

AUS DER ABTEILUNG
FÜR HÄMATOLOGIE UND INTERNISTISCHE ONKOLOGIE
PROF. DR. REINHARD ANDREESEN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss von MTA
auf die Differenzierung und Reifung
humaner Monozyten zu dendritischen Zellen
*in vitro***

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt
von Bernadette Neueder

2012

AUS DER ABTEILUNG
FÜR HÄMATOLOGIE UND INTERNISTISCHE ONKOLOGIE
PROF. DR. REINHARD ANDREESEN
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss von MTA
auf die Differenzierung und Reifung
humaner Monozyten zu dendritischen Zellen
*in vitro***

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt
von Bernadette Neueder

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Marina Kreutz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Fichtner-Feigl
Tag der mündlichen Prüfung:	07.11.2012

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Die Rolle der dendritischen Zellen	2
1.2.1 Dendritische Zellen in der Medizin	4
1.3 Veränderungen des Immunsystems durch Tumore	4
1.4 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA): ein weiterer immune escape-Mechanismus?	6
1.4.1 Mögliche Wirkmechanismen von MTA	8
1.5 Zielsetzung	10
2 Material.....	11
2.1 Geräte.....	11
2.2 Verbrauchsmaterial.....	12
2.3 Chemikalien, Kits und Reagenzien	13
2.4 Antikörper	14
2.4.1 Antikörper für Durchflusszytometrie	14
2.4.2 Antikörper für Western-Blot	14
2.5 RT-qPCR-Primer für humane Sequenzen	15
2.6 Software, Datenbanken	15
3 Methoden	16
3.1 Zellbiologische Methoden	16
3.1.1 Bestimmung der Zellzahl.....	16
3.1.2 Einfrieren und Auftauen.....	16
3.1.3 Gewinnung von Monozyten.....	17
3.1.4 Kultivierung von Monozyten und Gewinnung dendritischer Zellen	18
3.1.5 Kultivierung von dendritischen Zellen zur weiteren Analyse.....	19
3.2 Durchflusszytometrie	19
3.2.1 Analyse der Vitalität von Monozyten	19
3.2.2 Analyse der Oberflächenantigenexpression dendritischer Zellen.....	20
3.3 Zytokinmessung mittels ELISA	21
3.4 Proliferationstest	21
3.4.1 Gemischte Lymphozytenreaktion	21
3.4.2 T-Zellproliferation ohne dendritische Zellen als Stimulatoren.....	22

3.5	Molekularbiologische Methoden.....	22
3.5.1	RNA-Isolierung	22
3.5.2	Reverse Transkription	23
3.5.3	Polymerase-Kettenreaktion	23
3.6	Proteinbiochemische Methoden.....	25
3.6.1	Proteinlysate.....	26
3.6.2	Proteinbestimmung	26
3.6.3	SDS-Gelelektrophorese.....	27
3.6.4	Western-Blot.....	29
3.7	Statistik	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Einfluss von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) auf die Vitalität von Monozyten und dendritischen Zellen.....	32
4.1.1	Apoptoseinduktion in Monozyten durch MTA	32
4.1.2	Zellausbeute der dendritischen Zellen bei Inkubation mit MTA	33
4.2	Oberflächenantigenexpression auf unreifen, reifen dendritischen Zellen und fast DCs unter dem Einfluss von MTA.....	34
4.2.1	Oberflächenantigenexpression auf iDCs nach MTA-Zugabe.....	35
4.2.2	Oberflächenantigenexpression auf mDCs durch MTA-Zugabe	36
4.2.3	Oberflächenantigenexpression auf fDCs unter MTA-Zugabe	37
4.3	IL-12- und IL-10-Produktion von stimulierten DCs unter MTA-Zugabe	38
4.4	Gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte reaction, MLR) in Gegenwart von MTA.....	39
4.5	Hemmung der T-Lymphozytenproliferation durch MTA-Zugabe	42
4.6	Regulation von Antigenprozessierungs-assoziierten Faktoren in dendritischen Zellen durch MTA auf mRNA- und Proteinebene	44
4.6.1	Analyse des Einflusses von MTA auf die Genexpression von <i>TAP1</i> , <i>TAP2</i> , <i>TAPASIN</i> , <i>LMP2</i> , <i>PSMB8</i> in DCs durch MTA.....	44
4.6.2	Analyse des Einflusses von MTA auf die Expression von <i>TAP1</i> , <i>TAP2</i> und <i>LMP2</i> auf Proteinebene	46
5	Diskussion	47
5.1	Einfluss von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) auf humane dendritische Zellen.....	47
5.1.1	Hemmung der DC-Reifung durch MTA.....	47
5.1.2	Modulation der Zytokinproduktion durch MTA.....	49

5.1.3	Hemmung der T-Zellaktivierung und -proliferation durch MTA.....	50
5.1.4	Hemmung der Antigenprozessierungsmaschinerie in DCs	52
6	Zusammenfassung	54
7	Literaturverzeichnis	55
	Danksagung	70
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Synthese und Metabolismus von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA).....	7
Abb. 2: Apoptoseinduktion in Monozyten durch MTA.....	33
Abb. 3: Zellausbeute von DCs nach Kultivierung mit MTA.....	34
Abb. 4: Oberflächenantigenexpression auf iDCs unter dem Einfluss von MTA.....	35
Abb. 5: Hemmung der Oberflächenantigenexpression von CD1a, CD14, CD86, CD83, CD86 auf mDCs nach Kultivierung mit MTA.....	37
Abb. 6: Oberflächenantigenexpression auf fDCs unter dem Einfluss von MTA.	38
Abb. 7: IL-12- und IL-10-Produktion von mit LPS stimulierten DCs nach Inkubation mit MTA.	39
Abb. 8: T-Zellproliferation von in Gegenwart von MTA differenzierter DCs.....	40
Abb. 9: T-Zellproliferation in Gegenwart von MTA in der MLR mit mDCs.	41
Abb. 10: T-Zellproliferation in Gegenwart von MTA in der MLR mit fDCs.	42
Abb. 11:T-Lymphozytenproliferation in Gegenwart von MTA.....	43
Abb. 12: Analyse der Genexpression von Komponenten der APM in DCs nach MTA- Zugabe.....	45
Abb. 13: Regulation von TAP2 in reifen dendritischen Zellen auf Protein-Ebene durch MTA-Zugabe.....	46

Abkürzungsverzeichnis

AB-Serum	Serum von Blutspendern mit Blutgruppe AB
AK	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle
APM	Antigenprozessierungsmaschinerie
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BSS	gepufferte Salzlösung (buffered salt solution)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Differenzierungs-Cluster (cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre (copy) DNA
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CTL	zytotoxische T-Zelle
DC	dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay)
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötale Kälberserum (fetal calf serum)
fDC	schnell gereifte dendritische Zelle (fast dendritic cell)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
H ₂ O	Wasser
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
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HLA	humanes Leukozytenantigen

iDC	unreife dendritische Zelle (immature dendritic cell)
iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase in Makrophagen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LMP	low molecular weight protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar (mol/l)
mDC	reife dendritische Zelle (mature dendritic cell)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minuten
MLR	mixed lymphocyte reaction
M-MLV	moloney murine leukemia virus
MNC	mononukleäre Zelle
mRNA	messenger RNA
MS	Milchsäure
MTA	5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin
MTAP	Methylthioadenosin-Phosphorylase
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nukleärer Faktor κB
ODC	Ornithin-Decarboxylase
P	Phosphat
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMBC	periphere mononukleäre Blutzelle (peripheral mononuclear blood cell)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Entwicklungsort des Kulturmediums)
RT-qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (real-time quantitative polymerase chain reaction)
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts (standard error of the mean)
TA	Tumorantigen
TAP	Antigenpeptid-Transporter (transporter associated with antigen processing)
TEMEN	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris-buffered saline)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TGF- β	transforming growth factor β
T _H 1	T-Helferzelle 1
TNF	Tumornekrosefaktor
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Die Aufgaben des menschlichen Immunsystems bestehen neben der Kontrolle und Elimination bestimmter Pathogene wie Bakterien, Viren oder Pilze auch in der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Man unterscheidet beim Immunsystem eine angeborene und eine erworbene (adaptive) Komponente.

Das angeborene Immunsystem besteht aus zellulären und humoralen Anteilen, die eine unspezifische aber sofortige Immunantwort gewährleisten. Eine erste physiologische Barriere für Krankheitserreger stellen die Epithelien der Haut und Schleimhaut dar. Durch Phagozytose werden eindringende Erreger von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen (DCs) eliminiert. Auch natürliche Killerzellen, welche zu den Lymphozyten gehören, tragen durch Abtötung von Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen zur sofortigen Immunantwort bei. Diese Zelltypen können über spezielle Rezeptoren, wie die Toll-like-Rezeptoren, Pathogene erkennen. Des Weiteren können Erreger oder infizierte Zellen durch lösliche Faktoren, wie dem Komplementsystem, durch Opsonisierung erkennbar gemacht oder zerstört werden. Eine wichtige regulatorische Komponente stellen Zytokine dar, die nach Aktivierung von Immunzellen als Botenstoffe freigesetzt werden. Durch die Rekrutierung von phagozytierenden Zellen und die Aktivierung sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems tragen sie zu einer korrekten Immunantwort bei.

Zu den wichtigsten zellulären Bestandteilen des adaptiven Immunsystems gehören die antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und die Lymphozyten, bei denen man zwischen B- und T-Lymphozyten unterscheidet. B-Lymphozyten differenzieren nach Aktivierung durch körperfremde Antigene zu Plasmazellen, welche spezifische Antikörper produzieren. Diese Antikörper führen u.a. durch Komplementaktivierung zur Lyse der Erregerzelle. Aus aktivierten B-Lymphozyten können Gedächtniszellen hervorgehen, die bei wiederholter Infektion durch einen bekannten Erreger eine sofortige Immunantwort auslösen können. Während B-Zellen für die humorale Immunität verantwortlich sind, bilden die T-Lymphozyten den zellvermittelten Anteil des adaptiven Immunsystems. Sie werden durch APCs aktiviert, wodurch es zu einer klonalen Expansion der T-Zellen kommt. Zu den APCs zählen neben Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten vor allem DCs. Diese Aktivierung findet mit Hilfe

ihres Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) und weiteren kostimulatorischen Molekülen statt. MHC-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren zelleigene Antigene. Hingegen findet man MHC-II-Moleküle ausschließlich auf APCs. Diese binden Antigene, die nach Phagozytose eines Pathogens zur Präsentation an die Zelloberfläche transportiert werden. $CD8^+$ (cluster of differentiation) zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) werden durch Peptid/MHC-I-Komplexe aktiviert und zerstören ihre Zielzelle direkt. Dagegen erkennen die den $CD4^+$ -Korezeptor tragenden T-Helferzellen Peptid/MHC-II-Komplexe und regen durch Zytokinproduktion die Immunantwort weiter an. Somit stellen professionelle APCs eine entscheidende Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar. [1]

1.2 Die Rolle der dendritischen Zellen

DCs haben ihren Namen auf Grund ihrer Morphologie erhalten, da sie sich durch viele lange Ausläufer auszeichnen (lat. *dendriticus* = verzweigt). Man unterscheidet grundsätzlich DCs, die sich aus der myeloiden Zellreihe entwickeln, von DCs, die sich aus der lymphoiden Reihe entwickeln. Die Hauptaufgabe der myeloiden DCs besteht in der Antigenpräsentation gegenüber T-Lymphozyten, wohingegen lymphoide DCs vor allem in der Toleranzinduktion eine Rolle spielen [2]. Unreife DCs befinden sich vor allem in der Peripherie des Körpers und migrieren nach Kontakt mit einem Antigen zu den sekundären lymphatischen Organen, meist entlang der afferenten Lymphstrombahn in den nächsten Lymphknoten. Hier findet ihre Ausreifung, die Rekrutierung von B- und T-Lymphozyten durch Chemokine und die anschließende Antigenpräsentation statt [3-6]. Unreife DCs zeichnen sich vor allem durch ihre Fähigkeit der Phagozytose aus [7, 8]. Sie sind im Gegensatz zu reifen DCs nur schwache T-Zell-Stimulatoren und kaum in der Lage, Antigene zu präsentieren. Dies spiegelt sich in der niedrigen Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen und in der hohen Anzahl der $Fc\gamma$ - und $Fc\epsilon$ -Rezeptoren für die Erkennung von Immunglobulinen wieder [7, 9]. Für die Antigenaufnahme stehen ihnen neben diesen Rezeptoren auch der Mannoserezeptor und die Pinozytose zur Verfügung, über die DCs in großen Mengen extrazelluläre Flüssigkeiten in Vesikeln internalisieren und speichern können [10]. Bei der Reifung der DCs kommt es u.a. zur Abnahme der Phagozytose-Fähigkeit sowie zur

Hochregulation von MHC- und kostimulatorischen Molekülen [11-13]. Sobald DCs exogenes Antigen gebunden haben, wird dieses nach der Internalisierung über das Phagosom abgebaut und über MHC-II präsentiert [14, 15]. Für die Antigenpräsentation spielen die Komponenten der sogenannten Antigenprozessierungsmaschinerie (APM) eine wichtige Rolle. Zu ihnen zählen u.a. die Proteine LMP2 (low molecular weight protein), LMP10 und PSMB8 (PSMB8 entspricht LMP7), welche Untereinheiten des Proteasoms sind, sowie die Antigenpeptid-Transporter (TAP) 1 und TAP2. Auch diese Komponenten werden im Zuge der Reifung hochreguliert [16, 17]. Die Zahl der Peptid/MHC-Komplexe ist auf reifen DCs weitaus höher als bei anderen antigenpräsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten oder Monozyten [7, 18]. Dadurch stellen sie die effektivsten Stimulatoren von T-Lymphozyten dar und können durch die „ausgeprägte“ Antigenpräsentation eine antigenspezifische T-Zell-Antwort vermitteln [15, 19]. Darüber hinaus sezernieren DCs Zytokine, welche starken Einfluss auf verschiedene Zellen des Immunsystems haben. Hierzu zählt Interleukin (IL)-12 [20-22], welches unter anderem eine verstärkte T-Helferzelle 1 (T_H1)-Antwort mit Interferon (INF)- γ -Produktion vermittelt und zur Aktivierung von natürlichen Killerzellen beiträgt [23, 24].

In vitro erfolgt die Generierung von myeloiden DCs entweder aus peripheren Blutmonozyten oder aus $CD34^+$ Stammzellen [25-27], welche aus (Nabelschnur-) Blut oder dem Knochenmark [25, 28, 29] gewonnen werden. Aus Monozyten erfolgt die Differenzierung zu DCs durch Zugabe von IL-4 und Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) für 5 Tage [30-32]. Die Reifung der DCs kann durch verschiedene Stimuli, wie Lipopolysaccharide (LPS) oder andere bakterielle Bestandteile, CD40 oder durch die Zytokine IL-1 und Tumornekrose (TNF)- α erreicht werden [7, 10, 12, 33]. Eine weitere Möglichkeit haben Jonuleit *et al.* beschrieben, bei der eine Zugabe von TNF- α , IL-1, IL-6 und Prostaglandin E_2 (PGE₂) erfolgt [34]. Dagegen führen sowohl IL-10 als auch Glukokortikoide zu einer Hemmung der DC-Reifung [35, 36]. Schnell gereifte DCs (fDCs) werden im Gegensatz zu den mDCs innerhalb von 48 Stunden gereift, sind aber funktionell und phänotypisch vergleichbar [37, 38]. Die Reifung von DCs kann man durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle nachverfolgen. Unreife DCs sind gekennzeichnet durch CD1a, worüber sie Lipidantigene präsentieren, und eine niedrige Expression von kostimulatorischen Molekülen [7, 39]. Reife DCs dagegen zeichnen sich durch eine hohe Expression von CD40, CD80, CD86, humanes Leukozytenantigen (HLA)-DR sowie CD83 aus [9, 12, 32]. Das vor allem auf

Monozyten und Makrophagen vorkommende CD14 wird durch IL-4 runterreguliert [40, 41], während CD1a durch GM-CSF stärker exprimiert wird [42].

1.2.1 Dendritische Zellen in der Medizin

Dendritischen Zellen kommt dank ihrer Rolle als APCs in der Medizin eine wichtige klinische Bedeutung zu. Mit dem Ziel bei Patienten mit bestehender maligner Erkrankung eine tumorspezifische Immunantwort zur Reduktion des Tumors auszulösen, werden sie vermehrt als Impfadjuvans genutzt [43]. Hierfür werden isolierte autologe DCs entweder mit Tumorpeptiden beladen oder mit Tumor-RNA transfiziert und anschließend in den Patienten zurückgegeben [44, 45]. Die Tumorantigen (TA)-tragenden DCs führen zu einer spezifischen Antigenpräsentation und lösen eine Reaktion CTLs gegen die TA-tragenden Tumorzellen aus [46-48]. Mit dieser so genannten „Krebsvakzinierung“ wurde in präklinischen Experimenten u.a. bei Mäusen mit einem induzierten Kolonkarzinom gezeigt, dass durch die TA-präsentierenden DCs eine spezifische T-Zell-Antwort ausgelöst wird. Weiterhin wurde auch ein Rückgang der bestehenden Lungenmetastasen verzeichnet [49, 50]. Auch in klinischen Studien konnten positive Ergebnisse erzielt werden: bei Patienten mit fortgeschrittenem malignen Melanom und Nierenzellkarzinom im metastasierten Stadium kam es zu einer Regression des Tumors und der Metastasen [51-53]. Ebenfalls konnte bei Patienten mit einem malignen Melanom eine tumorspezifische Antwort auch von CD4+-T-Lymphozyten nachgewiesen werden, was mit einem besseren klinischen Verlauf assoziiert war [54, 55]. fDCs werden in aktuellen Studien bereits als mögliche Impfadjuvantien diskutiert, die eine Einsparung in Zeit und Geld bedeuten würden [56, 57].

1.3 Veränderungen des Immunsystems durch Tumore

Das menschliche Immunsystem ist neben seiner Rolle in der Bekämpfung einer Entzündung grundsätzlich imstande entartete Zellen zu detektieren und zu eliminieren. Diese Fähigkeit wird als *immunosurveillance* (Immunüberwachung) bezeichnet [58]. Jedoch vermögen Tumore durch verschiedene Mechanismen die Immunantwort zu umgehen und sich dadurch einen Überlebensvorteil zu verschaffen. Diesen sogenannten *immune escape* (Immunevasion) erreichen sie

einerseits durch Veränderungen der Tumorzellen selbst, andererseits durch Mechanismen, die zur Modulation des umgebenden Tumorstromas führen.

So zeichnen sich Tumorzellen durch eine verringerte Expression oder einen Verlust von MHC- und kostimulatorischen Molekülen aus, wodurch ihre Erkennung erschwert wird [59-62]. In einigen Tumoren konnten Defekte in der APM nachgewiesen werden, so dass eine spezifische Erkennung und Elimination durch CTLs nicht mehr gewährleistet war. Hierbei waren vor allem die APM-assoziierten Transporter TAP-1 und -2, und LMP-2, -10 und PSMB8 betroffen [63-67]. Tumorprogression, Metastasierung und schlechteres Überleben der Patienten korrelierten mit Defizienzen in der APM im Prostata- und Nierenzellkarzinom [68-70]. Neben der Expression von Molekülen wie PD-L1 [71, 72], durch welches PD-1 exprimierende T-Lymphozyten supprimiert werden können, spielen auch vom Tumor produzierte immunsuppressive Wachstumsfaktoren und Zytokine wie TGF (transforming growth factor)- β , VEGF (vascular endothelial growth factor) und IL-10 eine wichtige Rolle [73-77].

Des Weiteren kommt es durch den Tumor zu Veränderungen der Immunzellen, so dass diese in ihrer Fähigkeit einer aktiven Bekämpfung des Tumors geschwächt sind oder sogar die Tumorprogression fördern [78, 79]. Tumor-assoziierte Makrophagen zeichnen sich durch einen veränderten Phänotyp aus und produzieren immunsuppressive Mediatoren wie TGF- β , IL-10 und PGE₂ [80, 81]. Bei verschiedenen humanen und murinen Tumoren zeigte sich, dass Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten funktionell beeinträchtigt waren und CD8⁺ T-Zellen auch nach *ex vivo* Stimulation weder IFN- γ , Perforin noch Granzyme B produzieren konnten [82-84]. Auch bei DCs wurden durch den Tumor induzierte Veränderungen beschrieben, die als Hauptursache für eine geschwächte Immunität bei Tumoren diskutiert werden [85]. Eine insgesamt reduzierte Anzahl an kompetenten DCs im Tumor bei gleichzeitiger Akkumulation von unreifen DCs im peripheren Blut korrelierte bei Patienten mit Brust-, Lungen-, Kopf- und Halstumoren mit dem Stadium und teilweise mit Dauer der Erkrankung. Durch eine chirurgische Entfernung des Tumors kam es zu einem Wiederanstieg der funktionsfähigen DCs [86]. Die Herunterregulation von typischen Oberflächenantigenen der tumorinfiltrierenden DCs führt zu einer konsekutiven Schwächung der Antigenpräsentation gegenüber T-Lymphozyten [87, 88]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass vom Tumor modulierte defekte DCs die Proliferation der CTLs supprimieren. Durch Inhibition der Tumor-infiltrierenden DCs konnte eine Expansion der CTLs und eine resultierende Suppression des Tumorwachstums erreicht werden [89]. Neben der verminderten Anzahl konnte bei

Patienten mit maligner Erkrankung auch eine geringere Produktion von IL-12 der DCs nachgewiesen werden [87, 90]. In weiteren Studien wurde eine verstärkte Expression von bestimmten Proteinen, wie z.B. des Glykoproteins Glycodelin beim Lungenkarzinom oder des Lektins Galektin-1 beim Ovarialkarzinoms, detektiert, die ebenfalls mit einer Änderung des Phänotyps von DCs und einer daraus hervorgehenden Schwächung der lymphoproliferativen Aktivität assoziiert ist. Außerdem führte dies bei den DCs zu einer Hochregulation der IL-10-Produktion [91, 92].

