

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

# Der Einfluss von Milchsäure auf humane T-Zellen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sabine Schwartz

2012



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

Der Einfluss von Milchsäure  
auf humane T-Zellen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sabine Schwartz

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Marina Kreutz  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Claus Hellerbrand  
Tag der mündlichen Prüfung: 15. April 2013

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwartz, S., Rothe, G., Hoves, S., Renner, K., Timischl, B., Mackensen, A., Kunz-Schughart, L., Andreesen, R., Krause, S. W., and Kreutz, M. (2007).

**Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T-cells.**

Blood, 109(9):3812-3819.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1 Das Immunsystem . . . . .	11
1.1.1 Die Zellen des Immunsystems . . . . .	12
1.1.2 T-Zellen . . . . .	13
1.2 Strategien des „Immune Escape“ bei Tumoren . . . . .	19
1.3 Tumormetabolismus . . . . .	20
1.3.1 Aminosäuremetabolismus: Arginin und Tryptophan . . . . .	20
1.3.2 Warburg-Effekt . . . . .	22
1.3.3 Laktatentstehung . . . . .	24
1.3.4 Tumor-Metabolismus und Immunsystem . . . . .	25
1.4 Klinische Relevanz des Tumormetabolismus . . . . .	26
1.4.1 Diagnostik: PET . . . . .	26
1.4.2 Neue Therapieansätze . . . . .	27
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>29</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>30</b>
3.1 Materialien . . . . .	30
3.1.1 Geräte . . . . .	30
3.1.2 Verbrauchsmaterialien . . . . .	31
3.1.3 Chemikalien . . . . .	31
3.1.4 Medien und Zusätze . . . . .	31
3.1.5 Antikörper . . . . .	32
3.1.6 Primer . . . . .	32
3.1.7 Testsysteme . . . . .	33
3.2 Methoden . . . . .	33
3.2.1 Gewinnung und Kultur von Zellen . . . . .	33
3.2.2 Reinheitskontrolle in der Durchfluszytometrie . . . . .	37
3.2.3 Proliferationsbestimmung mit $^3\text{H}$ -Thymidin . . . . .	38

3.2.4	Proliferationsbestimmung mit CFSE	39
3.2.5	Bestimmung der Apoptoserate	41
3.2.6	Bestimmung der mRNA-Expression mittels quantitativer Real Time PCR (qRT-PCR)	42
3.2.7	Bestimmung des IL-2 mittels „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)	45
3.2.8	Western Blot	47
3.2.9	Immunhistochemische Färbung	51
3.2.10	Analyse der Laktat-Aufnahme mittels Massenspektrometrie	52
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
4.1	Proliferation von T-Zellen nach Inkubation mit Milchsäure	55
4.1.1	Proliferationsbestimmung mit $^3\text{H}$ -Thymidin	55
4.1.2	Proliferationsbestimmung mit Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)	58
4.2	Apoptoseinduktion durch Milchsäure	61
4.3	Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) zur Bestimmung von IFN $\gamma$ - und IL-2-mRNA	63
4.4	IL-2 von T-Zellen in Zellüberständen nach Inkubation mit Milchsäure	65
4.5	Proliferation in Abhängigkeit von IL-2	67
4.5.1	MNC	68
4.5.2	CD4+ und CD8+ Zellen	69
4.6	MCT-1-Expression	69
4.7	Laktataufnahme in verschiedenen T Zellpopulationen	71
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
5.1	Tumormetabolismus	74
5.2	Einfluss von Milchsäure auf T-Zellen	75
5.2.1	Inhibition der Proliferation verschiedener T-Zellpopulationen durch Milchsäure	75
5.2.2	Induktion von Apoptose durch Milchsäure	76
5.2.3	Suppression der Zytokin-Expression durch Milchsäure	76
5.2.4	Untersuchung des Laktat-Transporters	77
5.2.5	Quantifizierung der Laktataufnahme	78
5.3	Klinische Relevanz durch neue Ansätze in der Therapie	78
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>81</b>

<b>Danksagung</b>	<b>90</b>
-------------------	-----------

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APC	Antigenpräsentierende Zelle („Antigen-presenting Cell“)
APS	Ammoniumpersulfat
ARG	Arginase
3-BrPA	3-Bromopyruvat
BSA	Rinderserumalbumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy DNA
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	zytotoxische T-Lymphozyten-assoziertes Antigen 4
DC	Dendritische Zelle („Dendritic Cell“)
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-gekoppeltes Immunadsorptionsverfahren („Enzyme-linked Immunosorbent Assay“)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszens-aktiviertes Zellsortieren („Fluorescence-activated Cell Sorting“)
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FMISO	18F-Fluoromisonidazol
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor („Granulocyte/Macrophage-colony Stimulating Factor“)
3-HAA	3-Hydroxyanthranilsäure („3-Hydroxy Anthranil Acid“)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIF-1	Hypoxie induzierbarer Faktor 1 („Hypoxia Inducible Factor 1“)
HRP	Meerrettich-Peroxidase („Horseradish Peroxidase“)
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 („Intracellular Adhesion Molecule 1“)
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
KIR-Rezeptor	Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor („Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor“)
LDH	Laktatdehydrogenase
LFA-1	Lymphozytenfunktion assoziiertes Antigen 1 („Lymphocyte-function-associated Antigen-1“)
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetisches Zellsortieren („Magnetic Cell Sorting“)
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor („Macrophage-colony Stimulating Factor“)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („Major Histocompatibility Complex“)
MNC	Mononukleäre Zellen
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Milchsäure
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („Phosphate Buffered Saline“)
PCR	Polymerase Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin

PI	Propidium-Iodid
PMA	Phorbolmyristylacetat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
RNA	Ribonukleinsäure
qRT-PCR	quantitative Echtzeit PCR („quantitative Realtime PCR“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
STBS	Suspension TBS
TAE	Tris-Acetat/EDTA Elektrophorese Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung („Tris Buffered Saline“)
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween („Tris Buffered Saline Tween“)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCGF	T-Zell Wachstumsfaktor („T-Cell Growth Factor“)
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TIL	Tumor-infiltrierende Leukozyten („Tumor-infiltrating Leukocytes“)

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem setzt sich aus einer Vielzahl von Zelltypen zusammen, die alle zueinander in komplexen Wechselwirkungen stehen.

Zu den Aufgaben des Immunsystems gehört es, die Integrität eines Individuums zu wahren und somit Krankheitserreger zu erkennen, zu bekämpfen und zu eliminieren, um einen Schutz vor Eindringlingen von außen zu gewährleisten. Je nach Sitz der Infektion und Art des Krankheitserregers wirken dabei verschiedene Mechanismen des Immunsystems zusammen. Weiterhin ist das Immunsystem für die Immunüberwachung des Körpers im Hinblick auf Tumore zuständig. Durch die Zerstörung von abnormalen Zellen vermittelt es einen Schutz gegen entartete körpereigene Zellen. Voraussetzungen dafür sind die Fähigkeit zur Unterscheidung von „selbst“ und „fremd“, sowie effektive Erkennungsmechanismen, durch die bei erneutem Kontakt ein stärkerer Schutz gewährleistet werden kann.

