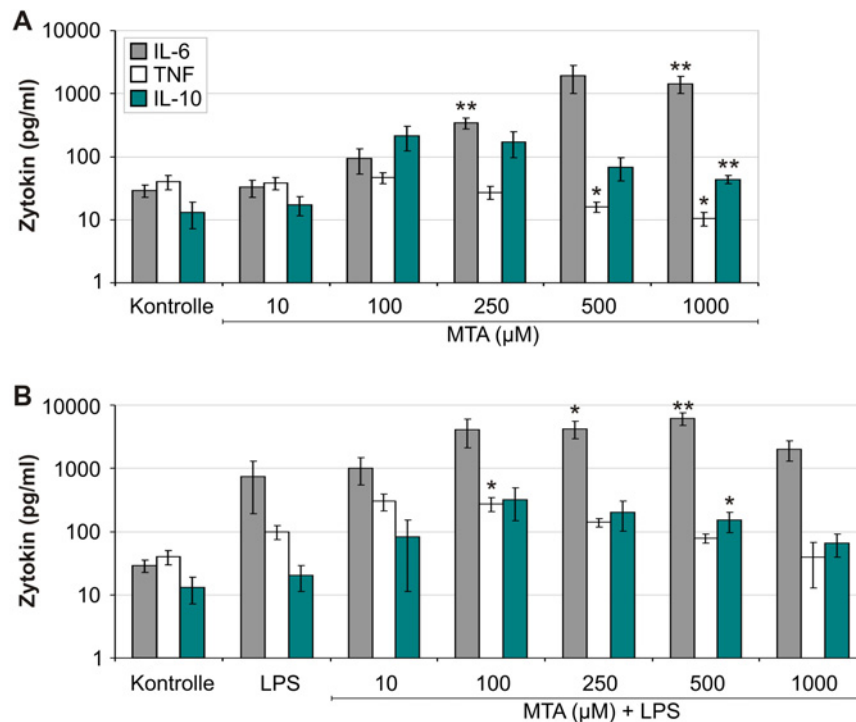


Abbildung 5-1: Einfluss von MTA auf die Zytokinsekretion von Monozyten

Frisch isolierte humane Monozyten wurden ohne LPS (**A**) bzw. mit 10 pg/ml LPS (**B**) für 18 bis 20 Stunden mit 10, 100, 250, 500 oder 1000 µM MTA inkubiert. Als Kontrollen wurden Monozyten ohne LPS (**A, B**) bzw. mit LPS (**B**) kultiviert. Die Konzentrationen von TNF, IL-6 und IL-10 im Kulturüberstand wurden mittels ELISA ermittelt. Die Daten stellen Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Experimenten \pm SEM dar. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, relativ zur Kontrolle ohne LPS (**A**) oder mit LPS (**B**).

Außerdem wurde untersucht, ob eine 24-stündige Vorinkubation mit 10, 100 oder 1000 µM MTA die Zytokinsekretion in Gegenwart von LPS beeinflusst. Hierbei wurde kein Effekt festgestellt (Daten nicht gezeigt).

5.1.1.2 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Gegenwart von MTA

Darüber hinaus wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, sogenannter ROS (reactive oxygen species), bei Inkubation der Monozyten mit MTA analysiert. Hierzu wurde die Produktion von Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$), welche im Verlauf der ROS-Produktion durch Phagozyten initial gebildet werden [227], mittels Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz detektiert. Die Superoxidanionproduktion durch Monozyten wurde mit Hilfe von Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) induziert. Die Zellen wurden mit PMA alleine bzw. mit unterschiedlichen MTA-Konzentrationen inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Monozyten. Unmittelbar bei Versuchsstart und nach 30 sowie 60 Minuten wurde die Gesamtmenge an Superoxidanionen in den Proben luminometrisch bestimmt.

Da die größten Mengen an Superoxidanionen nach 30 Minuten detektiert wurden, sind in Abbildung 5-2 nur die zu diesem Zeitpunkt erhaltenen Daten dargestellt.

In Gegenwart von MTA war nach PMA-Stimulation eine konzentrationsabhängige Abnahme der Superoxidanionproduktion festzustellen. Eine signifikante Reduktion lag ab einer MTA-Konzentration von 400 μM vor.

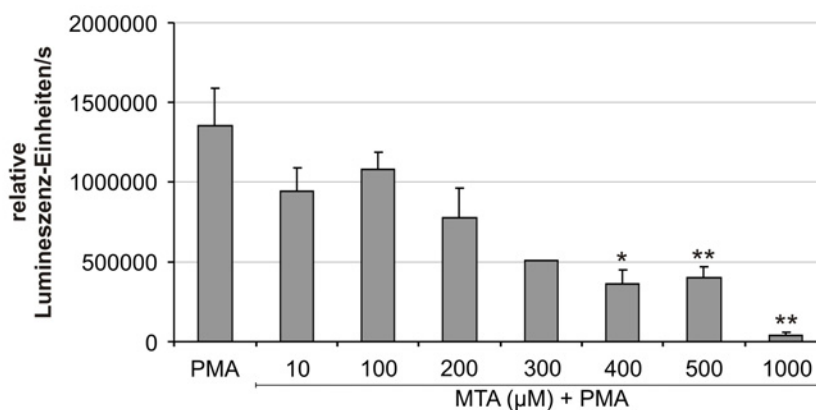


Abbildung 5-2: Superoxidanionproduktion von Monozyten unter Einfluss von MTA

Monozyten wurden mit 0,1 μM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) alleine bzw. mit 10, 100, 200, 300, 400, 500 und 1000 μM MTA inkubiert. Die Menge an Superoxidanionen, gemessen in relativen Lumineszenz-Einheiten pro Sekunde, wurde nach 30 Minuten luminometrisch bestimmt. Die gezeigten Daten repräsentieren den Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SEM (300 μM MTA mit PMA zwei Experimente). Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, relativ zu PMA.

5.1.2 Einfluss von MTA auf die Vitalität von Monozyten

Da in verschiedenen Arbeiten proapoptotische Effekte von MTA beobachtet wurden [238, 239], wurde der Einfluss von MTA auf die Vitalität der Monozyten untersucht. Dazu wurden in Zusammenarbeit mit einer medizinischen Doktorandin (Bernadette Neueder, Arbeitsgruppe Kreutz) Monozyten für 48 Stunden mit verschiedenen MTA-Konzentrationen inkubiert. Anschließend erfolgte eine Färbung der Zellen mit Annexin-V-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD). Die Zahl der lebenden, apoptotischen oder toten Zellen wurde schließlich durchflusszytometrisch bestimmt.

Wie in Abbildung 5-3 zu erkennen, hatten 100 bis 1000 μM MTA keinen signifikanten Einfluss auf den prozentualen Anteil der überlebenden Zellen.

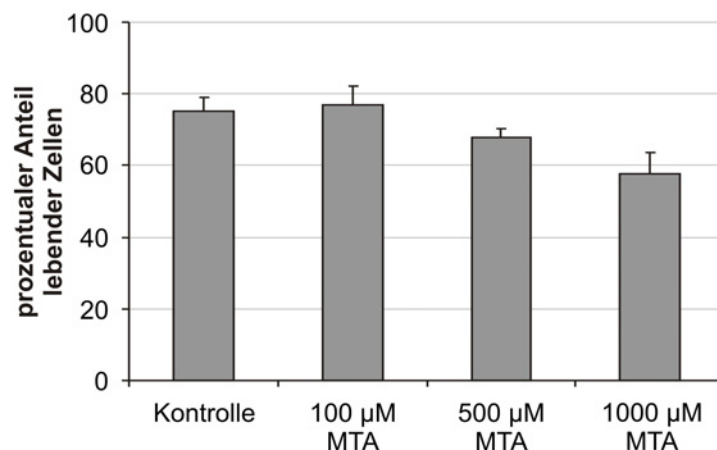


Abbildung 5-3: Einfluss von MTA auf die Vitalität von Monozyten

Monozyten wurden für 48 Stunden ohne bzw. mit 100, 500 oder 1000 µM MTA inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Annexin-V-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Abbildung zeigt den Mittelwert (\pm SEM) der prozentualen Anteile der überlebenden Zellen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.1.3 Analysen zum Wirkmechanismus von MTA auf Monozyten

Da Veröffentlichungen über eine Wechselwirkung von MTA mit Adenosinrezeptoren existieren [240, 241], wurde analysiert, ob die Effekte von MTA auf Monozyten auf einer Interaktion mit Adenosinrezeptoren basieren. Infolge der Bindung eines Liganden an Adenosinrezeptoren (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3) werden überwiegend unterschiedliche G-Proteingekoppelte Signalwege in Zellen aktiviert oder inhibiert. So erfolgt nach Ligandbindung an A_{2A} und A_{2B} die Bildung von zyklischem (cyclic) Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Adenylatzyklase. Im Gegensatz dazu kann die Ligandbindung an A_1 , und A_3 von einer Inhibition der Adenylatzyklase gefolgt sein, was zur Abnahme des intrazellulären cAMP-Spiegels führt. Zudem kann infolge der Bindung eines Liganden an die Rezeptoren A_1 , A_{2B} und A_3 die Phospholipase C stimuliert und so die Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum induziert werden [242-244].

5.1.3.1 Nachweis von Adenosinrezeptoren

Zunächst wurde eine immunhistochemische Analyse der Oberflächenexpression von Adenosinrezeptoren auf frisch isolierten Monozyten durchgeführt. Auf den Zellen wurden vor allem die Rezeptoren A_{2A} und A_{2B} und in deutlich geringeren Mengen auch A_1 und A_3 detektiert (Abbildung 5-4).

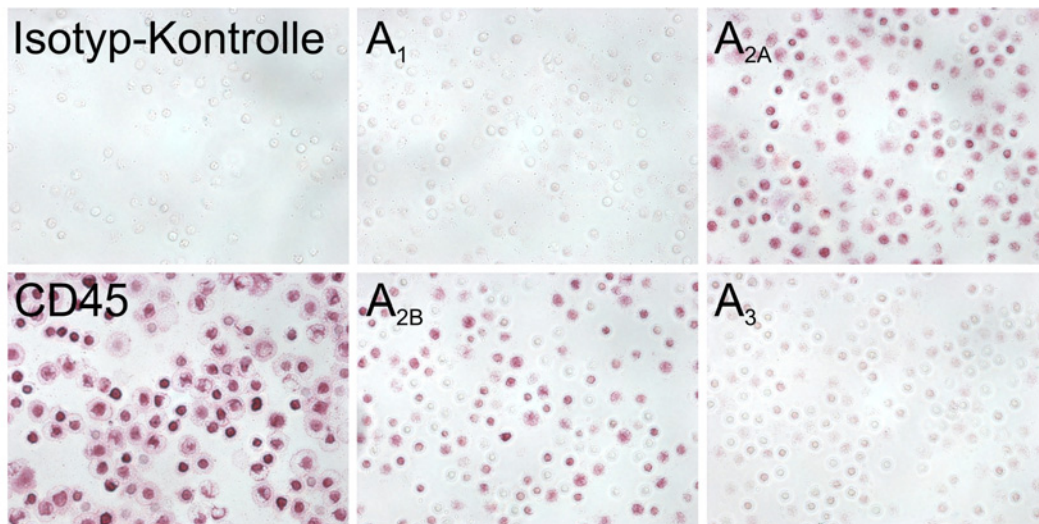


Abbildung 5-4: Expression von Adenosinrezeptoren auf Monozyten

Die Adenosinrezeptoren A_1 , A_{2A} , A_{2B} oder A_3 wurden auf frisch isolierten Monozyten immunhistochemisch gefärbt. Zur Kontrolle der Spezifität der Färbung durch die ausgewählten Antikörper wurde eine Isotyp-Kontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde der Oberflächenmarker CD45 immunhistochemisch gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives aus drei unabhängigen Experimenten.

5.1.3.2 Analyse des intrazellulären cAMP-Gehalts in Gegenwart von MTA

Um zu untersuchen, ob die Wirkung von MTA auf Monozyten über Adenosinrezeptoren vermittelt wird, wurden Monozyten mit oder ohne LPS-Stimulation für eine Stunde mit verschiedenen MTA-Konzentrationen inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Monozyten mit Forskolin, einem pflanzlichen Diterpenoid, kultiviert. Dieses führt durch direkte Stimulation der Adenylatzyklase zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration [245]. Außerdem wurde getestet, ob Adenosin, ein bekannter Adenosinrezeptoragonist [242], den intrazellulären cAMP-Gehalt von Monozyten beeinflusst.

Wie in Abbildung 5-5 gezeigt, steigerte Forskolin die intrazelluläre cAMP-Menge. Die Inkubation mit LPS führte im Vergleich zu den ohne LPS inkubierten Zellen zu einer leichten Reduktion des intrazellulären cAMP-Gehalts. Ein Effekt von MTA konnte jedoch weder mit noch ohne LPS festgestellt werden. Auch nach 15-minütiger Inkubation mit MTA wurde keine Wirkung von MTA auf den intrazellulären cAMP-Spiegel beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation mit Adenosin führte ebenfalls zu keinem Anstieg der cAMP-Menge.

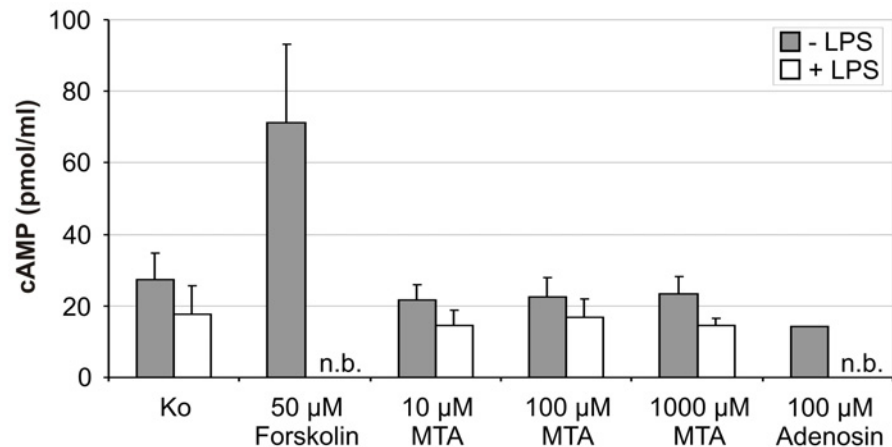


Abbildung 5-5: Intrazellulärer cAMP-Gehalt von Monozyten nach Inkubation mit MTA

Frisch isolierte Monozyten wurden für eine Stunde ohne oder mit 10 pg/ml LPS bzw. mit LPS in Kombination mit 10, 100 oder 1000 µM MTA inkubiert. Zusätzlich wurden Monozyten mit 100 µM Adenosin kultiviert. Als Positivkontrolle wurden Monozyten mit 50 µM Forskolin inkubiert. Der intrazelluläre Gehalt an cAMP wurde nach Lyse der Zellen mit Hilfe eines auf einer immunologischen Nachweismethode basierenden Tests ermittelt (n.b.: nicht bestimmt). Die gezeigten Daten repräsentieren den Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten ± SEM (100 µM Adenosin: zwei Experimente).

5.1.3.3 Einfluss von MTA auf den intrazellulären Kalziumgehalt

Des Weiteren wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jens Schlossmann (Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Regensburg) der Einfluss von MTA auf den intrazellulären Kalziumgehalt von Monozyten analysiert. Dies erfolgte, wie in Kapitel 4.1.6 beschrieben, durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes Fura-2 nach Anregung bei 340 und 380 nm (Verhältnis (F 340/380 nm)), gemessen bei 535 nm. Die Veränderung des intrazellulären Kalziumgehalts von zuvor mit Fura-2-Acetoxy-Methylester (Fura-2-AM) beladenen Monozyten wurde während eines Messzeitraumes von 80 Sekunden verfolgt, wobei verschiedene zu testende Substanzen jeweils nach vier Sekunden in die Kultur injiziert wurden: Als Positivkontrolle diente N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), ein N-terminal formyliertes bakterielles Tripeptid. fMLP löst nach Bindung an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor einen Anstieg intrazellulärer Kalziumkonzentrationen aus [246]. Darüber hinaus wurde MTA oder Adenosin injiziert. Als Kontrolle wurde Tyrode-Puffer zugegeben.

fMLP führte zu einer Zunahme des intrazellulären Kalziumgehalts (Abbildung 5-6). Ein Effekt von 100 μM Adenosin bzw. MTA auf den Kalziumgehalt der Monozyten wurde nicht festgestellt.

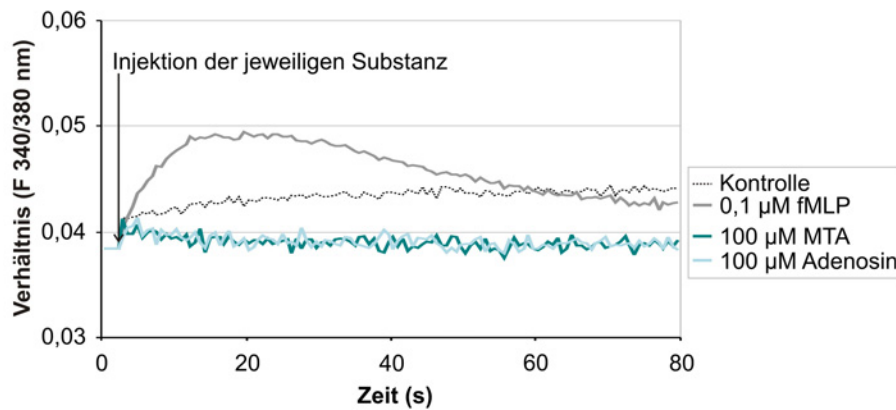


Abbildung 5-6: Einfluss von MTA auf den intrazellulären Kalziumgehalt

Die Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration frisch isolierter Monozyten wurde durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 nach Anregung bei 340 und 380 nm ($F_{340/380 \text{ nm}}$) während eines Messzeitraumes von 80 Sekunden bestimmt. Nach vier Sekunden erfolgte eine automatische Injektion von 100 μM MTA oder 100 μM Adenosin in die Kultur. Als Positivkontrolle wurde 0,1 μM N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) injiziert. Als Kontrolle diente Tyrode-Puffer. Die Abbildung zeigt eines von zwei unabhängigen Experimenten.

Auch 5 μM MTA oder Adenosin beeinflussten die intrazellulären Kalziumkonzentrationen nicht (Daten nicht gezeigt). In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von MTA oder Adenosin in Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS untersucht und ebenfalls kein Effekt festgestellt (Daten nicht gezeigt).

5.1.3.4 Effekt von Adenosinrezeptorantagonisten auf die Zytokinsekretion

Darüber hinaus wurde untersucht, wie sich die Anwesenheit von Adenosinrezeptorantagonisten auf die MTA-induzierte Zytokinsekretion von Monozyten auswirkt. Hierzu wurden Monozyten für 18 bis 20 Stunden mit MTA in Kombination mit Antagonisten der verschiedenen Adenosinrezeptoren inkubiert. Es handelte sich dabei um: 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin (DPCPX) (A_1 -Antagonist) [247], 8-(3-Chlorostyryl)-Koffein (CSC) (A_{2A} -Antagonist) [248], Alloxazin (A_{2A} -Antagonist) [249] und MRS 1292 (A_3 -Antagonist) [250]. Anschließend wurde die Konzentration an IL-6, dem durch MTA am stärksten beeinflussten Zytokin (siehe 5.1.1.1), mittels ELISA in den Kulturüberständen bestimmt.

Eine alleinige Inkubation der Monozyten mit den Adenosinrezeptorantagonisten hatte keinen Einfluss auf die IL-6-Sekretion (Daten nicht gezeigt). Die MTA-induzierte IL-6-Sekretion wurde durch Inkubation mit 0,05 μM der einzelnen Antagonisten nur leicht gehemmt (Abbildung 5-7).

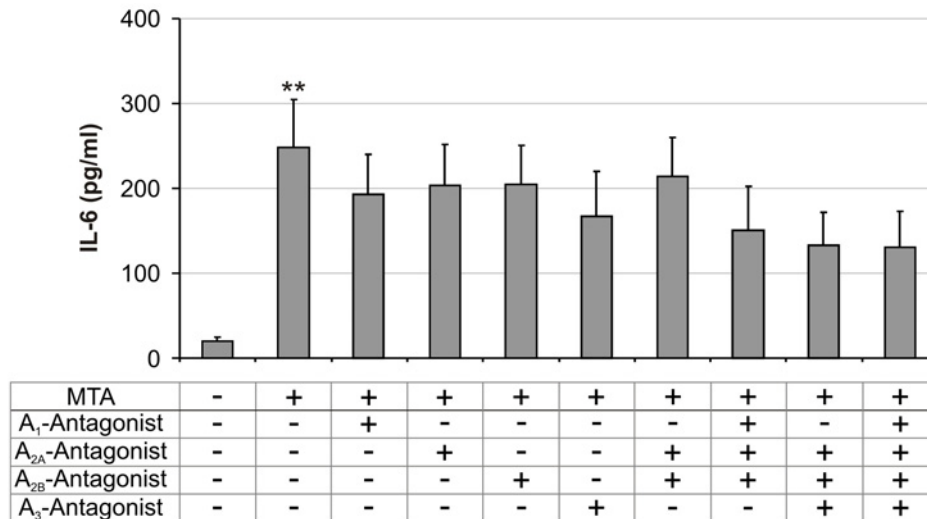


Abbildung 5-7: Einfluss von Adenosinrezeptorantagonisten auf die MTA-induzierte IL-6-Sekretion

Frisch isolierte Monozyten wurden für 18 bis 20 Stunden mit 250 μM MTA inkubiert. Als Kontrolle dienten ohne MTA kultivierte Monozyten. Weiterhin wurden Monozyten mit 250 μM MTA in Kombination mit je 0,05 μM verschiedener Adenosinrezeptorantagonisten inkubiert. Die eingesetzten Antagonisten waren: 8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin (DPCPX) (**A₁-Antagonist**), 8-(3-Chlorostyryl)-Koffein (CSC) (**A_{2A}-Antagonist**), Alloxazin (**A_{2B}-Antagonist**) und MRS 1292 (**A₃-Antagonist**). Die Konzentrationen an IL-6 in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert von mindestens vier unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: **P<0,01, relativ zur Kontrolle ohne MTA.

Dabei war weder durch höhere (bis zu 100 μM) noch durch niedrigere (0,01 μM) Konzentrationen der Antagonisten ein gesteigerter Effekt zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu den relativ schwachen Effekten niedriger MTA-Konzentrationen auf Monozyten (siehe 5.1.1) wurden in einer in der Arbeitsgruppe Kreutz parallel durchgeführten medizinischen Dissertation von Bernadette Neueder bereits bei geringen MTA-Konzentrationen eindeutige Effekte auf die *in vitro*-Differenzierung von humanen Monozyten zu dendritischen Zellen gefunden. In einer weiteren naturwissenschaftlichen Dissertation (Katrin Singer, Hämatologie und internistische Onkologie, Universitätsklinikum Erlangen; persönliche Kommunikation) zeigte sich außerdem, dass durch MTA die Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität von humanen zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten stark supprimiert wird. Der deutliche Einfluss von MTA auf diese beiden in

Langzeitkultur über mehrere Tage kultivierten Zelltypen könnte implizieren, dass die Effekte von MTA vor allem nach längerem Kontakt mit Immunzellen zum Tragen kommen.

5.2 Einfluss von Milchsäure auf humane Monozyten

In verschiedenen Tumoren wurden hohe extrazelluläre Milchsäurekonzentrationen beschrieben [159]. Da ein Einfluss von Milchsäure auf andere Immunzellen, zum Beispiel dendritische Zellen [187] und T-Zellen [188], gezeigt ist, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Milchsäure auf humane Monozyten untersucht. Um dabei von Effekten von Laktat und extrazellulärer Ansäuerung zu unterscheiden, wurden parallel zum Einfluss der Milchsäure die Wirkungen von Natriumlaktat und Ansäuerung auf Monozyten studiert.

Nachdem in Tumoren außerdem ein inflammatorisches Milieu vorliegt [101], wurden die Versuche zum Einfluss von Milchsäure auf Monozyten unter inflammatorischen Bedingungen durchgeführt. Zur Stimulation von TLR4, einem Rezeptor, der auch im Tumormilieu verschiedene Liganden bindet [119], diente LPS.

5.2.1 Funktion von Monozyten in Gegenwart von Milchsäure

Zur Untersuchung der Wirkung von Milchsäure auf Monozyten wurden zunächst verschiedene Funktionen dieser Zellen, die Sekretion von Zytokinen (siehe 5.2.1.1), die Bildung von reaktiven Sauerstoffarten (siehe 5.2.1.2), das Migrationsverhalten (siehe 5.2.1.3) und die zytostatische Wirkung auf Tumorzellen (siehe 5.2.1.4) unter Einfluss von Milchsäure analysiert.

5.2.1.1 Untersuchung der Zytokinsekretion

5.2.1.1.1 Sekretion verschiedener Zytokine in Gegenwart von Milchsäure

Zur Untersuchung der Wirkung von Milchsäure auf die Zytokinsekretion von Monozyten wurden Monozyten für 18 bis 20 Stunden mit LPS in An- oder Abwesenheit von L-Milchsäure inkubiert. Als Kontrolle wurden Monozyten ohne Zugabe von LPS kultiviert. Die Zytokinkonzentrationen in den Kulturüberständen wurden anschließend mittels ELISA bestimmt.

Abbildung 5-8A zeigt, dass Milchsäure bereits ab einer Konzentration von 5 mM die TNF-Sekretion von Monozyten deutlich inhibierte. Im Gegensatz zur TNF-Sekretion wurden

weder die IL-6- noch die IL-10-Sekretion (Abbildung 5-8B) durch niedrige Milchsäurekonzentrationen beeinflusst. Eine signifikante Inhibition der IL-6-Sekretion sowie eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion der IL-10-Sekretion waren nur bei Inkubation der Monozyten mit 20 mM Milchsäure festzustellen.

Die ebenfalls in den Kulturüberständen analysierten Konzentrationen des Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktors (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) und transformierenden Wachstumsfaktors β (transforming growth factor- β , TGF- β) wurden durch Milchsäure nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Da sich TNF bezüglich der Milchsäurewirkung als das empfindlichste Zytokin erwiesen hatte, wurde in weiteren Versuchen zum Einfluss von Milchsäure auf die Zytokinsekretion hauptsächlich die Sekretion dieses Zytokins analysiert.

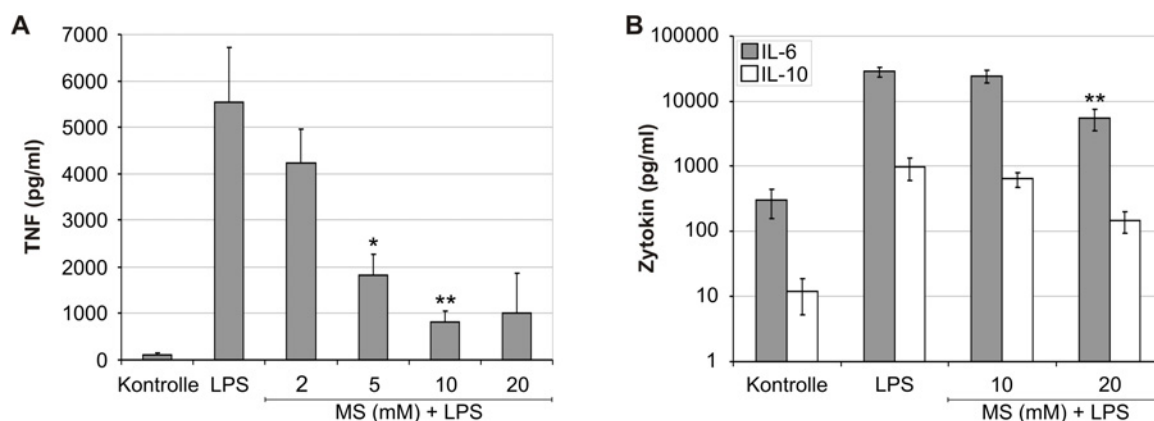


Abbildung 5-8: Einfluss von Milchsäure auf die Zytokinsekretion von Monozyten

Frisch isolierte humane Monozyten wurden mit 100 ng/ml LPS für 18 bis 20 Stunden in An- oder Abwesenheit von 2, 5, 10 und 20 mM (A) bzw. 10 und 20 mM (B) Milchsäure (MS) inkubiert. Als Kontrolle wurden Monozyten ohne LPS kultiviert. Die Konzentrationen von TNF (A), IL-6 und IL-10 (B) im Kulturüberstand wurden mittels ELISA ermittelt. Die Daten stellen Mittelwerte aus neun (A) bzw. mindestens fünf (B) unabhängigen Experimenten \pm SEM dar. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, relativ zu LPS.

5.2.1.1.2 Einfluss Tumor-produzierter Milchsäure auf die TNF-Sekretion

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Suppression der TNF-Sekretion durch Monozyten ebenso in einem physiologischeren Modell zu beobachten ist. Dazu wurden dreidimensionale Tumorsphäroide aus der Melanomzelllinie Mellm generiert. Diese Tumorzelllinie sezerniert, unter gleichzeitiger Ansäuerung des Kulturmediums, Laktat, was der Sekretion von Milchsäure entspricht [152]. Durch Inkubation der Tumorsphäroide mit Oxamsäure, einem Inhibitor der Laktat-Dehydrogenase (LDH) [251], wurde die Laktatproduktion der Tumorzellen inhibiert. Nach fünf Tagen wurde die Hälfte des

Kulturmediums der Tumorsphäroide durch eine Monozytensuspension ersetzt und die Kokultur mit LPS stimuliert. 18 bis 20 Stunden später wurden die Überstände der Kokultur geerntet und die darin enthaltenen Konzentrationen an Laktat und Zytokinen ermittelt.

Wie in Abbildung 5-9 zu sehen ist, wurde in der Kokultur von Monozyten und Tumorzellen ca. 35% weniger TNF als in der Monozytenkultur ohne Tumorzellkontakt detektiert.

Oxamsäure führte zu einer Abnahme der Laktatkonzentration in der Kokultur von ca. 3 mM auf ca. 1 mM bzw. ca. 0,5 mM.

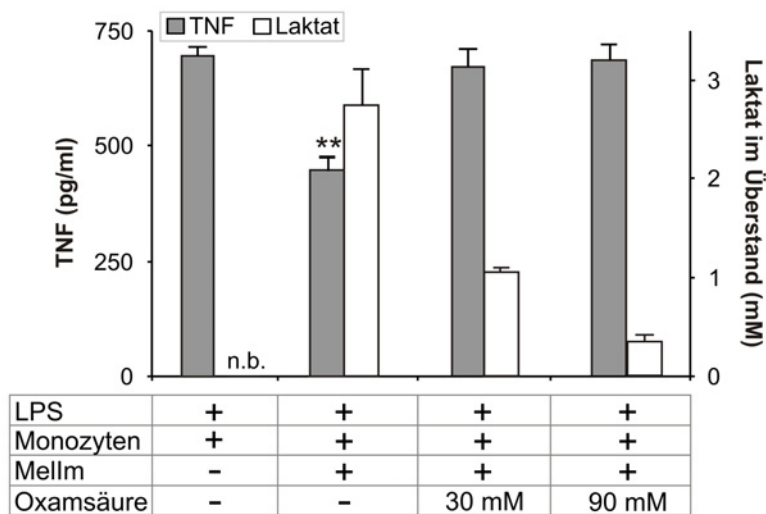


Abbildung 5-9: Einfluss von Tumor-produzierter Milchsäure auf die TNF-Sekretion von Monozyten

Tumorsphäroide der Melanom-Zelllinie Mellm wurden in An- oder Abwesenheit von 30 oder 90 mM Oxamsäure generiert. Nach fünf Tagen wurde die Hälfte des Kulturmediums durch eine Monozytensuspension ausgetauscht und die Kokultur mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Als Kontrolle wurden Monozyten in Gegenwart von 100 ng/ml LPS ohne Kontakt zu Tumorzellen kultiviert. Nach 18 bis 20 Stunden wurden die Kulturüberstände geerntet. Die TNF-Konzentration in den Überständen wurde mittels ELISA, die Laktatkonzentration enzymatisch bestimmt (n.b.: nicht bestimmt). Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens fünf Experimenten \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: $**P < 0,01$, relativ zu LPS-stimulierten Monozyten ohne Tumorzellkontakt. Abbildung veröffentlicht in [231].

Bei Inhibition der Laktatproduktion wurde der negative Effekt der Tumorzellen auf die TNF-Sekretion aufgehoben: die TNF-Konzentration in den Überständen der Kokultur war unter Einfluss von Oxamsäure vergleichbar mit der TNF-Konzentration in der Monozytenkultur ohne Tumorzellkontakt.

Die IL-6-Sekretion wurde in der Kokultur hingegen nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

5.2.1.1.3 Effekte von Ansäuerung und Laktat auf die Zytokinsekretion

Weiterhin wurde analysiert, ob die Reduktion der Zytokinsekretion durch Milchsäure ein Effekt der mit Milchsäure einhergehenden Ansäuerung des Kulturmediums, des enthaltenen Laktats oder der Kombination aus beiden Faktoren ist. Hierzu wurden Monozyten mit LPS und Milchsäure inkubiert. Zur Analyse von möglichen Ansäuerungseffekten der Milchsäure wurde der pH-Wert von Monozytenkulturen mit Hilfe von 1% Salzsäure (HCl) auf pH 7,1 (entsprechend 10 mM Milchsäure) bzw. pH 6,6 (entsprechend 20 mM Milchsäure) eingestellt. Um den Effekt von Laktat unter neutralen Bedingungen zu untersuchen, wurden Monozyten mit L-Natriumlaktat, dem Natriumsalz der Milchsäure, inkubiert. Durch Kombination aus Natriumlaktat und Ansäuerung wurden Monozyten mit den auch in der Milchsäure enthaltenen Protonen und Laktat-Anionen kultiviert. Weiterhin wurde der pH-Wert des mit Milchsäure versetzten Kulturmediums mit Natronlauge auf pH 7,6 rücktitriert.

Abbildung 5-10 zeigt, dass 10 mM (A) und 20 mM (B) Natriumlaktat einen leichten, aber nicht signifikanten Einfluss auf die TNF-Sekretion von Monozyten hatten. Die Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 7,1 (A) beeinflusste die TNF-Sekretion ebenfalls nur geringfügig. Im Gegensatz dazu reduzierte die Ansäuerung des Mediums auf pH 6,6 (B) die TNF-Sekretion signifikant.

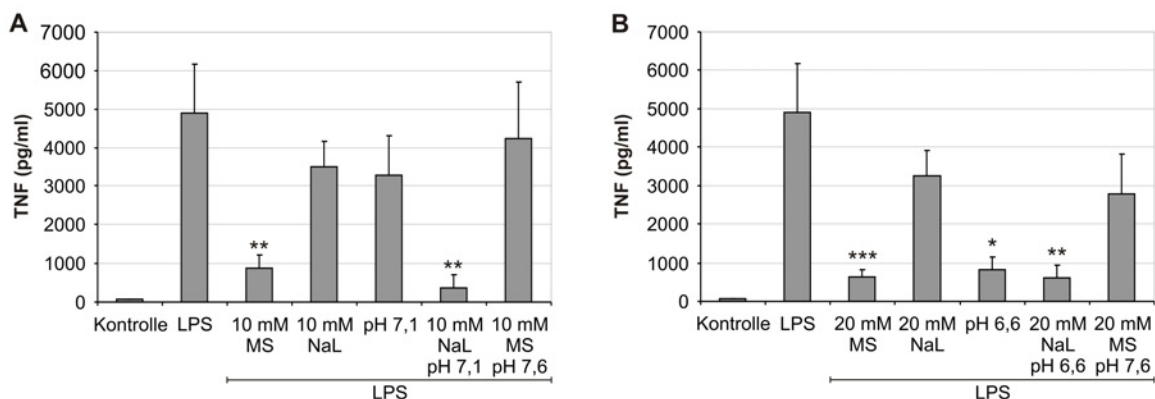


Abbildung 5-10: Bedeutung eines veränderten pH-Werts und von Natriumlaktat für die Milchsäure-supprimierte TNF-Sekretion

Monozyten wurden mit 100 ng/ml LPS für 18 bis 20 Stunden in Gegenwart von 10 mM (A) bzw. 20 mM (B) Milchsäure (MS) oder Natriumlaktat (NaL) inkubiert. Der Effekt der Ansäuerung wurde mit auf pH 7,1 (A) bzw. pH 6,6 (B) eingestelltem RPMI-Medium (entsprechend dem pH-Wert von 10 bzw. 20 mM MS in RPMI-Medium) analysiert. Weiterhin wurde der Effekt der Kombination aus NaL und Ansäuerung getestet sowie der pH-Wert des mit 10 mM (A) bzw. 20 mM (B) Milchsäure versetzten Mediums mit Natronlauge auf pH 7,6 rücktitriert. Die Konzentration an TNF in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus vier Experimenten \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, relativ zu LPS. Abbildung veröffentlicht in [231].

Die Inkubation von Monozyten mit 10 mM bzw. 20 mM Natriumlaktat unter saueren Bedingungen inhibierte die TNF-Sekretion in beiden Fällen. Die Milchsäure-abhängige Inhibition konnte durch Rücktitration des mit Milchsäure versetzten Mediums auf pH 7,6 fast vollständig aufgehoben werden.

Somit sind zur Inhibition der TNF-Sekretion durch 10 mM Milchsäure sowohl Laktat-Anionen, als auch die Ansäuerung des Kulturmediums nötig. Bei Inkubation mit 20 mM Milchsäure scheint die Ansäuerung des Kulturmediums die dominantere Rolle zu spielen.

Der geringe Einfluss von Natriumlaktat auf die TNF-Sekretion von Monozyten blieb auch nach Inkubation von Monozyten mit Natriumlaktatkonzentrationen bis zu 40 mM unverändert (Daten nicht gezeigt). Ein Austausch der üblicherweise verwendeten L-Enantiomere durch die D-Enantiomere von Milchsäure oder Laktat beeinflusste deren Wirkung auf Monozyten nicht (Daten nicht gezeigt).