Ebenso kann eine Akkumulation von toxischen Metaboliten im Tumor, wie z.B. des Stickstoffmonoxids, welches durch eine Überexpression des Enzyms iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase) in verschiedenen Tumoren vermehrt produziert wird, eine Förderung des Tumorwachstums bewirken [93]. Weiterhin zeichnen sich viele Tumore durch einen erhöhten aeroben Glukosestoffwechsel aus [94], der mit hohen Laktatkonzentrationen einhergeht [95, 96]. Es konnte bereits ein inhibierender Effekt von Milchsäure, das protonierte Laktat, auf die Proliferation und Zytokinsekretion von humanen T-Zellen und die Zytokinproduktion von humanen Monozyten nachgewiesen werden [97, 98]. Außerdem wird durch Milchsäure die Differenzierung und Aktivierung von DCs gehemmt [99].

1.4 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA): ein weiterer immune escape-Mechanismus?

MTA ist ein hydrophobes Schwefel-enthaltendes Adenin-Nukleosid und entsteht vor allem während der Biosynthese von Polyaminen wie Spermin und Spermidin aus decarboxyliertem S-Adenosylmethionin (SAM) [100]. Unter normalen Umständen kommt es zu keiner Akkumulation dieses Abbauprodukts [101]. MTA wird von der Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) zu Adenin, welches unter anderem für die Herstellung von Adenosintriphosphat (ATP) verwendet wird, und zu Methylthioribose-1-Phosphat gespalten, was der Methioninbiosynthese dient. MTAP befindet sich somit an einer wichtigen Schnittstelle von zwei essentiellen Stoffwechselfvorgängen (**Abb.1**).

Überaktivität kommt es zu einer gesteigerten Polyaminsynthese und somit zur vermehrten Zellproliferation dieser Tumorzellen [109]. *Subhi et al.* diskutieren einen möglichen Zusammenhang zwischen gesteigerter ODC-Aktivität und verminderter MTAP-Expression [110]. Von großer Bedeutung ist, dass MTAP-defiziente Tumorzellen MTA in das umgebende Tumormilieu sezernieren [111]. Die möglichen Auswirkungen von erhöhten MTA-Konzentrationen sind noch nicht vollständig untersucht. Es konnte jedoch schon gezeigt werden, dass MTA unter anderem zu einer Induktion der Expression von Matrixmetalloproteasen und Wachstumsfaktoren in Tumorzellen führt, was eine vermehrte Tumorinvasivität zur Folge haben könnte [112]. Eine weitere interessante Frage ist inwieweit MTA Effekte auf humane Immunzellen hat. *Wolford et al.* konnten zeigen, dass MTA zu einer Hemmung von murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen *in vivo* und *in vitro* führt [113]. Ferner hemmt MTA die Aktivität von natürlichen Killerzellen und führt zu einer Hemmung der Proliferation von T- und B-Lymphozyten. Auch die Antikörperproduktion von B-Lymphozyten wird durch MTA herunterreguliert [114-117]. Daneben wirkt MTA auch antiinflammatorisch durch eine Steigerung der IL-10-Produktion und eine Inhibition von TNF- α in Makrophagen [117-119]. In aktuellen Arbeiten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass MTA eine Suppression der Zytokinproduktion und Zytotoxizität von humanen CD8⁺ T-Lymphozyten bewirkt und modulierende Effekte auf die Zytokinproduktion von humanen Monozyten hat [120, 121].

1.4.1 Mögliche Wirkmechanismen von MTA

Der genaue Mechanismus der Wirkung von MTA auf verschiedene Zelltypen ist noch nicht hinreichend geklärt. MTA weist enge strukturelle Ähnlichkeiten zu dem immunsuppressiven Metaboliten Adenosin auf, ein natürlich vorkommendes Nukleosid, welches bei entzündlichen Prozessen im menschlichen Körper stark ansteigt [122, 123]. Adenosin bindet spezifisch an sogenannte Adenosin-Rezeptoren [124, 125]. Durch eine Bindung kommt es je nach Rezeptor zu einer Stimulation oder einer Hemmung der intrazellulär gelegenen Adenylatzyklase und daraus folgender Erhöhung oder Senkung der cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Konzentration. Auch kann über die Rezeptoren die intrazelluläre Calciumkonzentration durch Aktivierung der Phospholipase C beeinflusst werden [125]. Adenosinrezeptoren sind auf verschiedenen Immunzellen vorhanden und das bei

inflammatorischen Prozessen von Endothelzellen in ihre Umgebung sezernierte Adenosin bewirkt durch Bindung an diese Rezeptoren eine Suppression der Immunantwort [122, 123]. In Monozyten und Makrophagen kommt es durch Adenosin neben einer starken Suppression der IL-12-Produktion und einer Hemmung von TNF- α zu einer Stimulation des pro-inflammatorischen IL-10 [126-129]. Bei T-Lymphozyten bedingt es eine Hemmung der Proliferation und ebenfalls eine Suppression der Zytokinsekretion [130-132]. Auch auf DCs sind diese Adenosinrezeptoren vorhanden. Während durch ihre Stimulation die Chemotaxis in unreifen DCs über A₁- und A₃-Rezeptoren und einen intrazellulären Calciumanstieg gefördert wird, bewirkt es über A_{2A}-Rezeptoren in reifen DCs die Suppression der IL-12, IL-6 und INF- γ -Produktion sowie eine Stimulation der IL-10-Sekretion [133-136]. Munshi *et al.* und Daly *et al.* konnten bereits früh zeigen, dass MTA über Bindung an Adenosinrezeptoren wirkt [137, 138]. Die Arbeitsgruppe um Christa *et al.* konnte zeigen, dass es bei der konzentrationsabhängigen Inhibition der T-Zellproliferation eine Korrelation mit der cAMP-Erhöhung gibt, jedoch stellte sich als Mechanismus eine Hemmung der Phosphodiesterase mit fehlendem Abbau von cAMP in AMP heraus [139, 140]. In anderen Studien mit natürlichen Killerzellen und Makrophagen konnte hingegen kein Zusammenhang mit der intrazellulären cAMP-Konzentration festgestellt werden [116, 119]. In einer anderen Doktorarbeit wurde in Experimenten mit humanen Monozyten weder eine Beeinflussung des cAMP-Spiegels noch der intrazellulären Calciumkonzentration nachgewiesen [120].

Neben diesem Liganden vermittelten Weg werden noch weitere mögliche intrazelluläre Wirkmechanismen diskutiert. Stevens *et al.* stellten fest, dass MTA unter anderem zu einer Induktion der Expression von Metalloproteasen und Wachstumsfaktoren in Tumorzellen führt [112]. Andere Gruppen führen die Wirkung auf eine Inhibition der Adenosylhomocystein-Hydrolase zurück, wodurch Methyltransferasen gehemmt werden [100, 116, 141]. Neuere Studien weisen auf eine Beeinflussung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nukleärer Faktor κ B) durch MTA hin [119, 142, 143], welcher eine wichtige Rolle bei der Regulation des Immunsystems spielt [144-146]. Darüber hinaus ist MTA als kompetitiver Inhibitor der Spermidin Synthase beschrieben worden [147].

1.5 Zielsetzung

Viele Tumore entziehen sich einer anti-tumoralen Immunantwort über verschiedene Mechanismen und verschaffen sich so einen Wachstums- und Überlebensvorteil. Oft lassen sich in Tumorzellen Veränderungen in einem Stoffwechselweg nachweisen, wodurch sie einen hemmenden Einfluss auf die humanen Immunzellen erreichen. In vielen Tumorzellen liegt eine Defizienz der Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) vor, so dass es zu einer Akkumulation von Methylthioadenosin (MTA) kommt, einem bei der Polyaminsynthese natürlich anfallenden Nukleosid. In einigen wenigen Studien konnte MTA eine hemmende Wirkung auf humane Immunzellen nachgewiesen werden, darunter die Inhibition von T- und B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und der Antikörperproduktion von B-Zellen. In dieser Arbeit soll der Einfluss von MTA auf die wichtigste Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen, die dendritischen Zellen, untersucht werden.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Firma, Herkunft
Autoklav	Technomara, Fernwald, Deutschland
Bioanalyser	Agilent, Waldbronn, Deutschland
CASY Zellzählgerät	Schärfegerät, Reutlingen, Deutschland
Durchflusszytometer (FACD Calibur)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen, Deutschland
ELISA-Plattenlesegerät	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Elutriator (Avanti J-20XP)	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Film-Entwicklungsanlage	AGFA, Köln, Deutschland
Inkubatoren (BBD 6220)	Heraeus, Osterode, Deutschland
Mikroskope	Zeiss, Jena, Deutschland
Multipipettor (Multipette plus)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop (ND 1000)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Netzgeräte	Biometra, Göttingen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
PCR-Thermocycler PTC-200	MJ-Research/Biometra, Göttingen, Deutschland
Picofuge	Heraeus, Osterode, Deutschland
Realplex Mastercycler epGradient S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schweißgerät (Fermant 400)	Josten & Kettenbaum, Bensberg, Deutschland
Sterilbank (Lamin Air HA 2472)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermomixer (WB)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer	Scientific Industries, New York, USA
Wallac Harvester	PerkinElmer, Gaithersburg, USA
Wallac Betaplate Counter	PerkinElmer, Gaithersburg, USA
Wasserreinigungsanlage	Millipore, Eschborn, Deutschland
Wasserbad	Julabo, Seelstadt, Deutschland
Western-Blot-Kammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus, Osterode, Deutschland
Zentrifuge (J6M-E)	Beckmann, München, Deutschland

Zentrifuge (Megafuge 3.0 R)	Heraeus, Osterode, Deutschland
Zentrifuge (Sigma 2)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge (Sorvall RC 6 plus)	Thermo Fisher Scientific, Hudson, USA

2.2 Verbrauchsmaterial

Material	Firma, Herkunft
Biofolie 25	Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Dispenserspitzen für Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
„Heat sealing“ Film	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Mikrotiterplatten für ELISA	Costar, Cambridge, USA
Multiwell Zellkulturplatten für MLR	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Objektträger	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipetten	Costar, Cambridge, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PVDF-Membran Immobilon-P	Milipore, Schwalbach, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Topseal-A-Folien	Canberra Packard, Schwadorf, Österreich
Twintec 96-Well-Platten für PCR	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UniFilterplatten	Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland
6 bzw. 12-Well-Platten für Überstände	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen	Costar, Cambridge, USA
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland

2.3 Chemikalien, Kits und Reagenzien

Reagenzien, Kits	Firma, Herkunft
7AAD	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Annexin V	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
AB-Serum	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Annexin-Bindepuffer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
anti-CD28-AK	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
BSA	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
dNTPs	NEB, Frankfurt, Deutschland
DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
ECL Detection-Kit	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
FCS	PAA, Cölbe, Deutschland
GM-CSF	Berlex, Seattle, USA
HANK'S	PAA, Cölbe, Deutschland
IL-4	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
IL-2	Novartis, Nürnberg, Deutschland
Proteinmarker Kaleidoscope pre-stained standard	Biorad, München, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
LPS	Alexis, Grünberg, Deutschland
OKT-3	Cilag GmbH, Schaffhausen, Schweiz
PBS	PAA, Cölbe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Protein Assay Biorad	Biorad, München, Deutschland
QuantiFast SYBR green	Qiagen, Hilden, Deutschland
reverse Transkriptase M-MLV	Promega, Mannheim, Deutschland
RPMI 1640	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

Weitere Chemikalien, die in obiger Tabelle nicht aufgeführt sind, wurden von den Herstellern Sigma (Deisenhofen, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Für alle Lösungen, Puffer und Reaktionsansätze wurde grundsätzlich nur

Millipore-gereinigtes, entionisiertes Wasser oder Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes H₂O_{USB} der Firma Amersham (Braunschweig, Deutschland) verwendet.

2.4 Antikörper

2.4.1 Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Konjugat	Isotyp	Firma, Herkunft
CD 1a	PE	IgG1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
CD 14	FITC	IgG2b	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
CD 80	FITC	IgM	BD Pharmingen, California, USA
CD 83	FITC	IgG2b	Beckman Coulter, Marseille, France
CD 86	FITC	IgG1	BD Pharmingen, California, USA
HLA-DR	FITC	IgG2a	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Isotyp	PE	IgG1	BD Pharmingen, California, USA
Isotyp	FITC	IgG ges	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.4.2 Antikörper für Western-Blot

Antikörper	generiert in	Isotyp	Firma, Herkunft
anti-β-Aktin	Kaninchen	IgG	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
LMP2	Maus	IgG	Millipore, Schwalbach, Deutschland
TAP1	Maus	IgG	Abcam, Cambridge, UK
TAP2	Maus	IgG	MBL, Aachen, Deutschland

2.5 RT-qPCR-Primer für humane Sequenzen

Gen		Sequenz 5' → 3'
18S rRNA	forward	ACCGATTGGATGGTTT TAGTGAG
	reverse	CCTACGGAAACCTTGTTACGAC
LMP2	forward	GCATATAAGTCAGGCATGTCTCC
	reverse	AGCTGTAATAGTGACCAGGTAGATGAC
LMP10	forward	CATCCGTGTGGTCATCTC
	reverse	AGATCCACTTCATCGCCC
PSMB8	forward	CGGGTGAACAAGGTGATTGAG
	reverse	CCATTTTCGCAGATAGTACAGCC
TAP1	forward	CTGCAGCAGCTGTGATTTCC
	reverse	CCAATATGAGCACCGCTACCT
TAP2	forward	GCCCATCTCACAGTATGAACAC
	reverse	CACCTTATCATCTTCGCAGCTC
TAPASIN	forward	CGCTATGCCTGTCTGAATTCAC
	reverse	CTACGCTGTCCTCAAGGGAG

2.6 Software, Datenbanken

CellQuest Pro	BD, Heidelberg
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org
Graphpad Prism 5	http://www.graphpad.com/prism
Inkscape 0.46	http://www.inkscape.org
Ipe 6.0	http://tclab.kaist.ac.kr/ipe
Jabref 2.3.1	http://jabref.sourceforge.net
L ^A T _E X	http://www.latex-project.org
Debian Linux	http://www.debian.org
Microsoft Office 2003	http://www.microsoft.com
Openoffice.org 3.1	http://www.openoffice.org
PerlPrimer 1.1.14	http://perlprimer.sourceforge.net
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez
Scientific Python	http://www.scipy.org
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Die gesamte Arbeit mit Zellkulturen wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Soweit nicht anders erwähnt, wurden Zellen zum Waschen und Ernten für 8 Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert.

3.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer im Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Hierfür wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen an 0,2% Trypanblau-Lösung (0,2% (w/v) (0,2 g) Trypanblau ad 100 ml NaCl-Lösung (0,9%)) auf eine auszählbare Konzentration verdünnt. Durch die Trypanblau-Lösung lassen sich lebende von toten Zellen unterscheiden. Tote Zellen lagern aufgrund ihrer porösen Zellmembran Trypanblau ein und erscheinen somit unter dem Phasenkontrastmikroskop blau. Die Zellzahl wurde nach folgender Gleichung berechnet:

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

n = Zellzahl

N = Mittelwert der pro Quadrat gezählten Zellen (1 Eckquadrat besteht aus 16 Subquadraten und hat eine Fläche von 1 mm²)

V = Verdünnungsfaktor

3.1.2 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren erfolgte die Ernte der Zellen vor Erreichen der Konfluenz. Anschließend wurden 2-3 x 10⁶ Zellen in 800 µl eiskaltem RPMI 1640, welches 10% fötales Kälberserum (FCS) enthielt, aufgenommen. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen überführt, mit 160 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Endkonzentration 10%) und 640 µl FCS (Endkonzentration 40%) versetzt und sorgfältig gemischt. Für einen stufenweisen Einfrierprozess (1°C/min) erfolgte die Lagerung der Zellen in einem mit Isopropanol gefüllten Kryogefäß zunächst für zwei Stunden bei -20°C, dann für 48

Stunden bei -80°C . Die Zellen wurden zur dauerhaften Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

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 ihre Zellzahl bestimmt.

3.1.3 Gewinnung von Monozyten

Zur Gewinnung humaner Monozyten wurden einem gesunden Spender mit Hilfe der Leukapherese periphere mononukleäre Blutzellen (PMBCs) aus dem Blut entnommen [148]. Die Abtrennung der mononukleären Zellen (MNCs) von den restlichen Leukozyten erfolgte mittels der nachfolgenden Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll/Hypaque (PAN Biotech, Aidenbach) [149]. Die gewonnenen Zellen wurden in Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) aufgenommen und hiermit dreimal gewaschen. Die so isolierten MNCs setzten sich aus Lymphozyten und Monozyten zusammen, die teilweise noch mit Thrombozyten verunreinigt sind. Eine weitere Auftrennung erfolgte anschließend im Rahmen der Elutriation (Gegenstrom-Zentrifugation), bei der die MNCs in einer 50 ml-Trennkammer entsprechend ihrer Größe und Dichte in verschiedene Fraktionen getrennt wurden [150]. Dazu wurden zunächst Pumpe, Schläuche und Kammer selbst für 20 Minuten mit 6% Wasserstoffperoxid sterilisiert, mit PBS gespült und von Luftblasen befreit. Das System wurde zunächst bei 600 g und 4°C mit Hanks gepufferter Salzlösung (BSS) (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) geeicht und anschließend die MNCs bei einer Flussrate von 52 ml/min in das System gepumpt. Anschließend wurden die verschiedenen Zellfraktionen durch Erhöhung des Pumpendrucks der Reihe nach abgesammelt. Die erhaltenen Monozyten, die sich in der letzten Fraktion (III) befinden, wurden abschließend abzentrifugiert, in RPMI 1640 resuspendiert und gezählt. Die Ausbeute an Monozyten war spenderabhängig und betrug bezogen auf die eingesetzte Menge an MNCs typischerweise 10-20%. Die Reinheit der erhaltenen Monozytenfraktion war $\geq 85\%$, was zum einen unter dem Mikroskop und zum anderen durch die Analyse der CD (cluster of differentiation) 14-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie überprüft wurde. Um sicherzugehen, dass nur unstimulierte Monozyten in die nachfolgenden Experimente eingesetzt wurden, wurde routinemäßig durch die Bestimmung der Interleukin (IL)-6-Konzentration in Zellkulturüberständen (1×10^6 Monozyten/2ml RPMI 1640, 2%

humanes AB-Serum) der Stimulierungsgrad der Monozyten nach Übernachtinkubation kontrolliert.

3.1.4 Kultivierung von Monozyten und Gewinnung dendritischer Zellen

Kultivierung von Monozyten für die Apoptose-Experimente:

Isolierte Monozyten (10×10^6 Zellen) wurden in hydrophoben Teflonbeuteln in 10 ml RPMI 1640 bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dem Medium wurden 2% AB-Serum, 2 mmol/l L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zugegeben. Teilweise wurden Monozyten mit 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) in verschiedenen Konzentrationen (10 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM bzw. 1000 µM) inkubiert. Zur Induktion der Apoptose wurden an Tag 1 40 mM Milchsäure (MS) zugegeben. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet.

Gewinnung dendritischer Zellen (DCs):

Um unreife dendritische Zellen (immature DCs, iDCs) zu erhalten, wurden 20×10^6 Monozyten in mittelgroßen Zellkulturflaschen in 30 ml RPMI 1640 bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dem Medium wurden 10% FCS, 2 mmol/l L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zugegeben. Teilweise erfolgte die Zugabe von MTA in verschiedenen Konzentrationen (15 µM bzw. 150 µM), 144 U/ml IL-4 und 225 U/ml Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF). Die Zellen wurden regelmäßig auf Kontamination kontrolliert und nach 7 Tagen geerntet.

Um reife dendritische Zellen (mature DCs, mDCs) bzw. schnell gereifte – sogenannte fast DCs (fDCs) - zu erhalten, wurden 20×10^6 Monozyten in mittelgroßen Zellkulturflaschen in 30 ml RPMI 1640 bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dem Medium wurden 10% FCS, 2 mmol/l L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin zugegeben. Außerdem wurde MTA in verschiedenen Konzentrationen (10 µM, 15 µM, 100 µM bzw. 150 µM), 144 U/ml IL-4 und 225 U/ml GM-CSF zugegeben. Am Tag 5 (mDCs) bzw. nach 24 Stunden (fDCs) wurde zur Induktion der DC-Reifung 10 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) zugegeben. Die Zellen wurden ebenfalls regelmäßig auf Kontamination kontrolliert und nach 7 Tagen (mDCs) bzw. 48 Stunden (fDCs) Tagen geerntet.