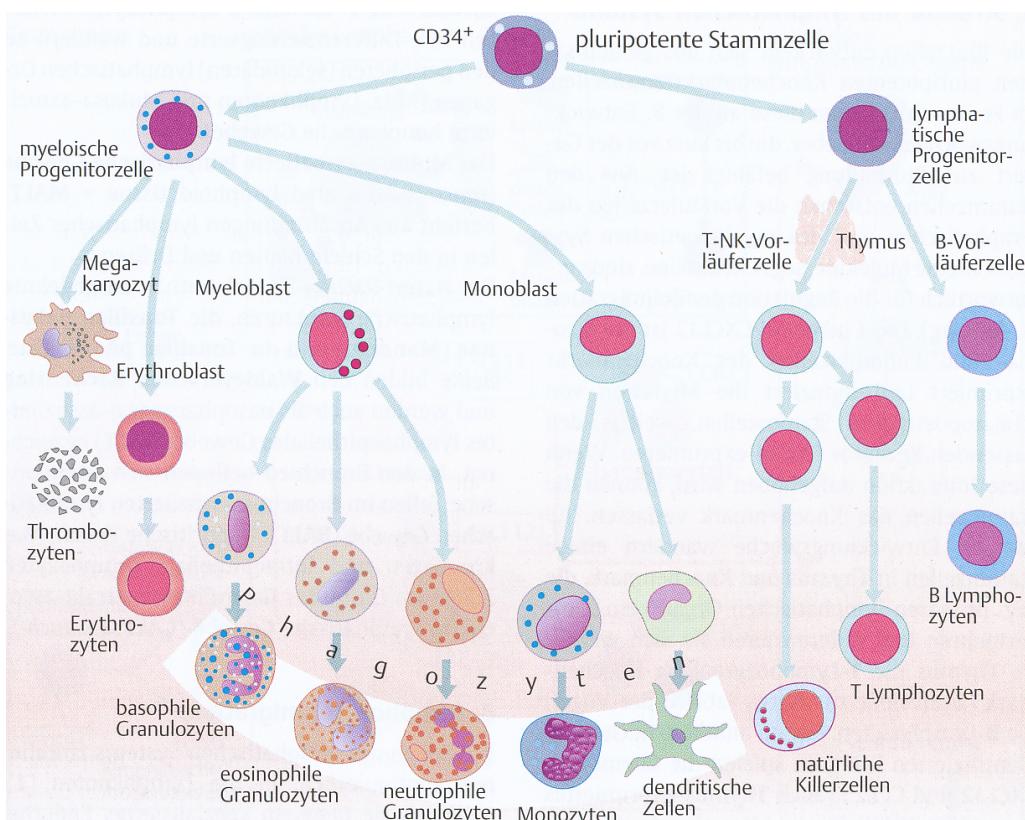
Das Immunsystem besteht aus zwei Grundelementen, der erworbenen und der angeborenen Immunität. Die angeborene Immunität zeichnet sich durch eine Vermittlung der Immunantwort durch einfache, unspezifische Erkennungsmechanismen aus und bildet meist die erste Verteidigungslinie bei einer Infektion. Nachdem ein Erreger die Schutzbarrieren des Körpers durchdrungen hat, wird sie als erstes aktiv und sorgt über phagozytierende Zellen und Granulozyten für die Elimination des Pathogens.

Die zwei Hauptmerkmale der erworbenen Immunantwort sind Spezifität und Gedächtnis, da sie sehr spezifisch auf ein bestimmtes Pathogen gerichtet ist und sich beim Zusammentreffen mit dem gleichen Pathogen verbessert, was als immunologisches Gedächtnis bezeichnet wird. Dadurch kann ein Krankheitsausbruch zu einem späteren Zeitpunkt verhindert oder zumindest eingeschränkt werden.

### 1.1.1 Die Zellen des Immunsystems

Alle immunkompetenten Zellen stammen in ihrer Gesamtheit von einer pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks ab (auch bezeichnet als CD34+ Stammzelle). Die Entwicklung über myeloische Vorläuferzellen führt zu Erythrozyten und Thrombozyten, sowie zu Monozyten und Granulozyten. Monozyten, die ins Gewebe eingewandert sind, differenzieren sich zu Gewebsmakrophagen. Weiterhin entstehen auch dendritische Zellen (DC) als spezialisierte antigenpräsentierende Zellen (APC) aus der myeloischen Progenitorzelle.

Über eine lymphatische Vorläuferzelle entwickeln sich aus der Stammzelle B- und T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), wie in Abb. 1.1 ersichtlich ist.



**Abbildung 1.1: Der Ursprung der Zellen des Immunsystems von einer gemeinsamen Vorläuferzelle (Pezzutto et al., 2006).**

Die angeborene Immunantwort wird zum Großteil durch Monozyten, Makrophagen und Granulozyten vermittelt. Monozyten differenzieren sich zu spezifischen Gewebsmakrophagen und eine ihrer Aufgaben ist es, eindringende Erreger abzufangen. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (Neutrophile, PMN) machen den Hauptbestandteil der Leukozyten im Blut aus. Sie wandern nach einem Stimulus

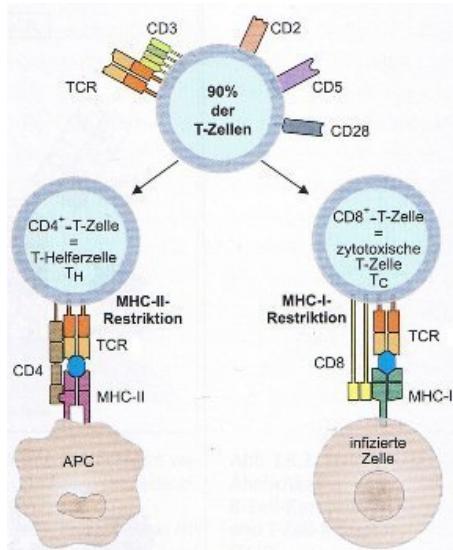
ebenfalls ins Gewebe ein, sind jedoch kurzlebig und sterben ab, nachdem sie einen Partikel aufgenommen und zerstört haben. Natürliche Killerzellen sind neben den spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (auch bezeichnet als CTL) die andere Gruppe zytotoxischer Zellen. Sie besitzen jedoch keine Antigenspezifität. Ihre Aktivierung hängt von der Balance aus inhibitorischen und stimulierenden Signalen der jeweiligen Körperzelle ab. Sie erkennen MHC-Klasse-I-Moleküle, die über KIR-Rezeptoren auf NK-Zellen ein inhibitorisches Signal vermitteln. Bei Herunterregulation oder Fehlen des MHC-I wird keine Hemmung mehr vermittelt und es kommt zur Aktivierung der NK-Zelle. Daraufhin kann die aktivierte NK-Zelle die infizierte Körperzelle oder Tumorzelle durch Ausschüttung zytotoxischer Granula eliminieren (Murphy et al., 2008). NK-Zellen sind vor allem für die Abwehr von intrazellulären Pathogenen entscheidend.