Die IL-6-Sekretion von Monozyten wurde weder durch die Ansäuerung noch durch Natriumlaktat beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus wurde der Einfluss von Milchsäure auf die Sekretion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (vascular endothelial factor, VEGF) (gemessenes Protein: VEGF₁₆₅) untersucht.

Wie in Abbildung 5-11 dargestellt, wurde dieser nicht durch LPS induziert. Sowohl 10 und 20 mM Milchsäure sowie die Ansäuerung des Kulturmediums induzierten die VEGF-Sekretion, was auf einen Effekt der Ansäuerung hindeutet.

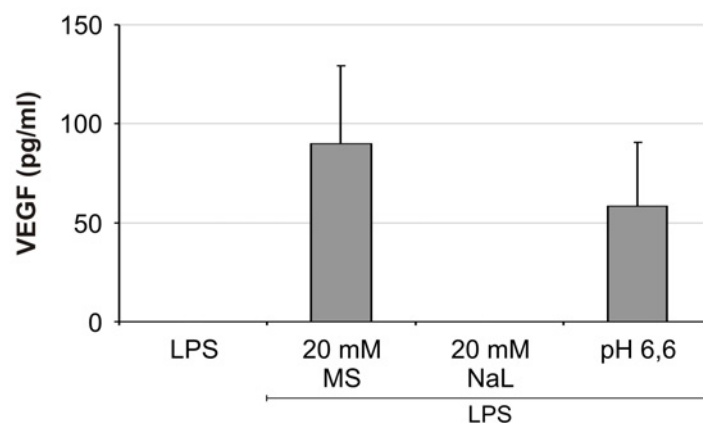


Abbildung 5-11: Einfluss von Milchsäure, Ansäuerung und Natriumlaktat auf die VEGF-Sekretion von Monozyten

Monozyten wurden für 18 bis 20 Stunden mit 100 ng/ml LPS in An- oder Abwesenheit von 10 bzw. 20 mM Milchsäure (MS) oder Natriumlaktat (NaL) inkubiert. Der Effekt der Ansäuerung wurde mit RPMI-Medium, dessen pH-Wert auf 6,6 titriert war (entsprechend dem pH-Wert von 20 mM MS in RPMI-Medium) analysiert. Die Konzentration an VEGF in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens drei Experimenten \pm SEM.

5.2.1.1.4 Einfluss von Milchsäure auf unterschiedlich stimulierte Monozyten

Um zu demonstrieren, dass die Inhibition der TNF-Sekretion durch Milchsäure unabhängig von der Bindung von LPS an TLR4 ist, wurde die Wirkung von Milchsäure auf die TNF-Sekretion von Monozyten auch nach Stimulation mit anderen bakteriellen Stimuli analysiert. Hierzu wurde bakterielles Flagellin, ein TLR5-Ligand [252], verwendet. Weiterhin wurde der Peptidoglykanbestandteil Muramyldipeptid (MDP) [253], welcher durch den intrazellulären Rezeptor Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne 2 (NOD2) gebunden wird [254], eingesetzt. Außerdem wurden Monozyten mit dem triacylierten Lipopeptid Tripalmitoyl-S-Glycerylcystein (Pam_3Cys), welches Ligand eines Heterodimers aus TLR1 und TLR2 ist [255], inkubiert.

Obwohl die verschiedenen Stimuli die TNF-Sekretion von Monozyten im Vergleich zur Kontrolle unterschiedlich stark induzierten, inhibierte Milchsäure die TNF-Sekretion bei Inkubation mit LPS, Flagellin und MDP signifikant (Abbildung 5-12).

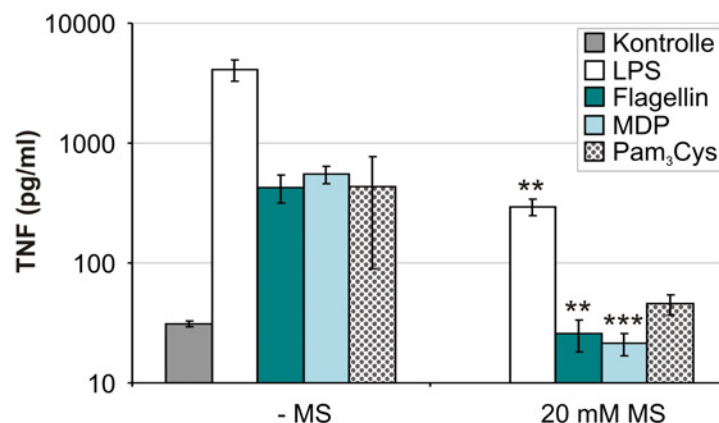


Abbildung 5-12: Einfluss von Milchsäure auf unterschiedlich aktivierte Monozyten

Monozyten wurden für 18 bis 20 Stunden mit je 100 ng/ml LPS, Flagellin, Muramyldipeptid (MDP) oder Tripalmitoyl-S-Glycerylcystein (Pam_3Cys) in An- oder Abwesenheit von 20 mM Milchsäure (MS) inkubiert. Als Kontrolle wurden Monozyten ohne Stimulus kultiviert. Die Konzentration an TNF in den Kulturüberständen wurde mittels ELISA ermittelt. Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, relativ zum jeweiligen Stimulus ohne Inkubation mit MS.

Dieser unabhängig vom gewählten bakteriellen Stimulus auftretende inhibitorische Effekt von Milchsäure wurde auch für die Sekretion von IL-6 beobachtet (Daten nicht gezeigt).

5.2.1.1.5 Kinetik der Zytokinsekretion unter Einfluss von Milchsäure

Weiterhin wurde die Kinetik der Sekretion von TNF und IL-6 unter Einfluss von Milchsäure untersucht. Dazu wurden Monozyten für 1, 2, 3, 4, 17, 24 oder 48 Stunden mit und ohne LPS bzw. mit LPS in Kombination mit 10 oder 20 mM Milchsäure inkubiert.

Wie in Abbildung 5-13A zu sehen, nahm die Konzentration an TNF in den Kulturüberständen der unstimulierten Kontroll-Zellen innerhalb der ersten beiden Stunden zu und blieb anschließend konstant. Dies zeigt, dass die TNF-Sekretion der Monozyten bereits durch Adhärenz leicht induziert wird. Im Gegensatz dazu wurde die IL-6-Sekretion der Monozyten nicht durch Adhärenz stimuliert (Abbildung 5-13B).

Die Inkubation mit LPS führte im Vergleich zur Kontrolle bereits innerhalb der ersten Stunde zu einer ca. 100-fach höheren Konzentration an TNF in den Kulturüberständen, welche bis zu einer Kulturdauer von ca. drei Stunden weiter deutlich anstieg. Die Konzentration an TNF in den Überständen der mit 20 mM Milchsäure und LPS inkubierten Monozyten war im Vergleich zur LPS-Kontrolle nach einer Stunde stark reduziert und stieg im weiteren Verlauf der Kultur nur noch schwach an. Auch in Gegenwart von 10 mM Milchsäure war die LPS-induzierte TNF-Sekretion der Monozyten vermindert, der Effekt war jedoch weniger stark als bei Inkubation mit 20 mM Milchsäure.

Erwartungsgemäß steigerte die Inkubation mit LPS die IL-6-Sekretion stark. Das Maximum der IL-6-Sekretion war nach 17 Stunden erreicht. Die Inkubation mit 20 mM Milchsäure verursachte eine deutliche Verzögerung der LPS-stimulierten IL-6-Sekretion.

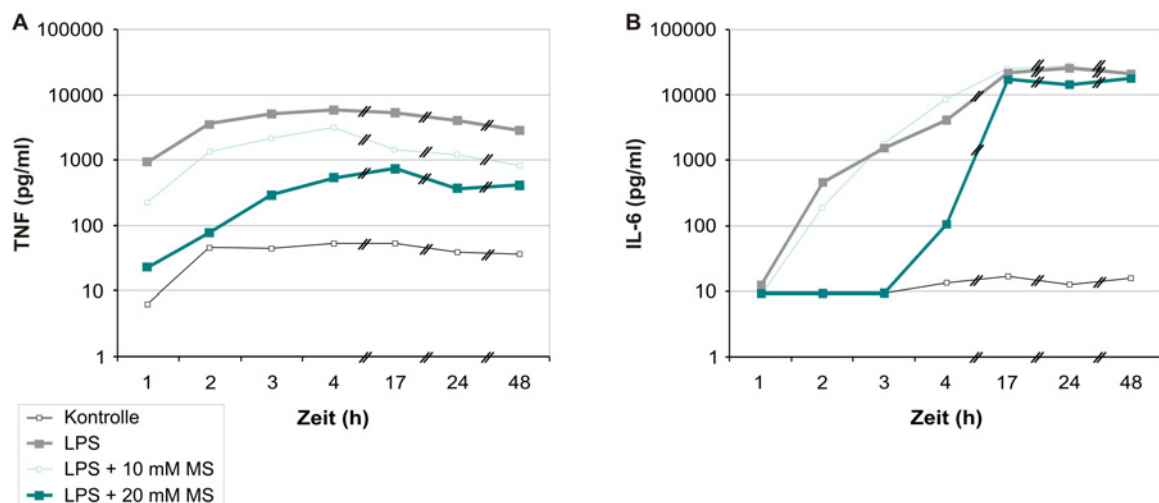


Abbildung 5-13: Einfluss von Milchsäure auf die Kinetik der Zytokinsekretion

Monozyten wurden für 1, 2, 3, 4, 17, 24 oder 48 Stunden mit 100 ng/ml LPS alleine bzw. in Kombination mit 10 oder 20 mM Milchsäure (MS) inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Kulturüberstände geerntet und die Konzentrationen an TNF (A) bzw. IL-6 (B) mittels ELISA gemessen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives aus drei unabhängigen Experimenten.

In Übereinstimmung mit vorhergehenden Beobachtungen (siehe 5.2.1.1.1) wurde die IL-6-Sekretion durch 10 mM Milchsäure nicht beeinflusst. Im Gegensatz zur TNF-Sekretion erreichte die LPS-stimulierte IL-6-Sekretion auch unter Einfluss von Milchsäure nach 17 Stunden ein ähnliches Niveau wie die mit LPS inkubierten Zellen.

5.2.1.2 Wirkung von Milchsäure auf die ROS-Produktion

Anschließend wurde untersucht, ob Milchsäure die ROS-Produktion von Monozyten beeinflusst. Hierzu wurde die PMA-stimulierte Produktion von Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) mittels Lucigenin-verstärkter Chemilumineszenz detektiert. Monozyten wurden mit PMA bzw. mit PMA in An- oder Abwesenheit von 20 mM Milchsäure oder bei pH 6,6 inkubiert. Unmittelbar bei Versuchsstart sowie nach 30 und 60 Minuten wurde die Gesamtmenge an Superoxidanionen in den Proben luminometrisch bestimmt.

Wie Abbildung 5-14 zeigt, wurde die größte Menge an Superoxidanionen nach 30 Minuten detektiert. Im Vergleich zu den nur mit PMA behandelten Monozyten führten sowohl die Inkubation mit 20 mM Milchsäure, als auch die Ansäuerung des Mediums nach 30 Minuten zu einer signifikanten Reduktion der Menge an Superoxidanionen. Eine signifikante Inhibition der ROS-Produktion durch geringere Milchsäurekonzentrationen wurde nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

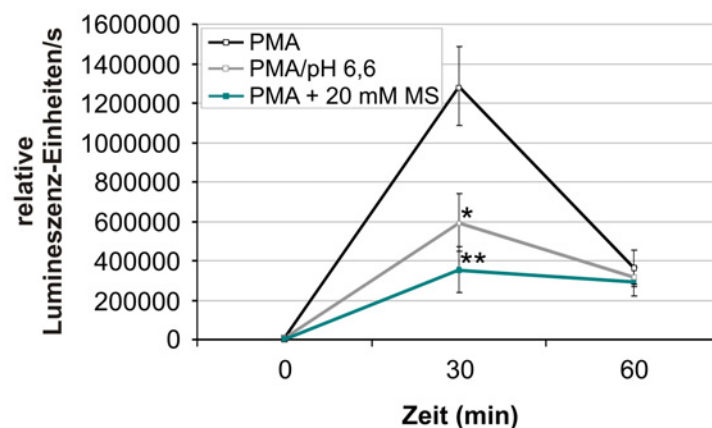


Abbildung 5-14: Produktion von Superoxidanionen unter Einfluss von Milchsäure und Ansäuerung

Monozyten wurden mit 0,1 μ M Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) alleine, in Kombination mit 20 mM Milchsäure (MS) oder RPMI-Medium, dessen pH-Wert mit HCl auf 6,6 titriert wurde (entsprechend dem pH-Wert von RPMI-Medium mit 20 mM MS), inkubiert. Die Menge an Superoxidanionen, gemessen in relativen Lumineszenz-Einheiten pro Sekunde, wurde unmittelbar nachdem alle Substanzen zusammengegeben worden waren sowie 30 und 60 Minuten nach Inkubationsstart bestimmt. Die angegebenen Daten repräsentieren den Mittelwert von mindestens fünf unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, relativ zu 30 Minuten PMA.

5.2.1.3 Effekt von Milchsäure auf das Migrationsverhalten

Die Migration von Monozyten in Richtung einer chemotaktisch wirkenden Substanz ist für den Ablauf einer korrekten Immunantwort unerlässlich. Um zu analysieren, ob Milchsäure die Migration von Monozyten beeinflusst, wurde der untere Teil einer Chemotaxiskammer mit Milchsäure- und Kontrolllösungen und der obere Teil mit Monozytensuspensionen befüllt. Als Stimulus für die Migration diente fMLP, welches als N-terminal formyliertes bakterielles Tripeptid eine für Phagozyten stark chemoattraktive Wirkung hat [256]. Die verwendete Konzentration von 0,1 μM erwies sich in Testreihen mit 0,01 μM , 0,1 μM und 1 μM fMLP als stärkster Stimulus (Daten nicht gezeigt). Die Wanderung der Zellen in dem nach unten ansteigenden Konzentrationsgradienten während einer 90-minütigen Inkubation wurde anschließend, wie in Kapitel 4.1.10 erläutert, dokumentiert. Die Rate der spontan migrierenden Monozyten wurde durch Inkubation in Kulturmedium ermittelt. Die Wirkung von 10 und 20 mM Milchsäure bzw. entsprechender Ansäuerung des Kulturmediums wurde sowohl unabhängig von fMLP (Abbildung 5-15A), als auch in Kombination mit fMLP (Abbildung 5-15B) getestet.

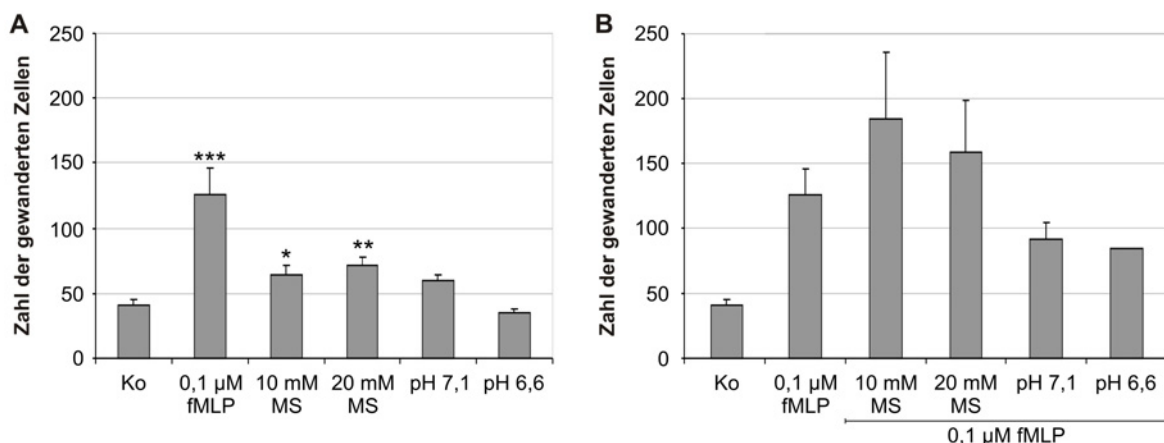


Abbildung 5-15: Migration von Monozyten unter Einfluss von Milchsäure und Ansäuerung

Von verschiedenen Substanzen durch eine poröse Membran getrennt wurden Monozyten für 90 Minuten in einer Chemotaxiskammer inkubiert. Die durch die Membran auf die steigende Konzentration der Substanz zugewanderten Zellen wurden anschließend auf der Membran fixiert, gefärbt und gezählt. **(A)** Zahl der gewanderten Zellen in einer mit 10 und 20 mM Milchsäure (MS) befüllten Chemotaxiskammer. Der Effekt der Ansäuerung wurde mit RPMI-Medium mit pH 7,1 bzw. pH 6,6 (entsprechend dem pH-Wert von RPMI-Medium mit 10 bzw. 20 mM MS) analysiert. Als Kontrolle (Ko) für die spontane Migration der Zellen diente Kulturmedium, als Positivkontrolle wurde 0,1 μM fMLP verwendet. **(B)** Zahl der gewanderten Zellen in einer Chemotaxiskammer, die Milchsäure und angesäuertes Medium analog zu **(A)** in Kombination mit 0,1 μM fMLP enthält. Die Daten repräsentieren den Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SEM (**(B)** pH 6,6 + 0,1 μM fMLP: 2 Experimente). Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, relativ zur Kontrolle (Ko) **(A)**.

Verglichen mit der Zahl der spontan gewanderten Zellen führte fMLP zu einer deutlichen Zunahme der Migration von Monozyten (Abbildung 5-15A). Auch 10 und 20 mM Milchsäure steigerten die Migration der Zellen, wenngleich in geringerem Ausmaß als fMLP. Die 10 mM Milchsäure entsprechende Ansäuerung auf pH 7,1 hatte ebenfalls eine gesteigerte, aber nicht signifikante Zahl an gewanderten Zellen zur Folge. Im Gegensatz dazu hatte die 20 mM Milchsäure entsprechende Ansäuerung des Mediums auf pH 6,6 eher inhibitorische Effekte. Die Kombinationen aus 10 bzw. 20 mM Milchsäure und fMLP steigerten die Migration der Zellen im Vergleich zur Migration mit fMLP geringfügig (Abbildung 5-15B). fMLP zusammen mit pH 7,1 oder pH 6,6 reduzierte die Zahl der migrierenden Zellen.

In einem weiteren Experiment wurden der obere und der untere Teil der Chemotaxiskammer mit Milchsäure bzw. angesäuertem Kulturmedium befüllt. Auch dann war bei Inkubation mit Milchsäure eine verstärkte Migration der Monozyten feststellbar.

Somit handelte es sich bei der positiven Wirkung der Milchsäure auf die Monozyten um Chemokinese, d.h. eine Steigerung der Beweglichkeit, und nicht um Chemotaxis, d.h. eine gerichtete Bewegung (Daten nicht gezeigt).

5.2.1.4 Einfluss von Milchsäure auf die zytostatischen Eigenschaften

Weiterhin wurde untersucht, ob die zytostatischen Eigenschaften von Monozyten durch Milchsäure verändert werden. Hierzu wurden Mclm-Melanomzellen in An- oder Abwesenheit von Monozyten mit LPS alleine bzw. in Kombination mit 2, 5, 10, oder 20 mM Milchsäure inkubiert. Um zwischen Effekten der Ansäuerung und Effekten von Milchsäure zu unterscheiden, wurden die Zellen außerdem mit LPS in Medium mit pH 7,1 oder pH 6,6 kultiviert. Als Kontrollen wurden Monozyten und Mclm-Melanomzellen einzeln oder als Kokultur inkubiert. Anschließend wurde die Proliferation der inkubierten Zellen anhand des Einbaus von ^3H -Thymidin in die neusynthetisierte DNA der Zellen bestimmt.

Wie für nicht proliferierende Zellen zu erwarten, war bei Monozyten nur ein sehr geringer Einbau von ^3H -Thymidin messbar (677 ± 355 Zerfälle pro Minute (Zpm); Daten nicht gezeigt).

Abbildung 5-16 zeigt die Proliferation der Mclm-Melanomzellkultur bzw. der Kokultur aus Monozyten und Melanomzellen. Die Proliferation der ohne Monozyten inkubierten Melanomzellen wurde weder durch LPS, noch durch die Kombination aus LPS und 2 mM Milchsäure beeinflusst. LPS und 5 bzw. 10 mM Milchsäure sowie LPS in Kulturmedium mit pH 7,1 führten zu einer leichten Abnahme der Proliferation der Melanomzellen.

Aufgrund des geringen Einbaus von Thymidin in die Monozyten wurden die für die Kokultur ermittelten Werte auf die Proliferation der Mellm-Melanomzellen zurückgeführt.

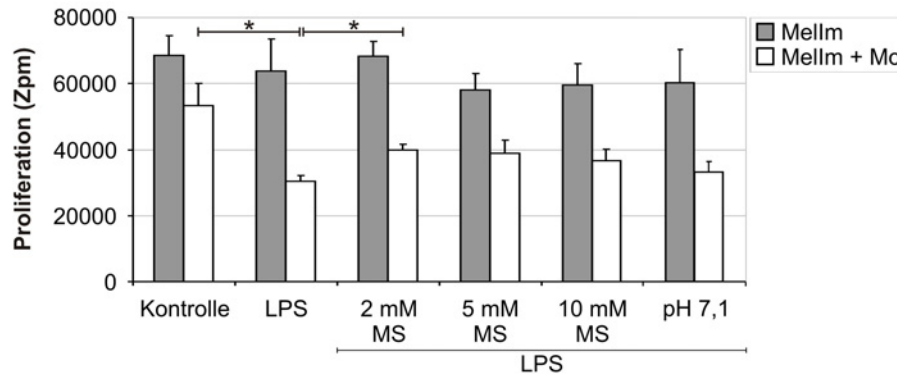


Abbildung 5-16: Einfluss von Milchsäure auf die zytostatischen Eigenschaften von Monozyten

Mellm-Melanomzellen bzw. Mellm-Melanomzellen zusammen mit Monozyten (Mo) wurden mit 100 ng/ml LPS alleine oder in Kombination mit 2, 5, 10 oder 20 mM Milchsäure (MS) inkubiert. Zur Untersuchung von Effekten der Ansäuerung wurden die Zellen außerdem mit LPS in Medium mit pH 7,1 bzw. pH 6,6 (entsprechend dem pH-Wert von Medium mit 10 bzw. 20 mM MS) inkubiert. Als Kontrollen wurden Mellm alleine bzw. Mellm mit Monozyten ohne LPS kultiviert. Nach 18 Stunden wurde der Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA der Zellen und somit die Proliferation der Zellen in Zerfällen pro Minute (Zpm) bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Analyse innerhalb der für die Kokultur ermittelten Werte erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, LPS relativ zur Kontrolle, LPS mit 2 mM MS relativ zu LPS.

Verglichen mit den ohne Monozyten inkubierten Mellm-Melanomzellen nahm die Proliferation der Tumorzellen in der nicht stimulierten Kokultur aus Melanomzellen und Monozyten (Kontrolle) leicht ab. Die Inkubation mit LPS verstärkte diesen Effekt deutlich. LPS in Kombination mit 2 mM Milchsäure führte zu einer signifikant gesteigerten Proliferation der Tumorzellen in der Kokultur. Auch eine Inkubation mit 5 oder 10 mM Milchsäure beeinflusste die Proliferation in ähnlicher Weise, jedoch waren die Effekte nicht signifikant. Verglichen mit der LPS-Kontrolle wurde die Proliferation in der Kokultur infolge der Inkubation in Kulturmedium mit pH 7,1 kaum beeinflusst.

5.2.2 Analyse des Wirkmechanismus von Milchsäure auf Monozyten

Nachdem eindeutig gezeigt war, dass Milchsäure unterschiedliche Funktionen von Monozyten beeinflusst, wurde der Mechanismus der Wirkung von Milchsäure untersucht.

5.2.2.1 Einfluss von Milchsäure auf die Vitalität von Monozyten

Um auszuschließen, dass die inhibitorischen Effekte der Milchsäure aus einer Abnahme der Zahl lebender Zellen in Gegenwart von Milchsäure resultieren, wurden Monozyten für 18 bis 20 Stunden in An- und Abwesenheit von LPS in Kombination mit 20 mM Milchsäure oder entsprechender Ansäuerung inkubiert. Als Kontrollen wurden Monozyten mit oder ohne LPS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin-V-FITC und 7-AAD gefärbt. Die Zahl der lebenden, apoptotischen oder toten Zellen wurde schließlich durchflusszytometrisch bestimmt.

Wie in Abbildung 5-17A/B gezeigt, unterschied sich die Zahl der lebenden Zellen nach Inkubation mit 20 mM Milchsäure nicht signifikant von der Zahl der lebenden Zellen ohne Kontakt zu Milchsäure. Auch die 20 mM Milchsäure entsprechende Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 6,6 veränderte die Zahl der lebenden Zellen nicht.

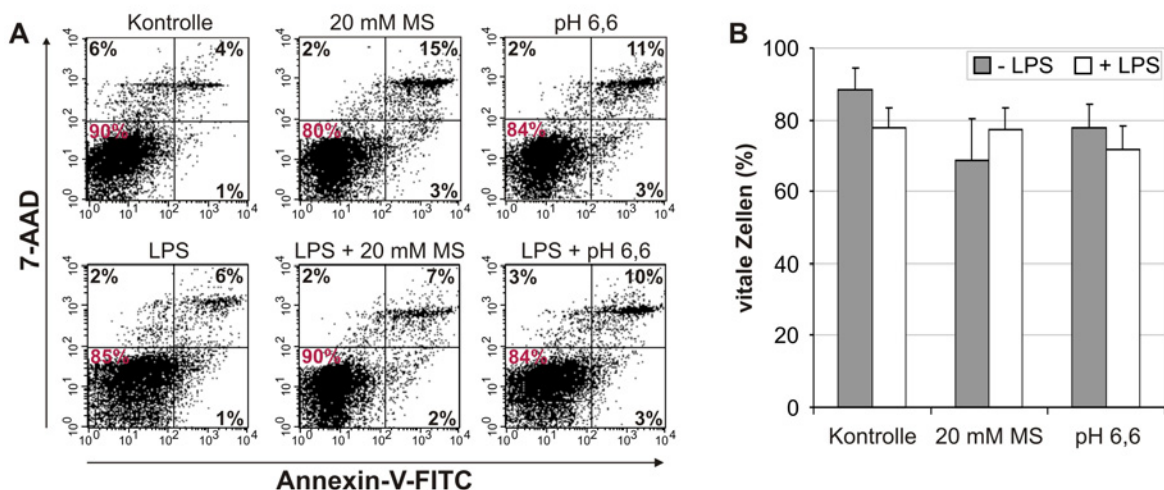


Abbildung 5-17: Vitalität von Monozyten nach Inkubation mit Milchsäure oder Ansäuerung
 Monozyten wurden für 18 bis 20 Stunden mit 20 mM Milchsäure (MS) bzw. bei Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 6,6 (entsprechend 20 mM MS) in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml LPS inkubiert. Als Kontrollen wurden Monozyten mit bzw. ohne LPS in Kultur genommen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Annexin-V-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** Die Abbildung zeigt ein repräsentatives aus drei unabhängigen Experimenten. Abbildung veröffentlicht in [231]. **(B)** Die Abbildung zeigt die Mittelwerte (\pm SEM) des prozentualen Anteils vitaler Zellen aus drei unabhängigen Experimenten.

5.2.2.2 Metabolische Untersuchungen: Glykolyse und Respiration

Milchsäure, die aus der Produktion von Laktat in der Glykolyse und dessen Export im Kotransport mit Protonen resultiert, liegt unter physiologischen Bedingungen beinahe vollständig zu Laktat und Protonen dissoziiert vor [151, 152]. Laktat stellt aber kein ungenutztes Endprodukt der Glykolyse dar, sondern dient vielmehr als Energiequelle und Koordinator des Zellmetabolismus [151]. In diesem Zusammenhang ist beispielsweise bekannt, dass Laktat die Aktivität der 6-Phosphofrukto-1-Kinase (PFK-1), einem Schlüsselenzym der Glykolyse [257], inhibiert und so den glykolytischen Fluss reduziert [258]. Somit stellte sich die Frage, ob hohe extrazelluläre Konzentrationen an Milchsäure bzw. Laktat oder Protonen einen Einfluss auf den Glukosemetabolismus von Monozyten haben.

5.2.2.2.1 Analyse der Aufnahme von Laktat

Im Rahmen dieser Fragestellung wurde zunächst untersucht, ob und unter welchen Bedingungen Laktat in Monozyten aufgenommen wird. Hierzu wurden frisch isolierte Monozyten für 18 Stunden mit und ohne Zugabe von LPS mit Natrium-[3-¹³C]Laktat inkubiert. Um den Effekt einer leichten Ansäuerung und somit der Anwesenheit von Protonen auf die Laktataufnahme zu studieren, wurde in weiteren Ansätzen der pH-Wert des Natrium-[3-¹³C]Laktat-enthaltenden Kulturmediums mit HCl auf pH 7,1 titriert. Zur Kontrolle wurden Monozyten mit und ohne LPS-Stimulation in Abwesenheit von Natrium-[3-¹³C]Laktat in Kultur genommen. Die Quantifizierung der intrazellulären Menge an [3-¹³C]Laktat mittels Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wurde durch Mitarbeiter des Instituts für Funktionelle Genomik (Universitätsklinikum Regensburg) durchgeführt.

Abbildung 5-18 zeigt, dass Monozyten konstitutiv Laktat aufnehmen. Die Stimulation der Zellen mit LPS bei neutralem pH hatte keinen signifikanten Effekt auf die Laktataufnahme.

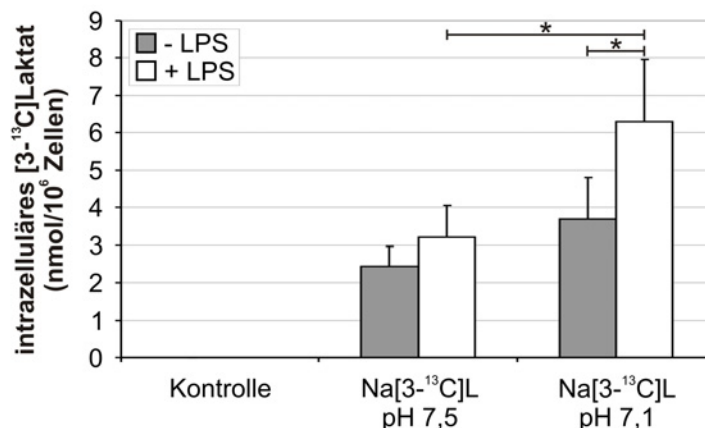


Abbildung 5-18: Laktataufnahme unter neutralen und leicht sauren Bedingungen

Monozyten wurden für 18 Stunden mit oder ohne 20 mM Natrium-[3-¹³C]Laktat (Na[3-¹³C]L) in An- oder Anwesenheit von 100 ng/ml LPS inkubiert. Zur leichten Ansäuerung wurde außerdem in weiteren Ansätzen der pH-Wert des Natrium-[3-¹³C]Laktat-enthaltenden Kulturmediums mit HCl auf pH 7,1 titriert. Als Kontrolle wurden Monozyten mit oder ohne LPS in Abwesenheit von Natrium-[3-¹³C]Laktat kultiviert. Die Aufnahme von Natrium-[3-¹³C]Laktat in die Zellen wurde mittels Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus vier unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, LPS bei pH 7,1 relativ zu LPS bei pH 7,5, LPS bei pH 7,1 relativ zu ohne LPS bei pH 7,1. Abbildung veröffentlicht in [231].

Verglichen mit der Laktataufnahme bei pH 7,5 verbesserte die Ansäuerung des Kulturmediums die Aufnahme von [3-¹³C]Laktat in Abwesenheit von LPS. Die Kombination aus LPS-Stimulation und Ansäuerung des Kulturmediums steigerte die Aufnahme des Laktatisotops durch die Monozyten signifikant.

Die gesteigerte Aufnahme von Laktat unter leicht sauren Bedingungen und somit in Anwesenheit einer vermehrten Menge von Protonen gab Grund zu der Annahme, dass der Transport von Laktat in die Monozyten zumindest teilweise durch Monocarboxylat-transporter (MCT) vermittelt wird. Diese Transporter befördern Protonen und Laktat-Anionen im Kotransport durch die Zellmembran. Die Richtung des Transports ist dabei abhängig vom Konzentrationsgradienten von Protonen und Laktat [259, 260].

Da die Laktataufnahme nach Inkubation mit LPS unter leicht sauren Bedingungen zu einer deutlichen Zunahme des intrazellulären Laktats führte, wurde untersucht, ob die Expression der Monocarboxylattransporter durch LPS beeinflusst wird. Dazu wurde mittels „real-time“ quantitativer PCR (RT-qPCR) die Expression von *MCT-1* und *MCT-4* nach vier- bzw. 18-stündiger LPS-Stimulation analysiert. In drei unabhängigen Experimenten wurde die mRNA-Expression beider Rezeptoren in Monozyten festgestellt, ein eindeutiger Einfluss von LPS wurde jedoch nicht gefunden (Daten nicht gezeigt).

5.2.2.2.2 Messung von Glukoseaufnahme und Laktatproduktion

Nachdem gezeigt war, dass Monozyten extrazelluläres Laktat aufnehmen, wurde der Glukosemetabolismus der Zellen untersucht. Da die Aktivierung von Monozyten, aber auch Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen, von der Glykolyse abhängig ist und mit einer Steigerung der Glykolyserate einhergeht [69-72], wurde zunächst überprüft, wie sich die LPS-Stimulation auf die Glykolyserate der Monozyten auswirkt. Hierzu wurden frisch isolierte Monozyten für 18 Stunden mit bzw. ohne LPS inkubiert. Durch Mitarbeiter des Instituts für Funktionelle Genomik wurde anschließend mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) die Glukoseaufnahme der Zellen sowie die Konzentration an Laktat in den Kulturüberständen ermittelt.

Abbildung 5-19 zeigt, dass die Glukoseaufnahme der Monozyten nach Inkubation mit LPS nicht verändert war. Im Gegensatz dazu sezernierten die Zellen nach LPS-Stimulation eine signifikant höhere Menge an Laktat als die unstimulierten Zellen, was auf eine gesteigerte Glykolyserate der Monozyten nach LPS-Stimulation hinweist.

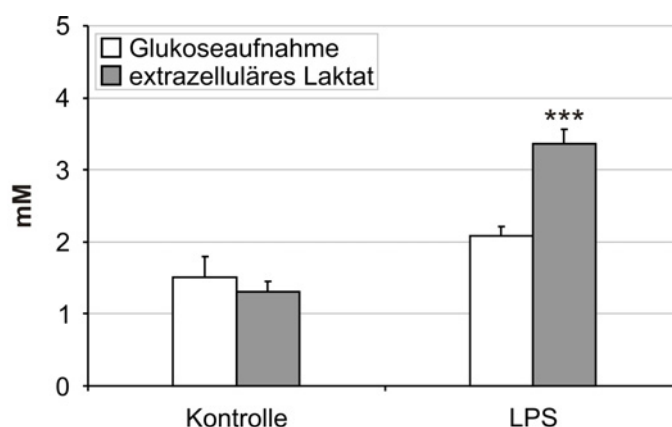


Abbildung 5-19: Glukoseaufnahme und Laktatsekretion mit und ohne LPS-Stimulation

Frisch isolierte humane Monozyten wurden für 18 Stunden ohne bzw. mit 100 ng/ml LPS inkubiert. Die Konzentrationen an Laktat und Glukose in den Kulturüberständen wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) bestimmt. Ausgehend von den ebenfalls mit GC-MS ermittelten Konzentrationen an Laktat und Glukose in Kontrollmedium ohne Zellkontakt wurden anschließend die Glukoseaufnahme und die Laktatproduktion durch die Monozyten errechnet. Die Daten sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: *** $P < 0,001$. Abbildung veröffentlicht in [231].

Des Weiteren wurde untersucht, ob endogenes Laktat, welches in Form von Milchsäure sezerniert wird [259], einen Einfluss auf die TNF-Sekretion der Monozyten haben könnte. Dazu wurden Monozyten mit LPS stimuliert und für 1, 2, 3, 4, 17, 24 oder 48 Stunden inkubiert. Die in den Kulturüberständen enthaltenen Mengen an Laktat und TNF wurden anschließend enzymatisch bzw. mittels ELISA bestimmt. Die höchste TNF-Konzentration

wurde nach vierstündiger Inkubation detektiert (Abbildung 5-20). Nach 17 Stunden war die TNF-Konzentration in den Kulturüberständen reduziert. Im Gegensatz dazu war die extrazelluläre Laktatkonzentration zu diesem Zeitpunkt deutlich angestiegen und nahm auch im weiteren Verlauf der Kultur zu.

Der Kulturüberstand LPS-aktivierter Monozyten wies außerdem im Vergleich zu nicht aktivierten Monozyten einen leicht reduzierten pH-Wert auf (pH 7,4 bei Kontrollzellen, pH 7,3 nach 17 Stunden LPS-Aktivierung) (Daten nicht gezeigt).

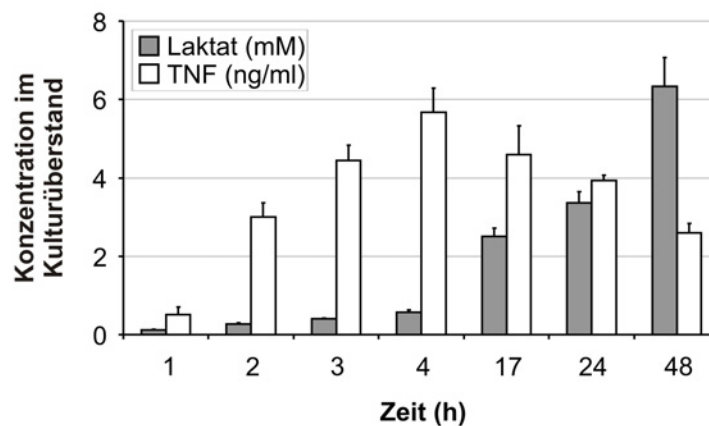


Abbildung 5-20: Kinetik der endogenen Laktatproduktion durch Monozyten

Monozyten wurden für 1, 2, 3, 4, 17, 24 oder 48 Stunden mit 100 ng/ml LPS inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Kulturüberstände abgenommen. Die Konzentrationen an Laktat und TNF in den Überständen wurden enzymatisch bzw. mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM.