3.1.5 Kultivierung von dendritischen Zellen zur weiteren Analyse

Zur späteren Bestimmung von Zytokinen in Kulturüberständen und zur Generierung von Zelllysaten zur RNA- und Proteinanalyse wurden die Zellen in Mikrotiterplatten weiterkultiviert.

- Für die Gewinnung von Zellkulturüberständen wurden 1×10^6 Zellen in 2 ml Medium (RPMI 1640, 2% AB-Serum) in An- und Abwesenheit von LPS (10 pg/ml bzw. 10 ng/ml) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände geerntet, indem der Kulturüberstand mit einer Spritze abgenommen und mit Hilfe eines Sterilfilters (0,2 µm) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde.
- Für die spätere RNA-Isolation und Proteinextraktion wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen in 4 ml Medium (RPMI 1640, 2% AB-Serum) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen und dem Protokoll für RNA- oder Proteinlysate unterzogen.

Zellkulturüberstände sowie RNA- oder Proteinlysate wurden bei -20°C bis zur Weiterverwendung für den ELISA (siehe 3.3), die RNA-Isolation (siehe 3.5.1) bzw. die Proteinextraktion (siehe 3.6.2) gelagert.

3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine Analyse der Zellen bezüglich ihrer phänotypischen Eigenschaften. Hierbei erfasst ein Laserstrahl die Zellen und wird dadurch gestreut, wodurch sich Aussagen über deren Größe („Vorwärts-Streulicht“) und die Granularität der Zellen („Seitwärts-Streulicht“) machen lassen. Des Weiteren kann die Expression bestimmter Proteine mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenproteine, aber auch intrazelluläre Proteine, analysiert werden. In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie dazu benutzt, die Vitalität und Oberflächenantigenexpression der Zellen zu untersuchen.

3.2.1 Analyse der Vitalität von Monozyten

Die durchflusszytometrischen Analyse der Zell-Vitalität erfolgte mit Hilfe der Farbstoffe Annexin-V-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und 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 die 7-AAD nicht permeabel. Bei beschädigten oder toten Zellen dringt 7-AAD in die Zelle ein und interkaliert in die DNA. Diese Methode hilft zur Unterscheidung von apoptotischen, nekrotischen oder vitalen Zellen [151, 152].

Für Untersuchungen der Zell-Vitalität wurden frische Monozyten entsprechend 3.1.4 kultiviert. Um ein leichteres Ablösen der adhärenen Zellen von den Innenwänden des Beutels zu ermöglichen, wurden die Teflonbeutel zunächst für 10 Minuten auf 4°C gestellt. Anschließend wurden sie aus dem Beutel entnommen und zweimal mit PBS gewaschen. Nachdem die Zellzahl bestimmt worden war, wurden nach Herstellerangaben je 250000 Zellen in 200 µl Annexin-Bindepuffer aufgenommen und mit 5 µl Annexin-V-FITC und 20 µl 7-AAD für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Unmittelbar nach der Färbung erfolgte die durchflusszytometrische Analyse und die Auswertung der Daten mit der Software „CellQuestPro“.

3.2.2 Analyse der Oberflächenantigenexpression dendritischer Zellen

Für die Untersuchung der Reifungsmarker wurden DCs entsprechend 3.1.4 kultiviert. Diese wurden nach ihrer Ernte zweimal mit PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden je 250000 Zellen zweimal mit 1 ml gekühltem FACS-Waschpuffer gewaschen. Für die Herstellung des FACS-Puffers werden 300 mg Sandoglobulin (0,6 mg/ml, Sandoz) und 0,5 g Natriumazid (0,1%) in 500 ml PBS gelöst. Anschließend erfolgte die Färbung mit 2,5 µl CD1a (PE), 5 µl CD14 (FITC), 20 µl HLA-DR (FITC), 10 µl CD80 (FITC), 20 µl CD83 (FITC) und 10 µl CD86 (FITC) für 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln.

Anschließend folgten zwei weitere Waschschriffe mit FACS-Puffer und die Fixierung mit 200 µl PFA (1%). Bis zur Messung wurden die Zellen maximal 5 Tage im Kühlschrank unter Lichtausschluss aufbewahrt. Die Messungen erfolgten an einem FACS-Gerät der Firma Becton/Dickinson und wurden mit Hilfe der Software „CellQuestPro“ ausgewertet.

3.3 Zytokinmessung mittels ELISA

Für die Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurde ein ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) eingesetzt. Das zu analysierende Antigen bindet an einen Antikörper, der an eine feste Phase (z.B. Mikrotiterplatte) gekoppelt ist. Durch einen Detektionskörper, 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.

Die Analyse erfolgte mittels „DuoSet ELISA“ nach Angaben des Herstellers (R&D Systems, Wiesbaden).

3.4 Proliferationstest

3.4.1 Gemischte Lymphozytenreaktion

Zur Bestimmung der Stimulationsaktivität von DCs werden diese in einer MLR mit allogenen naiven T-Lymphozyten zusammengebracht. Zunächst wurden DCs wie in 3.1.4 beschrieben kultiviert. Die DCs wurden als Stimulatorzellen in die Vertiefungen von 96-Well-Platten (Rundbodenplatten) in aufsteigender Konzentration von 0 bis 7.500 Zellen pro Well mit allogenen T-Lymphozyten als Responderzellen in konstanter Konzentration von 100.000 Zellen pro Well bei einem Endvolumen von 200 µl unter sterilen Bedingungen in RPMI 1640 und gefiltertem 5% humanen AB-Serum kokultiviert. In weiteren Ansätzen wurde MTA (10 µM, 25 µM bzw. 50 µM) zu den ausdifferenzierten DCs und T-Lymphozyten gegeben. Um die Zellen dicht zu packen, wurden anschließend die Platten 8 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Anschließend wurden sie 5 Tage lang bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Kontrollen dienten die jeweiligen DCs bzw. die allogenen T-Lymphozyten alleine. Zur quantitativen Messung der Proliferation wurden die Zellen mit [³H]-Thymidin (0,5 µCi pro Well) versetzt. Nach einer Inkubation von 18-20 Stunden wurden die Zellen mit Hilfe eines Wallac-Harvesters (Perkin Elmar, Gaithersburg, USA) auf 96-Well-UniFilterplatten übertragen, mit 50 µl Szintillationslösung überschichtet und die Oberseiten mit TopSeal-A-Folien (beide Canberra Packard, Schwadorf, Österreich) verschlossen. Die Inkorporation von [³H]-

Thymidin in die neusynthetisierte DNA, welche als Maß für die Proliferationsrate der Zellen gilt [153], wurde anschließend mit einem Wallac-Betaplattenzähler (Perkin Elmer, Gaithersburg, MD) bestimmt. Das Ergebnis wird als „counts“ pro Minute (cpm) wiedergegeben. Jeder hier angegebene Messwert entspricht dem Mittelwert einer Drei- bzw. Vierfachbestimmung +/- SEM.

Arbeitsschritte, die den Umgang mit radioaktiven Substanzen einschlossen, wurden freundlicherweise von hierfür zugelassenen Labormitgliedern durchgeführt.

3.4.2 T-Zellproliferation ohne dendritische Zellen als Stimulatoren

In einer Versuchsreihe wurden die T-Lymphozyten durch IL-2 (100 U/ml), CD28 (1 µg/ml) und OKT3 (1 µg/ml) anstelle der DCs stimuliert.

3.5 Molekularbiologische Methoden

Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurde strikt mit Handschuhen, RNase-freien Gefäßen und Pipetten gearbeitet. Alle Lösungen wurden ausschließlich mit RNase-freiem Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem H₂O (H₂O_{DEPC}) hergestellt. Dafür wurde zweifach destilliertes Millipore-Wasser mit 0,1% DEPC versetzt, mehrmals geschüttelt und über Nacht inkubiert. Durch zweifaches Autoklavieren wurde DEPC anschließend inaktiviert. Alternativ wurde DEPC-behandeltes H₂O_{USB} von der Firma Amersham (Braunschweig, Deutschland) verwendet.

3.5.1 RNA-Isolierung

DCs, die wie in 3.1.4 und 3.1.5 beschrieben kultiviert wurden, wurden zunächst unter dem Abzug mit 350 µl RLT-β-Mercaptoethanol lysiert und mit Hilfe einer 1 ml-Spritze und einer gelben Kanüle lysiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und sofort auf Eis gelegt. Anschließend wurde unter Verwendung eines „RNeasy Mini-Kits“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) Gesamt-RNA aus den Lysaten isoliert. Die Integrität der RNA wurde mit dem Agilent Bioanalyzer (Waldbronn, Deutschland) bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte mittels des Spektralphotometers Nanodrop ND1000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland).

3.5.2 Reverse Transkription

Um mRNA-Expressionsanalysen per Real-time quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) durchführen zu können, wurde die isolierte RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies erfolgte 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). Hierfür wurden pro Probe 500 ng RNA in einem Gesamtreaktionsansatz von 20 µl umgeschrieben.

Reaktionsansatz (auf Eis pipettiert):	RNA (500 ng)	x µl
	RNAse freies H ₂ O	13-x µl
	Random-Decamere (10 µM)	1 µl
	dNTPs (10 µM)	1 µl

- 5 min bei 65 °C inkubieren um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, auf Eis stellen, abzentrifugieren
- +4 µl 5 x M-MLV-Puffer
- mischen und 2 min bei 42°C inkubieren
- +1 µl M-MLV reverse Transkriptase
- 50 min bei 42°C inkubieren
- 15 min bei 70°C inkubieren

3.5.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR erlaubt die *in-vitro*-Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte im Genom. Benötigt werden hierfür prinzipiell ein DNA-Template, eine thermostabile DNA-Polymerase und sequenzspezifische Primer, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Im folgenden Abschnitt werden Bedingungen und Reagentien für eine Standard-PCR beschrieben.

Primerdesign

Sequenzen der genomischen DNA für das Primerdesign wurden aus der Onlinedatenbank „Ensembl Genome Browser“ (<http://www.ensembl.org>) bezogen. Die Primer wurden mit der Software „Perlprimer“ (<http://perlprimer.sourceforge.net>)

konstruiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotidsequenzen einen GC-Gehalt von 40-60% aufwiesen. Für die Primer galten folgende Kriterien:

Schmelztemperatur	65-68°C
Länge	18-28 bp
Amplikon Länge	70-200 bp

Mittels BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) und *in-silico*-PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?db=hg18>) erfolgte die Kontrolle der Spezifität der Primer, um die Amplifikation unspezifischer Nebenprodukte zu verhindern. Um die Amplifikation genomischer DNA zu verhindern, wurden RT-qPCR Primer zur Quantifizierung von mRNA auf zwei benachbarte Exons gelegt. Bestellt wurden die Primer bei Metabion (Martinsried, Deutschland).

Real-time quantitative PCR

Die quantitative Real-time PCR (RT-qPCR) basiert auf der Erzeugung fluoreszierender PCR-Produkte. Der Farbstoff SYBR® Green I wird zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert in gebundenem Zustand. Die Fluoreszenz steigt proportional mit zunehmender Anzahl an PCR-Produkten. Diese kann in einer mit UV-Lampe und CCD-Kamera ausgestatteten PCR-Maschine am Ende jedes Zyklus gemessen und verfolgt werden. Somit kann die zu Beginn vorhandene Menge an Nukleinsäuren über die Kinetik der PCR-Reaktion bestimmt werden. Es werden also keine absoluten Mengen an PCR-Produkt gemessen, sondern relative Unterschiede zwischen verschiedenen Proben bezüglich eines internen Standards. Die RT-qPCRs wurden in Twintec 96-Well-Platten an einem Realplex Mastercycler epGradient S (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Ansätze wurden in einem Reaktionsgesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Für die RT-qPCR wurde der „QuantiFast SYBR Green-Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Reaktionsansatz (auf Eis pipettiert):

QuantiFast SYBR Green PCR Mix	5 µl
cDNA (mind. 1:5 verd.)	1 µl
Primer forward (10 µM)	0,5 µl

Primer reverse (10 μ M)	0,5 μ l
RNase freies H ₂ O	3 μ l

Die cDNA wurde dabei mindestens 1:5 verdünnt. Um valide Ergebnisse zu gewährleisten, wurden alle Proben in Triplikaten pipettiert.

Programm für die RT-qPCR:

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	5 min
Denaturierung/Annealing	95°C	8 s *
Elongation	60°C	20 s *
Schmelzkurve	95°C	15 s
	65°C	15 s
	65°C-95°C	10 min

* 45 Zyklen

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 der y-Achse (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. 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.

3.6 Proteinbiochemische Methoden

Die Analyse der Proteinexpression wurde mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in Kombination mit Western-Blots vorgenommen. Proteine haben die Eigenschaft SDS zu binden. Dies nutzt man bei der SDS-PAGE, bei der sich SDS-Protein-Komplexe (Ladung~Masse) bilden. SDS denaturiert in Kombination mit β -Mercaptoethanol, welches im Probenpuffer

enthalten ist, Proteine und unterbindet so Protein-Protein-Wechselwirkungen (Tertiär-/Sekundärstrukturen). Somit unterscheiden sich die Proteine nur noch in ihrer Größe bzw. ihrem Molekulargewicht. Die Proteine wandern im SDS-Gel entsprechend der angelegten Spannung zum Pluspol. Die Auftrennung durch den Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix erfolgt entsprechend ihrem Molekulargewicht. Im Western-Blot werden im Gel aufgetrennte Proteine elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PDVF) übertragen. Proteine, die auf der Membran gebunden sind, können durch spezifische Antikörper gebunden werden. Mit Farbreaktionen können diese sichtbar gemacht werden, was Aussagen über die Stärke der Expression eines Proteins erlaubt.

3.6.1 Proteinlysate

DCs, die wie in 3.1.4 und 3.1.5 beschrieben kultiviert wurden, wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl RIPA-Puffer pro 5 Mio. Zellen überschichtet. Mit einem sterilen Kunststoffschaber wurde das Lysat an den Rand der Vertiefung geschabt und mit einer Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Auf- und Abpipettieren mit der Pipette wurde die Suspension anschließend nochmals eine Minute gevortext, für 5 min auf -20°C gestellt, wieder 1 min gevortext und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen werden die Lysate für 15 min bei 4°C und 15000 g zentrifugiert und der Überstand zur Proteinbestimmung verwendet.

3.6.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der Protein-Assay von Biorad (München, Deutschland) verwendet. Der Assay basiert auf dem Lowry-Test, bei dem Protein mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bildet (Biuret-Reaktion). Diese gebundenen Cu^{2+} -Ionen werden zu Cu^+ -Ionen reduziert und bilden zusammen mit einem Folin-Reagenz einen blauen Komplex, der als Maß der Proteinkonzentration dient. Zur Konzentrationsbestimmung dient eine interne Standardkurve bekannter Konzentrationen aus Rinderserumalbumin (bovine serum albumine, BSA).

3.6.3 SDS-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde das diskontinuierliche Lämmli-System verwendet. Das Trenngel der in dieser Arbeit verwendeten SDS-Gele hatte eine Acrylamidkonzentration von 12,5%, das Sammelgel eine Konzentration von 5%. Das Gießen der Gele erfolgte meist einen Tag vor dem Lauf. Zum Gießen des Trenngels wurde eine Untergelstammlösung mit Ammoniumpersulfat (APS, 5 µl/1ml Stammlösung) als Radikalstarter und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, 1 µl/1ml Stammlösung) als Polymerisationskatalysator gemischt und sofort in die Gelkammern gegossen. Anschließend wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 30 min Polymerisationszeit wurde das Isopropanol abgegossen und das Obergel mit der Obergelstammlösung, APS und TEMED nach selbem Mischungsverhältnis darauf gegeben und der Kamm zur Erhaltung von Aussparungen für Probenaschen eingesetzt. Es wurde stets darauf geachtet die Gele luftbasenfrei zu gießen. Zur Elektrophorese wurden die Gele in die Kammern gesetzt und vollständig mit Lämmli-Elektrodenpuffer überschichtet. Proteinlysate wurden 1:1 mit SDS-Probenpuffer vermischt und 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der untersuchten Proteine wurde eine Geltasche mit 5 µl Proteinmarker Kaleidoskop (Biorad, München, Deutschland) beladen. Zum Durchlaufen des Sammelgels wurde eine Spannung von 60 V angelegt. Hatten die Proben das Trenngel erreicht, wurde die Spannung auf 120-140 V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid-Gelen:

Zugegebene Lösung	Untergel	Obergel
Stammlösung x%	6 ml (1 Gel)	5 ml (1 Gel)
TEMED	6 µl	50 µl
APS (10%)	30 µl	40 µl

Zusammensetzung der SDS-Gel-Stammlösungen:

Zugegebene Lösung	12,5% Trenngel	5% Sammelgel
Obergelpuffer	-	25 ml
Untergelpuffer	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

3.6.3.1 Benötigte Puffer und Lösungen

Acrylamid-Stammlösung: 146 g Acrylamid

Mit H₂O ad 500 ml, Lösung über Nacht im Kühlraum rühren und anschließend filtrieren.

Untergelpuffer: 90,83 g Tris/HCl
mit H₂O ad 500 ml

Obergelpuffer: 30 g Tris/HCl
mit H₂O ad 500 ml

SDS-Stammlösung: 10 g SDS
mit H₂O ad 100 ml

1 M Tris-Puffer: 13 g Tris/HCl
mit H₂O ad 100 ml

2 x SDS-Probenpuffer: 10 ml Glycerin
5 ml Tris-Puffer
2 g SDS
5 ml β-Mercaptoethanol
10 mg Bromphenolblau
mit H₂O ad 50 ml

Ammoniumpersulfat-Lösung:	100 mg Ammoniumpersulfat mit H ₂ O ad 1 ml, im Kühlschrank max. 5 d haltbar
50 x TAE-Puffer	242 g Tris-Base 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen
5 x Lämmli-Elektrodenpuffer	15 g Tris 216 g Glycin 15 g SDS mit H ₂ O ad 3000 ml

3.6.4 Western-Blot

Im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels einer Semidry-Blottingkammer von Biometra (Göttingen, Deutschland) auf eine PDVF-Membran (Milipore, Schwalbach, Deutschland) geblottet. Zu Beginn wurden je 3 Filterpapiere (Whatman, Dassel, Deutschland) mit den jeweiligen Anodenpuffern A, B und C getränkt. Die PDVF-Membran wurde durch kurzes Schwenken in Isopropanol aktiviert und anschließend in Anodenpuffer B geschwenkt. Die Blottingkammer wurde nach folgendem Prinzip zusammengebaut:

- Kathode -
3 x Filterpapier (in Anodenpuffer C)
SDS-Gel
PDVF-Membran
3 x Filterpapier (in Anodenpuffer B)
3 x Filterpapier (in Anodenpuffer A)
+ Anode +

Die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte für 45-60 min bei 0,8 mA pro cm² Gelfläche. Im Anschluss daran wurden die restlichen Proteinbindungsstellen der PDVF-Membran durch einstündiges Blocken in 5%iger Magermilchlösung abgesättigt. Die Immunfärbung erfolgte durch Inkubation mit den

Antikörpern (Verdünnung in 5%iger Magermilch-TBS-Tween-Pufferlösung) eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Waschen (je 10 Minuten) der Membran in Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (TBST)-Puffer entfernt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit dem „ECL-Detection-Kit“ (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien). Zur Quantifizierung von Proteinen wurde als Referenz β -Aktin verwendet.

3.6.4.1 Benötigte Puffer und Lösungen

Anodenpuffer A:	36,3 g Tris/HCl 200 ml Methanol mit H ₂ O ad 1000 ml
Anodenpuffer B:	3,03 g Tris/HCl 200 ml Methanol mit H ₂ O ad 1000 ml
Anodenpuffer C:	5,2 g ϵ -Amino-n-Caprinsäure 200 ml Methanol mit H ₂ O ad 1000 ml
Block-Lösung	5% Magermilchpulver in H ₂ O lösen und filtrieren, im Kühlschrank max. 3 Tage aufbewahren
2x TBS-Lösung	9,16 g Tris/HCl 35,1 g NaCl mit H ₂ O ad 2000 ml
TBST-Lösung:	1 ml Tween-20 auf 1000 ml TBS-Lösung

3.7 Statistik

Die erhaltenen Messwerte wurden gemittelt. Außerdem wurde die Standardabweichung des Mittelwerts (standard error of the mean, SEM) errechnet. Signifikanzen zwischen zwei verschiedenen Ansätzen wurden mit Hilfe der Software „GraphPad Prism 5“ unter Anwendung des unpaired Student's t-Tests 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.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) auf die Vitalität von Monozyten und dendritischen Zellen (DCs)

4.1.1 Apoptoseinduktion in Monozyten durch MTA

Aus der Literatur ist bekannt, dass MTA einen starken Einfluss auf das humane Immunsystem hat. So supprimiert MTA u.a. die Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität von CD8⁺ (cluster of differentiation) T-Lymphozyten [113, 121]. Da für die Induktion einer T-Zell-Antwort antigenpräsentierende Zellen (APCs) unerlässlich sind, stellte sich die Frage, ob MTA ebenfalls einen Effekt auf diese Zellen hat. Hierbei wurden DCs untersucht, welche aus humanen Monozyten durch die Zugabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren generiert werden können. Zunächst wurde der Einfluss von MTA auf die Apoptoseinduktion in Monozyten untersucht. Hierzu wurden Monozyten in Teflonbeuteln für 48 Stunden in RPMI mit 2% AB-Serum und MTA in verschiedenen Konzentrationen (10 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM) kultiviert. Um die Apoptose der Monozyten für die Positivkontrolle zu induzieren, wurde mit 40 mM Milchsäure inkubiert (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit 7-AAD und Annexin-V gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

In Abb. 2 sind die Mittelwerte der Annexin-V- und 7-AAD negativen Monozyten gezeigt. MTA hatte in Konzentrationen von 10 µM bis 500 µM keinen Einfluss auf die Vitalität von Monozyten. Nur in einer Konzentration von 1000 µM MTA zeigte sich ein signifikanter Rückgang ($p < 0,05^*$) der Anzahl lebender Monozyten um 17% gegenüber den unbehandelten Monozyten.