Die Effektorzellen der erworbenen Immunität, ohne die keine Antigen-spezifische Immunabwehr im menschlichen Körper möglich wäre, werden als Lymphozyten bezeichnet und lassen sich nach ihrem Oberflächenrezeptor und ihrer Funktion unterteilen in B- und T-Lymphozyten. B-Zellen tragen auf ihrer Zelloberfläche Immunglobuline (IgM, IgD), über die sie Antigene erkennen. Während ihres Reifungsprozesses im Knochenmark führen sie verschiedene Zellteilungen durch, die als klonale Expansion bezeichnet werden. Als Klone differenzieren sie sich schließlich zu Plasmazellen und produzieren Antikörper, die zusammen mit dem Komplementsystem die humorale Abwehr des Körpers bilden (Murphy et al., 2008).

T-Zellen hingegen sind eine heterogene Gruppe mit verschiedenen Zelltypen und einer Vielzahl an Funktionen. Darunter fallen vor allem Zytotoxizität sowie die Produktion und Sekretion von Faktoren für die Aktivierung und Regulierung anderer T-Zellen. Eine erste Unterteilung lässt sich nach Oberflächenmarkern und Funktion in CD4+ und CD8+ Zellen machen.

### **1.1.2 T-Zellen**

Alle T-Zellen exprimieren den T-Zellrezeptor (TCR), der in Struktur und Funktion dem Immunglobulin der B-Zellen sehr ähnlich ist. Man unterscheidet  $\alpha\beta$ -T-Zellen, bei denen der TCR aus den disulfidgebundenen Polypeptiden  $\alpha$  und  $\beta$  besteht und die den Großteil der T-Zellen ausmachen, von  $\gamma\delta$ -T-Zellen, bei denen der TCR aus den Polypeptiden  $\gamma$  und  $\delta$  aufgebaut ist. Diese kommen nur zu etwa 10% vor. Der TCR ist jeweils mit einem Satz aus fünf Polypeptiden (einer  $\gamma$ -, einer  $\delta$ - und zwei  $\epsilon$ -Ketten, die das CD3-Molekül bilden, sowie der  $\zeta$ -Kette) assoziiert, mit denen er zusammen den T-Zell-Rezeptorkomplex bildet (TCR-CD3-Komplex). T-Zellen stammen wie alle anderen Immunzellen aus dem Knochenmark und machen im



**Abbildung 1.2: Unterteilung differenzierter  $\alpha\beta$ -T-Zellen über Oberflächenmarker** (Modifiziert nach Vollmar und Dingermann, 2005).

Thymus einen Reifungs- und Selektionsprozess durch, wobei sie die Unterscheidung von „selbst“ und „fremd“ lernen, indem durch negative Selektion alle „anti-selbst“ reaktiven Zellen eliminiert werden. Je nachdem ob die Zellen mit schwacher Affinität MHC-I/Peptid-Komplexe oder MHC-II/Peptid-Komplexe binden, entwickeln sie sich zu CD8+ bzw. CD4+ Zellen, was als positive Selektion bezeichnet wird (Vollmar und Dingermann, 2005).

### T-Zellaktivierung und Funktion

Im Unterschied zu B-Zellen, erkennen T-Zellen Antigene ausschließlich, wenn sie ihnen von körpereigenen Zellen präsentiert werden. Diese können von Viren und intrazellulären Bakterien stammen oder von anderen Pathogenen, die von Phagozyten aufgenommen worden sind. Hierzu dienen die Haupthistokompatibilitätskomplex-Proteine („Major-Histocompatibility-Complex Proteins“ (MHC)), die Antigenfragmente über Ankersequenzen in der Bindungstasche des MHC-Moleküls binden und präsentieren. Der TCR erkennt über seine variablen Abschnitte bestimmte Aminosäuresequenzen des Peptid-Fragments sowie auch bestimmte Sequenzen des MHC-Proteins (Murphy et al., 2008). Neben dem TCR bildet jede reife T-Zelle auch einen Korezeptor aus, der für eine MHC-Klasse spezifisch ist. Zellen, die CD4 tragen, erkennen ausschließlich MHC-II-Moleküle, Zellen mit CD8 nur MHC-Moleküle der Klasse I, siehe auch Abb. 1.2. Diese Korezeptoren spielen auch in der Funktion der T-Zellen eine entscheidende Rolle. Peptide, die über MHC-I präsentiert werden, stammen von intrazellulären Erregern wie Viren. Da MHC-I-Moleküle auf jeder kern-

haltigen Zelle des Körpers vorkommen, kann jede Zelle, sobald sie infiziert ist, das jeweilige Antigen auf ihrer Oberfläche präsentieren. Dies wird von aktivierten CD8+ Zellen erkannt und die infizierte Zelle kann durch zytotoxische Substanzen eliminiert werden.

MHC-II-Moleküle sitzen dagegen nur auf spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (APC). Sie binden Peptide, die von phagozytierten Proteinen stammen und werden von CD4+ Zellen erkannt. Die Erkennung führt zu Aktivierung und Zytokinsekretion durch die CD4+ Zellen.

Für die Aktivierung der T-Zellen werden neben dem TCR und den Korezeptoren allerdings noch weitere akzessorische Proteine benötigt. Wichtig dabei sind vor allem Integrine als Adhäsionsmoleküle und kostimulatorische Moleküle. Das Integrin CD2 auf T-Lymphozyten bindet an seinen Liganden CD58 auf APC und kann dadurch einen ersten Zell-Zell-Kontakt herstellen. Ein weiteres Integrin, Lymphocyte-function-associated antigen-1 (LFA-1), auf T-Lymphozyten erkennt das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) auf APC und kann die Bindung der Zellen stabilisieren, da der TCR-Komplex mit sehr niedriger Affinität an MHC-Peptid-Komplexe bindet (Vollmar und Dingermann, 2005). Um eine Aktivierung der T-Zellen zu erzeugen, muss die Bindung jedoch über einen genügend langen Zeitraum aufrecht erhalten werden. Daher sezernieren die APC nach Kontakt mit Erregern Chemokine, die an Rezeptoren auf T-Zellen binden. LFA-1 wird dadurch in sehr kurzer Zeit hochaffin und der Lymphozyt kann fest an die APC binden. Außerdem wird die Affinität des LFA-1 auch durch die Antigenerkennung des TCR erhöht und ein fester und dauernder Kontakt kann hergestellt werden (Vollmar und Dingermann, 2005). Diese Interaktionen zwischen den Zellen werden auch als „Immunologische Synapse“ bezeichnet.