5.2.2.2.3 Einfluss von Milchsäure auf die Glukoseaufnahme

Anschließend wurde die Wirkung von Milchsäure auf die Glukoseaufnahme aktivierter Monozyten untersucht. Dazu wurden frisch isolierte Monozyten für 18 Stunden mit LPS alleine bzw. in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen an Milchsäure, mit der 20 mM Milchsäure entsprechenden Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 6,6 oder mit Natriumlaktat inkubiert. Die in den Kulturüberständen resultierende Menge an Glukose wurde anschließend mittels GC-MS durch Mitarbeiter des Instituts für Funktionelle Genomik bestimmt.

Abbildung 5-21 zeigt, dass extrazelluläre Milchsäure die Glukoseaufnahme LPS-stimulierter Monozyten konzentrationsabhängig reduzierte.

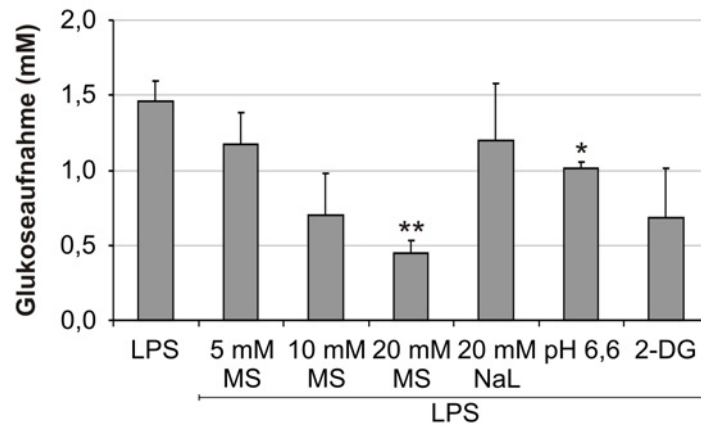


Abbildung 5-21: Einfluss von Milchsäure, Natriumlaktat und Ansäuerung auf die Aufnahme von Glukose durch Monozyten

Monozyten wurden für 18 Stunden mit 100 ng/ml LPS alleine bzw. in Kombination mit 5, 10, oder 20 mM Milchsäure (MS), 20 mM Natriumlaktat (NaL) oder Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 6,6 (entsprechend 20 mM MS) inkubiert. Die Glukose-Konzentrationen wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) in den Kulturüberständen gemessen. Die Aufnahme von Glukose wurde anschließend relativ zu der ebenfalls mittels GC-MS ermittelten Konzentration an Glukose in Kontrollmedium ohne Zellkontakt berechnet. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Auch in Kulturmedium mit pH 6,6 wurde eine verminderte Glukoseaufnahme der LPS-stimulierten Monozyten detektiert. Der Effekt der Ansäuerung war jedoch nicht so ausgeprägt wie der Effekt von 20 mM Milchsäure. Extrazelluläres Natriumlaktat führte in zwei von drei Experimenten zu einer reduzierten Glukoseaufnahme.

Um zu untersuchen, ob sich eine Inhibition der Glykolyse auf die Glukoseaufnahme von Monozyten auswirkt, wurden die LPS-stimulierten Monozyten außerdem mit 2-Deoxyglukose, einem kompetitiven Inhibitor der Hexokinase [261], inkubiert. 2-Deoxyglukose reduzierte die Glukoseaufnahme leicht.

Da das verwendete Kulturmedium neben Glukose auch Aminosäuren als alternative Kohlenstoffquellen enthielt, wurden von Mitarbeitern des Instituts für Funktionelle Genomik neben den Glukosekonzentrationen (Abbildung 5-19 und Abbildung 5-21) auch die Aminosäurekonzentrationen in den Kulturüberständen der Monozyten mittels GC-MS bestimmt. Nachdem in Vorversuchen nur leichte Unterschiede in den Konzentrationen von Alanin, Glutamin und Glutamat zu erkennen waren (Daten nicht gezeigt), wurden in nachfolgenden Messungen nur die Konzentrationen dieser Aminosäuren berücksichtigt.

Es zeigte sich jedoch, dass auch die Konzentrationen dieser Aminosäuren in den Kulturüberständen weder durch LPS-Stimulation, noch durch Inkubation mit Milchsäure, entsprechender Ansäuerung oder Natriumlaktat verändert wurden (Abbildung 5-22).

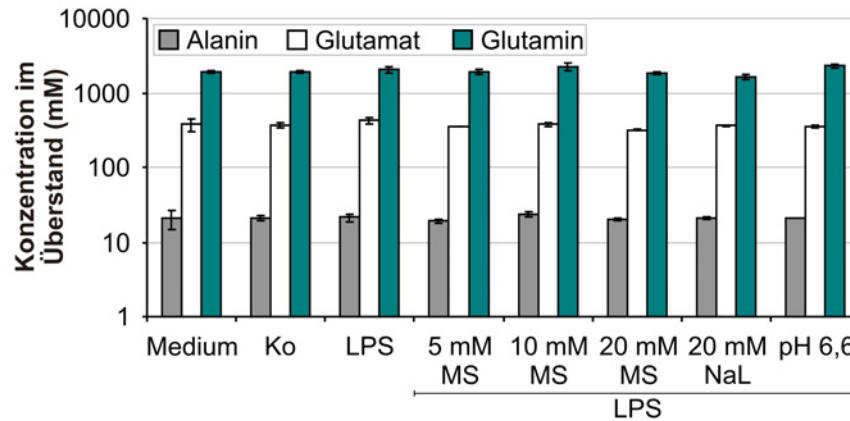


Abbildung 5-22: Einfluss von Milchsäure, Natriumlaktat und Ansäuerung auf die Aminosäurekonzentrationen in Kulturüberständen von Monozyten

Monozyten wurden für 18 Stunden mit 100 ng/ml LPS bzw. mit 100 ng/ml LPS in Kombination mit 5, 10, oder 20 mM Milchsäure (MS), 20 mM Natriumlaktat (NaL) oder Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 6,6 (entsprechend 20 mM MS) inkubiert. Als Kontrolle (Ko) wurden Monozyten ohne LPS kultiviert. Die Konzentrationen an Glutamin, Glutamat und Alanin in den Kulturüberständen sowie in Kulturmedium ohne Zellkontakt (Medium) wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) gemessen. Die Mittelwerte \pm SEM wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet.

5.2.2.2.4 Analyse des glykolytischen Flusses unter Einfluss von Milchsäure

Um zu untersuchen, ob sich Milchsäure auf den glykolytischen Fluss von Monozyten auswirkt, wurde glukosefreies Kulturmedium, versetzt mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glukose, verwendet. Monozyten wurden für 18 Stunden mit LPS in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen von Milchsäure, entsprechender Ansäuerung des Kulturmediums oder Natriumlaktat inkubiert. Des Weiteren wurden LPS-stimulierte Monozyten mit 2-Deoxyglukose kultiviert. Als Kontrolle dienten Monozyten ohne LPS-Stimulation. Anschließend wurden die Kulturüberstände und die Zellpellets durch Mitarbeiter des Instituts für Funktionelle Genomik mittels Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Dabei wurde die Konzentration von $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat, welches durch Abbau der $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glukose in der Glykolyse entsteht, gemessen. Darüber hinaus wurden die Konzentrationen der Isotope $[1,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat und $[3-^{13}\text{C}]$ Laktat, die durch den Fluss der $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glukose durch den Pentosephosphatweg und den anschließenden Abbau in der Glykolyse gebildet werden, bestimmt. Da nur ein sehr geringer Anteil (ca. 2 bis 5%) der durch die Monozyten produzierten Laktatisotope $[1,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat und $[3-^{13}\text{C}]$ Laktat waren (Daten nicht gezeigt), konzentrierten sich die Analysen auf $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat.

Extrazelluläre Laktatkonzentrationen

In Übereinstimmung mit vorhergehenden Ergebnissen (siehe 5.2.2.2) reicherte sich [2,3-¹³C₂]Laktat infolge der LPS-Stimulation der Monozyten stark im Kulturüberstand an (Abbildung 5-23A). Die Inkubation mit extrazellulärer Milchsäure resultierte in einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Menge an extrazellulärem [2,3-¹³C₂]Laktat. Auch Natriumlaktat reduzierte die Menge an extrazellulärem [2,3-¹³C₂]Laktat leicht.

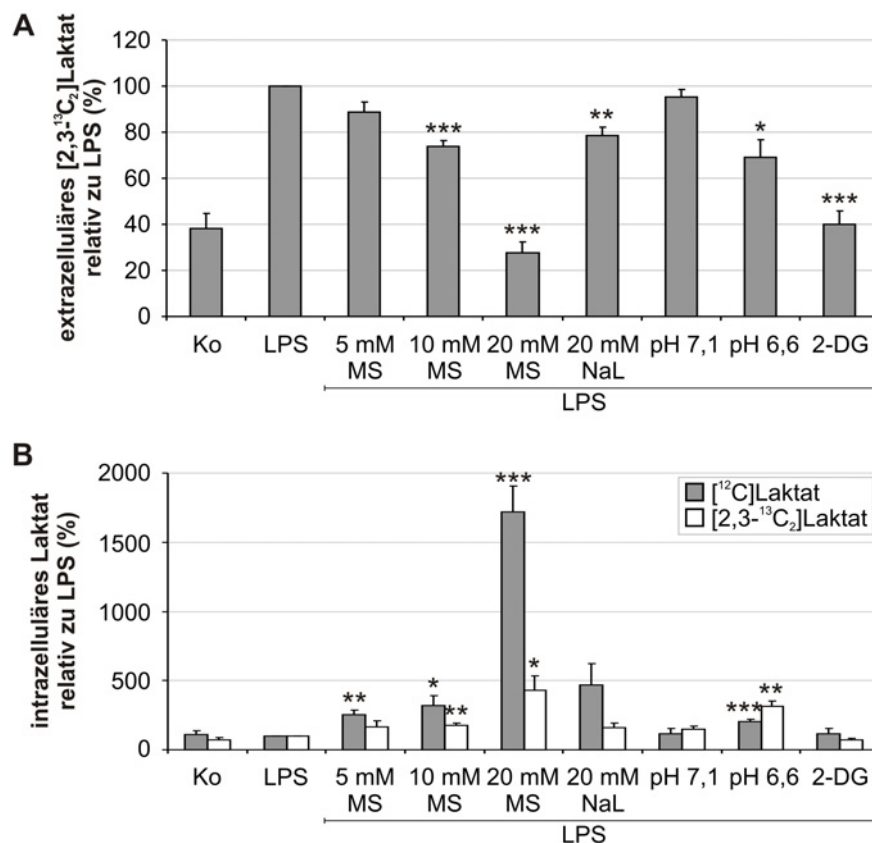


Abbildung 5-23: Einfluss von Milchsäure, Natriumlaktat, Ansäuerung und 2-Deoxyglukose auf den glykolytischen Fluss von LPS-stimulierten Monozyten

Zur Analyse des glykolytischen Flusses wurde glukosefreies Kulturmedium, welches mit 2 g/l [1,2-¹³C₂]Glukose versetzt wurde, verwendet. Frisch isolierte Monozyten wurden für 18 Stunden nur mit 100 ng/ml LPS bzw. mit LPS in Kombination mit 5, 10 oder 20 mM Milchsäure (MS), entsprechender Ansäuerung des Kulturmediums (pH 7,1 entsprechend 10 mM MS; pH 6,6 entsprechend 20 mM MS), oder 20 mM Natriumlaktat (NaL) inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit 10 mM 2-Deoxyglukose (2-DG), einem Inhibitor der Hexokinase, kultiviert. Als Kontrolle (Ko) wurden Monozyten ohne LPS-Stimulation inkubiert. Die extrazellulären Konzentrationen an [2,3-¹³C₂]Laktat (**A**) sowie die intrazellulären Konzentrationen an [2,3-¹³C₂]Laktat und [¹²C]Laktat (**B**) wurden mittels Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) gemessen. Anschließend wurden die prozentualen Konzentrationsunterschiede relativ zur jeweiligen LPS-Kontrolle errechnet. Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, relativ zur jeweiligen LPS-Kontrolle. Abbildung veröffentlicht in [231].

Die Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 7,1 hatte keinen Einfluss auf das extrazelluläre $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat. Im Gegensatz dazu verursachte die Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 6,6 eine Abnahme des extrazellulären $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktats. Der Effekt bei Inkubation mit pH 6,6 war jedoch deutlich schwächer als der Effekt bei Inkubation mit 20 mM Milchsäure. Die Zugabe von 2-Deoxyglukose führte ebenfalls zu einer verminderten Konzentration an extrazellulärem $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat.

Die Ergebnisse der Analyse der extrazellulären $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktatkonzentrationen sowie die Ergebnisse der Glukoseaufnahme (siehe 5.2.2.2.3) zeigen, dass Milchsäure bereits ab einer Konzentration von 10 mM den glykolytischen Fluss der Monozyten deutlich reduzierte. Bei Inkubation der Zellen in Kulturmedium mit pH 6,6 oder 20 mM Natriumlaktat wurde der glykolytische Fluss dagegen weniger stark beeinträchtigt.

Intrazelluläre Laktatkonzentrationen

Neben den extrazellulären $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktatkonzentrationen wurden auch die intrazellulären Konzentrationen an $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat sowie unmarkiertem $[^{12}\text{C}]$ Laktat quantifiziert (Abbildung 5-23B). Verglichen mit den extrazellulären $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktatkonzentrationen wurden intrazellulär ca. 1000-fach geringere Laktatkonzentrationen detektiert.

Im Gegensatz zur extrazellulären $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktatkonzentration wurde keine Zunahme der Menge an intrazellulärem $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat nach Inkubation mit LPS beobachtet. Die Inkubation mit Milchsäure resultierte in einer konzentrationsabhängigen Zunahme an intrazellulärem $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat und $[^{12}\text{C}]$ Laktat. Die Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 7,1 hatte kaum Einfluss auf die intrazellulären Laktatkonzentrationen. Im Gegensatz dazu wurde bei pH 6,6 eine signifikante Zunahme der intrazellulären Konzentrationen an $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat und $[^{12}\text{C}]$ Laktat detektiert. Durch Natriumlaktat wurden die intrazellulären Konzentrationen an $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat und $[^{12}\text{C}]$ Laktat leicht erhöht. Die Konzentration an intrazellulärem $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat wurde durch 2-Deoxyglukose nicht verändert.

Weiterhin wurde mittels LC-MS/MS untersucht, ob intrazellulär neben $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Laktat auch andere Stoffwechselprodukte mit ^{13}C -Markierung auftreten. Obwohl sehr geringe Mengen an $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvat, dem gemeinsamen glykolytischen Ausgangsprodukt für die Synthese von Laktat und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA), nachgewiesen wurden, wurden keine Intermediate des Citratzyklus mit ^{13}C -Markierung detektiert. Es wurden keine Unterschiede der intrazellulären $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Pyruvatkonzentrationen nach Inkubation mit LPS oder LPS in Kombination mit Milchsäure oder entsprechender Ansäuerung festgestellt (Daten nicht gezeigt).

5.2.2.2.5 Effekt von Milchsäure auf den Sauerstoff- und Energiehaushalt

Des Weiteren wurde untersucht, ob Milchsäure neben der Glykolyse auch die oxidative Phosphorylierung beeinflusst. Dazu wurde der Sauerstoffgehalt des Kulturmediums von Monozyten nach LPS-Stimulation in An- und Abwesenheit von Milchsäure, Natriumlaktat und Ansäuerung während einer Inkubation von 16 Stunden analysiert. Als Kontrolle wurde der Sauerstoffgehalt von Kulturmedium ohne Zellkontakt sowie von unstimulierten Monozyten gemessen. Von dem im Kulturüberstand resultierenden Sauerstoffgehalt wurde auf den Sauerstoffverbrauch der Monozyten geschlossen.

Im Vergleich zu unstimulierten Zellen führte die LPS-Stimulation der Monozyten nach sechs bis sieben Stunden zu einer Abnahme des Sauerstoffverbrauchs (Abbildung 5-24). Der Sauerstoffverbrauch der mit LPS und 20 mM Milchsäure inkubierten Zellen stieg während der ersten zwei bis drei Stunden stark an, wurde anschließend schwächer und erreichte schließlich ein ähnliches Niveau wie der Verbrauch der LPS-stimulierten Monozyten.

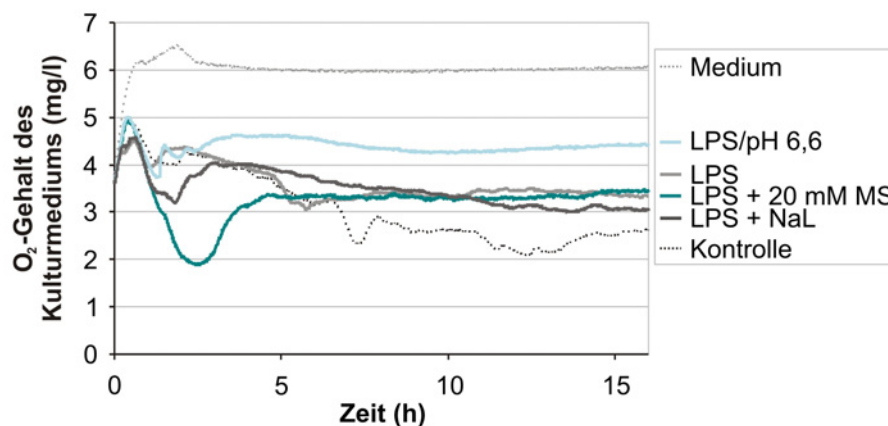


Abbildung 5-24: Sauerstoffgehalt des Kulturmediums von Monozyten während der Aktivierung mit LPS

Zur Analyse des Sauerstoffgehalts von Monozytenkulturen wurden Kulturplatten mit integrierten Sauerstoffsensoren verwendet. Die Monozyten wurden für 16 Stunden ohne (Kontrolle) bzw. mit 100 ng/ml LPS inkubiert. Weiterhin wurden Monozyten mit LPS in Kombination mit 20 mM Milchsäure (MS), 20 mM Natriumlaktat (NaL) bzw. in Kulturmedium mit pH 6,6 (entsprechend 20 mM MS) kultiviert. Außerdem wurde der Sauerstoffgehalt von Medium ohne Zellkontakt gemessen. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives aus vier unabhängigen Experimenten.

Eine leichte Zunahme des Sauerstoffverbrauchs fand auch bei Inkubation der Zellen mit LPS in Kombination mit Natriumlaktat sowie bei Inkubation mit LPS zusammen mit 10 mM Milchsäure (Daten nicht gezeigt) statt. Im Gegensatz dazu wurde bei Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 6,6 ab einer Inkubationszeit von ca. drei Stunden ein deutlich reduzierter Sauerstoffverbrauch gemessen.

Diese Ergebnisse implizieren, dass in der frühen Inkubationsphase LPS-aktivierter Monozyten der durch Milchsäure verursachte Energieverlust aufgrund der Inhibition des glykolytischen Flusses über eine gesteigerte Respiration ausgeglichen wird. Die Ansäuerung des Kulturmediums, welche den glykolytischen Fluss der Monozyten ebenfalls beeinträchtigte, hatte interessanterweise gegenteilige Effekte.

Zusätzlich zur Analyse des Sauerstoffverbrauchs wurde die Menge an intrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP) nach Inkubation mit Milchsäure gemessen. Hierfür wurden Monozyten für 18 Stunden mit LPS oder mit LPS in Kombination mit Milchsäure, entsprechender Ansäuerung oder Natriumlaktat inkubiert. Anschließend wurde der ATP-Gehalt der Zellen mit Hilfe eines Luciferase-basierten Tests ermittelt.

Die ATP-Mengen in unstimulierten und stimulierten Monozyten variierten nicht signifikant (Abbildung 5-25). Verglichen mit den LPS-stimulierten Monozyten lag aber eine signifikante Abnahme der intrazellulären ATP-Menge nach Inkubation mit 20 mM Milchsäure, entsprechender Ansäuerung sowie nach Inkubation mit 20 mM Natriumlaktat vor.

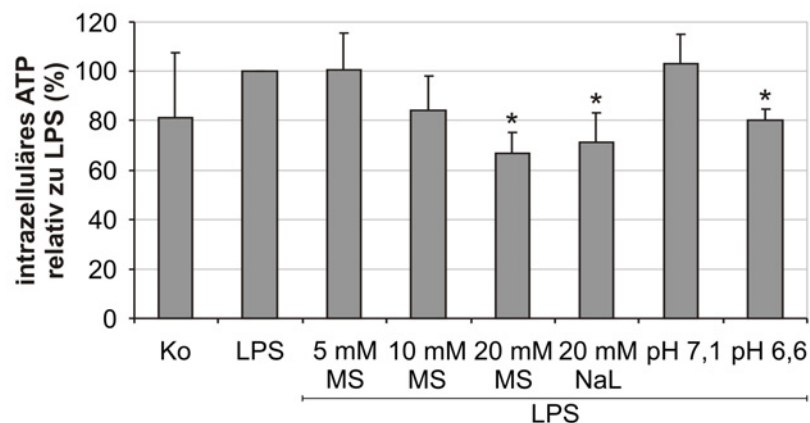


Abbildung 5-25: Einfluss von Milchsäure, Ansäuerung und Natriumlaktat auf den intrazellulären ATP-Gehalt LPS-stimulierter Monozyten

Zur Bestimmung intrazellulärer ATP-Konzentrationen wurden frisch isolierte Monozyten für 18 Stunden mit 100 ng/ml LPS bzw. mit LPS in Kombination mit 5, 10, 20 mM Milchsäure (MS) oder 20 mM Natriumlaktat (NaL) inkubiert. Außerdem wurden LPS-stimulierte Monozyten in Kulturmedium mit pH-Wert 7,1 (entsprechend 10 mM MS) oder 6,6 (entsprechend 20 mM MS) kultiviert. Als Kontrolle (Ko) wurden Monozyten ohne LPS-Stimulation in Kultur inkubiert. Die intrazellulären ATP-Mengen wurden anschließend mit Hilfe eines Luciferase-basierten Tests in den Zelllysaten gemessen und in Relation zur LPS-Kontrolle gesetzt. Die Daten sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, relativ zur LPS-Kontrolle. Abbildung veröffentlicht in [231].

Tabelle 5-1 beinhaltet eine Zusammenfassung der präsentierten Daten zur Suppression der LPS-stimulierten Funktionen und des Glukosemetabolismus durch 20 mM Milchsäure, die entsprechende Ansäuerung und 20 mM Natriumlaktat. Die Tabelle zeigt, dass (mit Ausnahme des intrazellulären ATP-Gehalts) alle untersuchten Parameter stärker durch Milchsäure als durch die entsprechende Ansäuerung oder Natriumlaktat beeinflusst wurden.

Tabelle 5-1: Zusammenfassung der Daten zur Suppression durch 20 mM Milchsäure (MS), die entsprechende Ansäuerung (pH 6,6) oder 20 mM Natriumlaktat (NaL)

untersuchter Parameter	20 mM MS	pH 6,6	20 mM NaL
TNF im Kulturüberstand ^a	***	*	n.s.
IL-6 im Kulturüberstand ^b	**	n.s.	n.s.
Glukoseaufnahme ^c	**	*	n.s.
extrazelluläres [2,3- ¹³ C ₂]Laktat ^d	***	*	**
Sauerstoffverbrauch ^e	0-4 h ↑↑/ 4-16 h ↔	0-3 h ↔/3-16 h ↓	0-3 h ↑/ 3-16 h ↔
intrazelluläres ATP ^e	*	*	*

Die Daten beziehen sich auf: ^aKapitel 5.2.1.1.3; ^bKapitel 5.2.1.1.1 und 5.2.1.1.3; ^cKapitel 5.2.2.2.3; ^dKapitel 5.2.2.2.4; ^eKapitel 5.2.2.2.5 (↓: geringerer, ↔: vergleichbarer, ↑: höherer Sauerstoffverbrauch als bei Inkubation mit LPS); n.s.: nicht signifikant; *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, relativ zur jeweiligen LPS-Kontrolle.

5.2.2.2.6 Einfluss von Inhibitoren von Glykolyse und Energiestoffwechsel auf die TNF-Sekretion

Im Rahmen der Untersuchungen des Glukosestoffwechsels wurde außerdem der Frage nachgegangen, ob sich eine Inhibition der Glykolyse oder der oxidativen Phosphorylierung auf die TNF-Sekretion von Monozyten auswirkt. Hierzu erfolgte eine Inkubation von Monozyten mit 2-Deoxyglukose, welche durch kompetitive Hemmung der Hexokinase zu einer Inhibition der Glykolyse führt [261]. Alternativ wurden Monozyten mit Rotenon, welches durch Unterbrechung des Elektronenflusses von NADH auf Ubiquinon als Inhibitor der oxidativen Phosphorylierung wirkt [262], inkubiert. Erwartungsgemäß führte

Rotenon zu einer starken Abnahme des Sauerstoffverbrauchs von LPS-stimulierten Monozyten (Abbildung 5-26A).

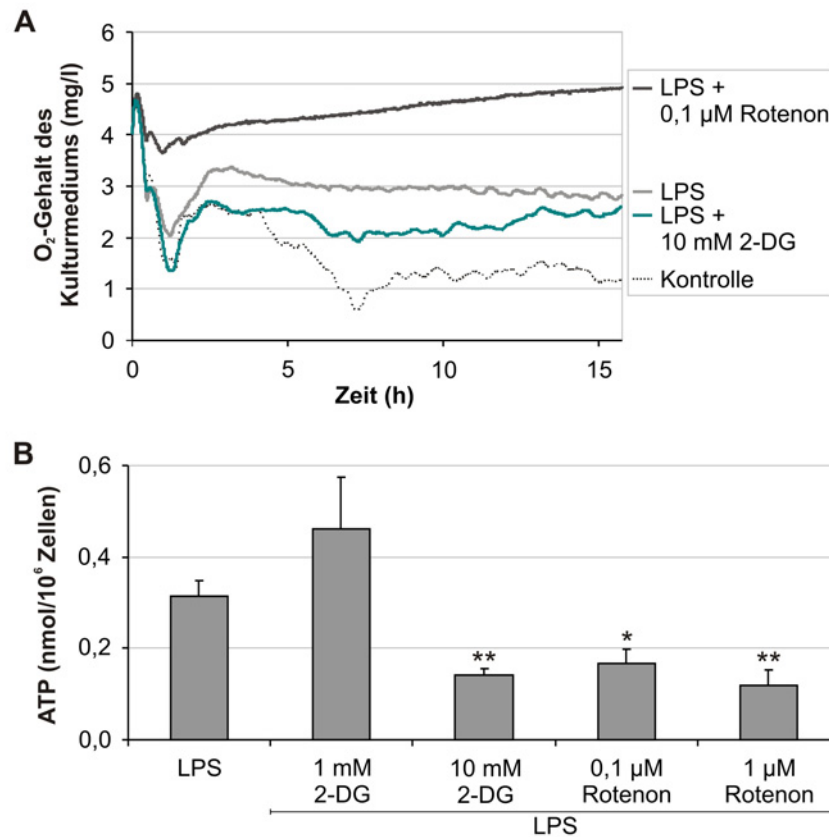


Abbildung 5-26: Atmung sowie ATP-Produktion von Monozyten bei Inhibition von Glykolyse oder Atmung

(A) Zur Analyse des Sauerstoffgehalts von Monozytenkulturen wurden Kulturplatten mit integrierten Sauerstoffsensoren verwendet. Die Monozyten wurden für 16 Stunden ohne bzw. mit 100 ng/ml LPS inkubiert. Weiterhin wurden Monozyten mit LPS in Kombination mit 0,1 µM Rotenon, einem Inhibitor der oxidativen Phosphorylierung sowie mit LPS in Kombination mit 10 mM 2-Deoxyglukose (2-DG), einem Inhibitor der Glykolyse, kultiviert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives aus vier unabhängigen Experimenten. (B) Frisch isolierte Monozyten wurden mit 100 ng/ml LPS bzw. mit LPS in Kombination mit 1 oder 10 mM 2-DG bzw. 0,1 oder 1 µM Rotenon inkubiert. Als Kontrolle wurden Monozyten ohne LPS-Stimulation kultiviert. Nach 18 Stunden wurden die intrazellulären ATP-Mengen mit Hilfe eines Luciferase-basierten Tests in den Zelllysaten gemessen. Die Daten sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: *P<0,05, **P<0,01, relativ zu LPS.

Im Gegensatz dazu zeigten Monozyten bei Inkubation mit LPS und gleichzeitiger Inhibition der Glykolyse mit 2-Deoxyglukose eine verstärkte Atmung.

Darüber hinaus wurde der Einfluss der beiden Inhibitoren auf den Energiezustand der Zellen untersucht. Die nach 18-stündiger Inkubation gemessenen ATP-Mengen LPS-stimulierter Monozyten waren sowohl durch 2-Deoxyglukose, als auch durch Rotenon deutlich reduziert (Abbildung 5-26B).

Um den Effekt einer verminderten Glykolyse oder oxidativen Phosphorylierung auf die TNF-Sekretion von Monozyten zu untersuchen, wurden die Zellen mit LPS in Kombination mit 2-Deoxyglukose oder Rotenon inkubiert. Als Kontrolle wurden Monozyten ohne LPS-Stimulation kultiviert.

Wie in Abbildung 5-27 zu sehen, hatte eine Inhibition der Atmung durch Rotenon einen nicht signifikanten Effekt auf die TNF-Sekretion der Monozyten. Infolge der Inhibition der Glykolyse durch 2-Deoxyglukose wurde die Sekretion von TNF dagegen konzentrationsabhängig und signifikant reduziert.

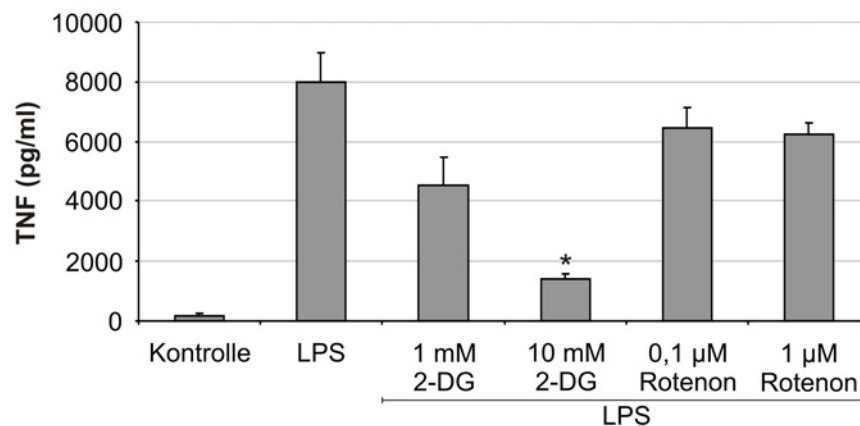


Abbildung 5-27: TNF-Sekretion von Monozyten bei Inkubation mit 2-Deoxyglukose und Rotenon

Frisch isolierte Monozyten wurden mit 100 ng/ml LPS alleine bzw. in Kombination mit 1 oder 10 mM 2-Deoxyglukose (2-DG) sowie 0,1 oder 1 µM Rotenon inkubiert. Zur Kontrolle wurden Monozyten ohne LPS-Stimulation kultiviert. Nach 18 bis 20 Stunden wurden die Kulturüberstände abgenommen und die darin enthaltenen TNF-Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, relativ zu LPS. Abbildung veröffentlicht in [231].

5.2.2.3 Globale Analyse mittels RNA-Expressionsarray – Modulation der LPS-Antwort durch Milchsäure

Um den Einfluss der Milchsäure auf Monozyten weiter zu untersuchen, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michael Rehli (Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie, Universitätsklinikum Regensburg) eine globale Analyse der RNA-Expression mittels RNA-Expressionsarrays durchgeführt.

5.2.2.3.1 Effekte von Milchsäure auf die LPS-induzierte Genexpression

Da die Analyse der Wirkung von Milchsäure auf Monozyten vor dem Hintergrund eines inflammatorischen Milieus, das in vielen Tumoren zu finden ist [101], stattfand, erfolgte auch die Untersuchung der Genexpression unter inflammatorischen Bedingungen. Hierzu wurden frisch isolierte Monozyten nur mit LPS bzw. mit LPS in Kombination mit Milchsäure, Natriumlaktat oder entsprechender Ansäuerung sowohl für eine, als auch für vier Stunden inkubiert. Als Kontrollen dienten frisch isolierte Monozyten ohne Inkubation bzw. für eine oder vier Stunden ohne LPS-Stimulation inkubierte Monozyten. Unmittelbar nach der Aufreinigung der Monozyten aus dem Blut sowie nach Ablauf der verschiedenen Inkubationszeiten, wurde RNA aus den Zellen isoliert und nach Fluoreszenzmarkierung auf RNA-Expressionsarrays hybridisiert (siehe 4.3.4). Die erhaltenen Rohdaten wurden anschließend, wie in Kapitel 4.3.4.3 erläutert, ausgewertet. Bei der Auswertung der RNA-Expressionsarrays wurde deutlich, dass Milchsäure überwiegend negative Effekte auf die LPS-induzierte Genexpression hat. Der stärkste Einfluss der Milchsäure auf die Genexpression lag dabei nach der einstündigen Inkubationsphase vor. Weiterhin zeigte sich, dass viele der durch Milchsäure beeinflussten Gene auch durch alleinige Ansäuerung beeinflusst wurden (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund konzentrierte sich die Auswertung der Array-Daten auf die Suche nach Genen, die nach einer einstündigen Inkubation einen mindestens zweifachen Unterschied in der Expression zwischen den ohne und den mit LPS inkubierten Zellen zeigten. Da vor allem Effekte der Milchsäure und nicht Effekte der Ansäuerung interessierten, wurde als weiteres Suchkriterium ein ebenfalls mindestens zweifacher Unterschied in der Expression der für eine Stunde mit 20 mM Milchsäure und der mit entsprechender Ansäuerung inkubierten Zellen angelegt. Im Rahmen dieser Suche wurden 193 Gene gefunden und unsupervidiert hierarchisch geclustert (Abbildung 5-28). Eine Liste dieser Gene mit ausgeschriebenen Gennamen befindet sich im Anhang dieser Arbeit (siehe Tabelle 9-1).

Erwartungsgemäß zeigten die in der hierarchischen Clusteranalyse enthaltenen Gene eine nach einer Stunde durch LPS induzierte Expression. Bei Inkubation mit LPS in Kombination mit 20 mM Milchsäure war bei einem Großteil der durch LPS-induzierten Gene nach einer Stunde eine deutlich geringere Genexpression zu finden. Dabei zeigte die Genexpression dieser Zellen eine größere Ähnlichkeit zu dem Niveau der ohne LPS inkubierten bzw. nicht inkubierten Zellen.