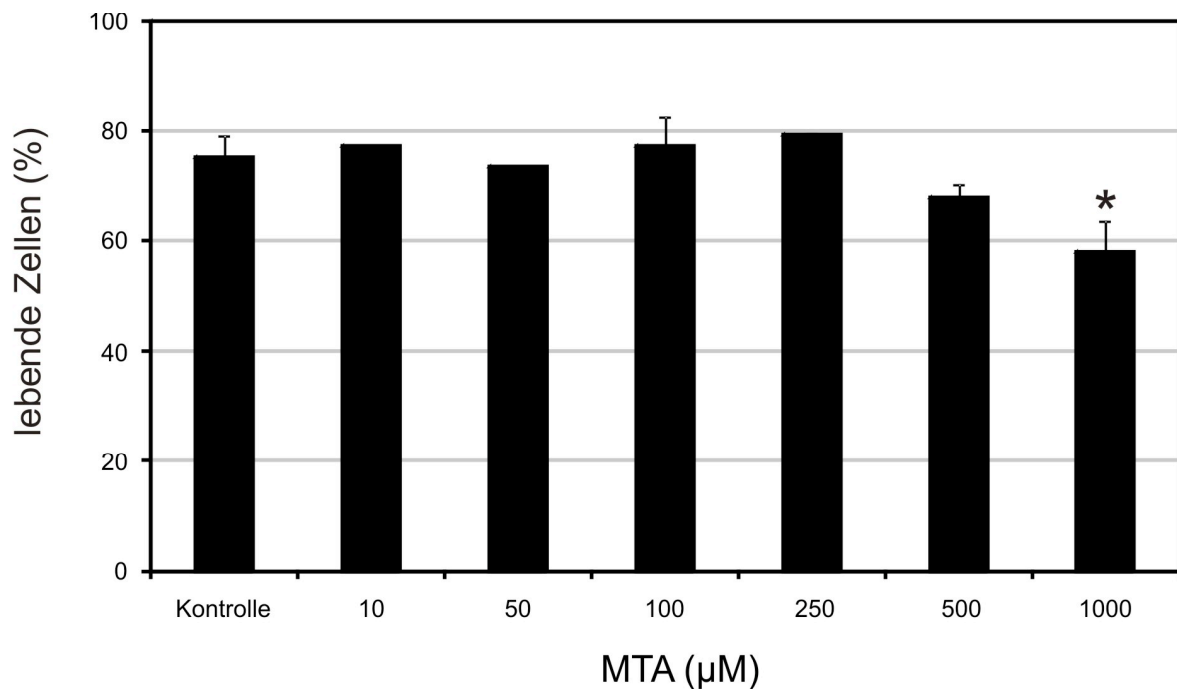


Abb. 2: Apoptoseinduktion in Monozyten durch MTA.

Monozyten wurden in Teflonbeuteln mit 2% AB-Serum mit und ohne MTA in verschiedenen Konzentrationen kultiviert. Als Kontrolle dienten Monozyten ohne MTA-Inkubation. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit Annexin-V und 7-AAD gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht. Dargestellt ist der ermittelte Anteil der lebenden Zellen. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz erfolgte mit einem Student's t-Test ($p < 0,05^*$). Es wurden bei 10 µM, 50 µM und 250 µM MTA $n = 2$ Experimente durchgeführt und mindestens $n = 3$ bei den restlichen Konzentrationen.

4.1.2 Zellausbeute der dendritischen Zellen bei Inkubation mit MTA

Als Nächstes stellte sich die Frage, ob MTA während der Kulturzeit von 7 Tagen bei der Ausreifung von Monozyten zu DCs einen Einfluss auf deren Überleben bzw. die Zellausbeute hat. Hierbei wurden unreife DCs (immature DCs, iDCs) und reife DCs (mature DCs, mDCs) miteinander verglichen. Für die Differenzierung zu DCs wurden humane Monozyten 5 Tage lang in mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) versetztem RPMI-Medium, dem außerdem noch 144 U/ml Interleukin-4 (IL-4) und 225 U/ml Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) zugefügt wurden, in An- bzw. Abwesenheit von 15 µM bzw. 150 µM MTA kultiviert. An Tag 5 wurden den iDCs zur Stimulation der Reifung 10 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) hinzugegeben. An Tag 7 wurden die Zellen geerntet, mit Trypanblau gefärbt und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

In Abb. 3 ist zu sehen, dass sich sowohl bei den iDCs ($p < 0,01^{**}$) als auch bei den mDCs ($p < 0,05^*$) nach Zugabe von 150 µM MTA eine signifikante Reduktion der Zellausbeute gegenüber den unbehandelten Zellen zeigte. Während es sich bei den iDCs um einen Rückgang gegenüber den unbehandelten Zellen um 35,2% handelte,

entsprach dieser bei den mDCs 22,1%. Zusätzlich wurden schnell gereifte DCs (fast dendritic cells, fDCs) untersucht. fDCs sind innerhalb 48 Stunden gereifte DCs die bereits nach 24 Stunden zur Stimulation 10 ng/ml LPS erhalten haben. Sie sind in ihrer Funktionalität und ihrem Phänotyp vergleichbar mit den üblich ausgereiften DCs [56]. Bei den fDCs ergab sich nach drei Tagen kein Unterschied in der Überlebenszahl (Daten nicht gezeigt).

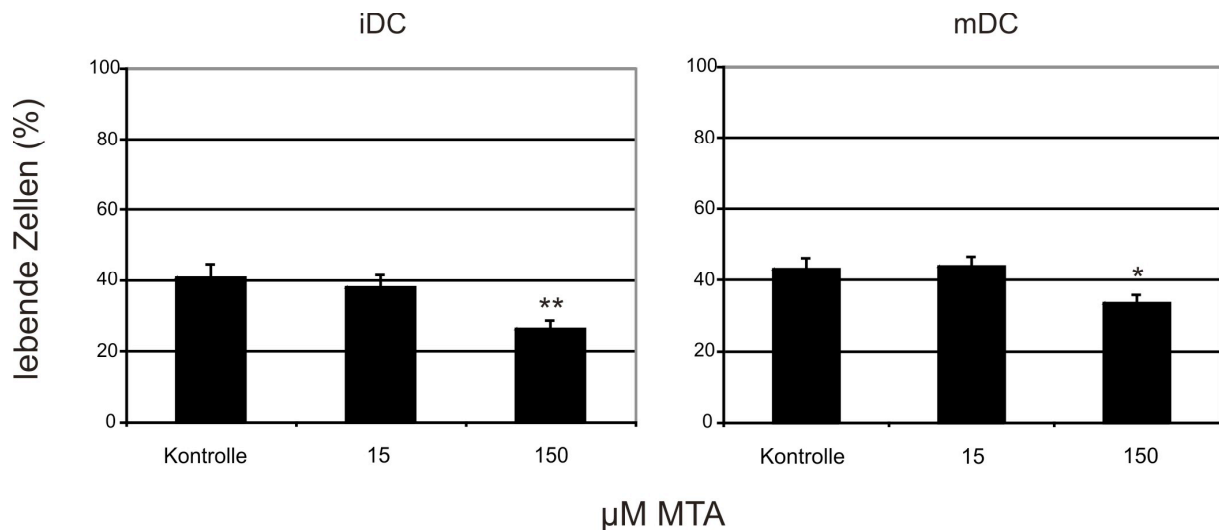


Abb. 3: Zellausbeute von DCs nach Kultivierung mit MTA.

Monozyten wurden mit 10% FCS, 225 U/ml GM-CSF und 144 U/ml IL-4 mit und ohne MTA kultiviert. An Tag 5 wurde zur Induktion der DC-Reifung 10 ng/ml LPS hinzugefügt. An Tag 7 wurden die Zellen geerntet, mit Trypanblau gefärbt und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM in Prozent im Vergleich zur an Tag 0 eingesetzten Zellzahl. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz erfolgte mit einem Student's t-Test ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$). Es wurden mindestens $n = 3$ Experimente mit verschiedenen Spendern durchgeführt.

Bereits unter dem Mikroskop waren phänotypische Unterschiede zwischen den mit MTA behandelten und den unbehandelten mDCs ersichtlich. Die unbehandelten mDCs waren im Vergleich zu den Monozyten größer, hatten mehrere lange Ausläufer und waren in den Flaschen größtenteils adhärent. Dagegen zeigten die mit MTA behandelten mDCs eine verringerte Größenzunahme mit gering ausgebildeten Ausläufern und verminderter Adhärenz. Bei den iDCs und den fDCs waren keine deutlichen morphologischen Unterschiede zu erkennen.

4.2 Oberflächenantigenexpression auf unreifen, reifen dendritischen Zellen und fast DCs unter dem Einfluss von MTA

Die wichtigste Aufgabe, die den DCs in der Immunabwehr zukommt, ist die Antigenpräsentation gegenüber T-Lymphozyten. Dabei spielen v.a. MHC-Moleküle (major histocompatibility complex) und kostimulatorische Moleküle wie CD80 und

CD86 eine wichtige Rolle. Um die Auswirkungen von MTA auf die Differenzierung von dendritischen Zellen zu untersuchen, wurde die Expression von typischen Oberflächenantigenen dieser Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden iDCs, mDCs und fDCs anhand ihrer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) miteinander verglichen.

4.2.1 Oberflächenantigenexpression auf iDCs nach MTA-Zugabe

Um iDCs zu induzieren wurden Monozyten, wie in 3.1.4 beschrieben, für 7 Tage kultiviert. Anschließend wurden sie geerntet und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD1a, CD14, HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 gefärbt. Die Messung der Oberflächenantigenexpression erfolgte mittels der Durchflusszytometrie.

Wie in Abb. 4 dargestellt, zeigten erwartungsgemäß iDCs eine hohe Expression des DC-Markers CD1a, während der Monozyten-Marker CD14 schwach exprimiert wurde. Weiterhin waren die kostimulatorischen Oberflächenantigene CD80 und CD86 sowie HLA-DR und der DC-Reifungsmarker CD83 kaum exprimiert, wobei HLA-DR noch am meisten exprimiert war. Die Zugabe von MTA zeigte bei allen untersuchten Oberflächenantigenen keine Auswirkung auf die Antigenexpression.

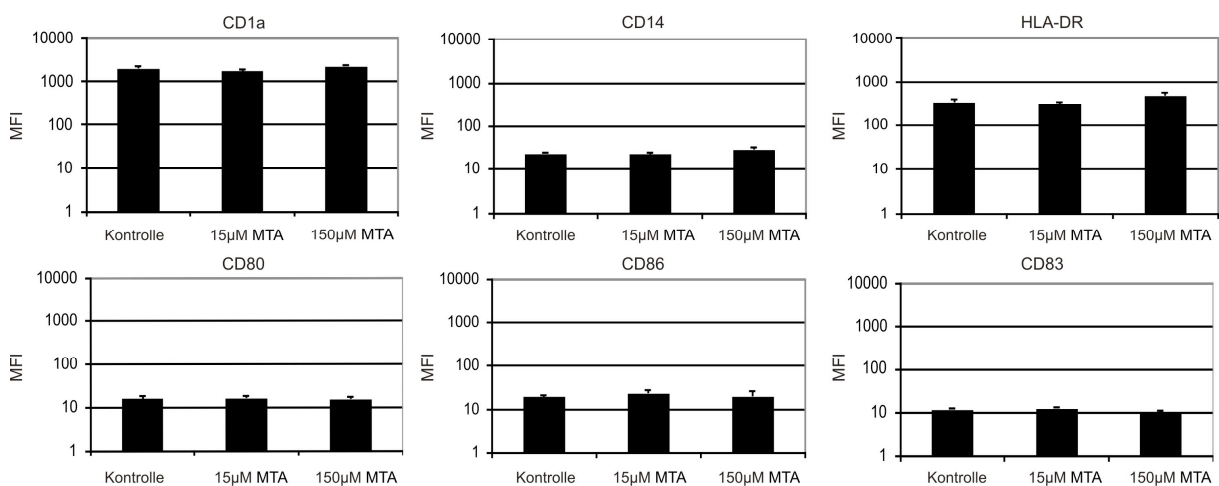


Abb. 4: Oberflächenantigenexpression auf iDCs unter dem Einfluss von MTA.

Monozyten wurden mit 10% FCS, 225 U/ml GM-CSF und 144 U/ml IL-4 mit und ohne MTA kultiviert. Als Kontrollen dienten Monozyten ohne MTA-Inkubation. An Tag 7 wurden die Zellen geerntet und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD1a, CD14, HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 gefärbt. Die Bestimmung der Antigenexpression erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte der MFI \pm SEM in logarithmischer Darstellung. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz erfolgte mit einem Student's t-Test. Es wurden n = 6 Experimente mit verschiedenen Spendern durchgeführt.

4.2.2 Oberflächenantigenexpression auf mDCs durch MTA-Zugabe

Als Nächstes wurde der Einfluss von MTA auf die Expression von Oberflächenantigenen auf mDCs untersucht. Monozyten wurden, wie in 3.1.4 beschrieben, kultiviert. Nach 5 Tagen erfolgte die Stimulation zur Ausreifung mit 10 ng/ml LPS für 2 Tage. Nach 7 Tagen wurden die Zellen geerntet, mit monoklonalen Antikörpern gegen CD1a, CD14, HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Wie in Abb.5 zu sehen ist, war im Vergleich zu den iDCs die Expression von CD1a auf den mDCs ähnlich, hingegen bei HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 deutlich erhöht. Durch die Zugabe von MTA kam es zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Reduktion der Expression des Oberflächenantigens CD1a. Während es bei der Zugabe von 100 μ M MTA im Vergleich zur Kontrolle zu einem Abfall um 31,2% kam, sank die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bei 150 μ M MTA von 977,05 +/- 127,09 SEM auf 400,46 +/- 66,13 SEM. Dies entspricht einem Abfall der Expression um 60%. Ebenfalls konnte bei den Oberflächenantigenen CD14, CD80, CD83 und CD86 eine signifikante Reduktion der Expression beobachtet werden. Die Expression der Oberflächenantigene CD83 und CD86 ging um mehr als 50% zurück. Beim Oberflächenantigen HLA-DR kam es dagegen durch die Zugabe von MTA zu einer signifikanten Hochregulation. Hier lag die MFI der Zellen ohne MTA-Zugabe bei 773,13 +/- 59,98 SEM, während sie bei DCs, die mit 150 μ M MTA kultiviert wurden, 1170,93 +/- 140,25 SEM erreichte.

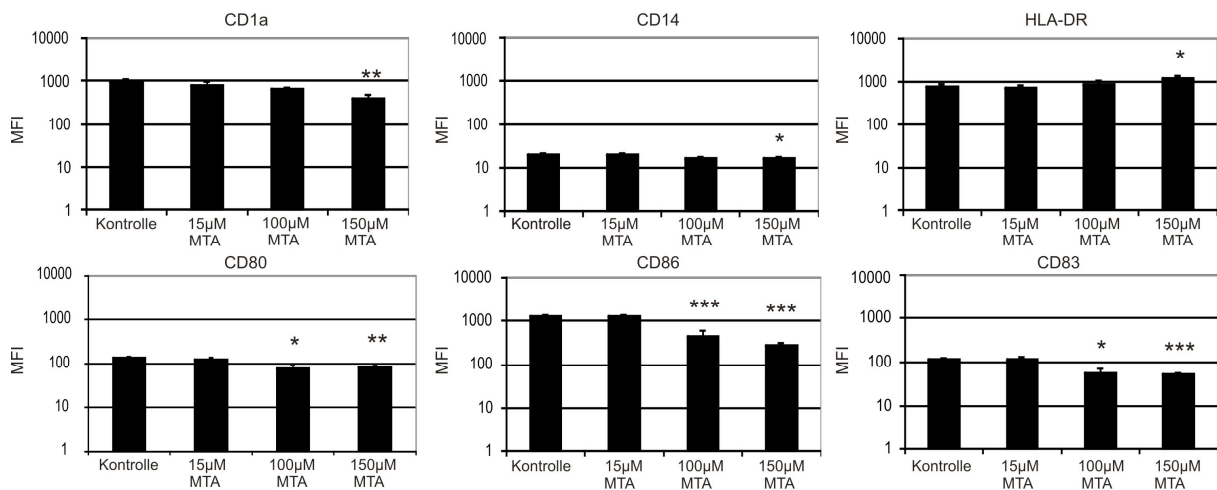


Abb. 5: Hemmung der Oberflächenantigenexpression von CD1a, CD14, CD86, CD83, CD86 auf mDCs nach Kultivierung mit MTA.

Monozyten wurden mit 10% FCS, 225 U/ml GM-CSF und 144 U/ml IL-4 ohne und mit MTA kultiviert. Als Kontrollen dienten Monozyten ohne MTA-Inkubation. An Tag 5 wurden zur Induktion der DC-Reifung 10 ng/ml LPS zugegeben. An Tag 7 wurden die Zellen geerntet und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD1a, CD14, HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 gefärbt. Die Bestimmung der Oberflächenantigenexpression erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte der MFI +/- SEM in logarithmischer Darstellung. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz erfolgte mit einem Student's t-Test ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$). Es wurden mindestens $n = 3$ Experimente mit verschiedenen Spendern durchgeführt.

4.2.3 Oberflächenantigenexpression auf fDCs unter MTA-Zugabe

Des Weiteren wurde der Einfluss von MTA auf fDCs untersucht. Hier stellte sich die Frage, inwieweit MTA innerhalb eines so kurzen Zeitraums eine Auswirkung auf die Oberflächenantigenexpression der fDCs hat.

Hierfür wurden Monozyten, wie in 3.1.4 beschrieben, für 48 Stunden kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte die Stimulation zur Ausreifung mit 10 ng/ml LPS. Nach der Kultivierungszeit wurden die Zellen geerntet, mit monoklonalen Antikörpern gegen CD1a, CD14, HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Im Gegensatz zu „normalen“ langzeitkultivierten DCs zeigten fDCs eine niedrigere Expression von allen untersuchten Antigenen mit Ausnahme von CD14 und HLA-DR. Nach 48 Stunden Inkubation mit MTA zeigte sich weder bei CD14 noch bei HLA-DR eine Änderung der Expression im Vergleich zu den unbehandelten fDCs. Hingegen scheint MTA die Expression von CD1a, CD80, CD83 und CD86 leicht negativ zu beeinflussen, wobei sich hier nur bei CD86 nach einer Inkubation mit 150µM MTA eine signifikant reduzierte Expression zeigte. Verglichen mit den Zellen ohne MTA-Zugabe kam es hier zu einer Reduktion der Expression um 43,6% (Abb. 6).

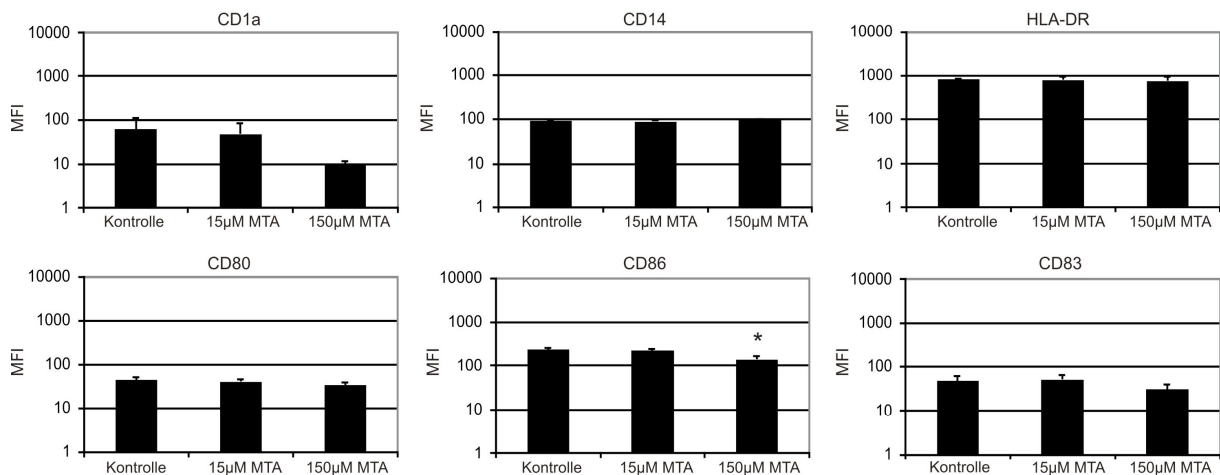


Abb. 6: Oberflächenantigenexpression auf fDCs unter dem Einfluss von MTA.