Für die Aktivierung der T-Zellen werden 2 stimulierende Signale benötigt. Das erste Signal wird durch die Antigenerkennung über den TCR vermittelt. Das zweite Signal kommt von kostimulatorischen Molekülen auf APC, die CD80 und CD86 Moleküle nach Erregerkontakt verstärkt exprimieren. Diese werden von CD28 auf T-Lymphozyten erkannt, woraufhin eine Aktivierungskaskade in Gang gesetzt wird. Ein weiteres essentielles kostimulatorisches Molekül auf APC ist CD40, welches vom CD40-Liganden (CD40-L) auf T-Zellen erkannt wird. Hierdurch wird jedoch nicht der Lymphozyt aktiviert, sondern die APC selber, die dadurch die Expression von CD80 und CD86 und die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-12, die für die Differenzierung der T-Zellen entscheidend sind, noch erhöht. Die APC wird dadurch also zu einer noch „besseren“ antigenpräsentierenden Zelle (Vollmar und Dingermann, 2005).

CD8+ Zellen, die Antigene auf MHC-I-Komplexen aller körpereigener Zellen ohne kostimulatorische Moleküle erkennen, benötigen für ihre Aktivierung CD4-Helfer-Zellen. Wenn diese ihrerseits aktiviert sind, setzen sie Zytokine, insbesondere IL-2, frei, die dann für die zusätzliche Aktivierung der CTL sorgen.

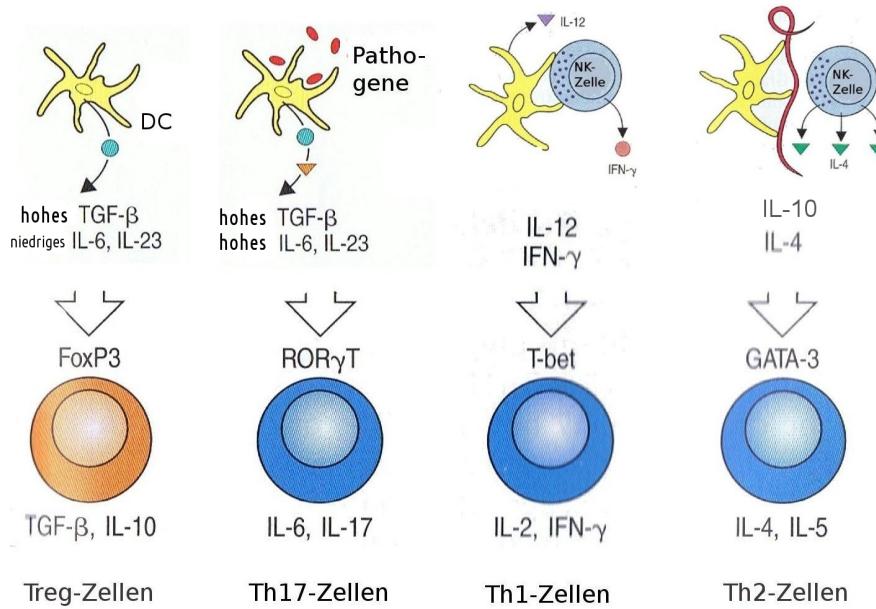
Nach ihrer Aktivierung durch Antigen und Kostimulation werden von den T-Lymphozyten verschiedene Zytokine mit unterschiedlichen Funktionen sezerniert, die in der Immunantwort essentiell sind. Eine entscheidende Rolle dabei spielt z.B. IL-2, das mit als erstes der Zytokine produziert und ausgeschüttet wird. Naive T-Zellen besitzen einen niedrig-affinen IL-2-Rezeptor, der aus 2 Untereinheiten ( $\beta\gamma$ ) zusammengesetzt ist. Nach ihrer Aktivierung exprimieren sie zusätzlich eine dritte Untereinheit ( $\alpha$ -Kette), die sich mit den beiden anderen zu einem hochaffinen Rezeptor zusammenlagert. Die autokrine Wirkung des sezernierten IL-2 führt zur klonalen Expansion der Zellen, die sich daraufhin zu unterschiedlichen Effektorzellen differenzieren (Vollmar und Dingermann, 2005).

### **CD4+ Zellen**

CD4+ T-Lymphozyten können sich funktionell in vier verschiedene Zelltypen differenzieren. Die Differenzierung ist abhängig vom Zytokinmilieu, das auf die Zellen einwirkt. Nach Kontakt mit IL-12, das von APC als Reaktion auf die Aufnahme von Viren oder intrazellulären Bakterien freigesetzt wird, differenzieren sich die  $T_H0$ -Zellen zu  $T_H1$ -Zellen (Vollmar und Dingermann, 2005). Sezernieren APC IL-10, erfolgt die Differenzierung zu  $T_H2$ -Zellen. Unter dem Einfluss von hohen Spiegeln IL-6, IL-23 und „Transforming growth factor  $\beta$ “ (TGF $\beta$ ), das von DCs in der Frühphase der Infektion gebildet wird, entstehen  $T_H17$ -Zellen. In der Abwesenheit einer Infektion produzieren DCs kaum IL-6 und IL-23, jedoch hohe Spiegel an TGF $\beta$  und IL-10, woraufhin sich die naiven  $T_H$ -Zellen zu regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) entwickeln (Murphy et al., 2008), siehe auch Abb. 1.3.

**T-Helferzellen**  $T_H1$ -Zellen setzen Faktoren wie Interleukin-2 (IL-2), Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor  $\beta$  (TNF $\beta$ ) und Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) frei und aktivieren so Makrophagen. Damit wird eine ausgeprägte Entzündungsreaktion und eine zelluläre Immunantwort gegen intrazelluläre Erreger induziert (Vollmar und Dingermann, 2005).

$T_H2$ -Zellen sind dagegen verantwortlich für die Ausschüttung von Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5) und anderen Interleukinen und stimulieren dadurch B-Zellen zur Produktion von Antikörpern. Sie binden durch ihren CD40-L an CD40 der B-Zellen und induzieren dadurch deren Proliferation. Außerdem werden durch ihren



**Abbildung 1.3: CD4+ Zell-Differenzierung unter Einfluss verschiedener Zytokine** (Modifiziert nach Murphy et al., 2008).

Einfluss vermehrt IgE- und IgM-Antikörper produziert und IL-5 regt seinerseits eosinophile Granulozyten an, zwei Mechanismen, die für die Parasitenabwehr von großer Bedeutung sind (Vollmar und Dingermann, 2005).