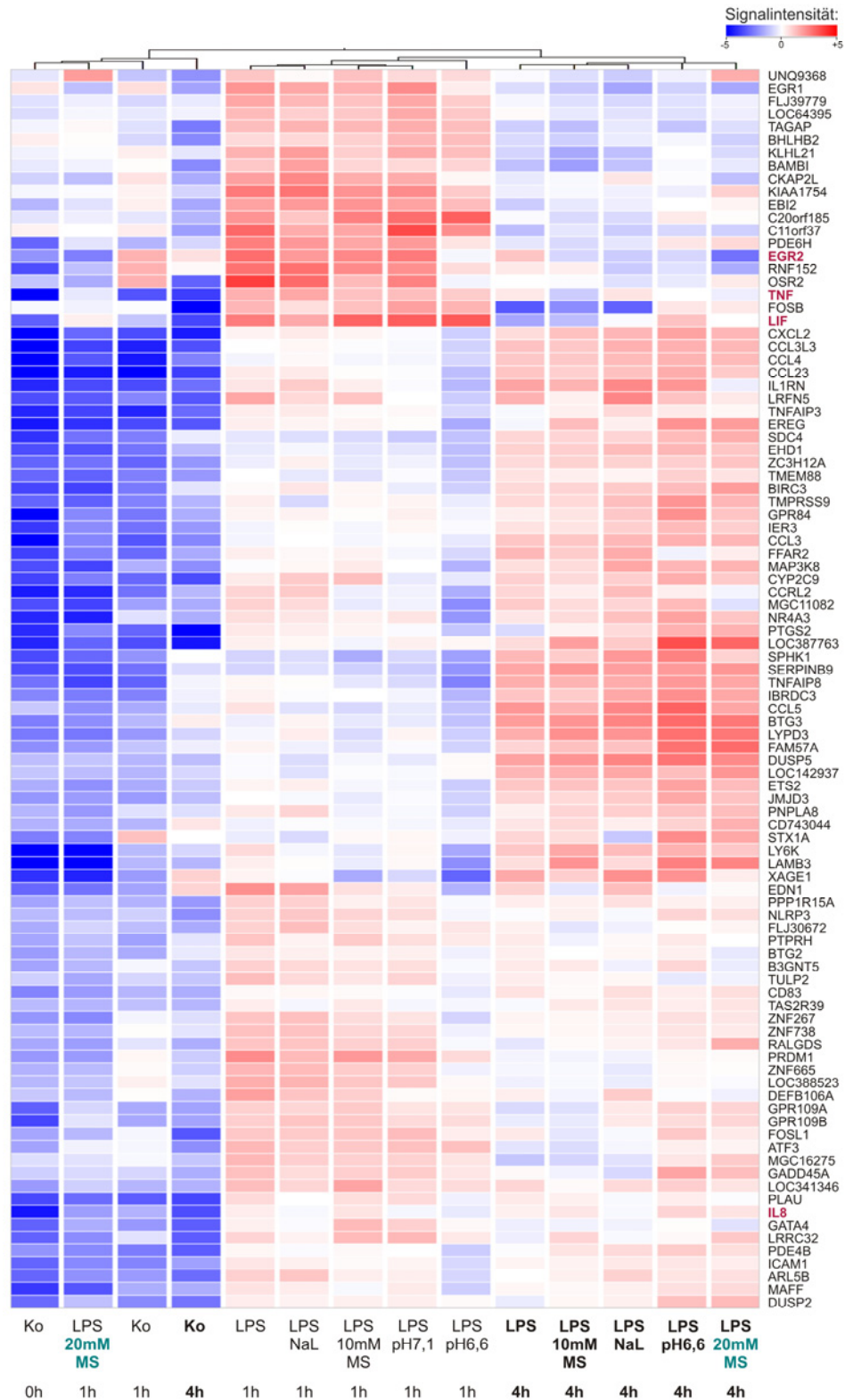
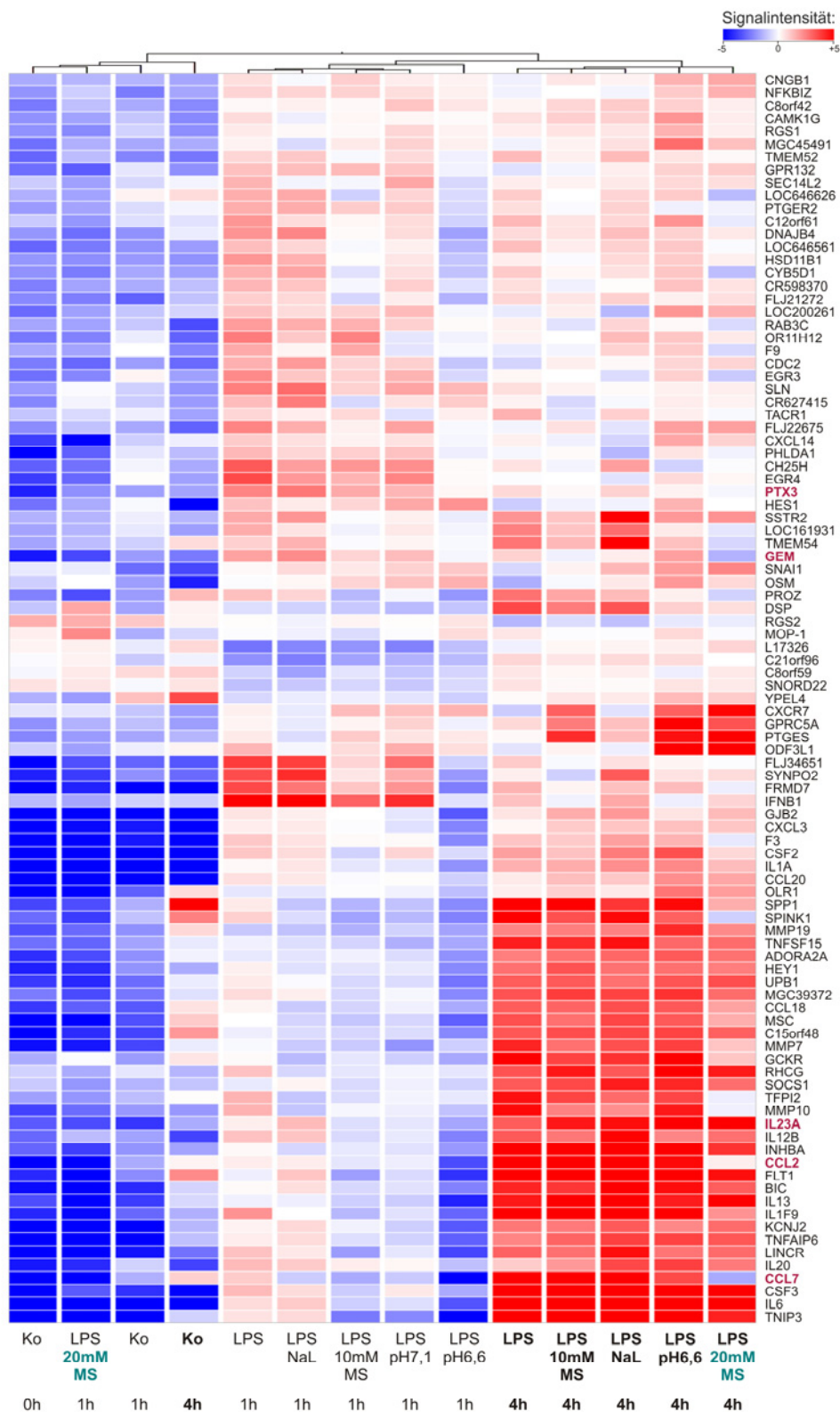


Abbildung 5-28: Hierarchische Clusteranalyse der durch LPS und Milchsäure beeinflussten Gene

Frisch isolierte Monozyten wurden für eine und vier Stunden mit 100 ng/ml LPS, 10 bzw. 20 mM Milchsäure (MS), Ansäuerung (pH 7,1 (eine Stunde); pH 6,6) oder 20 mM Natriumlaktat (NaL) inkubiert. Als Kontrolle (Ko) dienten frisch isolierte (0h) sowie für eine bzw. vier Stunden inkubierte Monozyten. Die Farben stehen für mindestens fünffache Herunter- (dunkelblau) oder Hochregulation (dunkelrot) der Genexpression. Der Baum zeigt Ähnlichkeiten in der Genexpression der unterschiedlichen Ansätze. Die in der rechten Spalte rot markierten Gene wurden per RT-qPCR verifiziert. Die Daten wurden aus vier unabhängigen Spendern (zweimal je eine Stunde, zweimal je 4 Stunden) gewonnen. Fortsetzung der Abbildung siehe nächste Seite.



Fortsetzung von Abbildung 5-28 (Seite 94)

Dies spiegelt sich auch in der Position wider, die die mit LPS und 20 mM Milchsäure behandelte Probe innerhalb des in Abbildung 5-28A/B gezeigten „Ähnlichkeitsbaumes“ einnimmt: Die mit 20 mM Milchsäure und LPS behandelte Probe zeigt große Ähnlichkeit zu den Proben, die nicht mit LPS behandelt bzw. nicht inkubiert wurden. Auch nach einer einstündigen Inkubation mit LPS bei pH 6,6 war bei einem Teil der LPS-induzierten Gene keine Induktion der Genexpression festzustellen. Verglichen mit den mit 20 mM Milchsäure inkubierten Zellen lag der Effekt jedoch bei einer deutlich geringeren Zahl von Genen vor und war schwächer ausgeprägt. Im Gegensatz dazu war bei einstündiger Inkubation mit LPS und 10 mM Milchsäure, Kulturmedium mit pH 7,1 oder Natriumlaktat kein wesentlicher Unterschied zu den nur mit LPS inkubierten Monozyten erkennbar.

Nach vier Stunden zeigten die mit LPS inkubierten Zellen im Vergleich zur Genexpression nach einer Stunde eine teils reduzierte, induzierte oder unveränderte Expression. Bei den für vier Stunden mit LPS und 20 mM Milchsäure inkubierten Monozyten war der überwiegend negative Einfluss der Milchsäure auf die Genexpression nicht mehr vorhanden. Ein großer Teil der Gene zeigte nun eine ähnliche Expression wie nach vierstündiger Inkubation mit LPS. Teilweise war im Vergleich zur Inkubation mit LPS noch immer eine reduzierte, bei manchen Genen auch eine verstärkte Expression festzustellen. Auch die nach einer Stunde aufgetretenen Effekte der Ansäuerung waren nach vier Stunden meist nicht mehr erkennbar. Dies zeigt, dass es sich bei dem negativen Effekt der Milchsäure (und der entsprechenden Ansäuerung) auf die LPS-induzierte Genexpression überwiegend um einen transienten Effekt handelte, der die LPS-Induktion nicht ausschaltet, sondern verzögert. Wie in Kapitel 5.2.2.3.3 gezeigt, wurden aber auch länger anhaltende Effekte der Milchsäure gefunden.

5.2.2.3.2 „Gene Ontology“-Analyse der regulierten Gene

Die Datenbank „Gene Ontology“ (www.geneontology.org) bietet ein standardisiertes Vokabular zur Beschreibung der Funktion von Genprodukten im zellulären Kontext (sogenannte „Gene Ontology“ (GO)-Begriffe). Um zu analysieren, welche zellulären Funktionen von Monozyten stark durch Milchsäure beeinflusst werden, wurde nach einer signifikanten Anreicherung von GO-Begriffen innerhalb der in der Clusteranalyse enthaltenen Gene gesucht (siehe auch 4.3.4.3). Tabelle 5-2 zeigt einige dieser signifikant angereichertern GO-Begriffe. Die vollständige Liste der (teils redundanten) GO-Begriffe mit den zugehörigen Definitionen befindet sich im Anhang dieser Arbeit (siehe Tabelle 9-2).

Tabelle 5-2: Signifikant angereicherte „Gene Ontology“-Begriffe

"Gene Ontology" (GO)-Begriff	korrigierter P-Wert ^{f, g}	Häufigkeit des GO-Begriffs innerhalb der Clusteranalyse	Häufigkeit des GO-Begriffs innerhalb aller Gene auf dem Array
Extrazellularraum	$9,96 \times 10^{-12}$	35	468
Zytokinaktivität	$1,21 \times 10^{-11}$	24	152
Reaktion auf Verwundung	$3,98 \times 10^{-09}$	28	362
Immunantwort	$1,04 \times 10^{-07}$	26	520
Stressantwort	$2,48 \times 10^{-06}$	33	1086
Rezeptorbindung	$4,83 \times 10^{-05}$	24	668
Chemokinaktivität	$8,64 \times 10^{-05}$	12	44
Regulation eines biologischen Prozesses	$3,72 \times 10^{-03}$	61	6327
programmierter Zelltod	$4,52 \times 10^{-03}$	11	374
Regulation der Zellkommunikation	$9,00 \times 10^{-03}$	1	252
Proteinbindung	$9,13 \times 10^{-03}$	61	6156
Regulation der biologischen Qualität	$1,40 \times 10^{-02}$	11	836
Reaktion auf virale Stimulation	$1,85 \times 10^{-02}$	6	76
vaskuläre Entwicklung	$2,06 \times 10^{-02}$	2	112
Regulation eines zellulären Prozesses	$2,86 \times 10^{-02}$	61	5843

^fBenjamini-Yekutieli-Korrektur (siehe 4.3.4.3); ^g* $P < 5 \times 10^{-2}$, ** $P < 1 \times 10^{-2}$, *** $P < 1 \times 10^{-3}$

5.2.2.3.3 Beispiele durch Milchsäure beeinflusster Gene

Wie bereits erwähnt, waren in der hierarchischen Gruppierung viele Gene zu finden, deren Expression nur innerhalb einer einstündigen Inkubation durch Milchsäure beeinflusst wurde. Darüber hinaus gab es aber vereinzelt auch Gene, deren Expression im Vergleich zur Inkubation mit LPS auch noch nach vier Stunden betroffen war. Aus diesem Grund wurden verschiedene Gene aus beiden Bereichen mittels RT-qPCR genauer analysiert. Dazu wurde RNA aus frisch isolierten Monozyten isoliert. Darüber hinaus wurden Monozyten, die für 1, 2, 3, 4 oder 17 Stunden ohne und mit LPS bzw. mit

LPS und 10 oder 20 mM Milchsäure, entsprechender Ansäuerung oder 20 mM Natriumlaktat inkubiert worden waren, verwendet.

Da auch mittels RT-qPCR meist kein Effekt von 10 mM Milchsäure, entsprechender Ansäuerung oder von 20 mM Natriumlaktat auf die Genexpression festzustellen war, sind in den folgenden Abbildungen nur die Daten für 20 mM Milchsäure und die entsprechende Ansäuerung gezeigt.

RT-qPCR-Analyse von kurzzeitig/transient durch Milchsäure beeinflussten Genen

Dem Ergebnis der Expressionsarrays zufolge wurde die *TNF*-Expression nach einer und vier Stunden durch Milchsäure reduziert (Abbildung 5-28). Die RT-qPCR-Analyse zeigte, dass die LPS-induzierte *TNF*-mRNA-Expression ihr Maximum nach ca. zwei Stunden erreichte und dann schwächer wurde (Abbildung 5-29A). Bereits nach ca. zwei Stunden hatte die *TNF*-Expression in Gegenwart von Milchsäure oder Ansäuerung das Niveau der LPS-stimulierten *TNF*-Expression erreicht. Im Gegensatz zur Arrayanalyse konnte eine reduzierte *TNF*-Expression nach vierstündiger Inkubation mit LPS und 10 oder 20 mM Milchsäure im Rahmen der RT-qPCR-Analyse nicht festgestellt werden (Daten für LPS und 10 mM Milchsäure nicht gezeigt). Nach 17 Stunden wurde eine schwach signifikante Inhibition der LPS-stimulierten *TNF*-mRNA-Expression detektiert ($P=0,049$). Somit wurde nicht nur die *TNF*-Sekretion (siehe 5.2.1.1.5), sondern auch die *TNF*-mRNA-Expression in einer frühen Inkubationsphase durch Milchsäure beeinflusst. Im Gegensatz zur *TNF*-Sekretion wurde auf mRNA-Ebene nur ein schwach negativer Effekt der Ansäuerung beobachtet.

In Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Arrayanalyse (Abbildung 5-28) wurde die *IL-8*-Expression innerhalb der ersten Stunde der Inkubation nur leicht durch LPS stimuliert (Abbildung 5-29B). Milchsäure inhibierte die Expression stärker als die entsprechende Ansäuerung. Der Zeitverlauf der *IL-8*-mRNA-Expression zeigt, dass dieser negative Effekt der Milchsäure bereits nach einer weiteren Stunde verschwunden war. Das Niveau der LPS-stimulierten *IL-8*-mRNA-Expression veränderte sich bis zu einer Inkubation von 17 Stunden kaum. Nach einer drei- bis vierstündigen Inkubationszeit war ein positiver Einfluss der Ansäuerung auf die LPS-stimulierte *IL-8*-mRNA-Expression detektierbar.

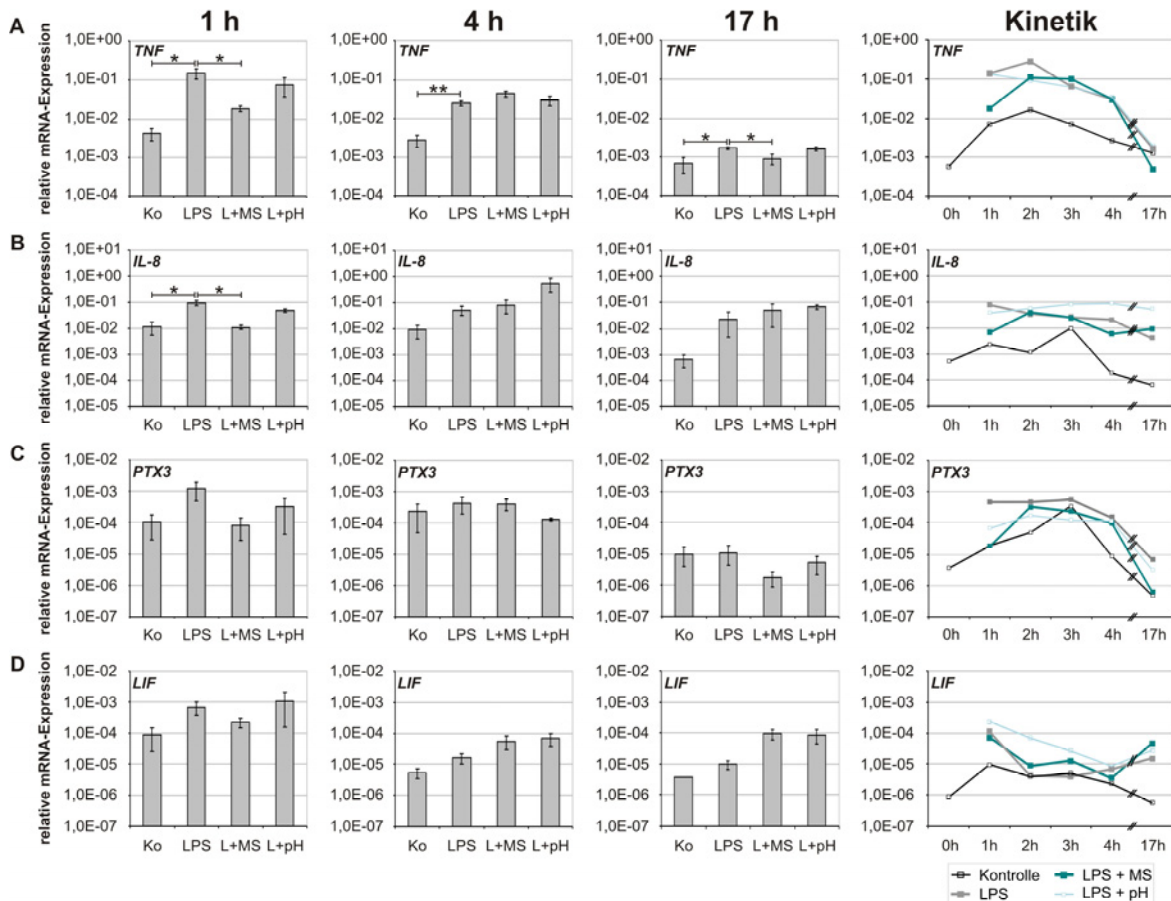


Abbildung 5-29: Kurzzeitiger Einfluss von Milchsäure auf die mRNA-Expression

Frisch isolierte Monozyten wurden für 1, 2, 3, 4 und 17 Stunden mit 100 ng/ml LPS in An- oder Abwesenheit von 20 mM Milchsäure (MS) inkubiert. Außerdem wurden Monozyten mit LPS in Kulturmedium mit pH 6,6 (pH) (entsprechend 20 mM MS) kultiviert. Als Kontrollen dienten frisch isolierte Monozyten (0 h) bzw. Monozyten, die für 1, 2, 3, 4 oder 17 Stunden ohne LPS inkubiert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA der Zellen isoliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression von *TNF* (A), *IL-8* (B), *PTX3* (C) und *LIF* (D) relativ zur *18S*-rRNA-Expression mittels RT-qPCR bestimmt. Gezeigt sind die aus drei unabhängigen Experimenten (*LIF* 17 h-Kontrolle: 2 Werte) gemittelten Expressionen (\pm SEM) nach 1, 4 und 17 Stunden sowie je eine repräsentative Kinetik. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, LPS relativ zur Kontrolle (Ko), LPS mit MS (L + MS) relativ zu LPS.

Ein Gen, das vor allem durch Milchsäure und weniger durch entsprechende Ansäuerung beeinflusst zu sein schien, war das für das lange Pentraxin 3 kodierende Gen *PTX3*. *PTX3* wird unter anderem von Monozyten als Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus hin produziert und dient der lokalen Amplifikation einer Entzündungsantwort [263]. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Expressionsarrays (Abbildung 5-28) zeigte die RT-qPCR-Analyse, dass die mRNA-Expression von *PTX3* nach einer Stunde in Gegenwart von LPS deutlich induziert war (Abbildung 5-29C). Zum selben Zeitpunkt beeinträchtigte Milchsäure die *PTX3*-Expression stärker als die entsprechende Ansäuerung. Nach vier Stunden konnte kein Einfluss der Milchsäure auf die mRNA-Expression von *PTX3* festgestellt werden. Die Ansäuerung beeinflusste die *PTX3*-mRNA-

Expression jedoch leicht. Nachdem die LPS-induzierte Expression nach 17 Stunden stark abgenommen hatte, hatte Milchsäure interessanterweise erneut eine negative Wirkung auf die mRNA-Expression von *PTX3*.

Die mRNA-Expression des Gens *LIF*, welches für das inflammatorische Zytokin Leukämie inhibitorischer Faktor kodiert [264], wurde in Übereinstimmung mit den Array-Daten (Abbildung 5-28) auch bei der RT-qPCR-Analyse durch 20 mM Milchsäure nach einer Stunde leicht reduziert (Abbildung 5-29D). Die entsprechende Ansäuerung hatte dagegen einen positiven Effekt. Im gesamten weiteren Verlauf der Kultur war ein positiver Einfluss von Milchsäure und entsprechender Ansäuerung auf die *LIF*-Expression festzustellen. Im Gegensatz zu den Array-Daten wurde kein Effekt von Natriumlaktat auf die Expression beobachtet (Daten nicht gezeigt).

RT-qPCR-Analyse von längerfristig/stabil durch Milchsäure beeinflussten Genen

Die Array-Daten zeigten, dass Milchsäure einen länger anhaltenden Effekt auf die Expression der Gene *CCL2* und *CCL7*, die für Chemokin (CC-Typ) Ligand 2 (*CCL2*) und *CCL7* kodieren, hat. Diese Proteine dienen der Rekrutierung von Monozyten und anderen Immunzellen zu Orten einer ablaufenden Immunantwort und werden unter anderem auch von Monozyten sezerniert [51, 265]. Die mRNA-Expression von *CCL2* und *CCL7* verlief sehr ähnlich (Abbildung 5-30A/B). In Übereinstimmung mit den Array-Daten wurde die mRNA-Expression beider Gene während der gesamten Inkubationszeit durch LPS gesteigert. Bereits innerhalb der ersten Stunde der Inkubation wurde die LPS-induzierte mRNA-Expression von *CCL2* und *CCL7* sowohl durch Milchsäure, als auch durch die entsprechende Ansäuerung deutlich reduziert. Der stark negative Einfluss der Milchsäure auf die Expression dieser Gene lag auch im weiteren Verlauf der Inkubation vor. Im Gegensatz dazu war der Effekt der Ansäuerung nach zwei, drei und vier Stunden deutlich schwächer. Nach 17 Stunden wurde die Expression beider Gene nicht nur durch Milchsäure, sondern auch durch die Ansäuerung beeinflusst.

Interessanterweise waren in der hierarchischen Gruppierung alle beschriebenen Gene der frühen Wachstumsantwort (early growth response, EGR) *EGR1* bis *EGR4* [266-269] zu finden. Diese Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, deren Expression unter anderem durch Aktivierungssignale in vielen Zelltypen induziert werden kann [270, 271]. Die in Abbildung 5-30C dargestellte mRNA-Expression von *EGR2* korrelierte mit den Array-Daten: Bereits die Adhäsion der unstimulierten Monozyten führte, verglichen mit den frisch isolierten Zellen, zu einer deutlichen Steigerung der *EGR2*-Expression. Die LPS-Stimulation hatte innerhalb der ersten Stunde eine gesteigerte *EGR2*-Expression zur Folge. Milchsäure reduzierte die Expression von *EGR2* bereits innerhalb der ersten

Stunde deutlich. Dieser Effekt war nach vier bzw. 17 Stunden verstärkt. Die Ansäuerung des Kulturmediums hatte nur nach einer Stunde eine mit Milchsäure vergleichbare Wirkung und beeinflusste die Expression im Folgenden nicht.

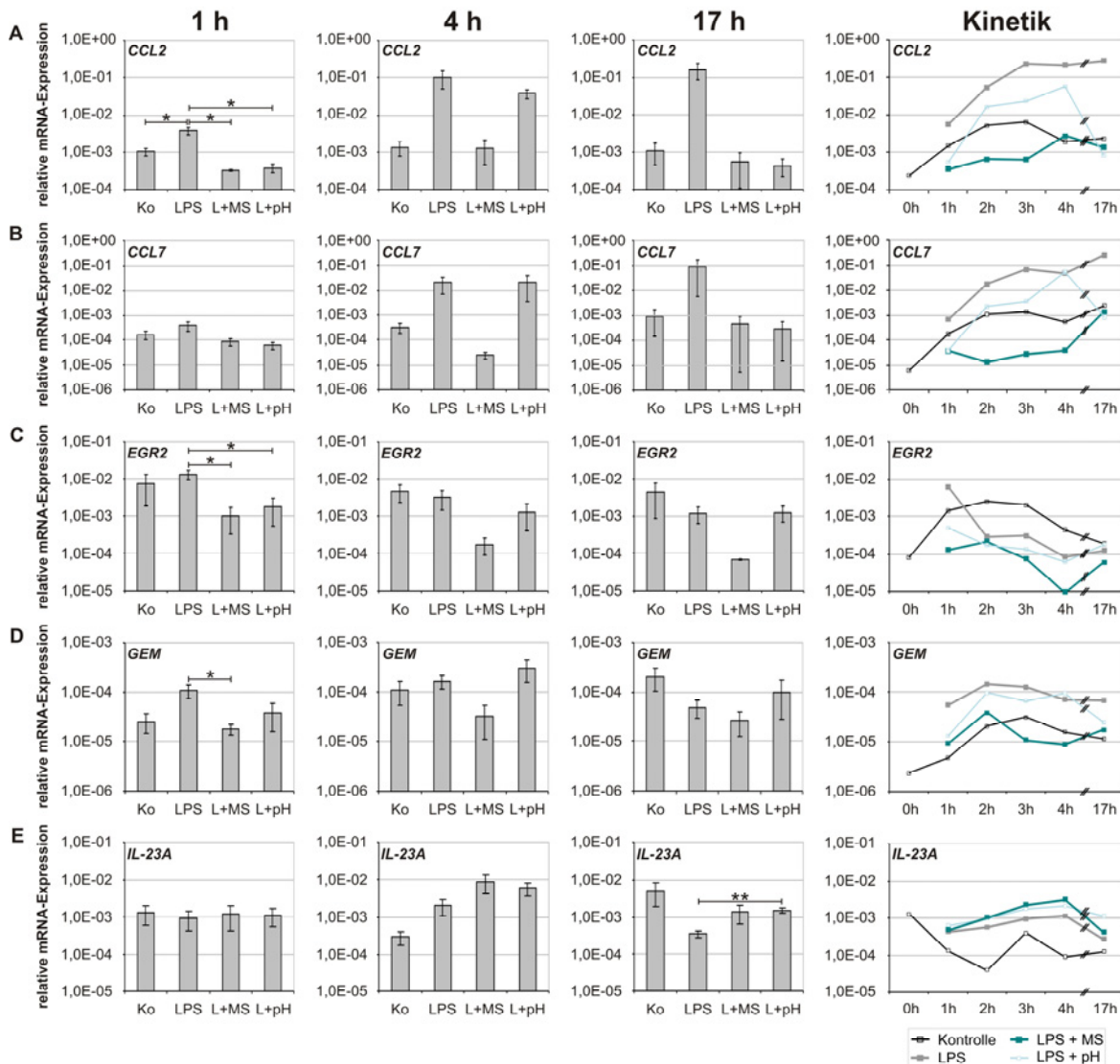


Abbildung 5-30: Längerfristiger Einfluss von Milchsäure auf die mRNA-Expression

Frisch isolierte Monozyten wurden für 1, 2, 3, 4 und 17 Stunden mit 100 ng/ml LPS in An- oder Abwesenheit von 20 mM Milchsäure (MS) inkubiert. Außerdem wurden Monozyten mit LPS in Kulturmedium mit pH 6,6 (pH) (entsprechend 20 mM MS) kultiviert. Als Kontrollen dienen frisch isolierte Monozyten (0 h) bzw. Monozyten, die für 1, 2, 3, 4 oder 17 Stunden ohne LPS inkubiert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA der Zellen isoliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression von *CCL2* (A), *CCL7* (B), *EGR2* (C), *GEM* (D) und *IL-23A* (E) relativ zur *18S*-rRNA-Expression mittels RT-qPCR bestimmt. Gezeigt sind die aus drei unabhängigen Experimenten gemittelten Expressionen (\pm SEM) nach 1, 4 und 17 Stunden sowie je eine repräsentative Kinetik. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, LPS relativ zur Kontrolle (Ko), LPS mit MS (L + MS) bzw. LPS mit pH (L + pH) relativ zu LPS.

Ein weiteres Gen, dessen Expression ausgehend von der Arrayanalyse über einen längeren Zeitraum durch 20 mM Milchsäure, nicht aber durch die entsprechende Ansäuerung reduziert zu sein schien, war das Gen *GEM* (GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle). Dieses Gen wurde als ein in T-Lymphozyten unmittelbar nach Mitogen-Stimulation transkribiertes Gen beschrieben [272]. Es wird angenommen, dass das kodierte Protein an der Kontrolle der Aktivität von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen beteiligt ist und eine Rolle bei der Umstrukturierung des Zytoskeletts spielt [273]. Die RT-qPCR-Analyse der *GEM*-Expression zeigte, dass sowohl Milchsäure, als auch die entsprechende Ansäuerung innerhalb der ersten Stunde der Inkubation einen stark negativen Einfluss auf die stark durch LPS stimulierte Expression von *GEM* hatten (Abbildung 5-30D). Im weiteren Verlauf der Inkubation dauerte jedoch nur der Effekt der Milchsäure an. Verglichen mit dem Niveau der LPS-stimulierten *GEM*-Expression führte die Ansäuerung nach 17 Stunden in zwei von drei Experimenten zu einer gesteigerten Expression.

Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse von Shime et al. zeigen, dass Tumor-produzierte Milchsäure, nicht aber die entsprechende Ansäuerung, die Expression von *IL-23A* und die Produktion von IL-23 durch TLR-stimulierte Monozyten induziert [36]. Interessanterweise befand sich *IL-23A*, dessen Proteinprodukt die p19-Untereinheit von IL-23 ist, auch in der hierarchischen Gruppierung (Abbildung 5-28). Entgegen der Array-Daten zeigte sich bei der RT-qPCR-Analyse nach einer Stunde weder eine LPS-induzierte *IL-23A*-Expression noch eine verminderte Expression dieses Gens nach einstündiger Inkubation mit Milchsäure oder entsprechender Ansäuerung (Abbildung 5-30E). Im Falle der für vier Stunden inkubierten Monozyten bestätigte die RT-qPCR-Analyse das Ergebnis des Arrays: Die LPS-induzierte *IL-23A*-Expression wurde durch 20 mM Milchsäure und die entsprechende Ansäuerung verstärkt. Auch Natriumlaktat und 10 mM Milchsäure beeinflussten die *IL-23A*-Expression nach vier Stunden ähnlich wie 20 mM Milchsäure. Die 10 mM Milchsäure entsprechende Ansäuerung des Kulturmediums hatte dagegen nur einen leicht positiven Effekt auf die Expression des Gens (Daten nicht gezeigt). Obwohl die LPS-induzierte Expression von *IL23A* nach 17 Stunden bereits wieder schwächer wurde, lag auch zu diesem Zeitpunkt noch eine leicht verstärkte *IL23A*-Expression nach Inkubation mit 20 mM Milchsäure und entsprechender Ansäuerung vor. Natriumlaktat und 10 mM Milchsäure beeinflussten die zu diesem Zeitpunkt vorliegende Expression nicht mehr (Daten nicht gezeigt).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des RNA-Expressionsarrays verdeutlichen die Daten der mit RT-qPCR überprüften Gene, dass die Milchsäure in teils säureabhängiger Weise unterschiedliche Phasen der Genexpression beeinflusste und in einer späteren Phase der Genexpression nicht nur negative, sondern auch positive Effekte vorlagen.

5.2.2.3.4 Analyse der Expression weiterer Gene

Da bei der Auswertung der Array-Daten weitere interessante Gene auffielen, die aber nicht in der erstellten hierarchischen Gruppierung (Abbildung 5-28) enthalten waren, wurde der Einfluss von Milchsäure auf die mRNA-Expression dieser Gene ebenfalls, wie unter 5.2.2.3.3 beschrieben, mittels RT-qPCR überprüft.

Ein Gen, dessen Expression im Gegensatz zu der überwiegenden Menge von innerhalb einer Stunde negativ beeinflussten Genen nach einer Stunde durch Milchsäure unabhängig von LPS positiv beeinflusst wurde, war das für den Vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A (VEGF-A) kodierende Gen *VEGF-A* [274]. Die RT-qPCR-Analyse zeigte, dass die *VEGF-A*-mRNA-Expression während der gesamten untersuchten Zeitspanne positiv durch Milchsäure und die entsprechende Ansäuerung beeinflusst wurde (Abbildung 5-31A).

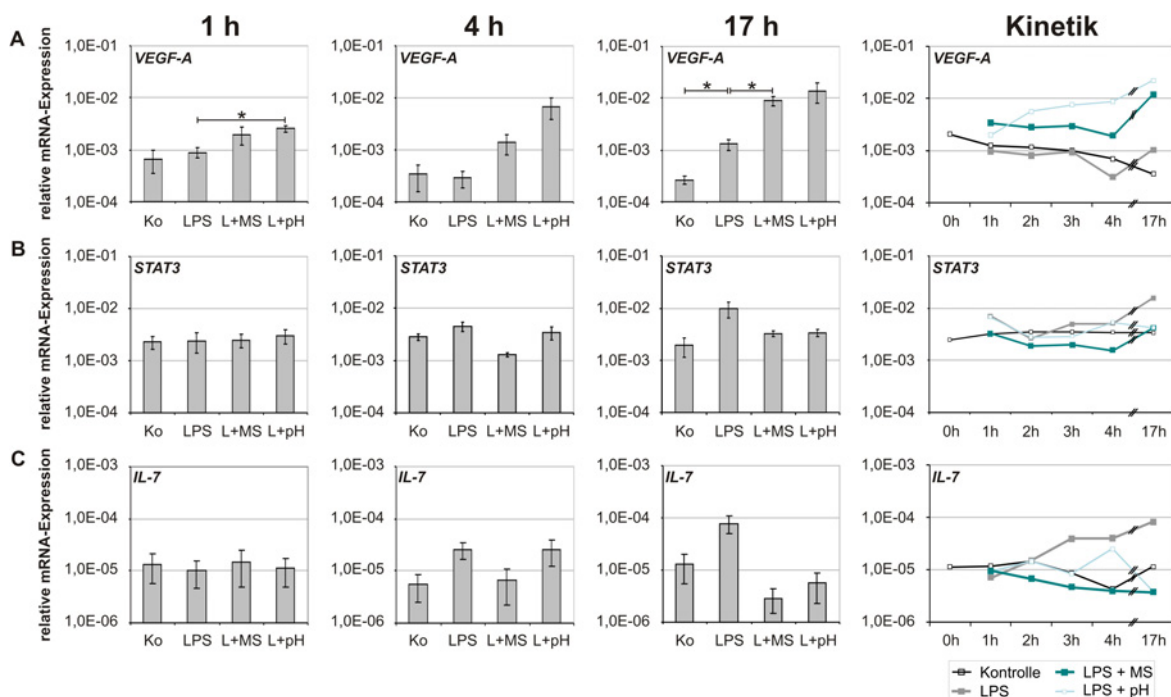


Abbildung 5-31: Analyse der mRNA-Expression weiterer durch Milchsäure beeinflusster Gene

Frisch isolierte Monozyten wurden für 1, 2, 3, 4 und 17 Stunden mit 100 ng/ml LPS in An- oder Abwesenheit von 20 mM Milchsäure (MS) inkubiert. Außerdem wurden Monozyten mit LPS in Kulturmedium mit pH 6,6 (pH) (entsprechend 20 mM MS) kultiviert. Als Kontrollen dienen frisch isolierte Monozyten (0 h) bzw. Monozyten, die für 1, 2, 3, 4 oder 17 Stunden ohne LPS inkubiert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA der Zellen isoliert. Anschließend wurde die mRNA-Expression von *VEGF-A* (A), *STAT3* (B) und *IL-7* (C) relativ zur *18S*-rRNA-Expression mittels RT-qPCR bestimmt. Gezeigt sind die aus drei unabhängigen Experimenten gemittelten Expressionen (\pm SEM) nach 1, 4 und 17 Stunden sowie je eine repräsentative Kinetik. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test: * $P < 0,05$, LPS relativ zur Kontrolle (Ko), LPS mit MS (L + MS) bzw. LPS mit pH (L + pH) relativ zu LPS.

Auch Natriumlaktat induzierte die Expression nach vier und 17 Stunden leicht, der Effekt von Milchsäure oder Ansäuerung war jedoch stärker (Daten nicht gezeigt). Somit ist gezeigt, dass Milchsäure und entsprechende Ansäuerung sowohl die Expression dieses Gens, als auch die Sekretion des VEGF₁₆₅-Proteins (siehe 5.2.1.1.1), einer durch alternatives Spleißen produzierten Isoform von VEGF-A [274], LPS-unabhängig beeinflussen. Ein Effekt von Natriumlaktat wurde dagegen nur auf Ebene der mRNA-Expression festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Bei der Auswertung der Array-Daten fiel außerdem auf, dass Milchsäure einen negativen Einfluss auf die mRNA-Expression des *STAT3* (signal transducer and activator of transcription 3)-Gens hat. Da *STAT3* sowohl in Tumor-, als auch in Immunzellen eine zentrale Rolle als pro-tumoraler Transkriptionsfaktor hat [124], wurde mittels RT-qPCR überprüft, ob Milchsäure einen Einfluss auf die *STAT3*-mRNA-Expression LPS-stimulierter Monozyten hat. Es zeigte sich, dass die LPS-stimulierte *STAT3*-Expression nach vier Stunden durch Milchsäure bzw. nach 17 Stunden durch Milchsäure und die entsprechende Ansäuerung reduziert wurde (Abbildung 5-31B).

Des Weiteren schien Milchsäure die Expression des *IL-7*-Gens zu beeinflussen. *IL-7* ist sowohl für Entwicklung, Proliferation und Überleben von B- und T-Lymphozyten von Bedeutung und spielt somit auch eine wichtige Rolle für eine effektive Antitumor-Antwort des Immunsystems [275]. Die RT-qPCR-Ergebnisse zeigen, dass Milchsäure die LPS-stimulierte *IL-7*-Expression von Monozyten, teils säureabhängig, stark supprimierte (Abbildung 5-31D). Dabei wurde der negative Effekt der Milchsäure mit steigender LPS-stimulierter *IL-7*-Expression immer ausgeprägter.