Monozyten wurden mit 10% FCS, 225 U/ml GM-CSF und 144 U/ml IL-4 mit und ohne MTA inkubiert. Als Kontrollen dienten Monozyten ohne MTA-Inkubation. Nach 24 Stunden wurde zur Induktion der DC-Reifung 10 ng/ml LPS zugegeben. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit monoklonalen Antikörpern gegen CD1a, CD14, HLA-DR, CD80, CD83 und CD86 gefärbt. Die Bestimmung der Antigenexpression erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert der MFI \pm SEM in logarithmischer Darstellung. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz erfolgte mit einem Student's t-Test ($p < 0,05^*$). Es wurden $n = 3$ Experimente mit verschiedenen Spendern durchgeführt.

4.3 IL-12- und IL-10-Produktion von stimulierten DCs unter MTA-Zugabe

Neben der Antigenprozessierung und -präsentation zeichnen sich DCs durch die Produktion verschiedener Zytokine aus, welche in zahlreichen immunologischen Reaktionen eine wichtige Rolle spielen. Dazu zählen IL-10, welches zu einer Inhibition der Immunantwort führen kann, als auch IL-12, welches eine Aktivierung und Differenzierung von spezifischen T-Zellen induziert. Im Folgenden wurde untersucht, ob MTA einen Einfluss auf die Sekretion dieser Zytokine durch DCs hat.

Zur Differenzierung von DCs wurden Monozyten für 7 Tage mit 10% FCS, 144 U/ml IL-4, 225 U/ml GM-CSF in An- und Abwesenheit von 15 μ M und 150 μ M MTA kultiviert. Nach ihrer Ernte wurden sie mit 10 pg/ml bzw. 10 ng/ml LPS stimuliert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände abgenommen und die IL-12- und IL-10-Produktion mittels eines enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) analysiert.

In Abb. 7 ist zu erkennen, dass sowohl bei den mit MTA behandelten als auch unbehandelten Kulturen eine konzentrationsabhängige Steigerung der IL-12-Produktion durch LPS stattfand. Nach Gabe von 10 ng/ml LPS ließ sich bei der Kultur mit 150 μ M MTA, verglichen mit den Zellen, die kein MTA während der DC-Reifung erhalten haben, eine signifikante Hemmung der IL-12-Produktion erkennen.

Hier liegt die mittlere Zytokinkonzentration 26,33 pg/ml +/- 10,29 SEM gegenüber 634,33 pg/ml +/- 271,88 SEM ohne MTA-Behandlung.

Die IL-10-Sekretion wurde ebenfalls bei allen drei Kulturen konzentrationsabhängig Steigerung der Interleukinproduktion durch LPS gesteigert. Die Zugabe von 150 µM MTA steigerte die IL10-Sekretion der DCs ohne, bzw. mit 10 pg/ml LPS leicht, aber nicht signifikant. Nach Stimulation mit 10 ng/ml LPS hatte MTA hingegen keinen Einfluss auf die IL-10-Produktion.

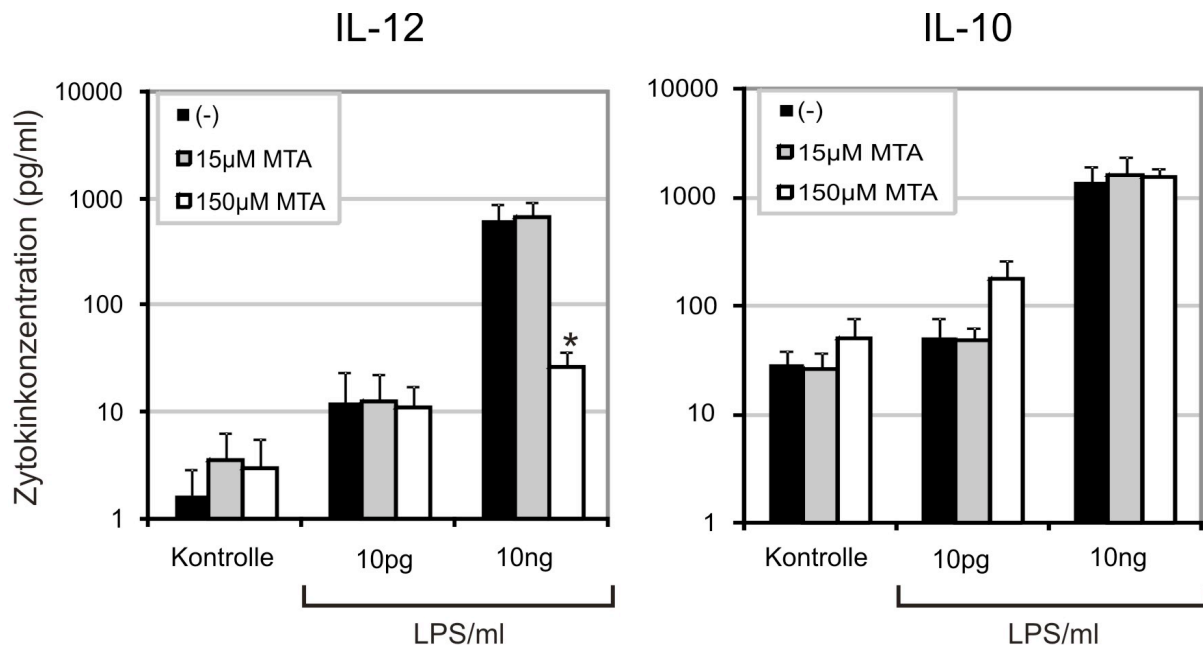


Abb. 7: IL-12- und IL-10-Produktion von mit LPS stimulierten DCs nach Inkubation mit MTA.

Monozyten wurden mit 10% FCS, 225 U/ml GM-CSF und 144 U/ml IL-4 mit und ohne MTA für 7 Tage kultiviert. Nach ihrer Ernte wurden sie mit 10 pg/ml bzw. 10 ng/ml LPS stimuliert und nach 24 Stunden die Kulturüberstände abgenommen. Anschließend wurde die IL-12- und IL-10-Produktion mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen Zytokinkonzentration im Kulturüberstand +/- SEM in logarithmischer Darstellung. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz erfolgte mit einem Student's t-Test ($p < 0,05^*$). Es wurden mindestens $n = 4$ Experimente mit verschiedenen Spendern durchgeführt.

4.4 Gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte reaction, MLR) in Gegenwart von MTA

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MTA auf mDCs eine Herunterregulation von CD1a, CD14, CD80, CD83 und CD86 bewirkt, stellte sich als Nächstes die Frage, ob MTA auch die Fähigkeit der DCs, eine allogene T-Zellantwort zu induzieren, beeinflussen kann. Hierbei wurde MTA zunächst während der Reifung der DCs zugegeben.

Dazu wurden aus Monozyten iDCs, mDCs und fDCs, wie in 3.1.4 beschrieben, kultiviert. MTA wurde in den Konzentrationen 15 μM bzw. 150 μM während der siebentägigen Kulturzeit zugegeben. Die DCs wurden anschließend in der MLR mit allogenen T-Lymphozyten kokultiviert. In einem anderen Ansatz erfolgte die MTA-Zugabe (10 μM , 25 μM bzw. 50 μM) erst nach vollständiger Ausdifferenzierung der DCs während der Inkubation mit den T-Lymphozyten. Alle Ansätze wurden mit [^3H]-Thymidin versehen, was von proliferierenden Zellen in die DNA eingebaut wird, so dass nach weiteren 18 Stunden die Proliferationsrate durch den [^3H]-Thymidineinbau bestimmt wird. DCs, die nicht proliferieren, zeigten keinen Einbau von Thymidin, weshalb der Thymidineinbau ein Maß für die T-Zellproliferation ist.

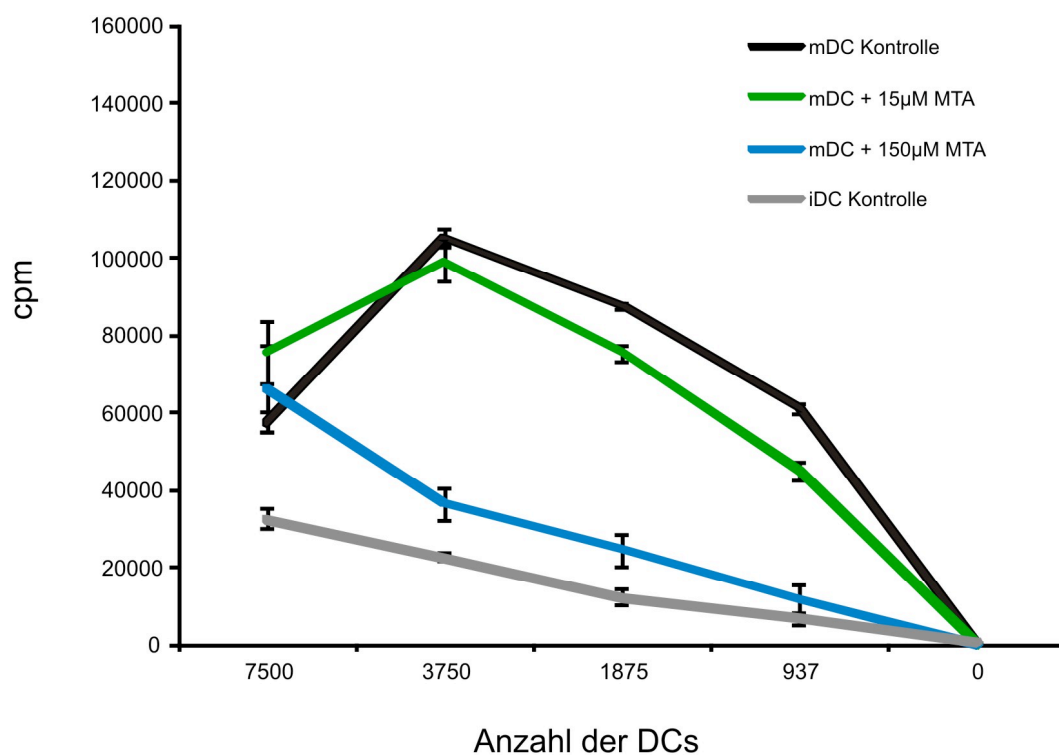


Abb. 8: T-Zellproliferation von in Gegenwart von MTA differenzierter DCs.

Monozyten wurden für 7 Tage mit 10% FCS, 225 U/ml GM-CSF und 144 U/ml IL-4 mit und ohne MTA in den angegebenen Konzentrationen kultiviert. An Tag 5 wurden zur Induktion der DC-Reifung 10 ng/ml LPS hinzugefügt. An Tag 7 wurden die Zellen geerntet und für weitere 5 Tage mit allogenen T-Lymphozyten kokultiviert. Anschließend wurde die Proliferation der T-Lymphozyten mittels [^3H]-Thymidineinbau bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus Vierfachwerten eines repräsentativen Einzelexperimentes von insgesamt 5 unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Spendern.

Unreife DCs führten erwartungsgemäß zu einer schwachen T-Zellproliferation, während mDCs eine starke T-Zellproliferation induzierten. Wurde MTA während der Ausdifferenzierung zugegeben, so war eine Abnahme der Proliferation der T-Lymphozyten mit steigender MTA-Konzentration feststellbar, die bei 15 μM MTA nur leicht, bei 150 μM MTA dagegen deutlich ausgeprägt war (Abb. 8). Hingegen hatte

MTA keinen Einfluss auf die Fähigkeit von iDCs und fDCs als Stimulatoren in der MLR (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurde der Effekt von MTA auf bereits ausdifferenzierte DCs während der MLR untersucht. Abb. 9 zeigt die Kokultur aus mDCs und T-Zellen in Gegenwart von MTA. Es ist zu sehen, dass MTA bereits in niedrigen Konzentrationen (10 μ M, 25 μ M und 50 μ M) einen inhibitorischen Einfluss auf die Proliferation von allogenen T-Lymphozyten hatte.

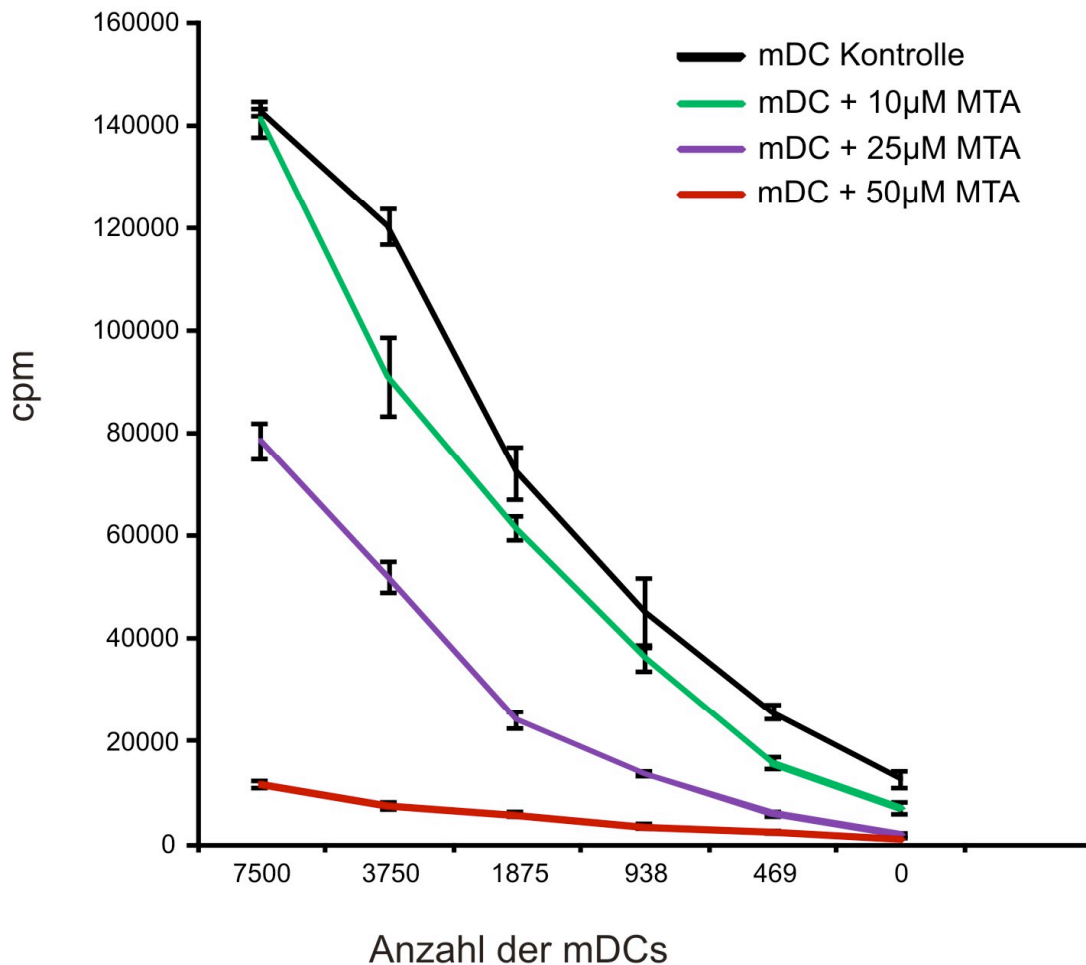


Abb. 9: T-Zellproliferation in Gegenwart von MTA in der MLR mit mDCs.

Monozyten wurden mit 10% FCS, 225 U/ml GM-CSF und 144 U/ml IL-4 kultiviert. An Tag 5 wurden zur Induktion der DC-Reifung 10 ng/ml LPS hinzugefügt. An Tag 9 wurden die Zellen geerntet und in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne MTA für weitere 5 Tage mit allogenen T-Lymphozyten kokultiviert. Anschließend wurde die Proliferation der T-Lymphozyten mittels [3 H]-Thymidineinbau bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus Vierfachwerten eines Einzelexperimentes von insgesamt 5 entsprechenden Experimenten mit verschiedenen Spendern.

fDCs induzierten im Vergleich zu den mDCs eine sehr viel schwächere Proliferation. Durch Zugabe von MTA kam es zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Proliferation der allogenen T-Lymphozyten (Abb. 10).

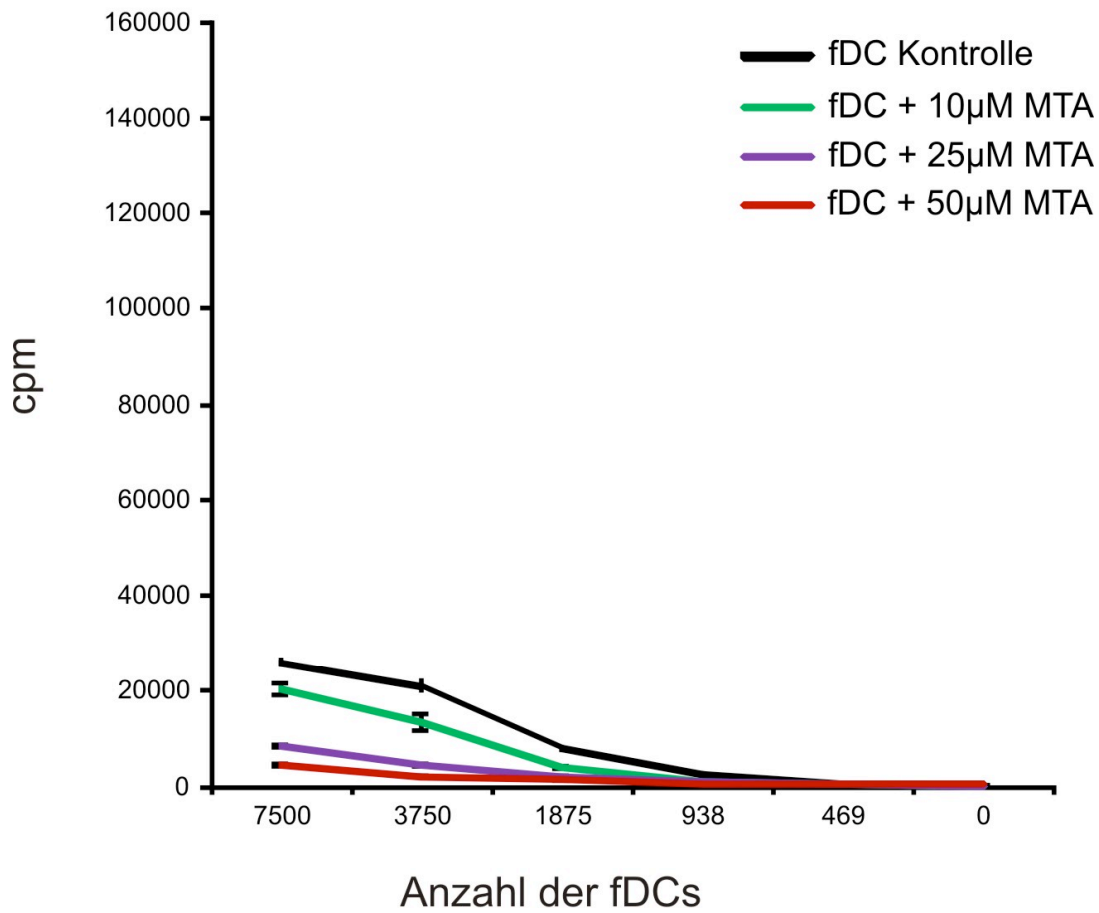


Abb. 10: T-Zellproliferation in Gegenwart von MTA in der MLR mit fDCs.

Monozyten wurden mit 10% FCS, 225 U/ml GM-CSF und 144 U/ml IL-4 kultiviert. Nach 24 Stunden wurden zur Induktion der DC-Reifung 10 ng/ml LPS hinzugefügt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit und ohne MTA in verschiedenen Konzentrationen für weitere 5 Tage mit allogenen T-Lymphozyten kokultiviert. Anschließend wurde die Proliferation der T-Lymphozyten mittels $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus Vierfachwerten eines Einzelexperimentes von insgesamt 3 repräsentativen Experimenten.

4.5 Hemmung der T-Lymphozytenproliferation durch MTA-Zugabe

Da in der MLR eine Hemmung der Proliferation der T-Lymphozyten durch MTA-Zugabe beobachtet wurde, stellte sich nun die Frage, ob die Hemmung der Proliferation durch MTA durch eine Suppression der DCs oder der T-Lymphozyten hervorgerufen wird.

Daher wurde als Nächstes untersucht, ob MTA die Proliferation von polyklonal stimulierten T-Lymphozyten supprimiert. Hierfür wurden T-Lymphozyten mit anti-CD28-Antikörper (AK) und IL-2 mit bzw. ohne anti-CD3-AK stimuliert und in An- oder Abwesenheit von MTA (10 μM , 25 μM , 50 μM und 150 μM) für 5 Tage inkubiert. Die Proliferation wurde anschließend durch den Einbau von $[^3\text{H}]$ -Thymidin gemessen.