$T_{H17}$  wirken vor allem durch Ausschüttung von IL-17 und vermitteln das Auftreten sowie die Aufrechterhaltung von Autoimmunkrankheiten und Gewebsverletzungen im Rahmen einer Entzündungsreaktion. Gehemmt werden sie durch  $T_{H1}$ -Zellen (Steinman, 2007).

**Regulatorische T-Zellen** Regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) bilden die vierte Untergruppe innerhalb der CD4+-Population. Sie sind verantwortlich für die Immunhomöostase und verhindern ein Überschießen der Immunreaktion. Sie exprimieren neben CD4 konstitutiv auch CD25 (die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors), im Gegensatz zu T-Helferzellen, die nur im aktivierte Zustand CD25 ausbilden. Außerdem werden CD103 ( $\alpha_E$ -Integrin) und CTLA-4 (CD152) von ihnen exprimiert. CTLA-4 ist ein inhibitorischer Rezeptor, der dem kostimulatorischen CD28-Rezeptor verwandt ist (Murphy et al., 2008) und ist für die hemmende Funktion von regulatorischen T-Zellen essentiell (Rudd, 2009). Von diesen Oberflächenmarkern ist jedoch keiner spezifisch für die Population der  $T_{reg}$ .

Innerhalb dieser Population kann man noch die Untergruppen der induzierten und der natürlichen regulatorischen T-Zellen unterscheiden. Die letztere Subpopu-

lation entsteht im Thymus. Die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 ist für natürliche T<sub>regs</sub> spezifisch und entscheidend für ihre Entstehung. T<sub>reg</sub> werden über den TCR hauptsächlich über Autoantigene aktiviert, zeigen jedoch nur eine geringe proliferative Aktivität und schütten hemmende Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) und TGF $\beta$  aus. Eine weitere Subpopulation von T<sub>regs</sub> wird aus dem zirkulatorischen Pool der naiven CD4+ Zellen induziert (Murphy et al., 2008).

### **CD8+ Zellen**

Die andere Hauptgruppe innerhalb der T-Zellpopulation bilden die CD8-positiven T-Zellen (zytotoxische T-Lymphozyten, CTL). Sie sind die Effektorzellen, wenn es um die Induktion von Zelltod bei einer Infektion oder einem Tumor geht.

CD8+ Zellen erkennen MHC-I-Peptid-Komplexe auf infizierten oder entarteten Zellen. Die Zellen werden daraufhin stimuliert und binden fest über Integrine an die Membran der Zielzelle. Für die Aktivierung der CD8+ Zelle sind jedoch mehr kostimulatorische Signale notwendig, als für die Aktivierung der CD4+ Zellen, wahrscheinlich weil diese Zellen aufgrund ihrer lytischen und zytotoxischen Fähigkeiten potentiell eine Gefahr für den Organismus darstellen. In den meisten Fällen kommen diese kostimulatorischen Signale von CD4+ Zellen (Murphy et al., 2008). Die Helferzellen erkennen das von APC auf MHC-II präsentierte Peptid und werden zur Ausschüttung von IL-2 angeregt. Dieses erreicht die CD8+ Zelle, die das Peptid auf MHC-I auf derselben APC erkannt hat. Die CD8+ Zelle wird dadurch selber zur Ausschüttung von autokrin-aktivem IL-2 stimuliert, welches ihre Differenzierung bewirkt. Die Bindung des CD40-Liganden der CD4+ Zelle an das CD40-Molekül der APC regt diese an, weitere B7-Moleküle (CD80 und CD86) auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. B7 kann über den CD28-Rezeptor der CD8+ Zelle diese dann ebenfalls kostimulieren (Murphy et al., 2008).

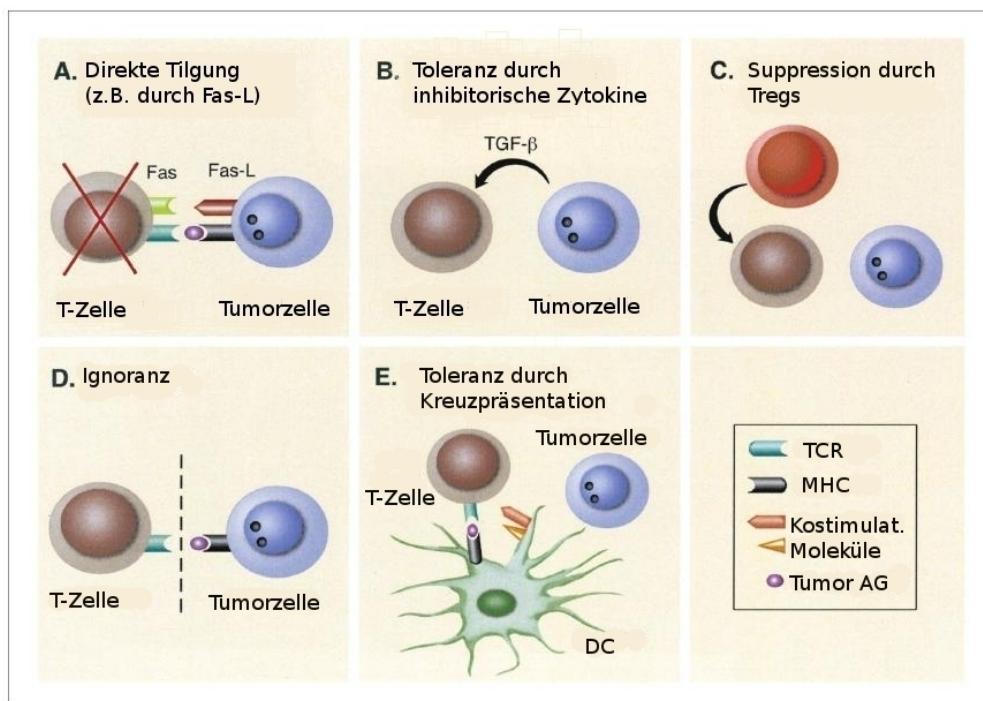
Als differenzierte zytotoxische T-Zelle wird die CD8+ Zelle zur Ausschüttung von Perforinen und Granzymen angeregt, die zu einer Durchlöcherung der Zellmembran und zur Apoptose der Zielzelle führen. Außerdem ist eine Tötung der Zielzelle durch den Fas-Liganden(CD95-L), ein Membranprotein der CTL, möglich. Er bindet an Fas (CD95), den Todesrezeptor von Körperzellen und führt über die Induktion von Caspasen in der Zelle zu deren Apoptose (Vollmar und Dingermann, 2005). Dadurch bilden die CD8+ Lymphozyten auch ein wichtiges Mittel für die Erkennung und Abwehr von entarteten Zellen.

Die Ausschüttung von IFN $\gamma$  durch die CTL führt zur Aktivierung von Makrophagen, die die Zellreste nach der Apoptose beseitigen.