5.2.2.4 Untersuchung der Wirkung von Milchsäure auf verschiedene LPS-stimulierte Signalwege

Die bisher gewonnenen Daten deuteten an, dass Milchsäure die LPS-Antwort in Monozyten verzögerte. Daher wurde die LPS-abhängige Signaltransduktion unter Einfluss von Milchsäure untersucht. Hierfür wurden die intrazellulären Mengen des Inhibitors von κB α ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), der phosphorylierten Formen der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 (phospho-p38) und der Proteinkinase B (Akt) (phospho-Akt) mittels Western-Blot analysiert. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ bindet als Inhibitor an den Transkriptionsfaktor nukleärer Faktor κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$). Infolge der Bindung von LPS an TLR4 kommt es zum Abbau von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und der Freisetzung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$, wodurch der Eintritt von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in den Zellkern ermöglicht wird. Die Proteinkinasen p38 und Akt werden nach Bindung von LPS an TLR4 phosphoryliert und somit aktiviert [23].

Für die spätere Western-Blot-Analyse wurden Monozyten für 5, 15 oder 30 Minuten mit LPS alleine bzw. mit 10 oder 20 mM Milchsäure, Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 6,6 oder Natriumlaktat inkubiert. Als Kontrollen dienten frisch isolierte Monozyten und Monozyten ohne LPS-Stimulation. Zu den entsprechenden Zeitpunkten erfolgte anschließend eine Proteinisolierung.

Wie in Abbildung 5-32A und D zu sehen, hatte bereits eine fünfminütige LPS-Stimulation eine Abnahme der intrazellulären Menge an I κ B α zur Folge.

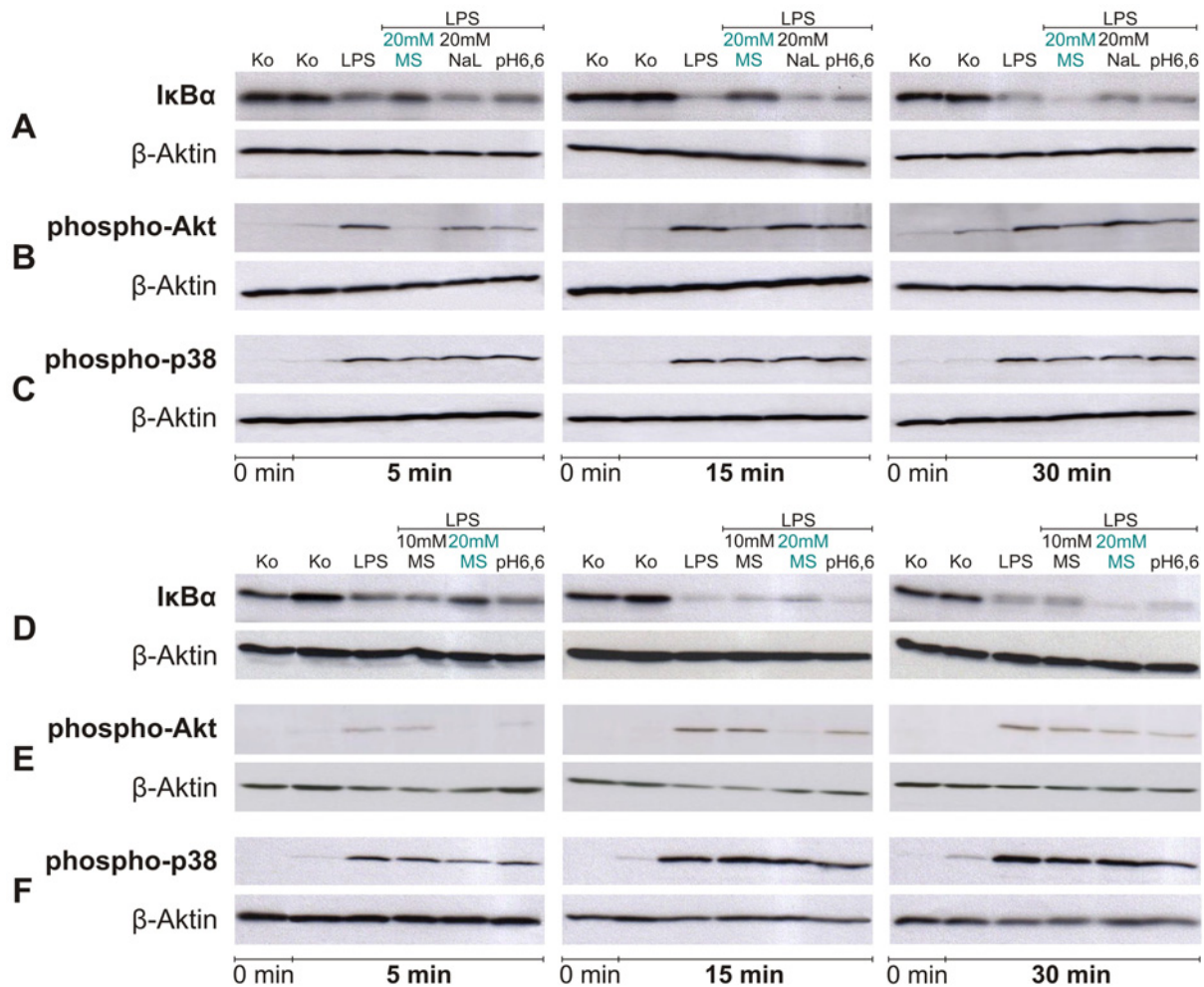


Abbildung 5-32: Einfluss von Milchsäure, Ansäuerung und Natriumlaktat auf die LPS-abhängige Signaltransduktion

Frisch isolierte Monozyten wurden für 5, 15 oder 30 Minuten mit 100 ng/ml LPS in Anwesenheit von 20 mM (A-F) oder 10 mM (D, E, F) Milchsäure (MS) inkubiert. Außerdem wurden Monozyten mit LPS in Kulturmedium mit pH 6,6 (entsprechend 20 mM MS) (A-F) bzw. mit 20 mM Natriumlaktat (NaL) (A-C) kultiviert. Als Kontrollen dienten frisch isolierte Monozyten ohne Inkubation (Ko 0 min) bzw. für 5, 15 oder 30 Minuten ohne LPS inkubierte Monozyten (Ko 5 min, Ko 15 min, Ko 30 min). Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte eine Proteinisolierung. Die Detektion von I κ B α (A, D), phospho-Akt (B, E) und phospho-p38 (C, F) in den Lysaten erfolgte durch spezifische Antikörper mittels Western-Blot. Zur Beladungskontrolle wurde nach dem Ablösen der zuvor verwendeten Antikörper die Menge an β -Aktin auf den Blots bestimmt. Gezeigt sind zwei von drei unabhängigen Experimenten (20 mM NaL: ein Experiment; 10 mM MS: zwei Experimente).

Im Gegensatz dazu lag nach fünf- bzw. 15-minütiger Inkubation mit LPS und 20 mM Milchsäure eine größere Menge an I κ B α in den Zellen vor als nach alleiniger Inkubation mit LPS. Infolge der Inkubation der Zellen mit LPS in Kulturmedium mit pH 6,6 wurde nach fünf Minuten ebenfalls eine leicht gesteigerte Menge von I κ B α detektiert. Nach 15 Minuten lag nur in einem (Abbildung 5-32A) von drei Experimenten eine geringfügig größere Menge an I κ B α vor. Die Kombination aus LPS und Natriumlaktat beeinflusste die intrazelluläre Menge an I κ B α nicht (Abbildung 5-32A). Ein schwach negativer Einfluss von 10 mM Milchsäure auf den LPS-stimulierten Abbau von I κ B α war nur nach 15 Minuten festzustellen (Abbildung 5-32D). Nach 30 Minuten lag bei Inkubation mit LPS und 20 mM Milchsäure eine geringere Menge an I κ B α als nach alleiniger Inkubation mit LPS vor. LPS zusammen mit Natriumlaktat (Abbildung 5-32A) sowie LPS mit 10 mM Milchsäure (Abbildung 5-32D) hatten keinen Einfluss auf die intrazelluläre Menge an I κ B α . Nach Ansäuerung auf pH 6,6 war in einem (Abbildung 5-32D) von drei Experimenten die intrazelluläre Menge an I κ B α leicht reduziert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Milchsäure und in deutlich abgeschwächtem Maße auch die entsprechende Ansäuerung den Abbau von I κ B α in Monozyten verzögerten: Der in Gegenwart von LPS bereits nach fünfminütiger Inkubation erkennbare Abbau von I κ B α war bei Inkubation mit LPS und Milchsäure erst nach 30 Minuten feststellbar.

Die Inkubation mit 20 mM Milchsäure verzögerte auch die LPS-stimulierte Bildung von phospho-Akt: Im Gegensatz zu den mit LPS inkubierten Monozyten, in denen phospho-Akt bereits nach fünf Minuten nachweisbar war, war phospho-Akt in den mit LPS und 20 mM Milchsäure inkubierten Zellen zu diesem Zeitpunkt kaum detektierbar (Abbildung 5-32B). Auch die Ansäuerung auf pH 6,6 und Natriumlaktat reduzierten die Menge an LPS-stimuliertem phospho-Akt leicht (Abbildung 5-32B/E). Im Gegensatz dazu hatte 10 mM Milchsäure keine Wirkung auf phospho-Akt (Abbildung 5-32E). Nach 15 und 30 Minuten lag jeweils eine leicht gesteigerte Menge von phospho-Akt bei Inkubation mit LPS und 20 mM Milchsäure vor, das Niveau der durch LPS hervorgerufenen Menge an phospho-Akt wurde aber auch nach 30 Minuten nicht erreicht. Die Ansäuerung auf pH 6,6 hatte zu diesen Zeitpunkten einen leicht negativen Einfluss. Effekte von Natriumlaktat (Abbildung 5-32B) und 10 mM Milchsäure (Abbildung 5-32B) waren weder nach 15, noch nach 30 Minuten vorhanden. Somit wurde die LPS-induzierte Phosphorylierung von Akt durch 20 mM Milchsäure und leicht auch durch die entsprechende Ansäuerung verzögert. Im Gegensatz zu den deutlichen Effekten der Milchsäure auf I κ B α und phospho-Akt wurde nur nach fünfminütiger Inkubation eine leichte Reduktion der intrazellulären phospho-p38-Menge durch 20 mM Milchsäure festgestellt (Abbildung 5-32C und F). Die Ansäuerung auf pH 6,6, Natriumlaktat (Abbildung 5-32C) oder 10 mM Milchsäure (Abbildung 5-32F) beeinflussten die Menge an phospho-p38 nicht.

6 Diskussion

6.1 Einfluss von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin auf humane Monozyten

Aufgrund einer Defizienz der Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) reichern verschiedene Tumore 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) intrazellulär an bzw. sezernieren es ins Tumormilieu [191]. Die daraus resultierende Akkumulation von MTA [201] könnte Tumor-infiltrierende Immunzellen, wie Monozyten, beeinflussen. Da nur wenige Arbeiten über die Wirkung von MTA auf Immunzellen existieren, aber am Beispiel verschiedener anderer Tumormetaboliten ein Einfluss auf Immunzellen gezeigt ist [143], wurde in dieser Arbeit analysiert, ob MTA Effekte auf humane Monozyten hat.

6.1.1 Funktion und Vitalität von Monozyten unter Einfluss von MTA

Zunächst wurde die Sekretion der Zytokine Interleukin (IL)-10, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF) durch humane Monozyten in Gegenwart von MTA-Konzentrationen bis 1000 μM analysiert. Die Sekretion von IL-10 wurde in Abwesenheit von Lipopolysaccharid (LPS) durch MTA induziert. Obwohl die basale IL-10-Produktion von Monozyten durch suboptimale LPS-Konzentrationen nicht erhöht wurde, war der positive Effekt von MTA auf die IL-10-Sekretion auch in Gegenwart von LPS zu beobachten. Ferner wurde die Sekretion von IL-6 LPS-unabhängig durch MTA induziert. Im Gegensatz zu IL-10 verstärkten suboptimale LPS-Konzentrationen die IL-6-Sekretion. Die TNF-Sekretion der Monozyten wurde nur bei Inkubation mit suboptimalen Mengen von LPS und niedrigen MTA-Konzentrationen gesteigert. In Abwesenheit von LPS wurde eine Inhibition der TNF-Sekretion durch 500 und 1000 μM MTA festgestellt.

Bei massenspektrometrischen Untersuchungen in lysierten Melanom-Gewebeproben wurden im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten MTA-Konzentrationen deutlich geringere Mengen (ca. 140 nM) quantifiziert [201]. Ob dies im Hinblick auf die mangelnde Vaskularisierung vieler Tumore repräsentativ ist, ist fraglich. Da aber unklar ist, wie hoch die tatsächlich auftretenden lokalen Konzentrationen von MTA in Tumoren sind, sind Effekte geringerer MTA-Konzentrationen als physiologisch relevanter einzustufen.

Auch andere Gruppen untersuchten Effekte von MTA auf Immunzellen im mikromolaren Bereich. Interessanterweise wurden dabei ausschließlich antiinflammatorische Effekte von MTA festgestellt: Hevia et al. fanden bei Inkubation der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 267.4 mit 300 und 500 μM MTA in Gegenwart von LPS eine Steigerung der IL-10-Sekretion. Eine Inhibition der TNF-Sekretion beobachteten sie bereits bei Inkubation mit 100 μM MTA. In Abwesenheit von LPS konnten sie jedoch keine Wirkung von MTA auf die Sekretion dieser beiden Zytokine detektieren [210]. Auch Cerri et al. stellten bei Versuchen mit murinen Makrophagen eine Inhibition der LPS-induzierten TNF-Sekretion durch 10 bis 500 μM MTA fest [209]. In Übereinstimmung damit berichtete die Gruppe um Lu et al. in zwei Arbeiten von einer Inhibition der LPS-stimulierten Transkription des *TNF*-Gens ab 250 μM MTA in murinen Makrophagen [212, 213]. Moreno et al. beobachteten nach Vorinkubation mit 100 μM MTA eine Inhibition der *TNF*-Expression in Mitogen-stimulierten humanen peripheren mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) [214].

Die Gründe für die teilweise Diskrepanz des Einflusses von MTA auf Immunzellen zwischen der vorliegenden Dissertation und den genannten Arbeiten könnten zell-, spezies- oder versuchsabhängige Unterschiede in der Reaktion auf MTA sein. Darüber hinaus wurden die von Cerri et al., Hevia et al. und der Gruppe um Lu et al. beobachteten Effekte von MTA auf die Zytokinsekretion in Gegenwart weitaus größerer LPS-Konzentrationen (0,5 bis 5 $\mu\text{g/ml}$) untersucht [209, 210, 212, 213]. In der vorliegenden Arbeit wurden bei Inkubation von Monozyten in Gegenwart einer höheren LPS-Konzentration (100 ng/ml) keine Effekte von MTA auf die Zytokinsekretion festgestellt (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass bei humanen Monozyten die Reaktion auf MTA stark von der eingesetzten LPS-Konzentration abhängig ist. Bezogen auf die Situation im Tumor, wo endogene „Toll-like“-Rezeptor (TLR)-Liganden zur Stimulation von Immunzellen beitragen [119, 120], scheinen also die LPS- und somit TLR-abhängigen positiven Effekte von MTA auf die TNF-Sekretion von Monozyten nur unter bestimmten Bedingungen zum Tragen zu kommen.

Die unabhängig von LPS durch MTA gesteigerte Sekretion von IL-6 und IL-10 könnte in Analogie zu Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) auf eine Veränderung der Monozyten in Richtung eines protumoralen Phänotyps hinweisen. Statt im Tumor durch Sekretion immunstimulatorischer Zytokine für eine Induktion einer antitumoralen Immunantwort zu sorgen, produzieren TAM häufig verstärkt verschiedene immun-suppressive Faktoren, unter anderem auch IL-10. Des Weiteren sezernieren sie IL-6 und fördern dadurch Wachstum und Überleben von Tumorzellen sowie die Entwicklung protumoraler Immunzellphänotypen [35, 126, 128].

Ebenfalls für eine Entwicklung eines protumoralen Monozyten-Phänotyps unter Einfluss von MTA könnte die beobachtete reduzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) sprechen. Monozyten können *in vitro* über ROS zytostatische oder zytotoxische Effekte gegenüber Tumorzellen vermitteln [63]. Auch TAM weisen eine reduzierte tumorizide Kapazität auf [128]. Da jedoch die ROS-Bildung nur durch relativ hohe MTA-Konzentrationen signifikant beeinflusst wurde, ist unklar, inwieweit dieser Effekt unter physiologischen Bedingungen auftritt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob MTA die Vitalität von Monozyten beeinträchtigt. Entgegen der Ergebnisse von Ansorena et al., die negative Effekte von 500 μM MTA auf die Vitalität einer humanen Hepatokarzinomzelllinie beobachteten [239], wurde in der vorliegenden Arbeit die Vitalität von Monozyten durch MTA nicht signifikant beeinträchtigt. Dies stimmt mit anderen Arbeiten überein, die keinen Einfluss von MTA auf die Vitalität von lymphoiden Zellen oder Tumorzellen feststellten [194, 215]. Somit steht fest, dass die Ergebnisse zur Funktion von Monozyten unter Einfluss von MTA nicht durch eine veränderte Zellzahl in der Kultur verfälscht wurden.

6.1.2 Mechanismus der Wirkung von MTA

Da Munshi et al. sowie Daly et al. durch Bindungsstudien mit isolierten Rattenzellmembranen zeigten, dass MTA mit den Adenosinrezeptoren A_1 und Rezeptoren vom A_2 -Typ interagiert [240, 241], wurde eine Wechselwirkung von MTA mit Adenosinrezeptoren untersucht.

Die verschiedenen Adenosinrezeptoren A_1 , A_{2A} , A_{2B} und A_3 aktivieren oder inhibieren unterschiedliche intrazelluläre Signalwege. Die Ligandbindung an A_{2A} und A_{2B} induziert die Bildung von zyklischem (cyclic) Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Adenylatzyklase. Im Gegensatz dazu kann die Ligandbindung an A_1 und A_3 eine Inhibition der Adenylatzyklase induzieren, was zur Abnahme des intrazellulären cAMP-Spiegels führt. Außerdem kann infolge der Bindung eines Liganden an die Rezeptoren A_1 , A_{2B} sowie A_3 die Phospholipase C und somit die Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum stimuliert werden. Die Rezeptoren A_1 und A_3 können darüber hinaus auch Kalzium- oder cAMP-unabhängige Signalwege, wie z.B. den Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (Akt)-Weg, aktivieren [242-244].

Die immunhistochemische Analyse von Adenosinrezeptoren auf humanen Monozyten zeigte, dass diese Zellen, wenngleich auch in unterschiedlicher Stärke, alle vier beschriebenen Adenosinrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren. Somit sollte die

Basis für eine mögliche Adenosinrezeptor-abhängige Wirkung von MTA auf Monozyten vorhanden sein.

Adenosin induzierte bei frisch isolierten Monozyten keine Veränderung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Eppel et al. sowie Najar et al. konnten bei Inkubation von frisch isolierten humanen Monozyten mit Adenosin ebenfalls keinen Effekt auf den intrazellulären cAMP-Spiegel erkennen [276, 277]. Auch bei Inkubation von Monozyten mit MTA war keine Veränderung des intrazellulären cAMP-Gehalts feststellbar. Dies stimmt mit Beobachtungen von Fredholm et al. überein. Sie fanden ebenfalls keinen Einfluss von MTA auf den intrazellulären cAMP-Gehalt von humanen natürlichen Killerzellen [218].

Des Weiteren veränderten weder Adenosin noch MTA die intrazellulären Kalziumkonzentrationen von Monozyten. Auch Broussas et al. konnten keine intrazelluläre Kalziumfreisetzung bei Inkubation humaner Monozyten mit Adenosin feststellen [278]. Dagegen zeigten Thiele et al., dass Adenosin einen Anstieg des intrazellulären Kalziumgehalts in Monozyten induziert [279]. Sie verwendeten jedoch im Vergleich zu der vorliegenden Dissertation und der Arbeit von Broussas et al. eine deutlich höhere Konzentration an Adenosin (200 μM).

Da MTA intrazelluläre cAMP- oder Kalzium-Konzentrationen nicht beeinflusste, scheinen die Effekte von MTA auf frisch isolierte humane Monozyten nicht über eine Veränderung dieser „second messenger“ vermittelt zu werden. Interessanterweise beobachteten Najar et al. trotz ausbleibender cAMP-Antwort auf Adenosin bei frisch isolierten humanen Monozyten eine Adenosin-induzierte Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels länger kultivierter Monozyten [277]. Obwohl MTA auch bei humanen natürlichen Killerzellen nach 15- oder 60-minütiger Inkubation keine Effekte auf den intrazellulären cAMP-Gehalt hatte [218], könnte es in Analogie zu Adenosin nach längerer Inkubation der Monozyten eine Adenosinrezeptor-abhängige cAMP- oder Kalziumantwort hervorrufen. Jedoch wurde die MTA-induzierte IL-6-Sekretion der Monozyten nach 24-stündiger Inkubation in Anwesenheit von Antagonisten der verschiedenen Adenosinrezeptoren nicht signifikant gehemmt. Aus diesem Grund scheinen Adenosinrezeptoren und ein damit gekoppelter Effekt von MTA auf die intrazellulären cAMP- oder Kalziumkonzentrationen länger inkubierter Monozyten für die beobachtete Wirkung von MTA auf die Zytokinsekretion von Monozyten keine vorrangige Rolle zu spielen.

Im Falle der ROS-Produktion von Monozyten, die bereits nach 30-minütiger Inkubation gemessen wurde, steht fest, dass die Effekte cAMP- und Kalzium-unabhängig vermittelt wurden. Nachdem für die Adenosinrezeptoren A_1 und A_3 auch eine cAMP- und Kalzium-unabhängige Aktivierung von Signalwegen beschrieben ist [242, 244], könnte MTA über diese Rezeptoren Einfluss auf Monozyten haben. Broussas et al. zeigten beispielsweise, dass Adenosin über A_3 -Rezeptoren eine Kalzium- und cAMP-unabhängige Inhibition der

ROS-Produktion humaner Monozyten induziert [278]. Da jedoch ein eindeutiger Effekt auf die ROS-Produktion nur bei relativ hohen MTA-Konzentrationen zu beobachten war, wurde der zugrundeliegende Mechanismus nicht weiter untersucht.

Verschiedene Gruppen beobachteten, trotz widersprüchlicher Aussagen über den Mechanismus, eine Aufnahme von MTA in Zellen [280-282]. Somit könnten die Effekte von MTA auf Monozyten auch intrazellulär vermittelt werden. Beispielsweise beeinflusst MTA Methylierungsreaktionen oder die Aktivität von Proteinkinasen [204, 213]. Dies müsste jedoch in weiteren Versuchen analysiert werden.

Nachdem die Wirkung von MTA auf Monozyten nur relativ schwach ausgeprägt war, wäre darüber hinaus interessant, ob Makrophagen eine stärkere Reaktion als Monozyten auf MTA zeigen. In einer medizinischen Dissertation (Bernadette Neueder, Arbeitsgruppe Kreuz) sowie in einer weiteren naturwissenschaftlichen Dissertation (Katrin Singer, Hämatologie und internistische Onkologie, Universitätsklinikum Erlangen; persönliche Kommunikation) wurden eindeutigere Effekte von MTA auf längerfristig inkubierte dendritische Zellen oder T-Lymphozyten gefunden. Dies könnte implizieren, dass auch die längerfristig inkubierten Monozyten/Makrophagen stärker als Monozyten durch MTA beeinflusst werden.

6.2 Einfluss von Milchsäure auf humane Monozyten

Aufgrund der hohen Glykolyserate in Tumorzellen und des Exports des dabei entstehenden Laktats im Kotransport mit Protonen, reichert sich Milchsäure im Tumormilieu an [151, 152]. Auch in Wunden sind hohe Laktatkonzentrationen und saure pH-Werte zu finden [77]. Da weitgehend unklar ist, wie die Anreicherung von Milchsäure die Immunantwort im Tumor (oder in Wunden) beeinflusst, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Milchsäure, bzw. deren Komponenten Laktat und Protonen auf humane Monozyten untersucht.

6.2.1 Funktion von Monozyten unter Einfluss von Milchsäure

Zunächst wurde gezeigt, dass Milchsäure die TNF-Sekretion von Monozyten bereits ab einer Konzentration von 5 mM supprimierte. Diese Inhibition war unabhängig vom verwendeten bakteriellen Stimulus. Auch in Kokultur mit Laktat-sezernierenden Tumorzellen, wo lediglich 3 mM Laktat vorlagen, wurde die TNF-Sekretion der Monozyten

inhibiert. Im Gegensatz zu TNF lag ein inhibitorischer Effekt der Milchsäure auf die IL-6-Sekretion nur in Gegenwart von 20 mM Milchsäure vor. Wahrscheinlich wurde in der Kokultur aufgrund dieser vergleichsweise geringen Sensitivität der IL-6-Sekretion gegenüber Milchsäure kein Effekt festgestellt. Die IL-10-Sekretion wurde selbst durch 20 mM Milchsäure nicht signifikant beeinträchtigt.

Bei Untersuchung der Wirkung der Ansäuerung auf die TNF-Sekretion zeigte sich, dass bei Inkubation mit 10 mM Milchsäure sowohl das Laktat-Anion, als auch die entsprechende Ansäuerung nötig war, um die TNF-Sekretion zu supprimieren. Die durch 20 mM Milchsäure hervorgerufene Inhibition lag dagegen auch bei entsprechender Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 6,6 vor. Im Gegensatz dazu wurde die IL-6-Sekretion weder durch 10 mM Milchsäure, noch durch die Ansäuerung beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

In Übereinstimmung mit den Daten der vorliegenden Arbeit beobachteten Douvdevani et al. eine Inhibition der LPS-stimulierten TNF-Sekretion humaner Monozyten und Makrophagen durch Peritonealdialyseflüssigkeiten, welche durch hohe Laktatkonzentrationen und niedrige pH-Werte gekennzeichnet sind [183]. Wantanabe et al. zeigten, dass 15 mM Milchsäure die LPS-stimulierte TNF-Sekretion der humanen monozytären Zelllinie THP-1, unabhängig von dem bei dieser Milchsäurekonzentration vorliegenden pH-Wert (pH 6,8), inhibiert [185]. Die TNF-Sekretion von Alveolar-Makrophagen aus Kaninchen wird jedoch bereits durch pH-Werte ab 7,0 (und geringer) inhibiert [283, 284]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten andere Arbeitsgruppen anhand von Ratten-Makrophagen, dass die TNF-Sekretion durch pH 7,0 bzw. durch 5 bis 15 mM Milchsäure stimuliert wird [186, 285]. Kellum et al. fanden sowohl nach Ansäuerung, als auch nach Inkubation mit Milchsäure eine Inhibition der Sekretion von IL-6 und IL-10 durch eine murine Makrophagen-Zelllinie [286]. Die teils variierenden Ergebnisse bezüglich der Wirkung von Milchsäure, Laktat und Ansäuerung in den genannten Arbeiten könnten speziesbedingt sein. Shime et al. stellten jedoch eine Induktion der IL-6-Sekretion durch Milchsäure bei humanen Monozyten fest [36]. Auch Samuvel et al. beobachteten eine Induktion der IL-6-Sekretion humaner Makrophagen durch Laktat [179]. Inwieweit diese Ergebnisse mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verglichen werden können, ist jedoch fraglich, denn sowohl bei Shime et al., als auch bei Samuvel et al. fand eine Vorinkubation der jeweiligen Zellen mit Milchsäure und Laktat statt [36, 179].

Um die Wirkung von Milchsäure auf die TNF- und IL-6-Sekretion genauer zu untersuchen, wurde die Kinetik der Sekretion dieser Zytokine analysiert. Im Gegensatz zu TNF, das bereits innerhalb der ersten vier Stunden nach LPS-Stimulation maximale Konzentrationen im Kulturüberstand erreichte, wurden die höchsten IL-6-Konzentrationen erst nach längerer LPS-Stimulation detektiert. Die zeitliche Reihenfolge der Sekretion dieser beiden

Zytokine entsprach somit den Angaben in der Literatur [287, 288]. Die Inkubation mit 20 mM Milchsäure reduzierte die Sekretion beider Zytokine während der ersten vier Stunden. Auch im weiteren Verlauf der Kultur lag TNF in deutlich reduzierten Mengen in den Überständen vor. Die IL-6-Konzentration dagegen war nach 17 Stunden beinahe maximal. Die TNF-Sekretion, nicht aber die IL-6-Sekretion, wurde auch durch 10 mM Milchsäure inhibiert. Dies bestätigt die Beobachtung, dass die TNF-Sekretion der Monozyten durch geringere Milchsäurekonzentrationen als die IL-6-Sekretion beeinflusst wird.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete starke Sensitivität der TNF-Sekretion von Monozyten bereits gegenüber relativ geringen Milchsäurekonzentrationen impliziert, dass auch unter physiologischen Bedingungen TNF das am frühesten durch Milchsäure beeinflusste Zytokin sein könnte. Milchsäure scheint also ein Faktor zu sein, der im Tumor besonders zur Inhibition der TNF-Sekretion beiträgt und somit eine Antitumor-Antwort von Immunzellen verhindert. Im Gegensatz dazu supprimiert Milchsäure die protumoralen Zytokine IL-6 und IL-10 nur sehr schwach bzw. nicht.

Interessanterweise zeigen auch TAM [128] sowie humane Tumor-assoziierte Monozyten eine reduzierte TNF-Sekretion [131]. Darüber hinaus wird bei Inkubation von Monozyten mit Tumor-produzierten Faktoren, wie Gangliosiden, häufig eine Inhibition der TNF-Sekretion beobachtet [140-142]. Da in Wunden aktivierte Immunzellen die Hauptproduzenten für Milchsäure sind [77], könnte die Inhibition der TNF-Sekretion dort eine Art Rückkopplungsmechanismus zur Beendigung einer Immunantwort darstellen.

Die Sekretion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (vascular endothelial growth factor, VEGF) wurde unabhängig von LPS durch Milchsäure und die entsprechende Ansäuerung induziert. Auch die im Rahmen der globalen Expressionsanalyse untersuchte *VEGF-A*-mRNA-Expression wurde LPS-unabhängig durch Milchsäure und die entsprechende Ansäuerung induziert. Diese Ergebnisse sprechen für eine Säure-abhängige Induktion der Sekretion dieses Wachstumsfaktors in Monozyten und implizieren, dass Monozyten zur Angiogenese im Tumor oder in Wunden beitragen könnten. Auch Xu et al. stellten eine vermehrte VEGF-Produktion bei Inkubation von Glioblastomzellen unter sauren Bedingungen fest [289]. Im Gegensatz dazu berichteten Constant et al. sowie Trabold et al. von einer Laktat-induzierten VEGF-Sekretion bei Makrophagen aus Kaninchen bzw. Ratten [77, 177]. Darüber hinaus fanden Beckert et al. eine Induktion der VEGF-Sekretion humaner Endothelzellen durch Laktat [161]. Obwohl in der vorliegenden Arbeit eine leichte Induktion der *VEGF-A*-mRNA-Expression durch Natriumlaktat beobachtet wurde, konnte keine Induktion der VEGF-Sekretion festgestellt werden. Dies spricht für eine zelltypspezifische Reaktion auf Natriumlaktat.

Neben der Sekretion von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren wurden auch andere Funktionen von Monozyten unter Einfluss von Milchsäure analysiert. Die ROS-Produktion der Monozyten wurde durch hohe Milchsäurekonzentrationen, aber auch die entsprechende Ansäuerung, inhibiert. Dies stimmt mit den Arbeiten von Ing et al. sowie Topley et al. überein, die eine pH-abhängige Inhibition der ROS-Produktion humaner neutrophiler Granulozyten bzw. Makrophagen feststellten [290, 291]. Da die Produktion von ROS pH-abhängig verändert wurde, könnte eine Modulation der ROS-Produktion durch Monozyten auch unter den sauren Bedingungen des Tumormilieus oder in Wunden stattfinden. Monozyten haben, zumindest *in vitro*, durch die Sekretion von ROS zytostatische oder zytotoxische Effekte gegenüber Tumorzellen [63]. Somit könnte die Inhibition der ROS-Produktion (zusätzlich zur Suppression der TNF-Sekretion) bei hohen Milchsäurekonzentrationen zur Suppression einer Antitumor-Antwort durch Milchsäure (und teilweise durch Ansäuerung) beitragen. In Wunden könnte eine Inhibition der ROS-Produktion einen weiteren Mechanismus zur Beendigung einer Immunantwort darstellen. Außerdem wurde der Einfluss von Milchsäure auf die Migration von Monozyten untersucht. Es wurde eine Stimulus- und pH-unabhängige Steigerung der Beweglichkeit (Chemokinese), jedoch keine gerichtete Bewegung (Chemotaxis) der Monozyten nach Inkubation mit Milchsäure beobachtet. In diesem Zusammenhang zeigten Walenta et al., dass Laktat die Beweglichkeit von Tumorzellen steigert [292].

Darüber hinaus hatten Monozyten eine schwach zytostatische Wirkung auf Melanomzellen, welche durch LPS deutlich verstärkt wurde. Zytostatische Effekte von Monozyten auf Tumorzellen können *in vitro* über die Sekretion von ROS [63], aber auch TNF, IL-1 und IL-6 vermittelt werden [65-67]. Da die Ausschüttung von Zytokinen durch LPS induziert wird, könnte der zytostatische Effekt über einen oder mehrere dieser Zytokine vermittelt worden sein. Nachdem bereits geringe Konzentrationen von Milchsäure die zytostatische Wirkung der Monozyten reduzierten, könnte TNF eine vorrangige Rolle gespielt haben, denn die TNF-Sekretion wurde bereits durch geringe Milchsäuremengen supprimiert. Wenngleich nicht klar ist, ob zytostatische Effekte von Monozyten auf Tumorzellen *in vivo* relevant sind, zeigen diese Ergebnisse, dass die Funktion von Monozyten durch Milchsäure negativ beeinflusst wird.

6.2.2 Wirkmechanismus von Milchsäure auf Monozyten

Obwohl Milchsäure auch positive Effekte auf die VEGF-Sekretion und die Chemokinese der Monozyten hatte, wurde die Zahl der apoptotischen, toten und vitalen Monozyten nach Inkubation mit Milchsäure analysiert. In Gegenwart von 20 mM Milchsäure oder

entsprechender Ansäuerung auf pH 6,6 wurde jedoch keine signifikante Abnahme der Vitalität der Monozyten beobachtet. Jensen et al. zeigten, dass 15 mM Milchsäure die Vitalität von Ratten-Makrophagen nicht beeinträchtigt [186]. Auch Kellum et al. stellten keine negativen Effekte auf die Vitalität einer murinen Makrophagen-Zelllinie durch 20 mM Milchsäure oder die Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 6,5 fest [286]. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass die Vitalität von Makrophagen aus Kaninchen erst ab pH-Werten von 6,0 (und geringer) beeinträchtigt wird [283].

6.2.2.1 Einfluss von Milchsäure auf den Glukosemetabolismus

Laktat kann einerseits als Energiequelle genutzt werden, hat andererseits aber auch regulatorische Wirkung auf den Zellmetabolismus [151, 258]. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob extrazelluläre Milchsäure die Glykolyse von Monozyten beeinflusst und deshalb möglicherweise die Funktion der Monozyten beeinträchtigt.

Massenspektrometrische Analysen zeigten, dass $[3-^{13}\text{C}]$ Laktat durch Monozyten konstitutiv aufgenommen wird. Eine leichte Ansäuerung des Kulturmediums hatte keinen signifikanten Effekt auf die $[3-^{13}\text{C}]$ Laktataufnahme. Die Kombination aus LPS-Stimulation und Ansäuerung führte zu einer signifikant gesteigerten Aufnahme von $[3-^{13}\text{C}]$ Laktat durch die Monozyten. Diese gesteigerte Aufnahme von $[3-^{13}\text{C}]$ Laktat in Anwesenheit von Protonen und LPS impliziert, dass Monocarboxylattransporter (MCTs) an der Aufnahme des Laktats in die Monozyten beteiligt sein könnten. MCTs transportieren Monocarboxylate, wie Pyruvat oder Laktat, im Kotransport mit Protonen. Da der Transport bidirektional erfolgen kann, bestimmen die Konzentrationsgradienten von Monocarboxylat und Protonen die Richtung des Transports [259, 260]. Loike et al. fanden eine pH-abhängige Aufnahme von Laktat in murine Makrophagen, die durch die Aktivierung gesteigert wurde [293]. Dies könnte auf eine Aktivierungs-abhängige Regulation der Expression von MCTs hinweisen und erklären, warum nur bei Kombination aus Ansäuerung und LPS-Stimulation eine signifikante Steigerung der $[3-^{13}\text{C}]$ Laktataufnahme zu verzeichnen war. Die Analyse der mRNA-Expression der Transporter MCT-1 und -4 bestätigte deren Expression in Monozyten [294]. Es wurde jedoch kein Einfluss von LPS auf die *MCT-1*- oder *MCT-4*-mRNA-Expression festgestellt (Daten nicht gezeigt). Um eine endgültige Aussage bezüglich der LPS-induzierten Expression von MCTs in Monozyten treffen zu können, müsste eine Untersuchung auf Proteinebene durchgeführt werden. Die beobachtete konstitutive Aufnahme von $[3-^{13}\text{C}]$ Laktat durch die Monozyten könnte im Kotransport mit im Medium vorliegenden Protonen über MCTs, aber auch über einen

anderen Laktattransporter, möglicherweise über einen Natrium-gekoppelten MCT [295], stattgefunden haben.