In Abb. 11 ist gezeigt, dass erwartungsgemäß bei fehlender Stimulation keine Proliferation der T-Lymphozyten stattfand. Die Stimulation über anti-CD3-Antikörper in Kombination mit anti-CD28-AK und IL-2 steigerte die Proliferation der T-Lymphozyten gegenüber der nur über anti-CD28-AK und mit IL-2 stimulierten Proliferation. Dabei zeigte sich bei beiden Ansätzen eine deutliche Dosis-abhängige Reduktion der Proliferation der T-Lymphozyten durch MTA.

Somit scheint MTA nicht nur einen hemmenden Einfluss auf die Reifung der DCs, sondern auch einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von T-Lymphozyten zu haben.

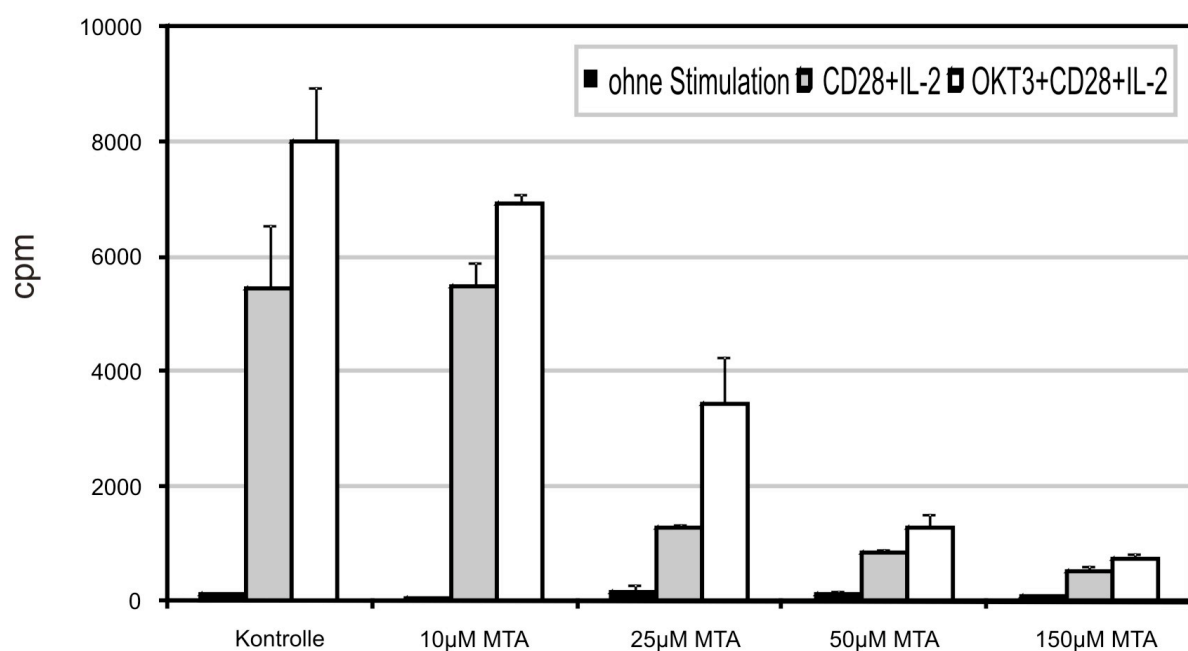


Abb. 11: T-Lymphozytenproliferation in Gegenwart von MTA.

Frische T-Lymphozyten wurden für 5 Tage mit anti-CD28-AK, IL-2 und MTA in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne anti-CD3-AK kultiviert. Anschließend wurde die Proliferation der T-Lymphozyten mittels [³H]-Thymidineinbau bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM aus Vierfachwerten eines repräsentativen Einzel-experimentes von insgesamt 4 Experimenten.

4.6 Regulation von Antigenprozessierungs-assoziierten Faktoren in dendritischen Zellen durch MTA auf mRNA- und Proteinebene

4.6.1 Analyse des Einflusses von MTA auf die Genexpression von *TAP1*, *TAP2*, *TAPASIN*, *LMP2*, *PSMB8* in DCs durch MTA

Als Nächstes stellte sich die Frage, ob MTA auch einen negativen Einfluss auf die Antigenprozessierung in DCs hat. Untersucht wurde die mRNA-Expression verschiedener Gene, die für Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie (APM) kodieren, wie z.B. *TAP1* und *TAP2* (antigen peptide transporter). Darüber hinaus wurde neben der Expression von *TAPASIN* auch *LMP2*, *LMP10* (low molecular mass protein) und *PSMB8* untersucht, welche für Untereinheiten des Proteasoms kodieren [154].

Zunächst wurden Monozyten, wie in 3.1.4 beschrieben, in An- und Abwesenheit von MTA (15 μ M und 150 μ M) kultiviert, um die DC-Differenzierung zu induzieren. Am Tag 5 wurde zur Induktion der DC-Reifung 10 ng/ml LPS hinzugefügt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und für weitere 24 Stunden in RPMI 1640 mit 2% AB-Serum kultiviert. Anschließend wurde ihre Gesamt-RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und über quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (RT-q-PCR) relativ zur 18S rRNA-Expression analysiert.

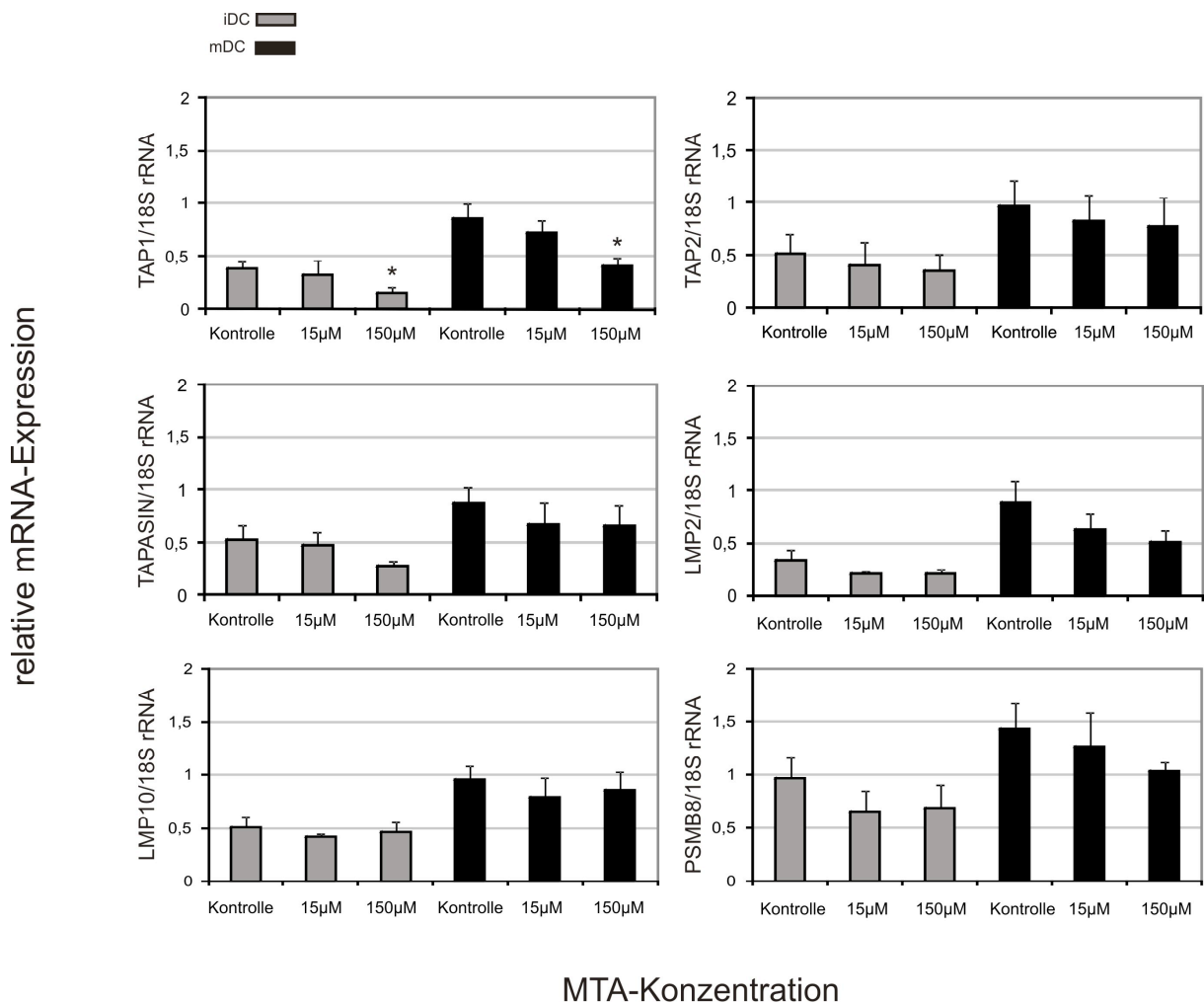


Abb. 12: Analyse der Genexpression von Komponenten der APM in DCs nach MTA-Zugabe.

Monozyten wurden mit 10% FCS, IL-4, GM-CSF und MTA in verschiedenen Konzentrationen kultiviert. Als Kontrollen dienten Monozyten, die ohne MTA inkubiert wurden. Am Tag 5 wurden zur Induktion der DC-Reifung 10 ng/ml LPS hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, ihre RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR ermittelt. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert der gemessenen mRNA-Expression \pm SEM. Der statistische Vergleich zum Kontrollansatz erfolgte mit einem Student's t-Test ($p < 0,05^*$). Es wurden $n = 3$ Experimente mit verschiedenen Spendern durchgeführt.

In den mDCs zeigte sich, verglichen mit den unreifen DCs, eine verstärkte mRNA-Expression der Antigenprozessierungskomponenten *TAP1* und *TAP2*, *TAPASIN*, *LMP2*, *LMP10* und *PSMB8*. Hierbei war bei Inkubation mit 150 μ M MTA eine signifikante Herunterregulation von *TAP1* sowohl in den unreifen als auch bei den reifen DCs zu erkennen. Eine leicht reduzierte mRNA-Expression bei steigender MTA-Zugabe war auch bei *TAP2*, *TAPASIN*, *LMP2*, *PSMB8* festzustellen. Die mRNA-Expression von *LMP10* wurde nicht durch MTA beeinflusst (Abb. 12).

4.6.2 Analyse des Einflusses von MTA auf die Expression von *TAP1*, *TAP2* und *LMP2* auf Proteinebene

Um die RNA-Daten auf Proteinebene zu bestätigen, wurden Monozyten 7 Tage lang mit 10% FCS, 144 U/ml IL-4, 225 U/ml GM-CSF und mit bzw. ohne MTA (15 μ M und 150 μ M) kultiviert. An Tag 5 wurden zur Reifung von DCs 10 ng/ml LPS hinzugefügt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und für weitere 24 Stunden in RPMI 1640 mit 2% AB-Serum kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression von *TAP1*, *TAP2*, *LMP2* und als Kontrolle β -Aktin mittels Western-Blot analysiert.

Wie in Abb. 13 gezeigt, wurde durch Einfluss von MTA weniger *TAP2* exprimiert als in den nicht behandelten dendritischen Zellen. Auch bei *TAP1* konnte eine Tendenz dieser Regulation beobachtet werden, wohingegen bei *LMP2* keine Regulation durch MTA auf Proteinebene ersichtlich war (Daten nicht gezeigt).

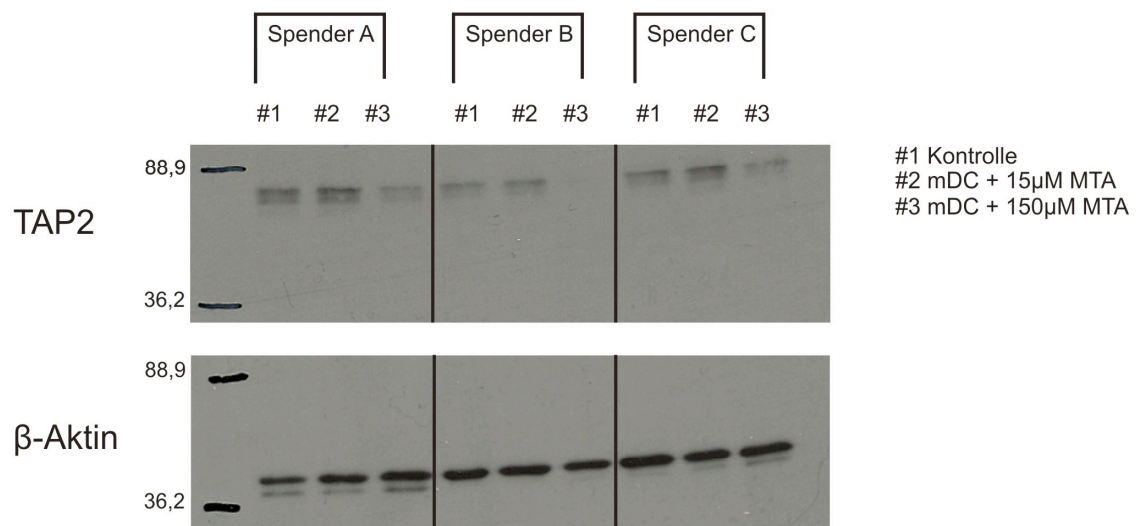


Abb. 13: Regulation von TAP2 in reifen dendritischen Zellen auf Protein-Ebene durch MTA-Zugabe.

Monozyten wurden mit 10% FCS, 144 U/ml IL-4, 225 U/ml GM-CSF mit und ohne MTA kultiviert. An Tag 5 wurden zur Induktion der DC-Reifung 10 ng/ml LPS hinzugefügt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und für weitere 24 Stunden mit 2% AB-Serum kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Die Detektion von *TAP2* in den Lysaten erfolgte durch spezifische Anti-körper mittels Western-Blot. Zur Kontrolle wurde gegen β -Aktin gefärbt. Es wurden n = 3 Experimente mit verschiedenen Spendern durchgeführt.

5 Diskussion

5.1 Einfluss von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) auf humane dendritische Zellen

In vielen Tumorzellen kommt es zu Veränderungen von Stoffwechselwegen und dadurch zu einer Akkumulation von Metaboliten. Verschiedene Tumoren wie das Mammakarzinom und das maligne Melanom weisen eine Defizienz der Methylthioadenosin-Phosphorylase (MTAP) auf, so dass es zu einer intrazellulären Ansammlung und Sekretion von (MTA) in das umgebende Milieu kommt [111, 155]. Insgesamt gibt es wenige Untersuchungen zur immunregulatorische Wirkung von MTA. Bisherige Studien konnten zeigen, dass MTA einen immunsuppressiven Effekt auf humane natürliche Killerzellen und auf B- und T-Lymphozyten bezüglich ihrer Proliferation, Antikörperproduktion und auch Zytotoxizität hat [115, 116, 121]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von MTA auf dendritische Zellen (DCs) analysiert.

5.1.1 Hemmung der DC-Reifung durch MTA

DCs wurden nach Kultivierung in Ab- und Anwesenheit von MTA durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei analysierten wir einerseits typische Antigene von unreifen DCs (CD1a) sowie andererseits Antigene, die speziell auf reifen DCs stark exprimiert sind (CD80, CD83, CD86). Zwar differenzierten die DCs auch in Anwesenheit von MTA zu unreifen (iDCs) und wiesen keine signifikante Veränderungen in der Expression von CD1a und HLA-DR auf. Jedoch war die durch LPS induzierte Hochregulation der Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86 deutlich supprimiert. Auch bei fast DCs (fDCs) kam es zu einer signifikant verminderten Expression von CD86, wohingegen die Expression von CD80 und CD83 nicht verändert wurde. Insgesamt zeigten fDCs aber eine deutlich reduzierte Expression der Reifungsmarker CD80, CD83 und CD86. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu Studien, die postulieren, dass fDCs eine gleichwertige Differenzierung wie mDCs zeigen [37, 38]. Hierbei wurde in diesen Arbeiten zur

Reifungsinduktion PGE₂ in Kombination mit Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) statt LPS verwendet.

Bisher gibt es wenige Studien, die eine Wirkung von MTA auf die Differenzierung von Immunzellen untersucht haben. Einen Effekt von MTA auf die terminale Differenzierung von hämatopoetischen Zelllinien konnte die Arbeitsgruppe von Riscoe *et al.* nicht nachweisen [156]. Dem widersprechen andere Studien, die eine Hemmung der Differenzierung von murinen erythroleukämischen Zellen und humanen T- und B-Lymphozyten bestätigen können [115, 157, 158]. Katrin Singer konnte in ihrer Dissertation zeigen, dass bei MTA-supprimierten CD8⁺-T-Zellen auch nach wiederholter Stimulation ein naiver Phänotyp herrschte [121]. Dies steht in Einklang mit unseren Ergebnissen, die zeigen, dass MTA eine Inhibition der DC-Reifung bewirkt. Durch diese Hemmung der Differenzierung zu kompetenten reifen DCs könnte MTA einen immunsupprimierenden Effekt im Tumormilieu haben, wie es auch oft bei Tumor-assoziierten DCs beschrieben ist.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Differenzierung und somit auch die Funktion von DCs im Tumormilieu verändert sind [85, 159-161]. Bei unterschiedlichen Tumoren, wie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und dem Mammakarzinom, konnte ein unreifer Phänotyp der intratumoralen DCs nachgewiesen werden [162-164]. Zum Beispiel sind bei Tumor-infiltrierenden DCs die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, welche wichtig für die Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung sind, herunterreguliert [165, 166]. Dieser unreife Status konnte bei Patienten mit Mamma- und Lungenkarzinom auch bei peripheren DCs nachgewiesen werden [86, 90, 160], so dass es sich um einen systemischen Effekt handelt, der durch lösliche Tumorfaktoren ausgelöst werden kann [159]. Almand *et al.* konnten zeigen, dass eine Akkumulation von unreifen DCs mit dem Tumorstadium und der Dauer der Erkrankung assoziiert war [86]. In mehreren Studien konnte eine Korrelation zwischen einer erniedrigten Expression von CD83 auf Tumor-infiltrierenden DCs und einem schlechteren klinischen Verlauf hervorgehoben werden [167, 168]. Für CD1a konnte ein solcher Zusammenhang beim Mammakarzinom nicht nachgewiesen werden [169, 170]. Diese inhibierende Modulation der DC-Reifung ähnelt der Wirkung von Tumormetaboliten wie Milchsäure oder MTA [99].

5.1.2 Modulation der Zytokinproduktion durch MTA

Auch in ihrer Zytokinsekretion wurden DCs durch MTA moduliert: Nach Stimulation mit 10 ng LPS wurde eine signifikante Reduktion der IL-12-Produktion von DCs nach Zugabe von 150 μ M MTA beobachtet. Außerdem zeigte sich tendenziell bei niedrig dosiertem LPS eine Erhöhung der IL-10-Sekretion von DCs, die mit 150 μ M MTA kultiviert wurden. IL-10 gilt wie VEGF (vascular endothelial growth factor) und IL-6 als immunsuppressiver Faktor und wurde bereits mit einer negativen Beeinflussung auf die Differenzierung und Reifung von DCs in Zusammenhang gebracht [171-174][175-177]. IL-10 wird auch von vielen Tumoren produziert [178-180] und es konnte bereits bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) und Magenkarzinom gezeigt werden, dass ein erhöhter IL-10-Spiegel im Serum mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [181-183]. Außerdem führt IL-10 zu einer Herunterregulation von CD1a [184, 185], so dass eine Änderung der Oberflächenantigenexpression nicht nur durch das MTA selbst, sondern auch über diesen autokrinen Weg noch verstärkt werden könnte. Bei Tumor-infiltrierenden DCs und DCs, die mit Tumorzellkulturüberständen kultiviert wurden, kam es nicht nur zu einer Steigerung der IL-10-Produktion, sondern oftmals konnte dabei gleichzeitig eine verringerte IL-12-Produktion der DCs nachgewiesen werden [87, 90, 91, 161, 162, 186]. IL-12 ist ein wichtiges Zytokin für die weitere Ausbildung einer T-Helferzellen 1 (T_H1)-Antwort [187] und hemmt nachweislich die Tumorneoangiogenese beim Ovarialkarzinom [188]. Die Hemmung der IL-12-Sekretion bei gleichzeitiger konstanter IL-10-Sekretion ist somit eine eindeutige Veränderung der DCs zu einem pro-tumoralen Phänotyp.

Bis dato konnten mehrere Gruppen zeigen, dass MTA in unterschiedlichen Zellarten wie Kolonkarzinomzellen, Hepatozyten, murinen und humanen Blutzellen eine Modulation der Zytokinproduktion bewirkt [117, 142, 189, 190]. Während Li *et al.* eine Inhibition von IL-10 durch MTA beobachtet haben [189], konnten Hevia *et al.* zeigen, dass MTA in murinen Makrophagen neben einer konzentrationsabhängigen Hemmung des pro-inflammatorischen Zytokins $TNF-\alpha$ auch die Stimulation der LPS-induzierten IL-10-Sekretion bewirkt [119]. Dies wurde von Veal *et al.* für $TNF-\alpha$ auf mRNA-Ebene in murinen RAW264.7-Zellen bestätigt [142]. Ähnliche Ergebnisse erzielten Moreno *et al.* in einer Studie zur Multiplen Sklerose, bei der es in humanen peripheren mononukleären Blutzellen unter MTA-Zugabe zu einer Abschwächung der Genexpression für $TNF-\alpha$ und *Interferon (INF)- γ* kam [117]. Eine Inhibition der

Genexpression verschiedener Zytokine wurde ebenfalls in *in vitro*-Versuchen in isolierten murinen und humanen T-Zellen und Jurkat-Zellen nach T-Zell-Rezeptoraktivierung und Zugabe von bis zu 1 mM MTA bestätigt [191, 192]. Insgesamt könnten die beschriebenen Veränderungen der Oberflächenantigenexpression und der Zytokinsekretion zu einer Hemmung der T-Zellaktivierung führen. Um dies zu überprüfen, folgten Experimente mit den behandelten DCs in der MLR.