## 1.2 Strategien des „Immune Escape“ bei Tumoren

Zytotoxische T-Zellen sind also potenziell in der Lage, jede abnormale Zelle des Körpers zu erkennen und zu eliminieren, was als „Immune Surveillance“ bezeichnet wird. Trotzdem leiden Patienten unter den verschiedensten Arten von malignen Neoplasien.

Tumore müssen also Strategien entwickelt haben sich der Immunabwehr des Körpers zu entziehen, die auch als „Immune Escape“ Mechanismen bezeichnet werden (siehe auch Abb. 1.4).



**Abbildung 1.4:** „Immune escape“ Mechanismen der Tumore (Modifiziert nach Mapara 2004).

Zu diesen Strategien zählen u.a. die

- Eliminierung der T-Zelle z.B. durch Fas-L auf Tumorzellen (A) (Mapara, 2004).
- Inhibition einer funktionierenden Immunantwort durch Produktion von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$  durch die Tumorzellen (B) (Shurin, 2006).
- Hemmung der Immunantwort durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen durch die Tumorzellen mittels IL-10 und TGF- $\beta$  (C) (Lamprecht, 2008).

- Ignoranz durch fehlende Expression von immunmodulatorischen Molekülen, die zur Erkennung durch CTL wichtig sind, wie z.B. MHC-Moleküle auf Tumorzellen (D) (Demanet, 2004; Mapara, 2004).
- Toleranzinduktion gegenüber Tumorzellen durch APC (E) (Mapara, 2004).

## 1.3 Tumormetabolismus

Neben den aufgeführten immunmodulatorischen Strategien nimmt auch der Metabolismus der Tumorzellen sowie das herrschende Milieu im Inneren des Tumors Einfluss auf die Immunantwort, die dadurch abgeschwächt bzw. zum Erliegen gebracht werden kann.

### 1.3.1 Aminosäuremetabolismus: Arginin und Tryptophan

#### Arginin

Ein Beispiel hierfür ist die Depletion sowie der Metabolismus der Aminosäure Arginin im Tumormilieu. Arginin ist für den Menschen eine bedingt-essentielle Aminosäure, d.h. der Körper braucht nur in Extremsituationen wie bei Schwangerschaft, Infektion oder Trauma eine Zufuhr von außen. Für schnell expandierende T-Zellen ist sie jedoch essentiell (Bronte und Zanovello, 2005).

Der Stoffwechsel der Aminosäure erfolgt über die beiden Enzyme Arginase (ARG), die Arginin in die beiden Produkte Ornithin und Harnstoff spaltet, und NO-Synthase, die daraus NO und Citrullin bildet. Beide Enzyme werden entweder einzeln oder in Kombination von myeloiden Suppressorzellen exprimiert (Bronte und Zanovello, 2005). Myeloide Suppressorzellen akkumulieren im Tumormilieu und bewirken dort eine Arginin-Depletion durch Hochregulierung der ARG (Bronte und Zanovello, 2005). Hierdurch wird die Reexpression der  $\zeta$ -Kette des TCR verhindert und die T-Lymphozyten somit unschädlich gemacht. Dies stellt einen weiteren Mechanismus des Tumor-„Immune-Escape“ dar. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass auch eine TCR-unabhängige Hemmung der T-Zellen durch ARG existiert. Eine Hochregulation der ARG in myeloiden Suppressorzellen konnte die T-Zellen auch dann supprimieren, wenn diese mit einem polyklonalen Stimulus wie PMA stimuliert sind, der den T-Zellrezeptor umgeht (Munder et al., 2006).

Es gibt jedoch auch Hinweise, dass die Tumorzellen selbst die Ursache der Arginin-Depletion sein können (Bronte et al., 2005). Auch für das Wachstum der Tumorzellen ist Arginin eine essentielle Aminosäure (Scott et al., 2000). Cheng et al. konnten zeigen, dass Arginindepletion über zugeführte Arginase zu einer Remission

bei Hepatozellulärem Karzinom (HCC) führte (Cheng et al., 2005). T-Zellen konkurrieren also sowohl mit myeloiden Suppressorzellen im Tumormilieu als auch mit den Tumorzellen selber um das für alle Zelltypen lebenswichtige Arginin.

Jedoch werden die T-Lymphozyten auch durch die Metaboliten des Arginin in Proliferation und Funktion beeinflusst. NO ist ein Hemmstoff für die Phosphorylierung von Signal-Proteinen und verhindert somit die Expression des IL-2-Rezeptors. Darüberhinaus beeinflusst NO die Stabilität der IL-2-mRNA und verhindert die Ausschüttung von IL-2 durch aktivierte Lymphozyten (Bronte und Zanovello, 2005). Die gleichzeitige Aktivierung beider Enzyme, Arginase und NO-Synthase, führt zur Suppression der CD3 $\zeta$ -Kette und letztendlich zur T-Zell-Apoptose (Bronte und Zanovello, 2005) über die Bildung von Superoxiden ( $O_2^-$ ), Peroxynitriten (ONOO $^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (Schmielau und Finn, 2001). Eine hohe Produktion von NO im Tumormilieu wurde bereits für mehrere maligne Neoplasien beschrieben und könnte der Grund für Metastasen, Chemotherapie-Resistenz und Tumor-bedingte Immunsuppression sein (Bogdan, 2001).

## **Tryptophan**

Auch über den Metabolismus der Aminosäure Tryptophan wird das Immunsystem beeinflusst und reguliert. Tryptophan wird über das Enzym Indolamin-2,3-Dioxigenase (IDO), ein zytosolisches Enzym, verstoffwechselt. Der Mechanismus der Immunregulation ist dem des Arginin-Stoffwechsels sehr ähnlich und bewirkt ebenfalls durch Depletion der Aminosäure eine Hemmung der Proliferation von T-Zellen (Uyttenhove et al., 2003). T-Lymphozyten werden in ihrem Wachstum gehemmt, da ihr Zellzyklus einen Tryptophan-sensitiven „Checkpunkt“ aufweist, der das Wachstum in der G<sub>1</sub>-Phase blockiert, wenn der Tryptophan-Spiegel unter ein bestimmtes Niveau fällt.

Daneben bewirken auch einige Tryptophan-Stoffwechselprodukte die Apoptose von T-Zellen (Uyttenhove et al., 2003). Unter den Metaboliten spielt 3-Hydroxyanthranilsäure (3-HAA) eine zentrale Rolle in der Hemmung der T-Zellen (Weber et al., 2006), die in ihrem Zellzyklus arretiert werden (Uyttenhove et al., 2003). Fallarino et al. konnten darüberhinaus auch die Induktion von CD4+/CD25+ regulatorischen T-Zellen durch den Metaboliten 3-HAA nachweisen (Fallarino et al., 2006). T<sub>regs</sub> ihrerseits wirken wiederum hemmend auf die Immunantwort, wie oben beschrieben. Gleichzeitig wird der TCR der Effektor-T-Zellen herunterreguliert, was zu einer weiteren Hemmung der Immunantwort führt (Fallarino et al., 2006). Umgekehrt wirken auch bereits differenzierte T<sub>regs</sub> auf den Tryptophanmetabolismus von mononukleären Zellen im peripheren Blut ein. Durch die Bindung ihres Rezeptors

CTLA-4 an B7 Moleküle auf mononukleären Zellen wird bei diesen die Ausschüttung von IFN $\gamma$  induziert, das wiederum eine Hochregulierung der IDO bewirkt (Boasso et al., 2005).