Die Aktivierung von Monozyten, aber auch anderen Immunzellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Lymphozyten, scheint stark von der Glykolyse abhängig zu sein [69-72]. Aus diesem Grund wurden im Rahmen der Untersuchung des Einflusses von Milchsäure auf die Glykolyse zunächst die Glukoseaufnahme und die Laktatproduktion der Monozyten nach Aktivierung analysiert. Nach LPS-Stimulation der Monozyten wurde keine Veränderung der Glukoseaufnahme, aber eine signifikante Zunahme der Laktatproduktion festgestellt. Im Gegensatz dazu fanden Marsin et al. sowie Orlinska et al. bei Stimulation von Monozyten eine gesteigerte Glukoseaufnahme [71, 73]. Marsin et al. berichteten darüber hinaus, dass bei Inkubation von Monozyten mit LPS die Synthese von Fruktose-2,6-Bisphosphat induziert wird [71]. Fruktose-2,6-Bisphosphat ist ein Aktivator der 6-Phosphofruktose-1-Kinase (PFK-1), des wichtigsten regulatorischen Enzyms der Glykolyse [257]. Eine erhöhte Aktivität der PFK-1 zusammen mit einer gesteigerten Laktatproduktion wurde auch bei aktivierten Ratten-Makrophagen festgestellt [69]. Rodríguez-Prados et al. stellten nach Stimulation von Makrophagen mit unterschiedlichen TLR-Liganden ebenfalls eine verstärkte Glukoseaufnahme sowie eine gesteigerte Laktatproduktion fest [296]. Jantsch et al. fanden eine erhöhte Glukoseaufnahme und Laktatproduktion in aktivierten dendritischen Zellen [70]. Von einer vermehrten Laktatproduktion bei Stimulation muriner Makrophagen wurde auch durch Cramer et al. berichtet [74]. Beide Gruppen zeigten außerdem, dass die Stimulation der Glykolyse durch eine Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF)-1 α (auch bei Normoxie) erfolgt [70, 74]. Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Glukoseaufnahme der Monozyten nicht verändert wurde, zeigt die gesteigerte Laktatproduktion, dass die Glykolyserate durch die LPS-Stimulation gesteigert wurde. Ein möglicher Grund für die unveränderte Glukoseaufnahme trotz gesteigerter Laktatproduktion ist, dass infolge der LPS-Stimulation weniger Pyruvat zur Energiegewinnung in die Mitochondrien transportiert wurde. Dafür spricht auch der reduzierte Sauerstoffverbrauch der Monozyten nach LPS-Aktivierung.

Da die Monozyten nach Aktivierung Laktat produzierten, stellte sich die Frage, ob sich diese endogene Laktatproduktion ebenfalls auf die TNF-Sekretion der Monozyten auswirken könnte. Es zeigte sich, dass die TNF-Konzentration in den Kulturüberständen nach 17 Stunden abgenommen, die Laktatkonzentration dagegen deutlich zugenommen hatte. Darüber hinaus wurde im Vergleich zu unstimulierten Zellen nach LPS-Stimulation ein geringfügig niedrigerer pH-Wert des Kulturmediums festgestellt. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine endogene Sekretion von Laktat und

Protonen, also Milchsäure, einen negativen Rückkopplungs-Effekt auf die TNF-Sekretion von Monozyten hat.

Extrazelluläre Milchsäure reduzierte die Glukoseaufnahme der Monozyten. Die Analyse der Aminosäurekonzentrationen im Kulturüberstand zeigte, dass die verminderte Glukoseaufnahme nicht durch die Aufnahme alternativer Kohlenstoffquellen (z.B. Glutamin) ausgeglichen wurde. Darüber hinaus reduzierte die Inkubation mit Milchsäure die Sekretion von [2,3-¹³C₂]Laktat, dem Laktatisotop, das bei Verstoffwechslung von [1,2-¹³C₂]Glukose in der Glykolyse entsteht. Auch die Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 6,6 sowie die Inkubation mit Natriumlaktat hatten einen moderaten Effekt auf beide Parameter. Die reduzierte Glukoseaufnahme und die geringeren Mengen an [2,3-¹³C₂]Laktat im Kulturüberstand deuten auf eine unterschiedlich ausgeprägte Inhibition des glykolytischen Flusses durch Milchsäure, Ansäuerung und durch Natriumlaktat hin. Die Inkubation der Monozyten mit 2-Deoxyglukose, einem kompetitiven Inhibitor der Hexokinase [261], zeigte, dass sich eine Inhibition des glykolytischen Flusses in einem deutlich reduzierten Export von Laktat äußert.

Extrazelluläre Milchsäure führte darüber hinaus zu einer signifikanten Anreicherung von intrazellulärem Laktat. Dies lässt sich durch die Transporteigenschaften der MCTs erklären, die Laktat zwischen dem intra- und extrazellulären Milieu in Abhängigkeit der Konzentrationsverhältnisse von Laktat und Protonen transportieren [259, 260]. Demzufolge führte die Anwesenheit von extrazellulärer Milchsäure zur Veränderung der Transportrichtung der MCTs: sie transportierten extrazelluläres Laktat ([¹²C]Laktat) in die Zellen, was einen Export des in der Glykolyse produzierten [2,3-¹³C₂]Laktats verhinderte. Auch die Ansäuerung des Kulturmediums auf pH 6,6 rief einen ähnlichen Effekt hervor, denn die hohe extrazelluläre Konzentration an Protonen verhinderte den Export von glykolytischem Laktat. Obwohl kein Laktat extrazellulär zugegeben wurde, sammelte sich auch hier unmarkiertes Laktat ([¹²C]Laktat) intrazellulär an. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine Blockierung des Exports von bereits vor Beginn der Inkubation der Monozyten gebildetem intrazellulärem Laktat sein. Da auch die Inkubation mit Natriumlaktat zu einer Veränderung der Konzentrationsverhältnisse zwischen intra- und extrazellulärem Milieu führte, erfolgte hier ebenso ein leichter, aber nicht signifikanter Einstrom von [¹²C]Laktat in die Zellen sowie eine schwache Anreicherung von [2,3-¹³C₂]Laktat. Interessanterweise zeigten Costa Leite et al., dass Laktat die Dissoziation des aktiven PFK-1-Tetramers in weniger aktive Dimere induziert, dadurch die Aktivität der PFK-1 herabsetzt und den glykolytischen Fluss reduziert [258]. Aus diesem Grund könnte die in der vorliegenden Arbeit beobachtete intrazelluläre Anreicherung von Laktat zu einer reduzierten Aktivität der PFK-1 geführt haben, was letztendlich die Abnahme des glykolytischen Flusses in Monozyten verursacht haben könnte. Dröge et al. zeigten, dass

extrazelluläres Laktat die Glukoseaufnahme von murinen T-Lymphozyten inhibiert [297]. Murray et al. fanden, dass ein pharmakologischer Eingriff in die Aktivität von MCT-1 bei T-Lymphozyten zu einer Inhibition des glykolytischen Flusses führt [298].

Auch der Sauerstoffverbrauch von Monozyten wurde durch die LPS-Aktivierung reduziert. Somit scheint es durch die LPS-Stimulation nicht nur zu einer Steigerung der Glykolyserate, sondern auch zu einer Reduktion der Atmung zu kommen. Der gesteigerte Sauerstoffverbrauch der mit LPS und 20 mM Milchsäure inkubierten Monozyten impliziert, dass der durch die Inhibition des glykolytischen Flusses bedingte Energieverlust zeitweise durch eine gesteigerte Respiration ausgeglichen wird. Der Sauerstoffverbrauch der Monozyten kehrte nach ca. vier Stunden auf das Niveau der LPS-stimulierten Zellen zurück. Die Messung intrazellulärer ATP-Konzentrationen ergab, dass der ATP-Gehalt der Monozyten bei Inkubation mit LPS und Milchsäure oder Natriumlaktat geringer war als bei Inkubation mit LPS alleine. Dies zeigt, dass die Inhibition des glykolytischen Flusses den Energiehaushalt der Monozyten über längere Zeit hinweg störte. Auch nach Inkubation der Monozyten in Kulturmedium mit pH 6,6 wurde ein reduzierter ATP-Gehalt gefunden. Anders als bei Inkubation mit Milchsäure scheint dies vor allem durch die stark reduzierte Atmung, die bei Ansäuerung des Kulturmediums beobachtet wurde, verursacht worden zu sein. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Ansäuerung auch Effekte auf Monozyten hatte, die durch Milchsäure nicht hervorgerufen wurden.

Schließlich wurde untersucht, wie sich eine Inhibition des glykolytischen Flusses auf die TNF-Sekretion der Monozyten auswirkt. Die Inkubation von Monozyten mit dem Glykolyseinhibitor 2-Deoxyglukose resultierte, wie auch teils bei Inkubation mit 20 mM Milchsäure beobachtet, in einer gesteigerten Respiration, die den glykolytischen Energieverlust jedoch nicht kompensierte. Darüber hinaus wurde die TNF-Sekretion durch 2-Deoxyglukose reduziert. Dagegen hatte Rotenon, welches sich auch in der vorliegenden Arbeit als Inhibitor der oxidativen Phosphorylierung erwies [262], keinen deutlichen Effekt auf die TNF-Sekretion der Monozyten. Dies bestätigt, dass die Glykolyse für die Zytokinsekretion der Monozyten von großer Bedeutung ist. In Übereinstimmung damit zeigten Orlinska et al. sowie Guida et al., dass eine effektive Sekretion von TNF bzw. IL-1 durch humane Monozyten nur bei ausreichender Glukoseversorgung stattfindet [73, 83]. Die Bedeutung der Glykolyse für die inflammatorische Antwort myeloider Zellen wird auch in der Arbeit von Cramer et al. deutlich: sie stellten bei funktioneller Inaktivierung von HIF-1 α eine reduzierte TNF-Sekretion fest [74]. Die Ergebnisse zur Wirkung von 2-Deoxyglukose auf Monozyten verdeutlichen darüber hinaus die Problematik der Anwendung von 2-Deoxyglukose zur Inhibition des Glukosemetabolismus von Tumorzellen in der Tumorthherapie [299]. Durch die gleichzeitige Inhibition der Glykolyse in Monozyten (und möglicherweise anderen Immunzellen), kommt es im

Tumormilieu durch einen weiteren Faktor zur Reduktion der Sekretion von TNF, eines Zytokins, das eine Antitumor-Antwort des Immunsystems auslösen könnte [126].

Somit zeigen die Ergebnisse der Analyse des Glukosemetabolismus, dass Milchsäure und die entsprechende Ansäuerung eine Inhibition der Glykolyse in humanen Monozyten verursachen. Dieser Effekt wurde in stark abgeschwächter Form auch durch Natriumlaktat hervorgerufen. Weiterhin wurde demonstriert, dass eine Inhibition der Glykolyse Effekte auf die TNF-Sekretion der Monozyten haben kann. Dies könnte ein möglicher Weg sein, wie Milchsäure insbesondere auch in niedrigen Konzentrationen zu einer Inhibition der TNF-Sekretion der Monozyten beitragen könnte.

6.2.2.2 Einfluss von Milchsäure auf die Genexpression

Um den Effekt der Milchsäure auf humane Monozyten weiter zu untersuchen, wurde eine globale Analyse mittels RNA-Expressionsarray durchgeführt. Dabei wurde nach Genen gesucht, die innerhalb einer einstündigen Inkubation mit LPS eine signifikante Expressionsänderung gegenüber der Kontrolle aufwiesen und ebenfalls einen deutlichen Unterschied zwischen 20 mM Milchsäure und der entsprechenden Ansäuerung zeigten.

Die Suche nach einer signifikanten Anreicherung von „Gene Ontology“ (GO)-Begriffen innerhalb der durch die Clusteranalyse ermittelten Gene ergab erwartungsgemäß eine starke Anreicherung von Begriffen, die mit einer ablaufenden Immunantwort in Verbindung stehen (z.B. Zytokinaktivität, Immunantwort, Reaktion auf Verwundung, Chemokinaktivität). Somit ist davon auszugehen, dass neben den bereits auf Proteinebene untersuchten Zytokinen die Sekretion weiterer Zytokine oder Chemokine durch Milchsäure beeinflusst wird. Darüber hinaus waren aber auch mit anderen zellulären Funktionen assoziierte GO-Begriffe signifikant angereichert. Dies impliziert, dass Milchsäure einen Einfluss auf unterschiedlichste zelluläre Abläufe in Monozyten haben könnte.

Obwohl Milchsäure einen ausgeprägten Einfluss auf die Glykolyse der Monozyten hatte, befand sich interessanterweise in der hierarchischen Gruppierung kein Gen, dessen Funktion eine Assoziation zum Glukosestoffwechsel aufweist. Rodríguez-Prados et al. zeigten, dass die LPS-Stimulation von murinen Makrophagen von einer Hochregulation von Genen, die für glykolytische Enzyme kodieren, begleitet wird. Gleichzeitig fanden sie eine Herunterregulation von Genen, deren Proteinprodukte in Citratzyklus und Atmung involviert sind [296]. Chen et al. stellten bei einer genomweiten Expressionsanalyse in humanen Epithelzellen einen negativen Einfluss von Milchsäure auf die Expression von Genen, die für glykolytische Enzyme kodieren, fest [300]. Wahrscheinlich wurde in der

vorliegenden Arbeit kein Einfluss von Milchsäure auf Gene für glykolytische Enzyme gefunden, weil Milchsäure die Glykolyse auf Ebene der Proteinregulation und nicht auf Genexpressionsebene beeinflusste.

Wie bereits im Zusammenhang mit der Sekretion von TNF beobachtet, war auch bei Analyse der Genexpression ein ausgeprägter früher Einfluss von Milchsäure auf die Monozyten zu erkennen. Dabei hatten Milchsäure und häufig auch die entsprechende Ansäuerung innerhalb einer Stunde fast ausschließlich negative Effekte auf die LPS-induzierte Genexpression. Auch Chen et al. beobachteten einen teils pH-abhängigen Einfluss der Milchsäure auf die Genexpression humaner Epithelzellen. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der Milchsäure meist nicht bei Inkubation mit Natriumlaktat hervorgerufen [300].

Unter den in der frühen Inkubationsphase durch Milchsäure beeinflussten Genen befand sich *TNF*. Milchsäure inhibierte somit nicht nur die TNF-Sekretion, sondern auch dessen Expression innerhalb einer frühen Inkubationsphase. Im Gegensatz zur TNF-Sekretion, die durch pH 6,6 ähnlich wie durch 20 mM Milchsäure beeinflusst wurde, wurde auf mRNA-Ebene nur ein schwacher Einfluss der Ansäuerung festgestellt. Dies könnte implizieren, dass die Effekte der Milchsäure und der entsprechenden Ansäuerung auf die TNF-Sekretion unterschiedliche Ursachen haben. Beispielsweise beobachteten Heming et al. eine reduzierte TNF-Sekretion bei pH 6,5, die sie nicht auf eine verminderte mRNA-Expression, sondern auf einen reduzierten Export des TNF-Proteins zurückführten [284]. Neben TNF wurden auch *IL-8*, *PTX3* und *LIF* früh durch Milchsäure beeinflusst. Da die Proteinprodukte dieser drei Gene im Laufe einer Immunantwort gebildet werden [263, 264, 301], könnten diese Gene weitere Beispiele für die Modulation der Funktion von Monozyten durch Milchsäure darstellen.

Entgegen der frühen ausgeprägten Wirkung der Milchsäure auf die Genexpression der Monozyten waren nach vier Stunden nur noch vereinzelte Effekte zu finden. Beispiele für länger durch Milchsäure (und teilweise durch Ansäuerung) beeinflusste Gene, deren Proteinprodukte sezerniert werden, waren *CCL2*, *CCL7* und *IL-23A* [36, 51, 265]. Auch *IL-7*, dessen Gen im Rahmen der Auswertung der Arrays auffiel, wird sezerniert [275] und wurde länger durch Milchsäure und die entsprechende Ansäuerung beeinflusst. Somit könnten die durch diese Gene kodierten Proteine Beispiele für einen längerfristigen Einfluss von Milchsäure auf die Funktion von Monozyten sein. Im Gegensatz zu Shime et al., die einen Effekt der Milchsäure, nicht aber der entsprechenden Ansäuerung auf die Expression von *IL-23A* und die Sekretion des protumoralen Zytokins IL-23 in humanen Monozyten beobachteten [36], wurde die Expression dieses Gens in der vorliegenden Arbeit durch Natriumlaktat, Milchsäure und die entsprechende Ansäuerung induziert. Auch Witkin et al. beobachteten in PBMCs eine Induktion der IL-23-Sekretion durch

Milchsäure, nicht aber durch die entsprechende Ansäuerung [181]. Möglicherweise ist auch dieser Unterschied zwischen der vorliegenden Dissertation und den Arbeiten von Shime et al. und Witkin et al. auf die variierenden experimentellen Bedingungen zurückzuführen (siehe 6.2.1), denn bei beiden Gruppen fand eine 24-stündige Vorinkubation der jeweiligen Zellen mit Milchsäure statt.

Auch die Expression des *GEM*-Gens (GTP-binding protein overexpressed in skeletal muscle), dessen Proteinprodukt eine Rolle in der Umstrukturierung des Zytoskeletts und bei der Kontrolle der Aktivität spannungsabhängiger Kalziumkanäle spielt [273], wurde noch nach 17-stündiger Inkubationszeit durch Milchsäure beeinflusst. Dies impliziert, dass Milchsäure auch über einen längeren Zeitraum hinweg verschiedenste intrazelluläre Mechanismen bei Monozyten verändert.

Interessanterweise wurde die Expression des „*early growth response 2*“ (*EGR2*)-Gens auch nach längerer Inkubation besonders durch Milchsäure reduziert. Da *EGR2* für einen Transkriptionsfaktor kodiert [271], könnte eine reduzierte Expression von *EGR2* bei Inkubation mit Milchsäure die Expression weiterer Gene beeinflussen.

Bei der Analyse von Genen, die nicht in der hierarchischen Gruppierung enthalten waren, zeigte sich außerdem, dass die mRNA-Expression des *STAT3*-Gens zunächst durch Milchsäure und nach 17-stündiger Kultur auch durch die Ansäuerung reduziert wurde. Da *STAT3* ebenfalls für einen Transkriptionsfaktor kodiert, der darüber hinaus häufig in Tumor-assoziierten Immunzellen aktiv ist [124], könnte Milchsäure auch über *STAT3* die Genexpression der Monozyten beeinflussen.

Da Milchsäure vor allem frühe Effekte auf die LPS-induzierte Genexpression hatte, die bei vielen Genen nach vier Stunden nicht mehr vorlagen, wurde vermutet, dass Milchsäure die frühe LPS-Antwort der Monozyten verzögert. Tatsächlich wurde der LPS-stimulierte Abbau des Inhibitors von $\kappa\text{B } \alpha$ ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), der zur Translokation des nukleären Faktors κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) in den Zellkern erfolgen muss [23], durch 20 mM Milchsäure verlangsamt. Auch die Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt), die ebenfalls nach LPS-Stimulation stattfindet und für deren Aktivität erforderlich ist [23], war bei Inkubation der Monozyten mit LPS und 20 mM Milchsäure mit zeitlicher Verzögerung erkennbar. In beiden Fällen wurde ebenfalls ein schwacher Effekt der entsprechenden Ansäuerung detektiert. Die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinase p38 wurde dagegen durch Milchsäure kaum beeinflusst.

In Übereinstimmung mit den Daten der vorliegenden Arbeit stellten Wantanabe et al. nach einstündiger Inkubation der monozytären Zelllinie THP-1 mit LPS und Milchsäure eine größere intrazelluläre Menge an $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ im Vergleich zu LPS-stimulierten Zellen fest. Ein Effekt von Milchsäure auf die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (ERKs), die ebenfalls zur Familie der MAP-Kinasen gehören [23], wurde von ihnen nicht gefunden

[185]. Auch die Ergebnisse anderer Gruppen sprechen für eine Wirkung von Milchsäure oder der entsprechenden Ansäuerung auf die LPS-induzierten Aktivierung von NF- κ B: Douvdevani et al. berichteten nach Inkubation humaner Makrophagen mit Peritonealdialyseflüssigkeit von einer reduzierten Bindung von NF- κ B an die DNA [184]. Eine verminderte LPS-induzierte Bindung von NF- κ B an die DNA fanden auch Kellum et al. bei Inkubation einer murinen Makrophagen-Zelllinie mit Milchsäure [286]. Sie stellten auch nach Inkubation der Zellen in Kulturmedium mit pH 6,5 eine reduzierte Bindung von NF- κ B an die DNA fest, was für einen säureabhängigen Effekt spricht.

Mit dem verzögerten Abbau von I κ B α , der verzögerten Aktivierung von Akt sowie der Inhibition der Glykolyse wurden in dieser Arbeit verschiedene Mechanismen gefunden, über die Milchsäure die Funktion der Monozyten beeinflussen könnte. Tabelle 6-1 bietet einen Überblick über das zeitliche Auftreten einiger beobachteter Effekte der Milchsäure auf die Monozyten und deren Sensitivität gegenüber Milchsäure. Sowohl die Parameter, die möglicherweise dem Mechanismus der Milchsäurewirkung zugeordnet werden können, als auch die Parameter, die eine Aussage über die Funktion der Monozyten unter Milchsäureeinfluss zulassen, wurden, wie in der Tabelle zu sehen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. unterschiedlich stark beeinflusst.

Tabelle 6-1: Überblick über das zeitliche Auftreten verschiedener beobachteter Effekte von Milchsäure (MS) und deren Sensitivität

Zuordnung des Parameters	untersuchter Parameter	deutlicher früher Effekt (bis 1 h)	anhaltender/später Effekt (bis 17 bzw. 18 h)
möglicher Mechanismus der Wirkung von Milchsäure auf die Monozyten	I κ B α , phospho-Akt	20 mM MS	-
	Glykolyse	-	(5), 10, 20 mM MS
Einfluss von Milchsäure auf die Funktion der Monozyten	TNF-Protein	-	5, 10, 20 mM MS
	IL-6-Protein	-	20 mM MS
	Genexpression (z.B. <i>TNF</i> , <i>IL-8</i>)	20 mM MS	-
	Genexpression (z.B. <i>EGR2</i> , <i>STAT3</i> , <i>GEM</i> , <i>CCL2</i> , <i>CCL7</i>)	-	20 mM MS

NF- κ B kontrolliert die Expression zahlreicher Zytokine, darunter auch TNF [23]. Der direkte Einfluss von 20 mM Milchsäure (und der entsprechenden Ansäuerung) auf die Aktivierung der LPS-abhängigen Signaltransduktion könnte somit für die beobachteten frühen Effekte von 20 mM Milchsäure (und der entsprechenden Ansäuerung) auf die Expression von *TNF* und anderer Gene verantwortlich sein. Fraglich ist jedoch, ob die Verzögerung der LPS-abhängigen Signaltransduktion die längerfristigen Effekte von Milchsäure auf die Genexpression (z.B. *CCL2*, *CCL7*) der Monozyten verursacht. Möglicherweise sind diese längerfristigen Effekte auf die Genexpression durch den Einfluss der Milchsäure auf die Expression von Genen, die für Transkriptionsfaktoren oder Signalproteine kodieren (z.B. *EGR2*, *STAT3*, *GEM*), zu erklären.

Die reduzierte Expression des *TNF*-Gens trug sehr wahrscheinlich zur verminderten TNF-Sekretion der Monozyten nach Inkubation mit Milchsäure bei. Jedoch wurde die Sekretion von TNF bereits bei sehr geringen Milchsäurekonzentrationen eindeutig inhibiert. Da bei diesen Konzentrationen keine Effekte auf den Abbau von I κ B α und die Aktivierung von Akt gesehen wurden, muss diese Inhibition unabhängig davon stattgefunden haben.

Die bei hohen Milchsäurekonzentrationen beobachtete Verzögerung der LPS-abhängigen Signaltransduktion könnte auch zur Inhibition der Glykolyse beigetragen haben, denn Akt steigert z.B. die Glukoseaufnahme von Zellen, indem es die Translokation des Glukosetransporters (GLUT)-4 zur Zytoplasmamembran induziert. Des Weiteren erhöht es die Glykolyserate durch Aktivierung der Hexokinase und Stimulation der PFK-1 [94, 95]. Interessanterweise wurde die Glykolyse ebenfalls bereits bei geringen Milchsäurekonzentrationen inhibiert. Darüber hinaus war der Effekt der Milchsäure auf die Glykolyse weitaus länger detektierbar als der Effekt auf die LPS-abhängige Signaltransduktion. Somit kann der Effekt der Milchsäure auf den Abbau von I κ B α und die Aktivierung von Akt auch nicht der alleinige Grund für die Inhibition des glykolytischen Flusses gewesen sein. Die bereits geschilderte intrazelluläre Akkumulation von Laktat (siehe 6.2.2.1), die auch bei geringen Milchsäurekonzentrationen vorlag, könnte jedoch durchaus hinter der Inhibition des glykolytischen Flusses stehen.

Nachdem sich eine Inhibition der Glykolyse auf die TNF-Sekretion auswirken kann, könnte der Einfluss von Milchsäure (und Ansäuerung) auf die Glykolyse für die beobachtete sensitive und lang anhaltende Inhibition der TNF-Sekretion verantwortlich sein.

Die IL-6-Sekretion der Monozyten wurde nach längerer Kulturdauer nur relativ schwach durch 20 mM Milchsäure und nicht durch die entsprechende Ansäuerung (Daten nicht gezeigt) beeinflusst. Deshalb ist fraglich, ob der Einfluss der Milchsäure auf die Glykolyse oder die LPS-induzierte Signaltransduktion den Effekt auf die IL-6-Sekretion hervorrief. Möglicherweise trägt aber die reduzierte Expression des *STAT3*-Gens zur reduzierten

Sekretion von IL-6 bei, denn STAT3 kontrolliert unter anderem die Expression von *IL-6* [124].

Somit könnten die Ursachen für die Modulation der verschiedenen Funktionen aktivierter Monozyten durch Milchsäure in deren Einfluss auf die Glykolyse, die Genexpression oder die LPS-Aktivierung liegen. Das Wissen über den Mechanismus der Wirkung von Tumormetaboliten auf Immunzellen könnte wichtige Hinweise für die Entwicklung selektiver Strategien zur Modulation des Tumormetabolismus im Rahmen von Antitumor-Therapien liefern. Aus diesem Grund sollte in weiteren Untersuchungen der Zusammenhang zwischen den in dieser Arbeit gefundenen durch Milchsäure beeinflussten Funktionen und Wirkmechanismen ermittelt werden.

7 Zusammenfassung

Tumorzellen weisen im Vergleich zu untransformierten Zellen häufig metabolische Dysregulationen auf. Beispielsweise können viele Tumorzellen aufgrund einer Defizienz der MTA-Phosphorylase (MTAP) das im Rahmen der Polyaminsynthese entstehende Nucleosid 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) nicht abbauen. Dies führt zur Akkumulation von MTA im Tumormilieu. Da bereits immunmodulatorische Effekte verschiedener Tumormetaboliten bekannt waren, wurde in dieser Arbeit der Einfluss des Tumormetaboliten MTA unter den im Tumormilieu vorherrschenden inflammatorischen Bedingungen auf humane Monozyten untersucht. MTA hatte bereits in relativ geringen und möglicherweise physiologischen Konzentrationen eindeutig positive Effekte auf die Sekretion der Zytokine Interleukin (IL)-6 und IL-10 durch Monozyten, die auch bei suboptimaler Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation auftraten. Die Sekretion des Zytokins Tumornekrosefaktor (TNF) wurde nur in Gegenwart suboptimaler LPS-Konzentrationen durch relativ geringe MTA-Konzentrationen stimuliert. Höhere MTA-Konzentrationen reduzierten die TNF-Sekretion nicht aktivierter Monozyten und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) durch die Monozyten.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Wirkung von MTA auf Monozyten über Adenosinrezeptoren vermittelt wird. Obwohl die Monozyten Adenosinrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimierten, wurde bei Analyse intrazellulärer cAMP- und Kalziumkonzentrationen kein Effekt von MTA festgestellt. Bei gleichzeitiger Inkubation von Monozyten mit MTA und Adenosinrezeptorantagonisten wurde die IL-6-Antwort nicht inhibiert. Dies deutet darauf hin, dass die Effekte auf die Zytokinsekretion und die ROS-Produktion der Monozyten nicht über Adenosinrezeptoren vermittelt werden.

Das wohl bekannteste Beispiel eines veränderten Stoffwechselweges in Tumorzellen stellt die Glykolyse dar. Infolge der starken glykolytischen Aktivität von Tumorzellen produzieren diese Laktat, welches im Kotransport mit Protonen, also als Milchsäure, aus den Zellen exportiert wird und im Tumormilieu akkumuliert. Der Einfluss von Milchsäure unter den im Tumormilieu vorherrschenden inflammatorischen Bedingungen auf humane Monozyten stand im Mittelpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit. Da Milchsäure zu einer extrazellulären Ansäuerung führt, wurden parallel zu dem Einfluss von Milchsäure auch der Einfluss von Natriumlaktat, des Natriumsalzes der Milchsäure sowie der Effekt des reduzierten pH-Werts auf die Monozyten studiert. Milchsäure hatte bereits in geringen Konzentrationen einen ausgeprägten Effekt auf die LPS-stimulierte TNF-Sekretion der Monozyten. Bei hohen Milchsäurekonzentrationen wurde dieser Effekt auch durch die entsprechende Ansäuerung, aber nicht durch Laktat hervorgerufen. Dieser Einfluss der

Milchsäure auf die TNF-Sekretion wurde bei Kokultur humaner Monozyten mit multizellulären Tumorsphäroiden bestätigt. Neben TNF wurde auch die LPS-stimulierte Sekretion von IL-6 durch hohe Milchsäurekonzentrationen, nicht aber durch die entsprechende Ansäuerung oder durch Laktat inhibiert. Die Produktion von ROS durch Monozyten wurde bei hohen Milchsäurekonzentrationen pH-abhängig supprimiert.

Analysen zum Mechanismus der Wirkung von Milchsäure auf Monozyten zeigten, dass Laktat, durch die Monozyten aufgenommen wird. Darüber hinaus wurden in Anwesenheit von Milchsäure eine Abnahme der LPS-induzierten Glukoseaufnahme sowie eine reduzierte Laktatsekretion festgestellt. Die entsprechende Ansäuerung und extrazelluläres Laktat hatten einen moderaten Effekt auf beide Parameter. Bei Inkubation mit Milchsäure und entsprechender Ansäuerung wurde außerdem eine intrazelluläre Akkumulation von Laktat beobachtet, die nur sehr schwach bei Inkubation mit Laktat auftrat. Diese Daten implizieren, dass extrazelluläre Milchsäure und in abgeschwächter Weise auch die entsprechende Ansäuerung bzw. Laktat die Glykolyse der Monozyten inhibieren. Eine Inhibition der Glykolyse durch 2-Deoxyglukose suppressierte ebenfalls die TNF-Sekretion der Monozyten. Dies bestätigt die bereits bekannte Relevanz der Glykolyse für die Zytokinsekretion von Monozyten und zeigt, dass niedrige Milchsäurekonzentrationen wahrscheinlich über die Inhibition der Glykolyse die TNF-Sekretion supprimieren.

Bei einer genomweiten Analyse mittels RNA-Expressionsarrays wurde eine ausgeprägte Verzögerung der LPS-induzierten Genexpression in Monozyten durch Milchsäure festgestellt. Dieser Effekt wurde nur teilweise durch die entsprechende Ansäuerung, nicht aber durch Natriumlaktat hervorgerufen. Innerhalb der erstellten Clusteranalyse wurde eine signifikante Anreicherung von verschiedenen „Gene Ontology“-Begriffen gefunden, die mit einer Immunantwort, aber auch anderen zellulären Abläufen in Verbindung stehen. Die Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener Gene bestätigte das Ergebnis der Arrays und zeigte, dass Milchsäure teils auch längerfristige Effekte auf die Genexpression hatte. In Übereinstimmung mit der Arrayanalyse konnte schließlich demonstriert werden, dass Milchsäure und in geringerem Ausmaß auch die entsprechende Ansäuerung den LPS-induzierten Abbau des Inhibitors von κB α ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) sowie die Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt) verzögern. Dies zeigt, dass im Wesentlichen hohe Milchsäurekonzentrationen über die kurzfristige Blockierung der LPS-abhängigen Signaltransduktion die Genexpression transient beeinflussen. Die daneben auftretenden lang anhaltenden Effekte auf die Genexpression könnten unter anderem über die Herunterregulation von Transkriptionsfaktoren oder Signalproteinen bedingt sein.

Die Ergebnisse zum Einfluss der Tumormetaboliten MTA und Milchsäure auf humane Monozyten zeigen, dass der dysregulierte Stoffwechsel von Tumoren wichtige Funktionen

von Monozyten beeinträchtigt und so zur Veränderung der Immunantwort im Tumormilieu beiträgt. Darüber hinaus verdeutlichen die Beispiele Milchsäure und MTA, dass die Modulation von Immunzellen durch Tumormetaboliten über verschiedene Mechanismen stattfinden kann: MTA fördert durch die Induktion von IL-6 und IL-10 eine protumorale Immunantwort. Im Gegensatz dazu trägt die bereits bei geringen Milchsäurekonzentrationen auftretende Inhibition der TNF-Sekretion zur Suppression einer Antitumor-Antwort des Immunsystems bei. Eine genaue Kenntnis der Wirkmechanismen verschiedener Tumormetaboliten auf Immunzellen ist nötig, um die komplexen Wechselwirkungen zwischen Tumorzellen und Immunzellen zu verstehen und mit diesem Wissen selektive Strategien zur Modulation des Tumormetabolismus im Rahmen von Antitumor-Therapien zu entwickeln.

8 Literaturverzeichnis

1. Abbas, A. K., A. H. Lichtmann, and Pillai S. 2007. *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier-Verlag.
2. Stix G. 2009. Bösartige Entzündungen. *Spektrum der Wissenschaft Dossier* 3:24-31.
3. Robbins, C. S. and F. K. Swirski. 2010. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell Mol.Life Sci.* 67:2685-2693.
4. Tacke, F. and G. J. Randolph. 2006. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211:609-618.
5. Gordon, S. and P. R. Taylor. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat.Rev.Immunol.* 5:953-964.
6. Serbina, N. V., T. Jia, T. M. Hohl, and E. G. Pamer. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu.Rev.Immunol.* 26:421-452.
7. Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. Macpherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn, and M. B. Lutz. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116:e74-e80.
8. Ancuta, P., R. Rao, A. Moses, A. Mehle, S. K. Shaw, F. W. Luscinskas, and D. Gabuzda. 2003. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J.Exp.Med.* 197:1701-1707.
9. Soehnlein, O., L. Lindbom, and C. Weber. 2009. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood* 114:4613-4623.
10. Bigley, V., M. Haniffa, S. Doulatov, X. N. Wang, R. Dickinson, N. McGovern, L. Jardine, S. Pagan, I. Dimmick, I. Chua, J. Wallis, J. Lordan, C. Morgan, D. S. Kumararatne, R. Doffinger, B. M. van der, J. van Dongen, A. Cant, J. E. Dick, S. Hambleton, and M. Collin. 2011. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J.Exp.Med.* 208:227-234.
11. Strauss-Ayali, D., S. M. Conrad, and D. M. Mosser. 2007. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J.Leukoc.Biol.* 82:244-252.
12. Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 20:197-216.
13. Kawai, T. and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat.Immunol.* 11:373-384.
14. Hasan, U., C. Chaffois, C. Gaillard, V. Saulnier, E. Merck, S. Tancredi, C. Guiet, F. Briere, J. Vlach, S. Lebecque, G. Trinchieri, and E. E. Bates. 2005. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J.Immunol.* 174:2942-2950.

15. O'Neill, L. A. J. 2008. Das immunologische Frühwarnsystem. *Spektrum der Wissenschaft Dossier* 3:6-13.
16. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
17. Schumann, R. R. 1992. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res.Immunol.* 143:11-15.
18. Schumann, R. R., S. R. Leong, G. W. Flaggs, P. W. Gray, S. D. Wright, J. C. Mathison, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch. 1990. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1429-1431.
19. Peri, F., M. Piazza, V. Calabrese, G. Damore, and R. Cighetti. 2010. Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules. *Biochem.Soc.Trans.* 38:1390-1395.
20. Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, and L. A. O'Neill. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.
21. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat.Immunol.* 4:1144-1150.
22. Kagan, J. C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov. 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat.Immunol.* 9:361-368.
23. Li, X., S. Jiang, and R. I. Tapping. 2010. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* 49:1-9.
24. Bianchi, M. E. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J.Leukoc.Biol.* 81:1-5.
25. Zhang, X. and D. M. Mosser. 2008. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J.Pathol.* 214:161-178.
26. Vogl, T., K. Tenbrock, S. Ludwig, N. Leukert, C. Ehrhardt, M. A. van Zoelen, W. Nacken, D. Foell, P. T. van der, C. Sorg, and J. Roth. 2007. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat.Med.* 13:1042-1049.
27. Ehrchen, J. M., C. Sunderkotter, D. Foell, T. Vogl, and J. Roth. 2009. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J.Leukoc.Biol.* 86:557-566.
28. Tsung, A., N. Zheng, G. Jeyabalan, K. Izuishi, J. R. Klune, D. A. Geller, M. T. Lotze, L. Lu, and T. R. Billiar. 2007. Increasing numbers of hepatic dendritic cells promote HMGB1-mediated ischemia-reperfusion injury. *J.Leukoc.Biol.* 81:119-128.
29. Ohashi, K., V. Burkart, S. Flohe, and H. Kolb. 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J.Immunol.* 164:558-561.

30. Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, S. Ghose, C. J. Kirschning, R. D. Issels, and H. Wagner. 2002. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J.Biol.Chem.* 277:15107-15112.
31. Szabo, G., C. L. Miller-Graziano, J. Y. Wu, T. Takayama, and K. Kodys. 1990. Differential tumor necrosis factor production by human monocyte subsets. *J.Leukoc.Biol.* 47:206-216.
32. Giambartolomei, G. H., V. A. Dennis, B. L. Lasater, and M. T. Philipp. 1999. Induction of pro- and anti-inflammatory cytokines by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins in monocytes is mediated by CD14. *Infect.Immun.* 67:140-147.
33. Kantari, C., M. Pederzoli-Ribeil, and V. Witko-Sarsat. 2008. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. *Contrib.Microbiol.* 15:118-146.
34. Dinarello, C. A. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118:503-508.
35. Naugler, W. E. and M. Karin. 2008. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol.Med.* 14:109-119.
36. Shime, H., M. Yabu, T. Akazawa, K. Kodama, M. Matsumoto, T. Seya, and N. Inoue. 2008. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J.Immunol.* 180:7175-7183.
37. Yang, X. O., A. D. Panopoulos, R. Nurieva, S. H. Chang, D. Wang, S. S. Watowich, and C. Dong. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J.Biol.Chem.* 282:9358-9363.
38. Jovanovic, D. V., J. A. Di Battista, J. Martel-Pelletier, F. C. Jolicoeur, Y. He, M. Zhang, F. Mineau, and J. P. Pelletier. 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J.Immunol.* 160:3513-3521.
39. Laan, M., Z. H. Cui, H. Hoshino, J. Lotvall, M. Sjostrand, D. C. Gruenert, B. E. Skoogh, and A. Linden. 1999. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J.Immunol.* 162:2347-2352.
40. Shahrara, S., S. R. Pickens, A. Dorfleutner, and R. M. Pope. 2009. IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. *J.Immunol.* 182:3884-3891.
41. Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 13:715-725.
42. Hesse, C., B. Andersson, and A. E. Wold. 2000. Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect.Immun.* 68:3581-3586.
43. Tominaga, K., T. Yoshimoto, K. Torigoe, M. Kurimoto, K. Matsui, T. Hada, H. Okamura, and K. Nakanishi. 2000. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int.Immunol.* 12:151-160.
44. Plataniias, L. C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 5:375-386.

45. Isaacs, A. and J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 147:258-267.
46. Ortaldo, J. R., A. Mantovani, D. Hobbs, M. Rubinstein, S. Pestka, and R. B. Herberman. 1983. Effects of several species of human leukocyte interferon on cytotoxic activity of NK cells and monocytes. *Int.J.Cancer* 31:285-289.
47. de Waal, M. R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, and J. E. de Vries. 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J.Exp.Med.* 174:1209-1220.
48. D'Andrea, A., M. Aste-Amezaga, N. M. Valiante, X. Ma, M. Kubin, and G. Trinchieri. 1993. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J.Exp.Med.* 178:1041-1048.
49. Bolger, A. P., R. Sharma, S. von Haehling, W. Doehner, B. Oliver, M. Rauchhaus, A. J. Coats, I. M. Adcock, and S. D. Anker. 2002. Effect of interleukin-10 on the production of tumor necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure. *Am.J.Cardiol.* 90:384-389.
50. Minty, A., P. Chalon, J. C. Guillemot, M. Kaghad, P. Liauzun, M. Magazin, B. Miloux, C. Minty, P. Ramond, N. Vita, and . 1993. Molecular cloning of the MCP-3 chemokine gene and regulation of its expression. *Eur.Cytokine Netw.* 4:99-110.
51. Charo, I. F. and R. M. Ransohoff. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N.Engl.J.Med.* 354:610-621.
52. Desjardins, M., L. A. Huber, R. G. Parton, and G. Griffiths. 1994. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J.Cell Biol.* 124:677-688.
53. Yamamoto, Y., T. W. Klein, and H. Friedman. 1997. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. *Infect.Immun.* 65:1077-1082.
54. Stein, M. and S. Gordon. 1991. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors. *Eur.J.Immunol.* 21:431-437.
55. Kaufmann, S. H. E. 2009. Mononukleäre Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen. In *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer.
56. Cross, A. R. and A. W. Segal. 2004. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochim.Biophys.Acta* 1657:1-22.
57. Albina, J. E. 1995. On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO? *J.Leukoc.Biol.* 58:643-649.
58. Muhl, H. and J. Pfeilschifter. 2003. Endothelial nitric oxide synthase: a determinant of TNFalpha production by human monocytes/macrophages. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 310:677-680.

59. Holtermann, O. A., I. Djerassi, B. A. Lisafeld, E. G. Elias, B. W. Papermaster, and E. Klein. 1974. In vitro destruction of tumor cells by human monocytes. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 147:456-459.
60. Rinehart, J. J., P. Lange, B. J. Gormus, and M. E. Kaplan. 1978. Human monocyte-induced tumor cell cytotoxicity. *Blood* 52:211-220.
61. Mantovani, A., T. R. Jerrells, J. H. Dean, and R. B. Herberman. 1979. Cytolytic and cytostatic activity on tumor cells of circulating human monocytes. *Int.J.Cancer* 23:18-27.
62. Duesberg, U., A. M. Schneiders, D. Flieger, G. Inchauspe, T. Sauerbruch, and U. Spengler. 2001. Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is not impaired in patients suffering from chronic hepatitis C. *J.Hepatol.* 35:650-657.
63. Mytar, B., M. Siedlar, M. Woloszyn, I. Ruggiero, J. Pryjma, and M. Zembala. 1999. Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumour cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. *Br.J.Cancer* 79:737-743.
64. Kornbluth, R. S. and T. S. Edgington. 1986. Tumor necrosis factor production by human monocytes is a regulated event: induction of TNF-alpha-mediated cellular cytotoxicity by endotoxin. *J.Immunol.* 137:2585-2591.
65. Ruggiero, V., K. Latham, and C. Baglioni. 1987. Cytostatic and cytotoxic activity of tumor necrosis factor on human cancer cells. *J.Immunol.* 138:2711-2717.
66. Ichinose, Y., J. Y. Tsao, and I. J. Fidler. 1988. Destruction of tumor cells by monokines released from activated human blood monocytes: evidence for parallel and additive effects of IL-1 and TNF. *Cancer Immunol.Immunother.* 27:7-12.
67. te Velde, A. A., W. vd, and C. G. Figdor. 1992. Differential cytostatic activity of monocyte-derived cytokines against human melanoma cells. *Int.J.Cancer* 50:746-751.
68. te Velde, A. A. and C. G. Figdor. 1992. Monocyte mediated cytotoxic activity against melanoma. *Melanoma Res.* 1:303-309.
69. Bustos, R. and F. Sobrino. 1992. Stimulation of glycolysis as an activation signal in rat peritoneal macrophages. Effect of glucocorticoids on this process. *Biochem.J.* 282 (Pt 1):299-303.
70. Jantsch, J., D. Chakravorty, N. Turza, A. T. Prechtel, B. Buchholz, R. G. Gerlach, M. Volke, J. Glasner, C. Warnecke, M. S. Wiesener, K. U. Eckardt, A. Steinkasserer, M. Hensel, and C. Willam. 2008. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J.Immunol.* 180:4697-4705.
71. Marsin, A. S., C. Bouzin, L. Bertrand, and L. Hue. 2002. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J.Biol.Chem.* 277:30778-30783.
72. Jones, R. G. and C. B. Thompson. 2007. Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity.* 27:173-178.

73. Orlinska, U. and R. C. Newton. 1993. Role of glucose in interleukin-1 beta production by lipopolysaccharide-activated human monocytes. *J.Cell Physiol* 157:201-208.
74. Cramer, T., Y. Yamanishi, B. E. Clausen, I. Forster, R. Pawlinski, N. Mackman, V. H. Haase, R. Jaenisch, M. Corr, V. Nizet, G. S. Firestein, H. P. Gerber, N. Ferrara, and R. S. Johnson. 2003. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112:645-657.
75. Haji-Michael, P. G., L. Ladriere, A. Sener, J. L. Vincent, and W. J. Malaisse. 1999. Leukocyte glycolysis and lactate output in animal sepsis and ex vivo human blood. *Metabolism* 48:779-785.
76. Ghani, Q. P., S. Wagner, H. D. Becker, T. K. Hunt, and M. Z. Hussain. 2004. Regulatory role of lactate in wound repair. *Methods Enzymol.* 381:565-575.
77. Constant, J. S., J. J. Feng, D. D. Zabel, H. Yuan, D. Y. Suh, H. Scheuenstuhl, T. K. Hunt, and M. Z. Hussain. 2000. Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia. *Wound.Repair Regen.* 8:353-360.
78. Carruthers, B. M. 1967. Leukocyte motility. II. Effect of absence of glucose in medium; effect of presence of deoxyglucose, dinitrophenol, puromycin, actinomycin D, and trypsin on the response to chemotactic substance; effect of segregation of cells from chemotactic substance. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 45:269-280.
79. O'Flaherty, J. T., D. L. Kreutzer, H. J. Showell, and P. A. Ward. 1977. Influence of inhibitors of cellular function on chemotactic factor-induced neutrophil aggregation. *J.Immunol.* 119:1751-1756.
80. Weisdorf, D. J., P. R. Craddock, and H. S. Jacob. 1982. Glycogenolysis versus glucose transport in human granulocytes: differential activation in phagocytosis and chemotaxis. *Blood* 60:888-893.
81. Weisdorf, D. J., P. R. Craddock, and H. S. Jacob. 1982. Granulocytes utilize different energy sources for movement and phagocytosis. *Inflammation* 6:245-256.
82. Simchowicz, L., J. Mehta, and I. Spilberg. 1979. Chemotactic factor-induced generation of superoxide radicals by human neutrophils: effect of metabolic inhibitors and antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* 22:755-763.
83. Guida, E. and A. Stewart. 1998. Influence of hypoxia and glucose deprivation on tumour necrosis factor-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in human cultured monocytes. *Cell Physiol Biochem.* 8:75-88.
84. Schuster, D. P., S. L. Brody, Z. Zhou, M. Bernstein, R. Arch, D. Link, and M. Mueckler. 2007. Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 292:L845-L851.
85. Kroemer, G. and J. Pouyssegur. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13:472-482.
86. Semenza, G. 2002. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem.Pharmacol.* 64:993-998.

87. Peyssonnaud, C., P. Cejudo-Martin, A. Doedens, A. S. Zinkernagel, R. S. Johnson, and V. Nizet. 2007. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J.Immunol.* 178:7516-7519.
88. Rius, J., M. Guma, C. Schachtrup, K. Akassoglou, A. S. Zinkernagel, V. Nizet, R. S. Johnson, G. G. Haddad, and M. Karin. 2008. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 453:807-811.
89. Chesney, J., R. Mitchell, F. Benigni, M. Bacher, L. Spiegel, Y. Al Abed, J. H. Han, C. Metz, and R. Bucala. 1999. An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:3047-3052.
90. Okar, D. A., A. Manzano, A. Navarro-Sabate, L. Riera, R. Bartrons, and A. J. Lange. 2001. PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends Biochem.Sci.* 26:30-35.
91. Sakakibara, R., M. Kato, N. Okamura, T. Nakagawa, Y. Komada, N. Tominaga, M. Shimojo, and M. Fukasawa. 1997. Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J.Biochem.* 122:122-128.
92. Minchenko, A., I. Leshchinsky, I. Opentanova, N. Sang, V. Srinivas, V. Armstead, and J. Caro. 2002. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J.Biol.Chem.* 277:6183-6187.
93. Obach, M., A. Navarro-Sabate, J. Caro, X. Kong, J. Duran, M. Gomez, J. C. Perales, F. Ventura, J. L. Rosa, and R. Bartrons. 2004. 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J.Biol.Chem.* 279:53562-53570.
94. Plas, D. R. and C. B. Thompson. 2005. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 24:7435-7442.
95. Manning, B. D. and L. C. Cantley. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-1274.
96. Krawczyk, C. M., T. Holowka, J. Sun, J. Blagih, E. Amiel, R. J. DeBerardinis, J. R. Cross, E. Jung, C. B. Thompson, R. G. Jones, and E. J. Pearce. 2010. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* 115:4742-4749.
97. Whiteside, T. L. 2010. Immune responses to malignancies. *J.Allergy Clin.Immunol.* 125:S272-S283.
98. DeNardo, D. G., P. Andreu, and L. M. Coussens. 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29:309-316.
99. Lin, W. W. and M. Karin. 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J.Clin.Invest* 117:1175-1183.
100. Ostrand-Rosenberg, S. 2008. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 18:11-18.

101. Grivennikov, S. I. and M. Karin. 2010. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 20:65-71.
102. Ernst, P. B. and B. D. Gold. 2000. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu.Rev.Microbiol.* 54:615-640.
103. Mas, V. R., D. G. Maluf, K. J. Archer, K. Yanek, X. Kong, L. Kulik, C. E. Freise, K. M. Olthoff, R. M. Ghobrial, P. McIver, and R. Fisher. 2009. Genes involved in viral carcinogenesis and tumor initiation in hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. *Mol.Med.* 15:85-94.
104. Kraus, S. and N. Arber. 2009. Inflammation and colorectal cancer. *Curr.Opin.Pharmacol.* 9:405-410.
105. Bottazzi, B., S. Walter, D. Govoni, F. Colotta, and A. Mantovani. 1992. Monocyte chemotactic cytokine gene transfer modulates macrophage infiltration, growth, and susceptibility to IL-2 therapy of a murine melanoma. *J.Immunol.* 148:1280-1285.
106. Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H. A. Weich, A. Mantovani, and D. Marme. 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87:3336-3343.
107. Karin, M. 2006. NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol.Carcinog.* 45:355-361.
108. Mayer, A. K., M. Muehmer, J. Mages, K. Gueinzus, C. Hess, K. Heeg, R. Bals, R. Lang, and A. H. Dalpke. 2007. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J.Immunol.* 178:3134-3142.
109. Schaefer, T. M., K. Desouza, J. V. Fahey, K. W. Beagley, and C. R. Wira. 2004. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology* 112:428-436.
110. Dauphinee, S. M. and A. Karsan. 2006. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 86:9-22.
111. Szczepanski, M. J., M. Czystowska, M. Szajnik, M. Harasymczuk, M. Boyiadzis, A. Kruk-Zagajewska, W. Szyfter, J. Zeromski, and T. L. Whiteside. 2009. Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res.* 69:3105-3113.
112. Szajnik, M., M. J. Szczepanski, M. Czystowska, E. Elishaev, M. Mandapathil, E. Nowak-Markwitz, M. Spaczynski, and T. L. Whiteside. 2009. TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene* 28:4353-4363.
113. Kelly, M. G., A. B. Alvero, R. Chen, D. A. Silasi, V. M. Abrahams, S. Chan, I. Visintin, T. Rutherford, and G. Mor. 2006. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 66:3859-3868.
114. He, W., Q. Liu, L. Wang, W. Chen, N. Li, and X. Cao. 2007. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol.Immunol.* 44:2850-2859.

115. Chen, R., A. B. Alvero, D. A. Silasi, and G. Mor. 2007. Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *Am.J.Reprod.Immunol.* 57:93-107.
116. Kundu, S. D., C. Lee, B. K. Billips, G. M. Habermacher, Q. Zhang, V. Liu, L. Y. Wong, D. J. Klumpp, and P. Thumbikat. 2008. The toll-like receptor pathway: a novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells. *Prostate* 68:223-229.
117. Backus, B. T. and L. F. Affronti. 1981. Tumor-associated bacteria capable of producing a human choriogonadotropin-like substance. *Infect.Immun.* 32:1211-1215.
118. Vogl, T., K. Tenbrock, S. Ludwig, N. Leukert, C. Ehrhardt, M. A. van Zoelen, W. Nacken, D. Foell, P. T. van der, C. Sorg, and J. Roth. 2007. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat.Med.* 13:1042-1049.
119. Lotze, M. T., H. J. Zeh, A. Rubartelli, L. J. Sparvero, A. A. Amoscato, N. R. Washburn, M. E. Devera, X. Liang, M. Tor, and T. Billiar. 2007. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol.Rev.* 220:60-81.
120. Mittal, D., F. Saccheri, E. Venereau, T. Pusterla, M. E. Bianchi, and M. Rescigno. 2010. TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells. *EMBO J.* 29:2242-2252.
121. Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-444.
122. Prasad, S., J. Ravindran, and B. B. Aggarwal. 2010. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol.Cell Biochem.* 336:25-37.
123. Dannenberg, A. J. and K. Subbaramaiah. 2003. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. *Cancer Cell* 4:431-436.
124. Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove. 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat.Rev.Cancer* 9:798-809.
125. Ben Baruch, A. 2006. Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. *Semin.Cancer Biol.* 16:38-52.
126. Balkwill, F., K. A. Charles, and A. Mantovani. 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7:211-217.
127. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati. 2007. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur.J.Immunol.* 37:14-16.
128. Mantovani, A. and A. Sica. 2010. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr.Opin.Immunol.* 22:231-237.

129. Biswas, S. K., L. Gangi, S. Paul, T. Schioppa, A. Saccani, M. Sironi, B. Bottazzi, A. Doni, B. Vincenzo, F. Pasqualini, L. Vago, M. Nebuloni, A. Mantovani, and A. Sica. 2006. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107:2112-2122.
130. Saccani, A., T. Schioppa, C. Porta, S. K. Biswas, M. Nebuloni, L. Vago, B. Bottazzi, M. P. Colombo, A. Mantovani, and A. Sica. 2006. p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer Res.* 66:11432-11440.
131. Mantovani, G., A. Maccio, M. Pisano, R. Versace, P. Lai, S. Esu, E. Massa, M. Ghiani, D. Dessi, G. B. Melis, and G. S. Del Giacco. 1997. Tumor-associated lympho-monocytes from neoplastic effusions are immunologically defective in comparison with patient autologous PBMCs but are capable of releasing high amounts of various cytokines. *Int.J.Cancer* 71:724-731.
132. Bunt, S. K., P. Sinha, V. K. Clements, J. Leips, and S. Ostrand-Rosenberg. 2006. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J.Immunol.* 176:284-290.
133. Bunt, S. K., L. Yang, P. Sinha, V. K. Clements, J. Leips, and S. Ostrand-Rosenberg. 2007. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* 67:10019-10026.
134. Sinha, P., C. Okoro, D. Foell, H. H. Freeze, S. Ostrand-Rosenberg, and G. Srikrishna. 2008. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J.Immunol.* 181:4666-4675.
135. Lauc, G. and M. Heffer-Lauc. 2006. Shedding and uptake of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biochim.Biophys.Acta* 1760:584-602.
136. Ladisch, S., H. Becker, and L. Ulsh. 1992. Immunosuppression by human gangliosides: I. Relationship of carbohydrate structure to the inhibition of T cell responses. *Biochim.Biophys.Acta* 1125:180-188.
137. Uzzo, R. G., P. Rayman, V. Kolenko, P. E. Clark, M. K. Cathcart, T. Bloom, A. C. Novick, R. M. Bukowski, T. Hamilton, and J. H. Finke. 1999. Renal cell carcinoma-derived gangliosides suppress nuclear factor-kappaB activation in T cells. *J.Clin.Invest* 104:769-776.
138. Ziegler-Heitbrock, H. W., E. Kafferlein, J. G. Haas, N. Meyer, M. Strobel, C. Weber, and D. Flieger. 1992. Gangliosides suppress tumor necrosis factor production in human monocytes. *J.Immunol.* 148:1753-1758.
139. Heitger, A. and S. Ladisch. 1996. Gangliosides block antigen presentation by human monocytes. *Biochim.Biophys.Acta* 1303:161-168.
140. Caldwell, S., A. Heitger, W. Shen, Y. Liu, B. Taylor, and S. Ladisch. 2003. Mechanisms of ganglioside inhibition of APC function. *J.Immunol.* 171:1676-1683.
141. Zou, J. P., L. A. Morford, C. Chougnet, A. R. Dix, A. G. Brooks, N. Torres, J. D. Shuman, J. E. Coligan, W. H. Brooks, T. L. Roszman, and G. M. Shearer. 1999. Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. *J.Immunol.* 162:4882-4892.

142. Mytar, B., M. Woloszyn, R. Szatanek, M. Baj-Krzyworzeka, M. Siedlar, I. Ruggiero, J. Wieckiewicz, and M. Zembala. 2003. Tumor cell-induced deactivation of human monocytes. *J.Leukoc.Biol.* 74:1094-1101.
143. Gottfried, E., Peter K., and Kreutz M.P. 2010. The metabolic Achilles' heel: tumor cell metabolism as therapeutic target. In *From molecular to modular tumor therapy: Tumors are reconstructible communicatively evolving systems*. Springer-Verlag.
144. Young, C. D. and S. M. Anderson. 2008. Sugar and fat - that's where it's at: metabolic changes in tumors. *Breast Cancer Res.* 10:202.
145. Mankoff, D. A., J. F. Eary, J. M. Link, M. Muzi, J. G. Rajendran, A. M. Spence, and K. A. Krohn. 2007. Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [18F] fluorodeoxyglucose and beyond. *Clin.Cancer Res.* 13:3460-3469.
146. Kunkel, M., T. E. Reichert, P. Benz, H. A. Lehr, J. H. Jeong, S. Wieand, P. Bartenstein, W. Wagner, and T. L. Whiteside. 2003. Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 97:1015-1024.
147. Mochiki, E., H. Kuwano, H. Katoh, T. Asao, N. Oriuchi, and K. Endo. 2004. Evaluation of 18F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose positron emission tomography for gastric cancer. *World J.Surg.* 28:247-253.
148. Moreno-Sanchez, R., S. Rodriguez-Enriquez, A. Marin-Hernandez, and E. Saavedra. 2007. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274:1393-1418.
149. 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.
150. DeBerardinis, R. J., J. J. Lum, G. Hatzivassiliou, and C. B. Thompson. 2008. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7:11-20.
151. Gladden, L. B. 2004. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J.Physiol* 558:5-30.
152. Brahimi-Horn, M. C., G. Bellot, and J. Pouyssegur. 2010. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Curr.Opin.Genet.Dev.*
153. Schornack, P. A. and R. J. Gillies. 2003. Contributions of cell metabolism and H⁺ diffusion to the acidic pH of tumors. *Neoplasia.* 5:135-145.
154. Gatenby, R. A. and R. J. Gillies. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat.Rev.Cancer* 4:891-899.
155. Montcourrier, P., I. Silver, R. Farnoud, I. Bird, and H. Rochefort. 1997. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin.Exp.Metastasis* 15:382-392.
156. 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.

157. 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.
158. 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.
159. Walenta, S. and W. F. Mueller-Klieser. 2004. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin.Radiat.Oncol.* 14:267-274.
160. 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.
161. Beckert, S., F. Farrahi, R. S. Aslam, H. Scheuenstuhl, A. Konigsrainer, M. Z. Hussain, and T. K. Hunt. 2006. Lactate stimulates endothelial cell migration. *Wound.Repair Regen.* 14:321-324.
162. Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, A. L. Harris, and E. Sivridis. 2006. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res.* 66:632-637.
163. Koukourakis, M. I., E. Kontomanolis, A. Giatromanolaki, E. Sivridis, and V. Liberis. 2009. Serum and tissue LDH levels in patients with breast/gynaecological cancer and benign diseases. *Gynecol.Obstet.Invest* 67:162-168.
164. Yamamoto, T., Y. Seino, H. Fukumoto, G. Koh, H. Yano, N. Inagaki, Y. Yamada, K. Inoue, T. Manabe, and H. Imura. 1990. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 170:223-230.
165. Wolf, A., S. Agnihotri, J. Micallef, J. Mukherjee, N. Sabha, R. Cairns, C. Hawkins, and A. Guha. 2011. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *J.Exp.Med.* 208:313-326.
166. 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.
167. 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.
168. Foldi, M., E. Stickeler, L. Bau, O. Kretz, D. Watermann, G. Gitsch, G. Kayser, H. A. Zur, and J. F. Coy. 2007. Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer. *Oncol.Rep.* 17:841-845.
169. Langbein, S., M. Zerilli, H. A. Zur, W. Staiger, K. Rensch-Boschert, N. Lukan, J. Popa, M. P. Ternullo, A. Steidler, C. Weiss, R. Grobholz, F. Willeke, P. Alken, G. Stassi, P. Schubert, and J. F. Coy. 2006. Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *Br.J.Cancer* 94:578-585.

170. Bartrons, R. and J. Caro. 2007. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J.Bioenerg.Biomembr.* 39:223-229.
171. 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.
172. Papandreou, I., R. A. Cairns, L. Fontana, A. L. Lim, and N. C. Denko. 2006. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3:187-197.
173. Kuphal, S., A. Winklmeier, C. Warnecke, and A. K. Bosserhoff. 2010. Constitutive HIF-1 activity in malignant melanoma. *Eur.J.Cancer* 46:1159-1169.
174. 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.
175. 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.
176. Freudig, D. and R. Sauermost. 2004. *Lexikon der Biologie; CD-Rom*. Spektrum Akademischer Verlag.
177. Trabold, O., S. Wagner, C. Wicke, H. Scheuenstuhl, M. Z. Hussain, N. Rosen, A. Seremetiev, H. D. Becker, and T. K. Hunt. 2003. Lactate and oxygen constitute a fundamental regulatory mechanism in wound healing. *Wound.Repair Regen.* 11:504-509.
178. Puig-Kroger, A., O. M. Pello, R. Selgas, G. Criado, M. A. Bajo, J. A. Sanchez-Tomero, V. Alvarez, G. del Peso, P. Sanchez-Mateos, C. Holmes, D. Faict, M. Lopez-Cabrera, J. Madrenas, and A. L. Corbi. 2003. Peritoneal dialysis solutions inhibit the differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: effect of lactate and glucose-degradation products. *J.Leukoc.Biol.* 73:482-492.
179. Samuvel, D. J., K. P. Sundararaj, A. Nareika, M. F. Lopes-Virella, and Y. Huang. 2009. Lactate boosts TLR4 signaling and NF-kappaB pathway-mediated gene transcription in macrophages via monocarboxylate transporters and MD-2 up-regulation. *J.Immunol.* 182:2476-2484.
180. Yabu, M., H. Shime, H. Hara, T. Saito, M. Matsumoto, T. Seya, T. Akazawa, and N. Inoue. 2011. IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid. *Int.Immunol.* 23:29-41.
181. Witkin, S. S., S. Alvi, A. M. Bongiovanni, I. M. Linhares, and W. J. Ledger. 2010. Lactic acid stimulates interleukin-23 production by peripheral blood mononuclear cells exposed to bacterial lipopolysaccharide. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*
182. Kellum, J. A., M. Song, and J. Li. 2004. Science review: extracellular acidosis and the immune response: clinical and physiologic implications. *Crit Care* 8:331-336.
183. Douvdevani, A., J. Rapoport, A. Konforti, M. Zlotnik, and C. Chaimovitz. 1993. The effect of peritoneal dialysis fluid on the release of IL-1 beta and TNF alpha by macrophages/monocytes. *Perit.Dial.Int.* 13:112-117.

184. Douvdevani, A., O. Abramson, A. Tamir, A. Konforty, N. Isakov, and C. Chaimovitz. 1995. Commercial dialysate inhibits TNF alpha mRNA expression and NF-kappa B DNA-binding activity in LPS-stimulated macrophages. *Kidney Int.* 47:1537-1545.
185. Watanabe, T., H. Nishio, T. Tanigawa, H. Yamagami, H. Okazaki, K. Watanabe, K. Tominaga, Y. Fujiwara, N. Oshitani, T. Asahara, K. Nomoto, K. Higuchi, K. Takeuchi, and T. Arakawa. 2009. Probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents indomethacin-induced small intestinal injury: involvement of lactic acid. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 297:G506-G513.
186. Jensen, J. C., C. Buresh, and J. A. Norton. 1990. Lactic acidosis increases tumor necrosis factor secretion and transcription in vitro. *J.Surg.Res.* 49:350-353.
187. 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.
188. 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.
189. Gerner, E. W. and F. L. Meyskens, Jr. 2004. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat.Rev.Cancer* 4:781-792.
190. Agostinelli, E., M. P. Marques, R. Calheiros, F. P. Gil, G. Tempera, N. Viceconte, V. Battaglia, S. Grancara, and A. Toninello. 2010. Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino.Acids* 38:393-403.
191. 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.
192. Albers, E. 2009. Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine. *IUBMB.Life* 61:1132-1142.
193. 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.
194. Stevens, A. P., K. Dettmer, S. Wallner, A. K. Bosserhoff, and P. J. Oefner. 2008. Quantitative analysis of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine in melanoma cells by liquid chromatography-stable isotope ratio tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 876:123-128.
195. 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.
196. Wong, Y. F., T. K. Chung, T. H. Cheung, T. Nobori, and A. M. Chang. 1998. MTAP gene deletion in endometrial cancer. *Gynecol.Obstet.Invest* 45:272-276.

197. Watanabe, F., M. Takao, K. Inoue, J. Nishioka, T. Nobori, T. Shiraishi, M. Kaneda, T. Sakai, I. Yada, and H. Shimpo. 2009. Immunohistochemical diagnosis of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) deficiency in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 63:39-44.
198. 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.
199. Hibasami, H., R. T. Borchardt, S. Y. Chen, J. K. Coward, and A. E. Pegg. 1980. Studies of inhibition of rat spermidine synthase and spermine synthase. *Biochem.J.* 187:419-428.
200. 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.
201. 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.
202. 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.
203. 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.
204. Maher, P. A. 1993. Inhibition of the tyrosine kinase activity of the fibroblast growth factor receptor by the methyltransferase inhibitor 5'-methylthioadenosine. *J.Biol.Chem.* 268:4244-4249.
205. 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.
206. Meissner, T., E. Krause, I. Lodige, and U. Vinkemeier. 2004. Arginine methylation of STAT1: a reassessment. *Cell* 119:587-589.
207. 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.
208. Meyer, S., P. J. Wild, T. Vogt, F. Bataille, C. Ehret, S. Gantner, M. Landthaler, M. Klinkhammer-Schalke, F. Hofstaedter, and A. K. Bosserhoff. 2010. Methylthioadenosine phosphorylase represents a predictive marker for response to adjuvant interferon therapy in patients with malignant melanoma. *Exp.Dermatol.* 19:e251-e257.
209. Cerri, M. A., A. Beltran-Nunez, S. Bernasconi, E. Dejana, L. Bassi, and G. Bazzoni. 1993. Inhibition of cytokine production and endothelial expression of adhesion antigens by 5'-methylthioadenosine. *Eur.J.Pharmacol.* 232:291-294.

210. 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.
211. Law, R. E., J. B. Stimmel, M. A. Damore, C. Carter, S. Clarke, and R. Wall. 1992. Lipopolysaccharide-induced NF-kappa B activation in mouse 70Z/3 pre-B lymphocytes is inhibited by mevinolin and 5'-methylthioadenosine: roles of protein isoprenylation and carboxyl methylation reactions. *Mol.Cell Biol.* 12:103-111.
212. Veal, N., C. L. Hsieh, S. Xiong, J. M. Mato, S. Lu, and H. Tsukamoto. 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated TNF-alpha promoter activity by S-adenosylmethionine and 5'-methylthioadenosine. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 287:G352-G362.
213. Ara, A. I., M. Xia, K. Ramani, J. M. Mato, and S. C. Lu. 2008. S-adenosylmethionine inhibits lipopolysaccharide-induced gene expression via modulation of histone methylation. *Hepatology* 47:1655-1666.
214. Moreno, B., H. Hevia, M. Santamaria, J. Sepulcre, J. Munoz, E. R. Garcia-Trevijano, C. Berasain, F. J. Corrales, M. A. Avila, and P. Villoslada. 2006. Methylthioadenosine reverses brain autoimmune disease. *Ann.Neurol.* 60:323-334.
215. 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.
216. Wolberg, G., T. P. Zimmerman, C. J. Schmitges, G. S. Duncan, and R. D. Deepröse. 1982. Inhibition of lymphocyte cyclic AMP phosphodiesterase and lymphocyte function by 5'-methylthioadenosine. *Biochem.Pharmacol.* 31:2201-2203.
217. 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.
218. 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.
219. Carlsson, J. and J. M. Yuhas. 1984. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res.* 95:1-23.
220. Graw, R. G., Jr., G. P. Herzig, R. J. Eisel, and S. Perry. 1971. Leukocyte and platelet collection from normal donors with the continuous flow blood cell separator. *Transfusion* 11:94-101.
221. Johnson, W. D., Jr., B. Mei, and Z. A. Cohn. 1977. The separation, long-term cultivation, and maturation of the human monocyte. *J Exp.Med* 146:1613-1626.
222. Sanderson, R. J., R. T. Shepperdson, A. E. Vatter, and D. W. Talmage. 1977. Isolation and enumeration of peripheral blood monocytes. *J Immunol.* 118:1409-1414.

223. Tsien, R. Y., T. J. Rink, and M. Poenie. 1985. Measurement of cytosolic free Ca^{2+} in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* 6:145-157.
224. Schmid, I., W. J. Krall, C. H. Uittenbogaart, J. Braun, and J. V. Giorgi. 1992. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13:204-208.
225. Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J.Immunol.Methods* 184:39-51.
226. Rajewsky, M. F. 1965. In vitro studies of cell proliferation in tumours. II. Characteristics of a standardised in vitro system for the measurement of 3H-thymidine incorporation into tissue explants. *Eur.J.Cancer* 1:281-287.
227. Caldefie-Chezet, F., S. Walrand, C. Moinard, A. Tridon, J. Chassagne, and M. P. Vasson. 2002. Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction. *Clin.Chim.Acta* 319:9-17.
228. Li, Y., K. H. Stansbury, H. Zhu, and M. A. Trush. 1999. Biochemical characterization of lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a chemiluminescent probe for detecting intramitochondrial superoxide anion radical production. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 262:80-87.
229. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254.
230. Luo, B., K. Groenke, R. Takors, C. Wandrey, and M. Oldiges. 2007. Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.A* 1147:153-164.
231. 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. 2010. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J.Immunol.* 184:1200-1209.
232. Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24:17-27.
233. Schober, D. 2002. Microarrays, Genexpressionsanalyse und Bioinformatik. *BIOspektrum* 8:307-310.
234. Benjamini Y. and Yekutieli D. 2001. The control of the false discovery rate under dependency. *Annals of Statistics* 29:1165-1188.
235. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
236. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24:145-149.

237. Cordell, J. L., B. Falini, W. N. Erber, A. K. Ghosh, Z. Abdulaziz, S. MacDonald, K. A. Pulford, H. Stein, and D. Y. Mason. 1984. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J.Histochem.Cytochem.* 32:219-229.
238. Andreu-Perez, P., J. Hernandez-Losa, T. Moline, R. Gil, J. Grueso, A. Pujol, J. Cortes, M. A. Avila, and J. A. Recio. 2010. Methylthioadenosine (MTA) inhibits melanoma cell proliferation and in vivo tumor growth. *BMC.Cancer* 10:265.
239. Ansorena, E., E. R. Garcia-Trevijano, M. L. Martinez-Chantar, Z. Z. Huang, L. Chen, J. M. Mato, M. Iraburu, S. C. Lu, and M. A. Avila. 2002. S-adenosylmethionine and methylthioadenosine are antiapoptotic in cultured rat hepatocytes but proapoptotic in human hepatoma cells. *Hepatology* 35:274-280.
240. Munshi, R., A. S. Clanachan, and H. P. Baer. 1988. 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine: a nucleoside which differentiates between adenosine receptor types. *Biochem.Pharmacol.* 37:2085-2089.
241. 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.
242. Hasko, G., J. Linden, B. Cronstein, and P. Pacher. 2008. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat.Rev.Drug Discov.* 7:759-770.
243. Hasko, G. and B. N. Cronstein. 2004. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.* 25:33-39.
244. Schulte G. 2004. Adenosin, Adenosinrezeptoren und adenosinrezeptoraktivierte Signalwege. *BIOspektrum* 2/04:159-161.
245. Laurenza, A., E. M. Sutkowski, and K. B. Seamon. 1989. Forskolin: a specific stimulator of adenylyl cyclase or a diterpene with multiple sites of action? *Trends Pharmacol.Sci.* 10:442-447.
246. Pettit, E. J. and F. S. Fay. 1998. Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol Rev.* 78:949-967.
247. Lohse, M. J., K. N. Klotz, J. Lindenborn-Fotinos, M. Reddington, U. Schwabe, and R. A. Olsson. 1987. 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)--a selective high affinity antagonist radioligand for A1 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 336:204-210.
248. Jacobson, K. A., O. Nikodijevic, W. L. Padgett, C. Gallo-Rodriguez, M. Maillard, and J. W. Daly. 1993. 8-(3-Chlorostyryl)caffeine (CSC) is a selective A2-adenosine antagonist in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* 323:141-144.
249. Daly, J. W., O. Hong, W. L. Padgett, M. T. Shamim, K. A. Jacobson, and D. Ukena. 1988. Non-xanthine heterocycles: activity as antagonists of A1- and A2-adenosine receptors. *Biochem.Pharmacol.* 37:655-664.

250. Yang, H., M. Y. Avila, K. Peterson-Yantorno, M. Coca-Prados, R. A. Stone, K. A. Jacobson, and M. M. Civan. 2005. The cross-species A3 adenosine-receptor antagonist MRS 1292 inhibits adenosine-triggered human nonpigmented ciliary epithelial cell fluid release and reduces mouse intraocular pressure. *Curr.Eye Res.* 30:747-754.
251. Fiume, L., M. Manerba, M. Vettrano, and G. Di Stefano. 2010. Impairment of aerobic glycolysis by inhibitors of lactic dehydrogenase hinders the growth of human hepatocellular carcinoma cell lines. *Pharmacology* 86:157-162.
252. Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.
253. Girardin, S. E., I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott, and P. J. Sansonetti. 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J.Biol.Chem.* 278:8869-8872.
254. Inohara, N., Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, S. J. Foster, A. P. Moran, J. L. Fernandez-Luna, and G. Nunez. 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J.Biol.Chem.* 278:5509-5512.
255. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J.Immunol.* 169:10-14.
256. Marasco, W. A., S. H. Phan, H. Krutzsch, H. J. Showell, D. E. Feltner, R. Nairn, E. L. Becker, and P. A. Ward. 1984. Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 259:5430-5439.
257. Voet D., Voet JG., and Pratt CW. 2002. *Lehrbuch der Biochemie*. Wiley-VCH Verlag.
258. Costa, L. T., D. Da Silva, C. R. Guimaraes, 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.
259. Poole, R. C. and A. P. Halestrap. 1993. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am.J.Physiol* 264:C761-C782.
260. Hertz, L. and G. A. Dienel. 2005. Lactate transport and transporters: general principles and functional roles in brain cells. *J.Neurosci.Res.* 79:11-18.
261. Bachelard, H. S., A. G. Clark, and M. F. Thompson. 1971. Cerebral-cortex hexokinase. Elucidation of reaction mechanisms by substrate and dead-end inhibitor kinetic analysis. *Biochem.J.* 123:707-715.
262. Gutman, M., T. P. Singer, H. Beinert, and J. E. Casida. 1970. Reaction sites of rotenone, piericidin A, and amytal in relation to the nonheme iron components of NADH dehydrogenase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 65:763-770.