5.1.3 Hemmung der T-Zellaktivierung und -proliferation durch MTA

Die Fähigkeit zur Induktion einer T-Zellantwort durch DCs hängt sowohl von der Expression von Oberflächenantigenen wie HLA-DR und kostimulatorischen Molekülen als auch von der Sekretion bestimmter Zytokine wie z.B. IL-12 ab. Da sowohl die Expression der kostimulatorischen Antigene als auch IL-12 nach Inkubation der DCs mit MTA deutlich reduziert war, wurde erwartungsgemäß auch eine schlechte Stimulation von T-Zellen in der MLR festgestellt. Auch Tumorf infiltrierende DCs und periphere DCs von Tumorpatienten zeigen im Vergleich zu DCs von gesunden Probanden eine eingeschränkte Fähigkeit in der MLR T-Lymphozyten zu aktivieren [162, 193-195].

Des Weiteren wurde in einer Versuchsreihe, bei der die MTA-Zugabe erst zur Kokultur von DCs und T-Zellen erfolgte, ebenfalls eine konzentrationsabhängige Inhibition der T-Zellproliferation in der MLR festgestellt. Um zu sehen, ob MTA die DCs oder die T-Zellen beeinflusst, wurde ein weiterer Versuch angeschlossen, in dem DC-unabhängig unter MTA-Zugabe T-Lymphozyten polyklonal stimuliert und anschließend ihre Proliferation gemessen wurde. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation durch MTA, so dass MTA beide Zelltypen beeinflussen kann. Diese Ergebnisse stimmen mit Studien überein, die zeigen, dass MTA die Proliferation von humanen Immunzellen hemmt. Bereits in den 80ern konnten Wolford *et al.* und Di Padova *et al.* zeigen, dass MTA in Konzentrationen bis 1 mM die Proliferation von murinen und humanen B- und T-Zellen konzentrationsabhängig inhibiert, wobei diese Inhibition reversibel war [114, 115]. Diese Ergebnisse werden von einer aktuellen Doktorarbeit bestätigt, in der MTA bei einer Konzentration ab 100 μ M die Proliferation von mitogen-stimulierten und polyklonal aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten inhibiert [121]. Auch bei murinen hämatopoetischen Vorläuferzellen konnte diese Hemmung *in vivo* und *in*

in vitro erzielt werden [113]. Allerdings scheint MTA nicht generell einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von Zellen zu haben. Während MTA offenbar einen hemmenden Einfluss auf Immunzellen hat und sich die Frage nach einem protumoralen Einfluss stellt, wird in verschiedenen Arbeiten kontrovers über den Einfluss von MTA auf Tumorzellen diskutiert. Andreu-Perez *et al.* konnten nachweisen, dass MTA die Proliferation von malignen Melanomzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmt, was die Theorie eines antitumoralen Potentials von MTA stützt [196]. Eine solche Inhibition des Wachstums zeigte sich zum Teil bei entarteten Blutzelllinien wie den MEL-Zellen nach Inkubation mit MTA [158]. Hierbei wurden Konzentrationen von 500 μM MTA eingesetzt. Dem widersprechen aktuelle Ergebnisse von Kirovski *et al.*, die eine Zunahme der Proliferation von Leberkarzinomzellen bei 5 μM MTA beobachten und eine Tumorprogression des HCCs durch eine konzentrationsabhängige Induktion der Genexpression von *MMP-1*, *MMP-9* und *IL-8* durch MTA nachweisen konnten [197]. Diesen protumoralen Einfluss bestätigen auch Stevens *et al.*, die zwar keinen direkten Einfluss auf die Proliferation von Zellen des malignen Melanoms zeigen konnten, jedoch durch eine induzierte Expression u.a. von VEGF und MMP-9 einen Zusammenhang mit der Exazerbation des Tumors sehen. In nicht-malignen Gewebezellen wie Melanozyten oder Myofibroblasten konnte entweder kein Einfluss auf die Proliferation oder eine Hemmung des Wachstums gezeigt werden [112, 190, 198]. MTA scheint folglich unterschiedliche Wirkungen auf die Proliferation von Zellen zu haben. Es ist davon auszugehen, dass diese hemmende oder fördernde Wirkung abhängig von der jeweiligen Zellart und der eingesetzten Konzentration ist. Bei Immunzellen jedoch sprechen die bisherigen Ergebnisse für einen hemmenden Effekt und somit eine immunsuppressive und dadurch protumorale Wirkung.

Eine mögliche Ursache der Proliferationshemmung ist die Induktion von Apoptose in den jeweiligen Zellen. Auch über diesen möglichen Wirkmechanismus von MTA herrscht derzeit noch Uneinigkeit in der Literatur. In diversen Studien wurde gezeigt, dass MTA konzentrationsabhängig einen proapoptotischen Effekt auf Tumorzelllinien hat, dies wurde sowohl für das Kolonkarzinom, das HCC als auch für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs beschrieben. Dagegen zeigte sich bei gesunden Zellen des Kolons und der Leber keine Induktion der Apoptose durch MTA [199-202]. Ein proapoptotischer Effekt konnte auch bei Zellen des Immunsystems bisher nicht nachgewiesen werden. Wolford *et al.* und Di Padova *et al.* konnten einen nicht toxischen und reversiblen Effekt von MTA auf T- und B-

Lymphozyten feststellen [114, 115]. In einer Versuchsreihe wurde in dieser Arbeit der Effekt von MTA auf die Apoptoseinduktion von Monozyten analysiert, da sich aus Monozyten *in vitro* unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF dendritische Zellen generieren lassen. Mithilfe einer Apoptose-Färbung konnte durchflusszytometrisch gezeigt werden, dass es bei Konzentrationen von 10 μM bis 500 μM MTA keinen Einfluss auf eine Apoptoseinduktion gab. Erst bei einer unphysiologischen Konzentration von 1000 μM MTA zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Anzahl der lebenden Monozyten gegenüber den unbehandelten Zellen.

5.1.4 Hemmung der Antigenprozessierungsmaschinerie in DCs

Die zentrale Aufgabe der DCs ist die Aufnahme und Prozessierung von Antigen, welches dann T-Zellen präsentiert wird. Hierfür ist die sogenannte Antigenprozessierungsmaschinerie (APM) notwendig. Sie besteht aus Proteinen wie LMP2, LMP10 (low molecular mass protein) und PSMB8, welche Untereinheiten des Proteasoms darstellen. Die Antigenpeptid-Transporter (TAP)1 und TAP2 katalysieren die Aufnahme von Peptiden in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums, wo TAPASIN die Bindung zwischen den Transportern und den MHC I (major histocompatibility complex)-Molekülen vermittelt [203].

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in Gegenwart von MTA die Aktivierung der T-Zellen vermindert ist, stellte sich die Frage, ob auch Komponenten der APM in DCs moduliert werden. Es kam zu einer leicht reduzierten mRNA-Expression von *TAP2*, *TAPASIN*, *LMP2* und *PSMB8*. Bei *TAP1* war eine signifikante Herunterregulation durch 150 μM MTA festzustellen. Diese Regulation konnte für *TAP1* und *TAP2* auch auf Proteinebene bestätigt werden.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bislang zeigen, dass die APM von DCs in Tumoren negativ beeinflusst ist. Während die Komponenten der APM im Laufe der DC-Reifung hochreguliert werden, kommt es bei Kokultur mit Tumorzelllinien zu einer Herunterregulation. Diese geht mit einer beeinträchtigten T-Zellaktivierung einher [16]. Tourkova *et al.* stellten bei *in vitro*-Kokultur von DCs mit Plattenepithelkarzinomzellen der Mundhöhle eine signifikante Herunterregulation der Komponenten LMP2, LMP10 und PSMB8 in den DCs fest. Durch die Zugabe von IL-15 konnte die verminderte Expression wieder rückgängig gemacht werden [204]. Neben dieser Modulation der Immunzellen verschaffen sich Tumore einen weiteren

Überlebensvorteil, indem ihre Erkennung durch Defekte in der eigenen APM erschwert wird [63, 66]. Tumorprogression, T-Zellinfiltration und schlechteres Überleben der Patienten korrelierte mit Defizienzen in der APM verschiedener Tumore wie des malignen Melanoms, Ovarial- und Prostatakarzinoms [68, 205-207].

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass MTA bei DCs einen hemmenden Einfluss auf die Antigenexpression, die Zytokinsekretion und die Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren hat. Eine Herunterregulation von wichtigen Komponenten der APM konnte auch auf mRNA-Ebene und zum Teil auf Proteinebene bestätigt werden, so dass insgesamt eine Schwächung ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen (APCs) und reduzierte Aktivierung der T-Zellantwort vorliegt. MTA ähnelt in seiner Wirkung immunsuppressiven Wachstumsfaktoren wie VEGF oder Metaboliten wie Laktat, die bei Tumoren in erhöhten Konzentrationen vorliegen [99, 174, 175]. Somit stellt die Sekretion von MTA einen weiteren *immune escape*-Mechanismus dar und die Erforschung des Tumormetabolismus und der Auswirkung der resultierenden Metaboliten auf die Immunantwort ist für die Etablierung neuer Therapiekonzepte interessant. Durch eine pharmakologische Modulation könnte bei Tumorpatienten neben einer Hemmung des Tumorwachstums auch eine Stärkung der tumor-spezifischen Immunantwort erzielt werden. Daher sollten in weiteren Experimenten die Wirkmechanismen, mit denen MTA DCs in ihrer Funktion verändert, untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Durch Modulation ihres Metabolismus sind maligne entartete Zellen häufig imstande, sich einen Überlebensvorteil gegenüber dem umgebenden Gewebe zu verschaffen. Beispielsweise zeigen Tumorzellen Veränderungen in der Polyaminsynthese: In vielen Tumoren lässt sich eine Defizienz der Methylthioadenosin-Phosphorylase nachweisen, wodurch es zu einer extrazellulären Akkumulation von 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) kommt. Da bereits immunmodulatorische Effekte von MTA bekannt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von MTA auf die Reifung und Funktion humaner dendritischer Zellen (DCs) analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass MTA einen hemmenden Einfluss auf die Antigenexpression wichtiger Oberflächenmarker auf DCs hat. Neben einer Modulation der Reifung kam es in Gegenwart von 150 μM MTA auch zu einer Suppression der IL-12-Produktion der DCs. In der gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) waren zuvor mit MTA inkubierte DCs in ihrer Fähigkeit, die Proliferation von alloge- nen T-Zellen zu induzieren, eingeschränkt. Auch bei Zugabe von MTA in die MLR kam es zu einer reduzierten Aktivierung der T-Zellantwort. In einem weiteren Ansatz konnte gezeigt werden, dass MTA einen hemmenden Effekt auf die Proliferation polyklonal stimulierter T-Zellen hat und somit DCs und T-Zellen beeinflusst. Des Weiteren wurde eine Herunterregulation von wichtigen Komponenten der Antigenprozessierungsmaschinerie wie TAP1, TAP2 und LMP2 in DCs auf mRNA-Ebene gezeigt, was bei einigen Komponenten auch auf Proteinebene detektierbar war. Insgesamt zeigte sich bei den DCs eine Hemmung ihrer Reifung und eine Schwächung ihrer Funktion als antigenpräsentierenden Zellen durch MTA.

Aufgrund der beobachteten Hemmung der Reifung von DCs und der Schwächung ihrer Funktion als antigenpräsentierenden Zellen durch MTA, stellt die Sekretion von MTA durch Tumorzellen einen *immune escape*-Mechanismus dar, die dem Tumor durch Beeinträchtigung der Immunantwort einen Wachstumsvorteil verschafft. Die weitere Erforschung des Tumormetabolismus und seine Auswirkung auf das Immunsystem ist folglich wesentlich, um eine erfolgreiche Antitumorthherapie zu konzipieren. In zukünftigen Experimenten sollten hierfür auch mögliche Wirkmechanismen, durch die MTA DCs und andere Immunzellen moduliert, untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Murphy, K.M., Travers, M., Walport, M., *Janeway's Immunobiology*. 2007. **7th edition**.
2. Steinman, R.M. and K. Inaba, *Myeloid dendritic cells*. *J Leukoc Biol*, 1999. **66**(2): p. 205-8.
3. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 271-96.
4. Cyster, J.G., *Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs*. *J Exp Med*, 1999. **189**(3): p. 447-50.
5. Steinman, R.M. and H. Hemmi, *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. **311**: p. 17-58.
6. Adema, G.J., et al., *A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells*. *Nature*, 1997. **387**(6634): p. 713-7.
7. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
8. Reis e Sousa, C., P.D. Stahl, and J.M. Austyn, *Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro*. *J Exp Med*, 1993. **178**(2): p. 509-19.
9. Verdijk, R.M., et al., *Polyribinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells*. *J Immunol*, 1999. **163**(1): p. 57-61.
10. Sallusto, F., et al., *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. *J Exp Med*, 1995. **182**(2): p. 389-400.
11. Cella, M., et al., *Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells*. *Nature*, 1997. **388**(6644): p. 782-7.
12. Verhasselt, V., et al., *Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway*. *J Immunol*, 1997. **158**(6): p. 2919-25.
13. Thomas, R., L.S. Davis, and P.E. Lipsky, *Comparative accessory cell function of human peripheral blood dendritic cells and monocytes*. *J Immunol*, 1993. **151**(12): p. 6840-52.
14. Ramachandra, L., D. Simmons, and C.V. Harding, *MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(1): p. 98-104.

15. Hart, D.N., *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3245-87.
16. Whiteside, T.L., et al., *Antigen-processing machinery in human dendritic cells: up-regulation by maturation and down-regulation by tumor cells*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1526-34.
17. Lopez-Albaitero, A., et al., *Maturation pathways of dendritic cells determine TAP1 and TAP2 levels and cross-presenting function*. J Immunother, 2009. **32**(5): p. 465-73.
18. Young, J.W., *Dendritic cells: expansion and differentiation with hematopoietic growth factors*. Curr Opin Hematol, 1999. **6**(3): p. 135-44.
19. Caux, C., et al., *Human dendritic Langerhans cells generated in vitro from CD34+ progenitors can prime naive CD4+ T cells and process soluble antigen*. J Immunol, 1995. **155**(11): p. 5427-35.
20. Cella, M., et al., *Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 747-52.
21. Koch, F., et al., *High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 741-6.
22. Reis e Sousa, C., et al., *In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas*. J Exp Med, 1997. **186**(11): p. 1819-29.
23. Wehner, R., et al., *The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells*. J Innate Immun, 2011. **3**(3): p. 258-63.
24. Heufler, C., et al., *Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(3): p. 659-68.
25. Romani, N., et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 83-93.
26. Peters, J.H., et al., *Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants*. Immunol Today, 1996. **17**(6): p. 273-8.
27. Peters, J.H., S. Ruhl, and D. Friedrichs, *Veiled accessory cells deduced from monocytes*. Immunobiology, 1987. **176**(1-2): p. 154-66.
28. Santiago-Schwarz, F., et al., *TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages*. J Leukoc Biol, 1992. **52**(3): p. 274-81.

29. Caux, C., et al., *GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells*. Nature, 1992. **360**(6401): p. 258-61.
30. Romani, N., et al., *Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability*. J Immunol Methods, 1996. **196**(2): p. 137-51.
31. Pickl, W.F., et al., *Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes*. J Immunol, 1996. **157**(9): p. 3850-9.
32. Zhou, L.J. and T.F. Tedder, *CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2588-92.
33. Winzler, C., et al., *Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures*. J Exp Med, 1997. **185**(2): p. 317-28.
34. Jonuleit, H., et al., *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3135-42.
35. Buelens, C., et al., *Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10*. Eur J Immunol, 1997. **27**(8): p. 1848-52.
36. Kitajima, T., et al., *A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 142-7.
37. Ramadan, G., et al., *Generation of Aspergillus- and CMV- specific T-cell responses using autologous fast DC*. Cytotherapy, 2004. **6**(3): p. 223-34.
38. Dauer, M., et al., *Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4069-76.
39. Cao, X., et al., *CD1 molecules efficiently present antigen in immature dendritic cells and traffic independently of MHC class II during dendritic cell maturation*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 4770-7.
40. Ruppert, J., et al., *IL-4 decreases the expression of the monocyte differentiation marker CD14, paralleled by an increasing accessory potency*. Immunobiology, 1991. **182**(5): p. 449-64.
41. Lauener, R.P., et al., *Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes*. Eur J Immunol, 1990. **20**(11): p. 2375-81.
42. Kasinrerk, W., et al., *CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. J Immunol, 1993. **150**(2): p. 579-84.

43. Banchereau, J. and A.K. Palucka, *Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 296-306.
44. Gilboa, E., S.K. Nair, and H.K. Lyerly, *Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines*. Cancer Immunol Immunother, 1998. **46**(2): p. 82-7.
45. Boczkowski, D., et al., *Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 465-72.
46. Condon, C., et al., *DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells*. Nat Med, 1996. **2**(10): p. 1122-8.
47. Berard, F., et al., *Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells*. J Exp Med, 2000. **192**(11): p. 1535-44.
48. Neidhardt-Berard, E.M., et al., *Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(4): p. R322-8.
49. Specht, J.M., et al., *Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases*. J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1213-21.
50. Song, W., et al., *Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity*. J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1247-56.
51. Turner, B., et al., *Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma*. J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1669-78.
52. Brossart, P., *Dendritic cells in vaccination therapies of malignant diseases*. Transfus Apher Sci, 2002. **27**(2): p. 183-6.
53. Asemissen, A.M. and P. Brossart, *Vaccination strategies in patients with renal cell carcinoma*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(7): p. 1169-74.
54. Palucka, A.K., et al., *Single injection of CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine can lead to induction of T-cell immunity in patients with stage IV melanoma*. J Immunother, 2003. **26**(5): p. 432-9.
55. Banchereau, J., et al., *Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine*. Cancer Res, 2001. **61**(17): p. 6451-8.
56. Kvistborg, P., et al., *Fast generation of dendritic cells*. Cell Immunol, 2009. **260**(1): p. 56-62.

57. Jarnjak-Jankovic, S., et al., *A full scale comparative study of methods for generation of functional Dendritic cells for use as cancer vaccines*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 119.
58. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. Prog Exp Tumor Res, 1970. **13**: p. 1-27.
59. Campoli, M., C.C. Chang, and S. Ferrone, *HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection*. Vaccine, 2002. **20 Suppl 4**: p. A40-5.
60. Chang, C.C., M. Campoli, and S. Ferrone, *HLA class I defects in malignant lesions: what have we learned?* Keio J Med, 2003. **52(4)**: p. 220-9.
61. Zang, X. and J.P. Allison, *The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition*. Clin Cancer Res, 2007. **13(18 Pt 1)**: p. 5271-9.
62. Denfeld, R.W., et al., *In situ expression of B7 and CD28 receptor families in human malignant melanoma: relevance for T-cell-mediated anti-tumor immunity*. Int J Cancer, 1995. **62(3)**: p. 259-65.
63. Seliger, B., *Molecular mechanisms of MHC class I abnormalities and APM components in human tumors*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57(11)**: p. 1719-26.
64. Seliger, B., et al., *HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells*. Semin Cancer Biol, 2002. **12(1)**: p. 3-13.
65. Marincola, F.M., et al., *Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance*. Adv Immunol, 2000. **74**: p. 181-273.
66. Hoves, S., et al., *In situ analysis of the antigen-processing machinery in acute myeloid leukaemic blasts by tissue microarray*. Leukemia, 2009. **23(5)**: p. 877-85.
67. Koopman, L.A., et al., *Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer*. J Exp Med, 2000. **191(6)**: p. 961-76.
68. Seliger, B., et al., *Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59(4)**: p. 529-40.
69. Seliger, B., et al., *Reduced membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression*. Clin Cancer Res, 1996. **2(8)**: p. 1427-33.
70. Murakami, Y., et al., *Prognostic significance of immuno-proteasome subunit expression in patients with renal-cell carcinoma: a preliminary study*. Mol Urol, 2001. **5(3)**: p. 113-9.

71. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
72. Blank, C., et al., *Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro*. Int J Cancer, 2006. **119**(2): p. 317-27.
73. Zhang, Q., et al., *Adoptive transfer of tumor-reactive transforming growth factor-beta-insensitive CD8+ T cells: eradication of autologous mouse prostate cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(5): p. 1761-9.
74. Chen, M.L., et al., *Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(2): p. 419-24.
75. Gorelik, L. and R.A. Flavell, *Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells*. Nat Med, 2001. **7**(10): p. 1118-22.
76. Gabrilovich, D.I., et al., *Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(10): p. 2963-70.
77. Kawamura, K., et al., *Secretion of interleukin-10 from murine colon carcinoma cells suppresses systemic antitumor immunity and impairs protective immunity induced against the tumors*. Cancer Gene Ther, 2002. **9**(1): p. 109-15.
78. Whiteside, T.L., *Immune responses to malignancies*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S272-83.
79. Ostrand-Rosenberg, S., *Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 11-8.
80. Mantovani, A. and A. Sica, *Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(2): p. 231-7.
81. Allavena, P., et al., *The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance*. Immunol Rev, 2008. **222**: p. 155-61.
82. Zippelius, A., et al., *Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance*. Cancer Res, 2004. **64**(8): p. 2865-73.
83. Blohm, U., et al., *Lack of effector cell function and altered tetramer binding of tumor-infiltrating lymphocytes*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5522-30.
84. Van den Hove, L.E., et al., *Phenotype, cytokine production and cytolytic capacity of fresh (uncultured) tumour-infiltrating T lymphocytes in human renal cell carcinoma*. Clin Exp Immunol, 1997. **109**(3): p. 501-9.
85. Gabrilovich, D., *Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 941-52.

86. Almand, B., et al., *Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1755-66.
87. Sharma, S., et al., *Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(3): p. 961-8.
88. Menetrier-Caux, C., et al., *Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor*. Blood, 1998. **92**(12): p. 4778-91.
89. Diao, J., et al., *Tumors Suppress In Situ Proliferation of Cytotoxic T Cells by Promoting Differentiation of Gr-1+ Conventional Dendritic Cells through IL-6*. J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5058-67.
90. Della Bella, S., et al., *Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer*. Br J Cancer, 2003. **89**(8): p. 1463-72.
91. Kuo, P.L., et al., *Lung cancer-derived galectin-1 mediates dendritic cell anergy through inhibitor of DNA binding 3/IL-10 signaling pathway*. J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1521-30.
92. Scholz, C., et al., *Ovarian cancer-derived glycodelin impairs in vitro dendritic cell maturation*. J Immunother, 2009. **32**(5): p. 492-7.
93. Xu, W., et al., *The role of nitric oxide in cancer*. Cell Res, 2002. **12**(5-6): p. 311-20.
94. Warburg, O., *[On the facultative anaerobiosis of cancer cells and its use in chemotherapy]*. Munch Med Wochenschr, 1961. **103**: p. 2504-6.
95. Walenta, S., et al., *High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers*. Cancer Res, 2000. **60**(4): p. 916-21.
96. Walenta, S., T. Schroeder, and W. Mueller-Klieser, *Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology*. Curr Med Chem, 2004. **11**(16): p. 2195-204.
97. Fischer, K., et al., *Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3812-9.
98. Dietl, K., et al., *Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes*. J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1200-9.
99. Gottfried, E., et al., *Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2013-21.
100. Williams-Ashman, H.G., J. Seidenfeld, and P. Galletti, *Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine*. Biochem Pharmacol, 1982. **31**(3): p. 277-88.

101. Seidenfeld, J., J. Wilson, and H.G. Williams-Ashman, *Androgenic regulation of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine concentrations and methylthioadenosine phosphorylase activity in relation to polyamine metabolism of rat prostate*. Biochem Biophys Res Commun, 1980. **95**(4): p. 1861-8.
102. Avila, M.A., et al., *Methylthioadenosine*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(11): p. 2125-30.
103. Christopher, S.A., et al., *Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16(cdkN2a/ARF), acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line*. Cancer Res, 2002. **62**(22): p. 6639-44.
104. Garcia-Castellano, J.M., et al., *Methylthioadenosine phosphorylase gene deletions are common in osteosarcoma*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(3): p. 782-7.
105. Watanabe, F., et al., *Immunohistochemical diagnosis of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) deficiency in non-small cell lung carcinoma*. Lung Cancer, 2009. **63**(1): p. 39-44.
106. Behrmann, I., et al., *Characterization of methylthioadenosin phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma*. Am J Pathol, 2003. **163**(2): p. 683-90.
107. Hori, Y., et al., *The methylthioadenosine phosphorylase gene is frequently co-deleted with the p16INK4a gene in acute type adult T-cell leukemia*. Int J Cancer, 1998. **75**(1): p. 51-6.
108. Subhi, A.L., et al., *Loss of methylthioadenosine phosphorylase and elevated ornithine decarboxylase is common in pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(21): p. 7290-6.
109. Gerner, E.W. and F.L. Meyskens, Jr., *Polyamines and cancer: old molecules, new understanding*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(10): p. 781-92.
110. Subhi, A.L., et al., *Methylthioadenosine phosphorylase regulates ornithine decarboxylase by production of downstream metabolites*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 49868-73.
111. Kamatani, N. and D.A. Carson, *Abnormal regulation of methylthioadenosine and polyamine metabolism in methylthioadenosine phosphorylase-deficient human leukemic cell lines*. Cancer Res, 1980. **40**(11): p. 4178-82.
112. Stevens, A.P., et al., *Direct and tumor microenvironment mediated influences of 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine on tumor progression of malignant melanoma*. J Cell Biochem, 2009. **106**(2): p. 210-9.
113. Wolford, R.W., et al., *Effect of 5'-methylthioadenosine (a naturally occurring nucleoside) on murine hematopoiesis*. Exp Hematol, 1984. **12**(11): p. 867-71.
114. Wolford, R.W., et al., *Effect of 5''-methylthioadenosine and its analogs on murine lymphoid cell proliferation*. Cancer Res, 1981. **41**(8): p. 3035-9.

115. Di Padova, F., et al., *Inhibition of lymphocyte function by a naturally occurring nucleoside: 5'-methylthioadenosine (MTA)*. Int J Immunopharmacol, 1985. **7**(2): p. 193-8.
116. Fredholm, B.B., et al., *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, 1984. **20**(6): p. 511-8.
117. Moreno, B., et al., *Methylthioadenosine reverses brain autoimmune disease*. Ann Neurol, 2006. **60**(3): p. 323-34.
118. Cerri, M.A., et al., *Inhibition of cytokine production and endothelial expression of adhesion antigens by 5'-methylthioadenosine*. Eur J Pharmacol, 1993. **232**(2-3): p. 291-4.
119. Hevia, H., et al., *5'-methylthioadenosine modulates the inflammatory response to endotoxin in mice and in rat hepatocytes*. Hepatology, 2004. **39**(4): p. 1088-98.
120. Peter, K., *Einfluss der Tumormetaboliten 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin und Milchsäure auf humane Monozyten* 2011.
121. Singer, K., *Die immunsuppressive Wirkung von Tumormetaboliten auf humane T-Zellen*. 2010.
122. Cronstein, B.N., *Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent*. J Appl Physiol, 1994. **76**(1): p. 5-13.
123. Hasko, G. and B.N. Cronstein, *Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(1): p. 33-9.
124. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(3): p. 413-92.
125. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(4): p. 527-52.
126. Hasko, G., et al., *Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice*. J Immunol, 1996. **157**(10): p. 4634-40.
127. Mayne, M., et al., *Adenosine A2A receptor activation reduces proinflammatory events and decreases cell death following intracerebral hemorrhage*. Ann Neurol, 2001. **49**(6): p. 727-35.
128. Hasko, G., et al., *Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms*. FASEB J, 2000. **14**(13): p. 2065-74.
129. Link, A.A., et al., *Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes*. J Immunol, 2000. **164**(1): p. 436-42.

130. Naganuma, M., et al., *Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 2765-9.
131. Lappas, C.M., J.M. Rieger, and J. Linden, *A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 1073-80.
132. Butler, J.J., et al., *Adenosine inhibits activation-induced T cell expression of CD2 and CD28 co-stimulatory molecules: role of interleukin-2 and cyclic AMP signaling pathways*. J Cell Biochem, 2003. **89**(5): p. 975-91.
133. Panther, E., et al., *Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells*. Blood, 2003. **101**(10): p. 3985-90.
134. Panther, E., et al., *Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells*. FASEB J, 2001. **15**(11): p. 1963-70.
135. Schnurr, M., et al., *Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells*. Blood, 2004. **103**(4): p. 1391-7.
136. Fossetta, J., et al., *Pharmacological analysis of calcium responses mediated by the human A3 adenosine receptor in monocyte-derived dendritic cells and recombinant cells*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(2): p. 342-50.
137. Munshi, R., A.S. Clanachan, and H.P. Baer, *5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine: a nucleoside which differentiates between adenosine receptor types*. Biochem Pharmacol, 1988. **37**(10): p. 2085-9.
138. Daly, J.W. and W.L. Padgett, *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, 1992. **43**(5): p. 1089-93.
139. Riscoe, M.K., P.A. Tower, and A.J. Ferro, *Mechanism of action of 5'-methylthioadenosine in S49 cells*. Biochem Pharmacol, 1984. **33**(22): p. 3639-43.
140. Christa, L., L. Thuillier, and J.L. Perignon, *5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine inhibition of rat T lymphocyte phosphodiesterase: correlation with inhibition of Con A induced proliferation*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. **113**(2): p. 425-32.
141. Ferro, A.J., A.A. Vandenbark, and M.R. MacDonald, *Inactivation of S-adenosylhomocysteine hydrolase by 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine*. Biochem Biophys Res Commun, 1981. **100**(2): p. 523-31.
142. Veal, N., et al., *Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated TNF-alpha promoter activity by S-adenosylmethionine and 5'-methylthioadenosine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(2): p. G352-62.

143. Ou, X., et al., *Inhibition of human betaine-homocysteine methyltransferase expression by S-adenosylmethionine and methylthioadenosine*. Biochem J, 2007. **401**(1): p. 87-96.
144. Dissanayake, D., et al., *Nuclear factor-kappaB1 controls the functional maturation of dendritic cells and prevents the activation of autoreactive T cells*. Nat Med, 2011. **17**(12): p. 1663-7.
145. Campbell, I.K., et al., *Differentiation of inflammatory dendritic cells is mediated by NF-kappaB1-dependent GM-CSF production in CD4 T cells*. J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5468-77.
146. Shakhov, A.N., et al., *Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages*. J Exp Med, 1990. **171**(1): p. 35-47.
147. Pegg, A.E., *Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy*. Cancer Res, 1988. **48**(4): p. 759-74.
148. Graw, R.G., Jr., et al., *Leukocyte and platelet collection from normal donors with the continuous flow blood cell separator*. Transfusion, 1971. **11**(2): p. 94-101.
149. Johnson, W.D., Jr., B. Mei, and Z.A. Cohn, *The separation, long-term cultivation, and maturation of the human monocyte*. J Exp Med, 1977. **146**(6): p. 1613-26.
150. Sanderson, R.J., et al., *Isolation and enumeration of peripheral blood monocytes*. J Immunol, 1977. **118**(4): p. 1409-14.
151. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
152. Schmid, I., et al., *Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry*. Cytometry, 1992. **13**(2): p. 204-8.
153. Rajewsky, M.F., *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, 1965. **1**(3): p. 281-7.
154. Belich, M.P. and J. Trowsdale, *Proteasome and class I antigen processing and presentation*. Mol Biol Rep, 1995. **21**(1): p. 53-6.
155. Stevens, A.P., et al., *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, 2008. **876**(1): p. 123-8.

156. Riscoe, M.K., et al., *Inhibition of growth but not differentiation of normal and leukemic myeloid cells by methylthioadenosine*. Cancer Res, 1987. **47**(14): p. 3830-4.
157. Di Fiore, P.P., et al., *Inhibition of dimethyl sulfoxide-induced differentiation of Friend erythroleukemic cells by 5'-methylthioadenosine*. Cancer Res, 1984. **44**(9): p. 4096-103.
158. Shafman, T.D., M.L. Sherman, and D.W. Kufe, *Effect of 5'-methylthioadenosine on induction of murine erythroleukemia cell differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **124**(1): p. 172-7.
159. Pinzon-Charry, A., T. Maxwell, and J.A. Lopez, *Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(5): p. 451-61.
160. Almand, B., et al., *Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 678-89.
161. Michielsen, A.J., et al., *Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27944.
162. Perrot, I., et al., *Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2763-9.
163. Bell, D., et al., *In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas*. J Exp Med, 1999. **190**(10): p. 1417-26.
164. Chaux, P., et al., *Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation*. Lab Invest, 1996. **74**(5): p. 975-83.
165. Jia, J., et al., *Morphological characteristics and co-stimulatory molecule (CD80, CD86, CD40) expression in tumor infiltrating dendritic cells in human endometrioid adenocarcinoma*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012. **160**(2): p. 223-7.
166. Nestle, F.O., et al., *Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells*. Am J Pathol, 1997. **150**(2): p. 641-51.
167. Ananiev, J., M.V. Gulubova, and I.M. Manolova, *Prognostic significance of CD83 positive tumor-infiltrating dendritic cells and expression of TGF-beta 1 in human gastric cancer*. Hepatogastroenterology, 2011. **58**(110-111): p. 1834-40.
168. Iwamoto, M., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas*. Int J Cancer, 2003. **104**(1): p. 92-7.

169. Coventry, B.J. and J. Morton, *CD1a-positive infiltrating-dendritic cell density and 5-year survival from human breast cancer*. Br J Cancer, 2003. **89**(3): p. 533-8.
170. Hillenbrand, E.E., A.M. Neville, and B.J. Coventry, *Immunohistochemical localization of CD1a-positive putative dendritic cells in human breast tumours*. Br J Cancer, 1999. **79**(5-6): p. 940-4.
171. Buelens, C., et al., *Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(9): p. 2668-72.
172. Steinbrink, K., et al., *Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4772-80.
173. Beckebaum, S., et al., *Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(21): p. 7260-9.
174. Gabrilovich, D.I., et al., *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells*. Nat Med, 1996. **2**(10): p. 1096-103.
175. Ohm, J.E. and D.P. Carbone, *VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency*. Immunol Res, 2001. **23**(2-3): p. 263-72.
176. Ratta, M., et al., *Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6*. Blood, 2002. **100**(1): p. 230-7.
177. Park, S.J., et al., *IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3844-54.
178. Smith, D.R., et al., *Production of interleukin-10 by human bronchogenic carcinoma*. Am J Pathol, 1994. **145**(1): p. 18-25.
179. Kruger-Krasagakes, S., et al., *Expression of interleukin 10 in human melanoma*. Br J Cancer, 1994. **70**(6): p. 1182-5.
180. Yue, F.Y., et al., *Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules*. Int J Cancer, 1997. **71**(4): p. 630-7.
181. Hattori, E., et al., *Possible contribution of circulating interleukin-10 (IL-10) to anti-tumor immunity and prognosis in patients with unresectable hepatocellular carcinoma*. Hepatol Res, 2003. **27**(4): p. 309-314.
182. Chau, G.Y., et al., *Serum interleukin-10 but not interleukin-6 is related to clinical outcome in patients with resectable hepatocellular carcinoma*. Ann Surg, 2000. **231**(4): p. 552-8.

183. Ikeguchi, M., et al., *Serum interleukin-6 and -10 levels in patients with gastric cancer*. Gastric Cancer, 2009. **12**(2): p. 95-100.
184. Gerlini, G., et al., *Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions*. Am J Pathol, 2004. **165**(6): p. 1853-63.
185. Fortsch, D., M. Rollinghoff, and S. Stenger, *IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 978-87.
186. Avila-Moreno, F., et al., *Lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cell lines use different mediators to induce comparable phenotypic and functional changes in human monocyte-derived dendritic cells*. Cancer Immunol Immunother, 2006. **55**(5): p. 598-611.
187. Macatonia, S.E., et al., *Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5071-9.
188. Curiel, T.J., et al., *Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5535-8.
189. Li, T.W., et al., *Effects of S-adenosylmethionine and methylthioadenosine on inflammation-induced colon cancer in mice*. Carcinogenesis, 2012. **33**(2): p. 427-35.
190. Latasa, M.U., et al., *Oral methylthioadenosine administration attenuates fibrosis and chronic liver disease progression in Mdr2-/- mice*. PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15690.
191. Mowen, K.A., et al., *Arginine methylation of NIP45 modulates cytokine gene expression in effector T lymphocytes*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 559-71.
192. Richard, S., M. Morel, and P. Cleroux, *Arginine methylation regulates IL-2 gene expression: a role for protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5)*. Biochem J, 2005. **388**(Pt 1): p. 379-86.
193. Lan, C.Y., et al., *Biological characteristics of dendritic cells derived from peripheral blood of patients with epithelial ovarian cancer*. Ai Zheng, 2009. **28**(2): p. 132-7.
194. Tourkova, I.L., et al., *Murine prostate cancer inhibits both in vivo and in vitro generation of dendritic cells from bone marrow precursors*. Prostate, 2004. **59**(2): p. 203-13.
195. Gabrilovich, D.I., et al., *Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(3): p. 483-90.
196. Andreu-Perez, P., et al., *Methylthioadenosine (MTA) inhibits melanoma cell proliferation and in vivo tumor growth*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 265.

197. Kirovski, G., et al., *Down-regulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) induces progression of hepatocellular carcinoma via accumulation of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA)*. Am J Pathol, 2011. **178**(3): p. 1145-52.
198. Pegg, A.E., R.T. Borchardt, and J.K. Coward, *Effects of inhibitors of spermidine and spermine synthesis on polyamine concentrations and growth of transformed mouse fibroblasts*. Biochem J, 1981. **194**(1): p. 79-89.
199. Li, T.W., et al., *S-Adenosylmethionine and methylthioadenosine inhibit cellular FLICE inhibitory protein expression and induce apoptosis in colon cancer cells*. Mol Pharmacol, 2009. **76**(1): p. 192-200.
200. Yang, H., et al., *S-adenosylmethionine and its metabolite induce apoptosis in HepG2 cells: Role of protein phosphatase 1 and Bcl-x(S)*. Hepatology, 2004. **40**(1): p. 221-31.
201. Ansorena, E., et al., *S-adenosylmethionine and methylthioadenosine are antiapoptotic in cultured rat hepatocytes but proapoptotic in human hepatoma cells*. Hepatology, 2002. **35**(2): p. 274-80.
202. Basu, I., et al., *A transition state analogue of 5'-methylthioadenosine phosphorylase induces apoptosis in head and neck cancers*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 21477-86.
203. Groettrup, M. and G. Schmidtke, *Selective proteasome inhibitors: modulators of antigen presentation?* Drug Discov Today, 1999. **4**(2): p. 63-71.
204. Tourkova, I.L., et al., *Restoration by IL-15 of MHC class I antigen-processing machinery in human dendritic cells inhibited by tumor-derived gangliosides*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 3045-52.
205. Ogino, T., et al., *Association of tapasin and HLA class I antigen down-regulation in primary maxillary sinus squamous cell carcinoma lesions with reduced survival of patients*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(11): p. 4043-51.
206. Tao, J., et al., *Expression of transporters associated with antigen processing and human leucocyte antigen class I in malignant melanoma and its association with prognostic factors*. Br J Dermatol, 2008. **158**(1): p. 88-94.
207. Han, L.Y., et al., *HLA class I antigen processing machinery component expression and intratumoral T-Cell infiltrate as independent prognostic markers in ovarian carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(11): p. 3372-9.

Danksagung

„Was lange währt wird endlich doch.“ Nach vier Jahren bin ich froh, dass es endlich zu Papier gebracht ist! Aber dies ist natürlich nur mit vielen helfenden Händen so zu schaffen gewesen:

Allen voran möchte ich **Prof. Dr. Reinhard Andreesen** für das Ermöglichen meiner Doktorarbeit in seiner Abteilung danken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich **Prof. Dr. Marina Kreuz** aussprechen, die sich immer ausreichend Zeit nahm um einem beratend zur Seite zu stehen. Eine bessere Betreuung einer medizinischen Doktorarbeit kann ich mir nicht vorstellen! Auch in den stressigsten Zeiten hatte sie immer einen Witz auf Lager, was sich meiner Meinung nach in der guten Stimmung im ganzen Labor widerspiegelt.

Als nächstes möchte ich mich bei allen im Labor ganz herzlich bedanken, ohne deren Hilfe ich wahrscheinlich zwischendurch verzweifelt wäre. Bei **Katrin P.** und **Kaste**, die ich beim Vorstellen so sympathisch fand, dass ich mich für diese Arbeitsgruppe entschied und es nie bereut habe. Die ich wirklich immer mit Fragen traktieren konnte und die sich immer Zeit genommen haben mir zu helfen. Bei der Rafaello-liebenden **Alice**, die immer auf meine Versuche aufgepasst hat, während ich an der Uni war. Bei **Julia W.**, die sich mit meinem Computer besser auskennt als ich und durch die ich gelernt habe, dass Formatieren kein Hexenwerk ist. Bei **Katrin S.**, **Katrin P.** und **Anja**, die meine Arbeit geduldig Korrektur gelesen haben. Und natürlich auch bei Gabi, Sandra, Carol, Julia, Isabel, Hang, Dagmar, Ireen, Chris, Eddy, etc. für eure Anregungen und für die netten Kaffeepausen, die mich meine Laborzeit nicht immer mit Arbeit verbinden ließen.

Des Weiteren danke ich meiner **Familie**, dass sie mich immer unterstützt hat.

Und abschließend natürlich **Fana und Franzi**, die immer an mich geglaubt haben, auch wenn ich es nicht getan habe.

Danke!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich 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 der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den _____

(Bernadette Neueder)