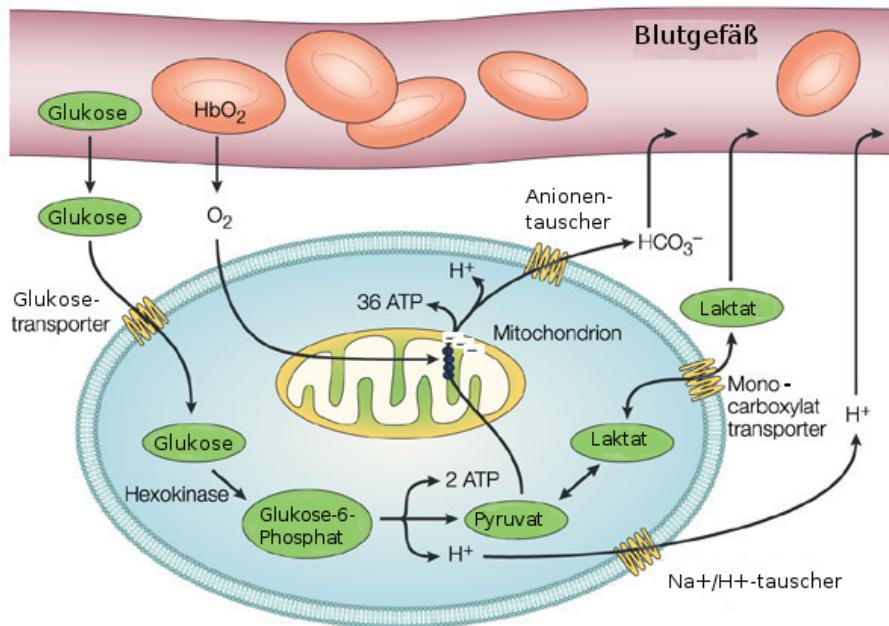
Der Tumormetabolismus hat somit ganz entscheidende Auswirkungen auf die Funktion des Immunsystems. Allerdings beeinflussen neben dem Aminosäurestoffwechsel auch Metaboliten des Glukosestoffwechsels die Immunantwort.

### 1.3.2 Warburg-Effekt

Bereits 1924 postulierte Otto Warburg die aerobe Glykolyse der Tumorzellen (Warburg et al., 1924), nach ihm als „Warburg-Effekt“ benannt. Warburg konnte zeigen, dass die Tumorzellen im Gegensatz zu normalen Körperzellen auch bei aeroben Bedingungen ihre Energie aus der Glykolyse gewinnen. Gatenby und Gillies zeigten 2004, dass die Hochregulierung der Glykolyse in entstehenden Tumoren Teil eines Evolutionsprozesses auf somatischer Ebene ist: glykolytisch hoch aktive Zellen werden selektioniert, da sie einen Wachstumsvorteil besitzen (Gatenby und Gillies, 2004). Die Entstehung des glykolytischen Phänotyps wird auf die Entstehung von Malignomen im hypoxischen Milieu zurückgeführt, wenn die entartenden Zellen durch eine intakte Basalmembran weitgehend von der Blutversorgung abgeschnitten sind. Die durch Milchsäure als Stoffwechselprodukt entstehende saure Umgebung verschafft ihnen im Gegensatz zu den Körperzellen einen Selektionsvorteil, was ihre weitere Ausbreitung ermöglicht: das entstandene Mikromilieu ist für andere Zellen toxisch, die Tumorzellen selbst sind jedoch nach klonaler Selektion inzwischen resistent gegenüber saurem pH. Invasives Wachstum, Zersetzung der extrazellulären Matrix sowie die Angiogenese werden dadurch erleichtert (Gatenby und Gillies, 2004).

Tumorzellen unter hypoxischen Bedingungen exprimieren den „Hypoxia inducible factor 1“ (HIF-1), welcher verschiedenste Zielgene, u.a. Glykolyse-Gene hochreguliert (Pouyssegur, 2006; Tennant et al., 2010). Auch der onkogene Transkriptionsfaktor MYC hat verschiedene wichtige Effekte auf den Tumorzellmetabolismus. Im Zusammenspiel mit HIF aktiviert er u.a. diverse Transporter und Enzyme der Glykolyse (Cairns et al., 2011).

HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor und kann eine Vielzahl von Tumor-assoziierten Genen induzieren, weshalb eine hohe aerobe Glykolyse mit der Tumorgenese in Zusammenhang steht (Gatenby und Gillies, 2004). Die Stabilisierung des HIF-1 durch Hypoxie oder durch genetische Mutationen bzw. Transformation hat daher eine Überexpression von Proteinen zur Folge, die mit Neoangiogenese, Metastasen, Glykolyse und Resistenz gegen Apoptose assoziiert sind (Koukourakis et al., 2003).



**Abbildung 1.5: Der Glukose Metabolismus in Körperzellen:** Glukose wird aus dem Blutstrom über Transportproteine (GLUT) in die Zelle aufgenommen, durch das Enzym Hexokinase in Glukose-6-Phosphat überführt und schließlich in 2 Moleküle Pyruvat gespalten. Dabei werden 2 Moleküle ATP freigesetzt. In Anwesenheit von Sauerstoff kann Pyruvat in den Mitochondrien weiter abgebaut werden. Die Zelle gewinnt dabei weitere 36 Moleküle ATP. Falls die Atmungskette in den Mitochondrien aufgrund von Sauerstoffmangel nicht zur Verfügung steht, wird Pyruvat zu Laktat umgewandelt, das über den Monocarboxylattransporter (MCT) aus der Zelle geschleust wird (Modifiziert nach Gatenby und Gillies, 2004).

Zusätzlich werden durch Hypoxie im Tumormilieu Glukosetransportproteine wie GLUT1 und glykolytische Enzyme wie die Laktatdehydrogenase (LDH) verstärkt exprimiert (Walenta und Mueller-Klieser, 2004). Dadurch, dass u.a. die Expression der LDH direkt der Regulation von HIF-1 unterliegt, kann der Tumor den glykolytischen Stoffwechsel weiter erhöhen (Koukourakis et al., 2003; Gatenby und Gillies, 2004). Niedrige Laktatspiegel im Tumor korrelieren mit einem längeren Überleben sowie mit kompletter Remission (Walenta und Mueller-Klieser, 2004). Umgekehrt konnte auch eine Korrelation von hohen Laktatspiegeln im Serum von Tumorpatienten mit einer hohen Tumorlast festgestellt werden (Fischer et al., 2007). Der Gehalt an Laktat im soliden Tumor spiegelt daher den Grad der Malignität der Neoplasie wieder.