263. Mantovani, A., C. Garlanda, and B. Bottazzi. 2003. Pentraxin 3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. *Vaccine* 21 Suppl 2:S43-S47.
264. Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem.J.* 374:1-20.
265. Melgarejo, E., M. A. Medina, F. Sanchez-Jimenez, and J. L. Urdiales. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 41:998-1001.
266. Suggs, S. V., J. L. Katzowitz, C. Tsai-Morris, and V. P. Sukhatme. 1990. cDNA sequence of the human cellular early growth response gene Egr-1. *Nucleic Acids Res.* 18:4283.
267. Joseph, L. J., M. M. Le Beau, G. A. Jamieson, Jr., S. Acharya, T. B. Shows, J. D. Rowley, and V. P. Sukhatme. 1988. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:7164-7168.
268. Patwardhan, S., A. Gashler, M. G. Siegel, L. C. Chang, L. J. Joseph, T. B. Shows, M. M. Le Beau, and V. P. Sukhatme. 1991. EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene* 6:917-928.
269. Crosby, S. D., J. J. Puetz, K. S. Simburger, T. J. Fahrner, and J. Milbrandt. 1991. The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol.Cell Biol.* 11:3835-3841.
270. Zipfel, P. F., E. L. Decker, C. Holst, and C. Skerka. 1997. The human zinc finger protein EGR-4 acts as autoregulatory transcriptional repressor. *Biochim.Biophys.Acta* 1354:134-144.
271. Kharbanda, S., T. Nakamura, R. Stone, R. Hass, S. Bernstein, R. Datta, V. P. Sukhatme, and D. Kufe. 1991. Expression of the early growth response 1 and 2 zinc finger genes during induction of monocytic differentiation. *J.Clin.Invest* 88:571-577.
272. Maguire, J., T. Santoro, P. Jensen, U. Siebenlist, J. Yewdell, and K. Kelly. 1994. Gem: an induced, immediate early protein belonging to the Ras family. *Science* 265:241-244.
273. Kelly, K. 2005. The RGK family: a regulatory tail of small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 15:640-643.
274. Eming, S. A. and T. Krieg. 2006. Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 11:79-86.
275. Jiang, Q., W. Q. Li, F. B. Aiello, R. Mazzucchelli, B. Asefa, A. R. Khaled, and S. K. Durum. 2005. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:513-533.
276. Eppell, B. A., A. M. Newell, and E. J. Brown. 1989. Adenosine receptors are expressed during differentiation of monocytes to macrophages in vitro. Implications for regulation of phagocytosis. *J.Immunol.* 143:4141-4145.

277. Najar, H. M., S. Ruhl, A. C. Bru-Capdeville, and J. H. Peters. 1990. Adenosine and its derivatives control human monocyte differentiation into highly accessory cells versus macrophages. *J.Leukoc.Biol.* 47:429-439.
278. Broussas, M., P. Cornillet-Lefebvre, G. Potron, and P. Nguyen. 1999. Inhibition of fMLP-triggered respiratory burst of human monocytes by adenosine: involvement of A3 adenosine receptor. *J.Leukoc.Biol.* 66:495-501.
279. Thiele, A., R. Kronstein, A. Wetzel, A. Gerth, K. Nieber, and S. Hauschildt. 2004. Regulation of adenosine receptor subtypes during cultivation of human monocytes: role of receptors in preventing lipopolysaccharide-triggered respiratory burst. *Infect.Immun.* 72:1349-1357.
280. Eloranta, T. O., K. Tuomi, and A. M. Raina. 1982. Uptake and utilization of 5'-methylthioadenosine by cultured baby-hamster kidney cells. *Biochem.J.* 204:803-807.
281. 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.
282. 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.
283. Bidani, A., C. Z. Wang, S. J. Saggi, and T. A. Heming. 1998. Evidence for pH sensitivity of tumor necrosis factor-alpha release by alveolar macrophages. *Lung* 176:111-121.
284. Heming, T. A., S. K. Dave, D. M. Tuazon, A. K. Chopra, J. W. Peterson, and A. Bidani. 2001. Effects of extracellular pH on tumour necrosis factor-alpha production by resident alveolar macrophages. *Clin.Sci.(Lond)* 101:267-274.
285. Bellocq, A., S. Suberville, C. Philippe, F. Bertrand, J. Perez, B. Fouqueray, G. Cherqui, and L. Baud. 1998. Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages. Evidence for involvement of nuclear factor-kappaB activation. *J.Biol.Chem.* 273:5086-5092.
286. Kellum, J. A., M. Song, and J. Li. 2004. Lactic and hydrochloric acids induce different patterns of inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 286:R686-R692.
287. Tracey, K. J. and A. Cerami. 1993. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu.Rev.Cell Biol.* 9:317-343.
288. Wang, J. E., P. F. Jorgensen, M. Almlöf, C. Thiemermann, S. J. Foster, A. O. Aasen, and R. Solberg. 2000. Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect.Immun.* 68:3965-3970.
289. Xu, L., D. Fukumura, and R. K. Jain. 2002. Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. *J.Biol.Chem.* 277:11368-11374.

-
290. Ing, B. L., D. K. Gupta, Z. M. Nawab, F. Q. Zhou, M. A. Rahman, and J. T. Daugirdas. 1988. Suppression of neutrophil superoxide production by conventional peritoneal dialysis solution. *Int.J.Artif.Organs* 11:351-354.
291. Topley, N., H. M. Alobaidi, M. Davies, G. A. Coles, J. D. Williams, and D. Lloyd. 1988. The effect of dialysate on peritoneal phagocyte oxidative metabolism. *Kidney Int.* 34:404-411.
292. Walenta, S., T. Schroeder, and W. Mueller-Klieser. 2002. Metabolic mapping with bioluminescence: basic and clinical relevance. *Biomol.Eng* 18:249-262.
293. Loike, J. D., E. Kaback, S. C. Silverstein, and T. H. Steinberg. 1993. Lactate transport in macrophages. *J.Immunol.* 150:1951-1958.
294. Merezhinskaya, N., S. A. Ogunwuyi, F. G. Mullick, and W. N. Fishbein. 2004. Presence and localization of three lactic acid transporters (MCT1, -2, and -4) in separated human granulocytes, lymphocytes, and monocytes. *J.Histochem.Cytochem.* 52:1483-1493.
295. Srinivas, S. R., E. Gopal, L. Zhuang, S. Itagaki, P. M. Martin, Y. J. Fei, V. Ganapathy, and P. D. Prasad. 2005. Cloning and functional identification of slc5a12 as a sodium-coupled low-affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2). *Biochem.J.* 392:655-664.
296. Rodriguez-Prados, J. C., P. G. Traves, J. Cuenca, D. Rico, J. Aragonés, P. Martín-Sanz, M. Cascante, and L. Bosca. 2010. Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J.Immunol.* 185:605-614.
297. Dröge, W., S. Roth, A. Altmann, and S. Mihm. 1987. Regulation of T-cell functions by L-lactate. *Cell Immunol.* 108:405-416.
298. Murray, C. M., R. Hutchinson, J. R. Bantick, G. P. Belfield, A. D. Benjamin, D. Brazma, R. V. Bundick, I. D. Cook, R. I. Craggs, S. Edwards, L. R. Evans, R. Harrison, E. Holness, A. P. Jackson, C. G. Jackson, L. P. Kingston, M. W. Perry, A. R. Ross, P. A. Rugman, S. S. Sidhu, M. Sullivan, D. A. Taylor-Fishwick, P. C. Walker, Y. M. Whitehead, D. J. Wilkinson, A. Wright, and D. K. Donald. 2005. Monocarboxylate transporter MCT1 is a target for immunosuppression. *Nat.Chem.Biol.* 1:371-376.
299. Pelicano, H., D. S. Martin, R. H. Xu, and P. Huang. 2006. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25:4633-4646.
300. Chen, J. L., J. E. Lucas, T. Schroeder, S. Mori, J. Wu, J. Nevins, M. Dewhirst, M. West, and J. T. Chi. 2008. The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. *PLoS.Genet.* 4:e1000293.
301. Rosenkilde, M. M. and T. W. Schwartz. 2004. The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS* 112:481-495.

9 Anhang

9.1 Gene der Arrayanalyse

Tabelle 9-1 enthält eine alphabetische Ordnung der bei der Analyse der RNA-Expressionsarrays erhaltenen Gene (siehe 5.2.2.3) sowie die ausgeschriebenen englischen Gennamen.

Tabelle 9-1: Im Rahmen der Arrayanalyse erhaltene Gene

Gen	Ausgeschriebener englischer Gennamen
<i>ADORA2A</i>	<i>adenosine A2A receptor</i>
<i>ARL5B</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like protein 5B</i>
<i>ATF3</i>	<i>activating transcription factor 3</i>
<i>B3GNT5</i>	<i>UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 5</i>
<i>BAMBI</i>	<i>BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog</i>
<i>BHLHB2</i>	<i>basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2</i>
<i>BIC</i>	<i>BIC transcript</i>
<i>BIRC3</i>	<i>baculoviral IAP repeat-containing 3</i>
<i>BTG2</i>	<i>BTG family, member 2</i>
<i>BTG3</i>	<i>BTG family, member 3</i>
<i>C11orf37</i>	<i>non-protein coding RNA 167</i>
<i>C12orf61</i>	<i>chromosome 12 open reading frame 61</i>
<i>C15orf48</i>	<i>chromosome 15 open reading frame 48</i>
<i>C20orf185</i>	<i>chromosome 20 open reading frame 185</i>
<i>C21orf96</i>	<i>chromosome 21 open reading frame 96</i>
<i>C8orf42</i>	<i>chromosome 8 open reading frame 42</i>
<i>C8orf59</i>	<i>chromosome 8 open reading frame 59</i>
<i>CAMK1G</i>	<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase 1G</i>
<i>CCL18</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 18</i>
<i>CCL2</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
<i>CCL20</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 20</i>
<i>CCL23</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 23</i>

Gen	Ausgeschriebener englischer Genname
<i>CCL3</i>	<i>mRNA for pLD78 peptide</i>
<i>CCL3L3</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3</i>
<i>CCL4</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 4</i>
<i>CCL5</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
<i>CCL7</i>	<i>chemokine (C-C motif) ligand 7</i>
<i>CCRL2</i>	<i>chemokine (C-C motif) receptor-like 2</i>
<i>CD743044</i>	<i>Homo sapiens cDNA clone UI-H-FT1-bjx-e-03-0-UI 3', mRNA sequence</i>
<i>CD83</i>	<i>CD83 molecule</i>
<i>CDC2</i>	<i>cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M</i>
<i>CH25H</i>	<i>cholesterol 25-hydroxylase</i>
<i>CKAP2L</i>	<i>cytoskeleton associated protein 2-like</i>
<i>CNGB1</i>	<i>cyclic nucleotide gated channel beta 1</i>
<i>CR598370</i>	<i>full-length cDNA clone CS0DF003YI18 of Fetal brain of Homo sapiens</i>
<i>CR627415</i>	<i>Homo sapiens mRNA (from clone DKFZp686G19280)</i>
<i>CSF2</i>	<i>colony stimulating factor 2</i>
<i>CSF3</i>	<i>colony stimulating factor 3</i>
<i>CXCL14</i>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 14</i>
<i>CXCL2</i>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i>
<i>CXCL3</i>	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 3</i>
<i>CXCR7</i>	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 7</i>
<i>CYB5D1</i>	<i>cytochrome b5 domain containing 1</i>
<i>CYP2C9</i>	<i>cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9</i>
<i>DEFB106A</i>	<i>defensin, beta 106A</i>
<i>DNAJB4</i>	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4</i>
<i>DSP</i>	<i>desmoplakin</i>
<i>DUSP2</i>	<i>dual specificity phosphatase 2</i>
<i>DUSP5</i>	<i>dual specificity phosphatase 5</i>
<i>EBI2</i>	<i>Epstein-Barr virus induced gene 2 (lymphocyte-specific G protein-coupled receptor)</i>
<i>EDN1</i>	<i>endothelin 1</i>
<i>EGR1</i>	<i>early growth response 1</i>

Gen	Ausgeschriebener englischer Genname
<i>EGR2</i>	<i>early growth response 2</i>
<i>EGR3</i>	<i>early growth response 3</i>
<i>EGR4</i>	<i>early growth response 4</i>
<i>EHD1</i>	<i>EH-domain containing protein testilin</i>
<i>EREG</i>	<i>epiregulin</i>
<i>ETS2</i>	<i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2</i>
<i>F3</i>	<i>coagulation factor III (receptor activity)</i>
<i>F9</i>	<i>coagulation factor IX</i>
<i>FAM57A</i>	<i>family with sequence similarity 57, member A</i>
<i>FFAR2</i>	<i>free fatty acid receptor 2</i>
<i>FLJ21272</i>	<i>Homo sapiens cDNA: FLJ21272 fis, clone COL01753</i>
<i>FLJ22675</i>	<i>Homo sapiens cDNA: FLJ22675 fis, clone HSI10553</i>
<i>FLJ30672</i>	<i>Homo sapiens cDNA FLJ30820 fis, clone FEBRA2001591</i>
<i>FLJ34651</i>	<i>Homo sapiens cDNA FLJ34651 fis, clone KIDNE2018167</i>
<i>FLJ39779</i>	<i>FLJ39779 protein</i>
<i>FLT1</i>	<i>fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)</i>
<i>FOSB</i>	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B</i>
<i>FOSL1</i>	<i>FOS-like antigen 1</i>
<i>FRMD7</i>	<i>FERM domain containing 7</i>
<i>GADD45A</i>	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>
<i>GATA4</i>	<i>GATA binding protein 4</i>
<i>GCKR</i>	<i>glucokinase (hexokinase 4) regulator</i>
<i>GEM</i>	<i>GTP binding mitogen-induced T-cell protein</i>
<i>GJB2</i>	<i>gap junction protein, beta 2</i>
<i>GPR109A</i>	<i>G protein-coupled receptor 109A</i>
<i>GPR109B</i>	<i>G protein-coupled receptor 109B</i>
<i>GPR132</i>	<i>G protein-coupled receptor 132</i>
<i>GPR84</i>	<i>G protein-coupled receptor 84</i>
<i>GPRC5A</i>	<i>G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A</i>
<i>HES1</i>	<i>hairy and enhancer of split 1</i>
<i>HEY1</i>	<i>hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1</i>

Gen	Ausgeschriebener englischer Genname
<i>HSD11B1</i>	<i>hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1</i>
<i>IBRDC3</i>	<i>IBR domain containing 3</i>
<i>ICAM1</i>	<i>intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor</i>
<i>IER3</i>	<i>immediate early response 3</i>
<i>IFNB1</i>	<i>interferon, beta 1</i>
<i>IL12B</i>	<i>interleukin 12B</i>
<i>IL13</i>	<i>interleukin 13</i>
<i>IL1A</i>	<i>interleukin 1 alpha</i>
<i>IL1F9</i>	<i>interleukin 1 family, member 9</i>
<i>IL1RN</i>	<i>interleukin 1 receptor antagonist (transcript variant 1)</i>
<i>IL20</i>	<i>interleukin 20</i>
<i>IL23A</i>	<i>interleukin 23, alpha subunit p19</i>
<i>IL6</i>	<i>interleukin 6</i>
<i>IL8</i>	<i>interleukin 8</i>
<i>INHBA</i>	<i>inhibin, beta A</i>
<i>JMJD3</i>	<i>jumonji domain containing 3</i>
<i>KCNJ2</i>	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2</i>
<i>KIAA1754</i>	<i>KIAA1754</i>
<i>KLHL21</i>	<i>kelch-like 21</i>
<i>L17326</i>	<i>Human pre-T/NK cell associated protein (1F6) mRNA, 3' end</i>
<i>LAMB3</i>	<i>laminin, beta 3</i>
<i>LIF</i>	<i>leukemia inhibitory factor</i>
<i>LINCR</i>	<i>likely ortholog of mouse lung-inducible Neutralized-related C3HC4 RING domain protein</i>
<i>LOC142937</i>	<i>cDNA clone IMAGE:3454038</i>
<i>LOC161931</i>	<i>testis nuclear RNA-binding protein-like</i>
<i>LOC200261</i>	<i>PP4277 mRNA</i>
<i>LOC341346</i>	<i>PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC341346</i>
<i>LOC387763</i>	<i>Homo sapiens hypothetical LOC387763</i>
<i>LOC388523</i>	<i>PREDICTED: Homo sapiens similar to Zinc finger protein 208</i>

Gen	Ausgeschriebener englischer Genname
LOC643950	<i>AF150420 Human mRNA from cd34+ stem cells Homo sapiens cDNA clone CBNAZD12, mRNA sequence</i>
LOC646561	<i>PREDICTED: Homo sapiens similar to WW45 protein</i>
LOC646626	<i>PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC646626</i>
LRFN5	<i>leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 5</i>
LRRC32	<i>leucine rich repeat containing 32</i>
LY6K	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus K</i>
LYPD3	<i>LY6/PLAUR domain containing 3</i>
MAFF	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F</i>
MAP3K8	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8</i>
MGC11082	<i>hypothetical protein MGC11082</i>
MGC16275	<i>Homo sapiens, clone IMAGE:5750465, mRNA</i>
MGC39372	<i>hypothetical protein MGC39372</i>
MGC45491	<i>hypothetical protein MGC45491</i>
MMP10	<i>matrix metalloproteinase 10</i>
MMP19	<i>matrix metalloproteinase 19</i>
MMP7	<i>matrix metalloproteinase 7</i>
MOP-1	<i>mRNA for MOP-1</i>
MSC	<i>musculin</i>
NFKBIZ	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta</i>
NLRP3	<i>NLR family, pyrin domain containing 3</i>
NR4A3	<i>nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3</i>
ODF3L1	<i>outer dense fiber of sperm tails 3-like 1</i>
OLR1	<i>oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1</i>
OR11H12	<i>olfactory receptor, family 11, subfamily H, member 12</i>
OSM	<i>oncostatin M</i>
OSR2	<i>odd-skipped related 2</i>
PDE4B	<i>phosphodiesterase 4B, cAMP-specific</i>
PDE6H	<i>phosphodiesterase 6H, cGMP-specific</i>
PHLDA1	<i>pleckstrin homology-like domain, family A, member 1</i>
PLAU	<i>plasminogen activator, urokinase</i>

Gen	Ausgeschriebener englischer Genname
<i>PNPLA8</i>	<i>patatin-like phospholipase domain containing 8</i>
<i>PPP1R15A</i>	<i>protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A</i>
<i>PRDM1</i>	<i>PR domain containing 1</i>
<i>PROZ</i>	<i>protein Z, vitamin K-dependent plasma glycoprotein</i>
<i>PTGER2</i>	<i>prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2)</i>
<i>PTGES</i>	<i>prostaglandin E synthase</i>
<i>PTGS2</i>	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>
<i>PTPRH</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, H</i>
<i>PTX3</i>	<i>pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta</i>
<i>RAB3C</i>	<i>RAB3C, member RAS oncogene family</i>
<i>RALGDS</i>	<i>ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>
<i>RGS1</i>	<i>regulator of G-protein signalling 1</i>
<i>RGS2</i>	<i>regulator of G-protein signalling 2</i>
<i>RHCG</i>	<i>Rh family, C glycoprotein</i>
<i>RNF152</i>	<i>RING finger protein 152</i>
<i>SDC4</i>	<i>syndecan 4</i>
<i>SEC14L2</i>	<i>mRNA for KIAA1658 protein</i>
<i>SERPINB9</i>	<i>serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9</i>
<i>SLN</i>	<i>sarcolipin</i>
<i>SNAI1</i>	<i>snail homolog 1</i>
<i>SNORD22</i>	<i>small nucleolar RNA, C/D box 22</i>
<i>SOCS1</i>	<i>suppressor of cytokine signaling 1</i>
<i>SPHK1</i>	<i>sphingosine kinase 1</i>
<i>SPINK1</i>	<i>serine peptidase inhibitor, Kazal type 1</i>
<i>SPP1</i>	<i>secreted phosphoprotein 1</i>
<i>SSTR2</i>	<i>somatostatin receptor 2</i>
<i>STX1A</i>	<i>syntaxin 1A</i>
<i>SYNPO2</i>	<i>Homo sapiens mRNA; cDNA (from clone DKFZp451G189)</i>
<i>TACR1</i>	<i>tachykinin receptor 1</i>
<i>TAGAP</i>	<i>T-cell activation GTPase activating protein</i>
<i>TAS2R39</i>	<i>taste receptor, type 2, member 39</i>

Gen	Ausgeschriebener englischer Genname
<i>TFPI2</i>	<i>tissue factor pathway inhibitor 2</i>
<i>TMEM52</i>	<i>transmembrane protein 52</i>
<i>TMEM54</i>	<i>transmembrane protein 54</i>
<i>TMEM88</i>	<i>transmembrane protein 88</i>
<i>TMPRSS9</i>	<i>cDNA FLJ16193 fis, clone BRTHA2018011</i>
<i>TNF</i>	<i>tumor necrosis factor</i>
<i>TNFAIP3</i>	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>
<i>TNFAIP6</i>	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6</i>
<i>TNFAIP8</i>	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8</i>
<i>TNFSF15</i>	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15</i>
<i>TNIP3</i>	<i>TNFAIP3 interacting protein 3</i>
<i>TULP2</i>	<i>tubby like protein 2</i>
<i>UNQ9368</i>	<i>clone DNA213069 RTFV9368</i>
<i>UPB1</i>	<i>ureidopropionase, beta</i>
<i>XAGE1</i>	<i>X antigen family, member 1</i>
<i>YPEL4</i>	<i>yippee-like 4</i>
<i>ZC3H12A</i>	<i>zinc finger CCCH-type containing 12A</i>
<i>ZNF267</i>	<i>zinc finger protein 267</i>
<i>ZNF665</i>	<i>zinc finger protein 665</i>
<i>ZNF738</i>	<i>zinc finger protein 738</i>

9.2 „Gene Ontology“-Analyse

Tabelle 9-2 beinhaltet alle in der Clusteranalyse signifikant angereicherten „Gene Ontology“ (GO)-Begriffe, die in der Datenbank „Gene Ontology“ (www.geneontology.org) hinterlegten zugehörigen englischen Begriffsdefinitionen, die Angaben zur Signifikanz der Anreicherung und der Häufigkeit des Begriffs. Die GO-Analyse erfolgte mit Hilfe der Software „GeneSpring GX 10.0.2“ unter Verwendung einer Benjamini-Yekutieli-Korrektur (siehe 4.3.4.3) (* $P < 5 \times 10^{-2}$, ** $P < 1 \times 10^{-2}$, *** $P < 1 \times 10^{-3}$).

Tabelle 9-2: In der Clusteranalyse signifikant angereicherte „Gene Ontology“-Begriffe

englischer „Gene Ontology“ (GO)-Begriff	englische Begriffs-Definition (aus www.geneontology.org)	korrigierter P-Wert	Häufigkeit in der Clusteranalyse/in allen Genen auf dem Array
cytokine receptor binding	Interacting selectively with a cytokine receptor.	$2,35 \times 10^{-16}$	16/142
extracellular space	That part of a multicellular organism outside the cells proper, usually taken to be outside the plasma membranes, and occupied by fluid.	$9,96 \times 10^{-12}$	35/468
cytokine activity	Functions to control the survival, growth, differentiation and effector function of tissues and cells.	$1,21 \times 10^{-11}$	24/152
extracellular region part	Any constituent part of the extracellular region, the space external to the outermost structure of a cell. For cells without external protective or external encapsulating structures this refers to space outside of the plasma membrane.	$3,98 \times 10^{-09}$	35/692
response to wounding	A change in state or activity of a cell or an organism (in terms of movement, secretion, enzyme production, gene expression, etc.) as a result of a stimulus indicating damage to the organism.	$3,98 \times 10^{-09}$	28/362
defense response	Reactions, triggered in response to the presence of a foreign body or the occurrence of an injury, which result in restriction of damage to the organism attacked or prevention/recovery from the infection caused by the attack.	$5,32 \times 10^{-09}$	27/470

englischer „Gene Ontology“ (GO)-Begriff	englische Begriffs-Definition (aus www.geneontology.org)	korrigierter P-Wert	Häufigkeit in der Clusteranalyse/in allen Genen auf dem Array
immune response	Any immune system process that functions in the calibrated response of an organism to a potential internal or invasive threat.	$1,04 \times 10^{-07}$	26/520
immune system process	Any process involved in the development or functioning of the immune system, an organismal system for calibrated responses to potential internal or invasive threats.	$2,82 \times 10^{-07}$	26/701
inflammatory response	The immediate defensive reaction (by vertebrate tissue) to infection or injury caused by chemical or physical agents.	$9,24 \times 10^{-07}$	22/259
extracellular region	The space external to the outermost structure of a cell. For cells without external protective or external encapsulating structures this refers to space outside of the plasma membrane.	$9,24 \times 10^{-07}$	41/1080
response to stress	A change in state or activity of a cell or an organism (in terms of movement, secretion, enzyme production, gene expression, etc.) as a result of a disturbance in organismal or cellular homeostasis.	$2,48 \times 10^{-06}$	33/1086
G-protein-coupled receptor binding	Interacting selectively and non-covalently with a G-protein-coupled receptor.	$1,55 \times 10^{-05}$	12/56
receptor binding	Interacting selectively and non-covalently with one or more specific sites on a receptor molecule.	$4,83 \times 10^{-05}$	24/668
chemokine activity	The function of a family of chemotactic pro-inflammatory activation-inducible cytokines acting primarily upon hemopoietic cells in immunoregulatory processes.	$8,64 \times 10^{-05}$	12/44
chemokine receptor binding	Interacting selectively and non-covalently with any chemokine receptor.	$1,08 \times 10^{-04}$	12/45
response to stimulus	A change in state or activity of a cell or an organism (in terms of movement, secretion, enzyme production, gene expression, etc.) as a result of a stimulus.	$1,21 \times 10^{-04}$	46/2135

englischer „Gene Ontology“ (GO)-Begriff	englische Begriffs-Definition (aus www.geneontology.org)	korrigierter P-Wert	Häufigkeit in der Clusteranalyse/in allen Genen auf dem Array
multi-organism process	Any process in which an organism has an effect on another organism of the same or different species.	$2,11 \times 10^{-03}$	6/255
multicellular organismal process	Any biological process, occurring at the level of a multicellular organism, pertinent to its function.	$3,13 \times 10^{-03}$	22/2927
regulation of biological process	Any process that modulates the frequency, rate or extent of a biological process. Biological processes are regulated by many means; examples include the control of gene expression, protein modification or interaction with a protein or substrate molecule.	$3,72 \times 10^{-03}$	61/6327
response to other organism	A change in state or activity of a cell or an organism (in terms of movement, secretion, enzyme production, gene expression, etc.) as a result of a stimulus from another living organism.	$4,37 \times 10^{-03}$	6/151
apoptosis	A form of programmed cell death.	$4,47 \times 10^{-03}$	11/373
programmed cell death	Cell death resulting from activation of endogenous cellular processes.	$4,52 \times 10^{-03}$	11/374
response to external stimulus	A change in state or activity of a cell or an organism (in terms of movement, secretion, enzyme production, gene expression, etc.) as a result of an external stimulus.	$5,17 \times 10^{-03}$	17/291
regulation of cell communication	Any process that modulates the frequency, rate or extent of cell communication. Cell communication is the process that mediates interactions between a cell and its surroundings. Encompasses interactions such as signaling or attachment between one cell and another cell, between a cell and an extracellular matrix, or between a cell and any other aspect of its environment.	$9,00 \times 10^{-03}$	1/252
protein binding	Interacting selectively and non-covalently with any protein or protein complex (a complex of two or more proteins that may include other nonprotein molecules).	$9,13 \times 10^{-03}$	61/6156
cell death	A biological process that results in permanent cessation of all vital functions of a cell.	$1,40 \times 10^{-02}$	11/420

englischer „Gene Ontology“ (GO)-Begriff	englische Begriffs-Definition (aus www.geneontology.org)	korrigierter P-Wert	Häufigkeit in der Clusteranalyse/in allen Genen auf dem Array
death	A permanent cessation of all vital functions: the end of life; can be applied to a whole organism or to a part of an organism.	$1,40 \times 10^{-02}$	11/420
wound healing	The series of events that restore integrity to a damaged tissue, following an injury.	$1,40 \times 10^{-02}$	7/103
regulation of biological quality	Any process that modulates the frequency, rate or extent of a biological quality. A biological quality is a measurable attribute of an organism or part of an organism, such as size, mass, shape, color, etc..	$1,40 \times 10^{-02}$	11/836
regulation of multicellular organismal process	Any process that modulates the frequency, rate or extent of a multicellular organismal process, the processes pertinent to the function of a multicellular organism above the cellular level; includes the integrated processes of tissues and organs.	$1,49 \times 10^{-02}$	2/371
oncostatin-M receptor binding	Interacting selectively and non-covalently with the oncostatin-M receptor.	$1,77 \times 10^{-02}$	2/2
response to virus	A change in state or activity of a cell or an organism (in terms of movement, secretion, enzyme production, gene expression, etc.) as a result of a stimulus from a virus.	$1,85 \times 10^{-02}$	6/76
anatomical structure development	The biological process whose specific outcome is the progression of an anatomical structure from an initial condition to its mature state. An anatomical structure is any biological entity that occupies space and is distinguished from its surroundings.	$1,87 \times 10^{-02}$	3/1559
blood vessel development	The process whose specific outcome is the progression of a blood vessel over time, from its formation to the mature structure.	$1,98 \times 10^{-02}$	2/111
vasculature development	The process whose specific outcome is the progression of the vasculature over time, from its formation to the mature structure.	$2,06 \times 10^{-02}$	2/112

englischer „Gene Ontology“ (GO)-Begriff	englische Begriffs-Definition (aus www.geneontology.org)	korrigierter P-Wert	Häufigkeit in der Clusteranalyse/in allen Genen auf dem Array
biological regulation	Any process that modulates the frequency, rate or extent of any biological process, quality or function.	$2,39 \times 10^{-02}$	65/6586
regulation of body fluid levels	Any process that modulates the levels of body fluids.	$2,40 \times 10^{-02}$	6/116
coagulation	The process in which a fluid solution, or part of it, changes into a solid or semisolid mass.	$2,82 \times 10^{-02}$	6/85
blood coagulation	The sequential process in which the multiple coagulation factors of the blood interact, ultimately resulting in the formation of an insoluble fibrin clot.	$2,82 \times 10^{-02}$	6/85
regulation of cellular process	Any process that modulates the frequency, rate or extent of a cellular process, any of those that are carried out at the cellular level, but are not necessarily restricted to a single cell. For example, cell communication occurs among more than one cell, but occurs at the cellular level.	$2,86 \times 10^{-02}$	61/5843
regulation of cell proliferation	Any process that modulates the frequency, rate or extent of cell proliferation.	$3,62 \times 10^{-02}$	21/392
hemostasis	The stopping of bleeding (loss of body fluid) or the arrest of the circulation to an organ or part.	$3,71 \times 10^{-02}$	6/90
response to pain	A change in state or activity of a cell or an organism (in terms of movement, secretion, enzyme production, gene expression, etc.) as a result of a pain stimulus.	$3,96 \times 10^{-02}$	1/3
interleukin-6 receptor binding	Interacting selectively and non-covalently with the interleukin-6 receptor.	$3,96 \times 10^{-02}$	2/3
positive regulation of cellular process	Any process that activates or increases the frequency, rate or extent of a cellular process, any of those that are carried out at the cellular level, but are not necessarily restricted to a single cell. For example, cell communication occurs among more than one cell, but occurs at the cellular level.	$4,43 \times 10^{-02}$	13/1073

englischer „Gene Ontology“ (GO)-Begriff	englische Begriffs-Definition (aus www.geneontology.org)	korrigierter P-Wert	Häufigkeit in der Clusteranalyse/in allen Genen auf dem Array
blood vessel morphogenesis	The process in which the anatomical structures of blood vessels are generated and organized.	$4,92 \times 10^{-02}$	1/96

9.3 Publikationen

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. 2010: **Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes.** *J.Immunol.* 184:1200-1209.

Gottfried E., S. Rogenhofer, H. Waibel, L.A. Kunz-Schughart, A. Reichle, M. Wehrstein, A. Peuker, **K. Peter**, G. Hartmannsgruber, R. Andreesen, M. Kreutz. 2011: **Pioglitazone modulates tumor cell metabolism and proliferation in multicellular tumor spheroids.** *Cancer Chemother Pharmacol.* 67:117-26. Epub 2010 Mar 9.

Gottfried E., **K. Peter**, M.P. Kreutz. 2010: **The metabolic Achilles' heel: tumor cell metabolism as therapeutic target.** In *From molecular to modular tumor therapy: Tumors are reconstructible communicatively evolving systems.* Springer Verlag.

9.4 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an **Prof. Dr. Marina Kreutz** für die tolle Betreuung dieser Arbeit, die nicht nur in der großartigen fachlichen Unterstützung und der Geduld bei der Beantwortung sämtlicher Fragen bestand, sondern vor allem auch in ihrem Interesse, die wissenschaftliche Denk- und Arbeitsweise zu vermitteln. Ich habe in den letzten Jahren sehr viel gelernt! In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch für die Kongressteilnahmen, u.a. in Innsbruck, München, Halle, Brescia und Edinburgh, bedanken.

Prof. Dr. Jens Schlossmann danke ich für die Bereitschaft, die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit von Seiten der Universität zu übernehmen, für sein Interesse an der Arbeit und die Unterstützung bei der Durchführung und Interpretation der Kalziummessungen. An dieser Stelle möchte ich auch **Bernhard Hieke** für seine Hilfe bei den Kalziummessungen danken.

Prof. Dr. Reinhard Andreesen danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit und seine Unterstützung sowie für die schönen Forschungswochenenden in Hirschberg, die Betriebsausflüge und Weihnachtsfeiern.

Ein besonderer Dank geht an **Prof. Dr. Michael Rehli** für seine konstruktiven Vorschläge in den Laborseminaren und die Auswertung der Arrays, bei der Ideen für viele weitere Versuche entstanden sind.

Prof. Dr. Peter Oefner danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen an seinem Lehrstuhl, dabei geht mein besonderer Dank an **Dr. Kathrin Renner**, **Dr. Kaja Dettmer-Wilde**, **Dr. Birgit Timischl**, **Karin Eberhart**, **Ireen Ritter** und **Nadine Nürnberger**.

Ein herzliches „Danke“ geht an die AGs Kreutz und Rehli sowie die weiteren Carreras-Bau-„Bewohner“: **Eva** möchte ich vor allem für die vielen Diskussionen der Daten, die Tipps und Anregungen dazu und für's Korrekturlesen danken. **Gabi** und **Alice**, vielen Dank für Eure Hilfe beim Realplexen, Westernblotten, ELISAen, ... allen sonstigen Laborproblem(ch)en und für die tolle Stimmung im Carreras-Labor, es war immer eine Freude, mit Euch zu arbeiten! **Kaste**, danke für die schöne Zeit im, aber auch außerhalb des Labors. Und nicht zu vergessen, danke, dass Du mir als Primerman unter die Arme gegriffen hast und ein Auge auf meine Realplex-Anfänge hattest. Auch **Monika** und **Alex**

danke ich für die Unterstützung im Labor. Monika, außerdem vielen Dank für's häufige Besorgen der AG-Kreutz-Geschenke. **Katrin**, schön, dass es Dich nun erneut in den Carreras-Bau verschlagen hat! Danke für Deinen Korrektureinsatz gleich zu Beginn dieser zweiten Carreras-Phase! **Lucia**, danke für Deine Unterstützung bei den Arrays, aber auch bei vielen anderen Laborfragen. Auch **Julia** und **Chris** danke ich für's Korrekturlesen. An alle bereits genannten sowie an **Sandra K., Martina, Hang, Dagmar, Ireen, Claudia, Maja, Sandra, Bernadette, Julia R., Sabine, Isabel, Thomas** und **Ute**: Danke für die vielen Aufmunterungen in der letzten Zeit, für das tolle Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft, die lustigen Kaffee- und Mittagspausen und die vielen gemeinsamen Unternehmungen außerhalb des Forschungsbaus!!

Und, nicht zu vergessen, auch wenn sie schon längst in alle Winde verweht sind, danke an **Carol, Eddy, Tobi** und **Moni** für die schöne Zeit im Labor und darüber hinaus! Moni, ohne Dich hätte ich wohl nie zu dieser tollen Arbeitsgruppe gefunden!

Ein riesengroßes DANKE geht an meine Geschwister **Maresa** und **Timo**, für die Unterstützung, für's Zuhören, für's Ablenken, für's Aufheitern, für die unwissenschaftlichen, aber sehr kreativen und unterhaltsamen Vorschläge zum Inhalt der Doktorarbeit und für's Mut machen. Von Herzen danke ich **meinen Eltern**, die mich immer in jeglicher Hinsicht unterstützt und ermutigt haben. Ohne Euch wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen!

Tom, DANKE für ALLES, nicht nur für Deine Geduld!

9.5 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....

.....

(Katrin Peter)