### 1.3.3 Laktatentstehung

Bei der Glykolyse wird ein Molekül Glukose in einer Serie von enzymkatalysierten Reaktionen zu 2 Molekülen Pyruvat abgebaut, einer 3-Kohlenstoffverbindung (Nelson und Cox, 2001). Der Nettogewinn der Zelle besteht dabei pro Molekül Glukose in 2 Molekülen ATP. Wenn Pyruvat nicht in Mitochondrien unter Anwesenheit von Sauerstoff vollständig zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  oxidiert wird, wird es über die Laktatdehydrogenase (LDH) zu Laktat reduziert. Durch die Reduktion von Pyruvat zu Laktat entsteht wieder  $\text{NAD}^+$ , das dann wieder für die Fortsetzung der Glykolyse zur Verfügung steht (Nelson und Cox, 2001). Die entstandene Milchsäure dissoziiert dabei sofort in ein Laktatanion und ein Proton ( $\text{La}^- + \text{H}^+$ ). Physiologisch kommen Konzentrationen von Laktat von 0,5 mM nach Fasten bis 5 mM nach körperlicher Betätigung im Gewebe vor. Mit seinem Redox-Partner Pyruvat steht Laktat in einem Gleichgewicht, wobei das Verhältnis mit 9:1 auf der Seite von Laktat liegt (Veech, 1991).

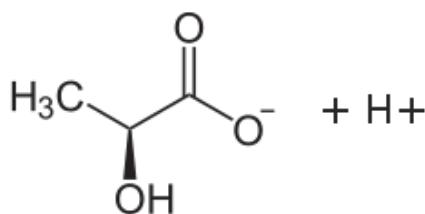


Abbildung 1.6: Strukturformel der Milchsäure

Unter physiologischen Bedingungen ist die Glykolyse durch die Aufrechterhaltung eines konstanten ATP-Spiegels streng reguliert. Die Geschwindigkeit des Stoffwechselweges wird durch zwei Schlüsselenzyme, Phosphofructokinase-1 und Pyruvakinase, an die jeweiligen Erfordernisse angepasst. In Tumoren gerät jedoch der Abbau von Glukose außer Kontrolle. Die Verstoffwechslung von Glukose in der Glykolyse verläuft dort etwa 10x schneller als im gesunden Gewebe (Nelson und Cox, 2001).

Für den Transport von Milchsäure bzw. Laktat über die Zellmembran stehen spezialisierte Transporter zur Verfügung, Monocarboxylate Transporter (MCT) (Gladden, 2004). Der Kotransport von Laktatanion und Proton ist gradientenabhängig und energieneutral.

### 1.3.4 Tumor-Metabolismus und Immunsystem

Im Tumormilieu reichert sich durch die hohe Glykolyserate Laktat an und es kommt durch den Kotransport von Laktat und Proton zur Ansäuerung des Tumorgewebes. Ein niedriger extrazellulärer pH allein hat bereits sehr große Auswirkungen auf die Immunfunktion. So konnte gezeigt werden (Lardner, 2001), dass ein saurer pH toxisch für Lymphozyten ist, die Zellbeweglichkeit herabgesetzt und die Toxizität von CTLs herabmindert. Auch eine herabgesetzte Funktion der Killerzellen und eine abgeschwächte Funktion von IL-2-stimulierten Lymphozyten bei niedrigem pH wurde festgestellt (Kellum et al., 2004).

Na-Laktat wirkt auch auf die Produktion von Zytokinen, wie Roth et al. anhand der IL-2-Produktion und -mRNA-Expression in vitro in Maus-T-Lymphozyten zeigen konnten (Roth und Dröge, 1991). So wiesen sie nach, dass hohe Mengen Laktat (bis zu 30 mM) eine Induktion der Produktion von IL-2 und der Expression der mRNA bewirkten. Der Mechanismus ist noch nicht vollständig erforscht, jedoch konnte eine pH-Änderung als Ursache ausgeschlossen werden, denn Natrium-Laktat bewirkt im Gegensatz zur Milchsäure keine Änderung des pH-Werts. Erst kürzlich konnten Mendler et al. nachweisen, dass eine Laktatazidose, wie sie in den meisten soliden Tumoren vorkommt, zytotoxische T-Lymphozyten in der Effektorphase komplett hemmt, indem sie sowohl die Zytokinproduktion als auch die Exozytose lytischer Granula inhibiert. Eine Neutralisierung des pH führte auch in Anwesenheit von Natriumlaktat zu einer erneuten Aufhebung der Inhibition (Mendler et al., 2012).

T-Lymphozyten nehmen Milchsäure bzw. Laktat über den Transporter für organische Anionen MCT-1 auf, wie Sommer et al. 1994 erstmalig beweisen konnten (Sommer et al., 1994). Es zeigte sich, dass die Aufnahme von Laktat dabei auch ganz entscheidend vom Stimulierungsgrad der Lymphozyten abhängt. Stimulierte Zellen nahmen um ein Vielfaches mehr Laktat auf als unstimulierte Zellen, die kaum eine Aufnahme zeigten (Sommer et al., 1994).

Die Hochregulation des Transporters für Laktat hängt wahrscheinlich mit der gesteigerten Glykolyse der T-Zellen nach Aktivierung zusammen und dient eigentlich dem Abtransport des gebildeten Laktats der T-Zelle. Da der Transport aber abhängig vom Laktat-Gradienten ist, führt eine hohe exogen zugegebene Menge an Laktat zum Influx in die T-Zelle. T-Zellen sind während ihrer Aktivierung auf aerobe Glykolyse angewiesen und eine Inhibition des MCT-1 in Lymphozyten führt daher zu einer Hemmung der Immunantwort, wie Murray et al. in ihrer Studie zeigen konnten (Murray et al., 2005). Dies beruht darauf, dass gebildetes Laktat nicht mehr an den interzellulären Raum abgegeben werden kann.

Wahrscheinlich sind aber weder der pH alleine noch das Laktatanion für alle inhibitorischen Effekte verantwortlich. Wie unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte, wird sowohl die Aktivierung von Monozyten als auch die Differenzierung von DC in Anwesenheit von Milchsäure, d.h. Proton und Laktatanion gehemmt (Gottfried et al., 2006; Dietl et al., 2010). In dieser Arbeit wurden daher die Effekte von Milchsäure auf T-Zellen näher untersucht.

## 1.4 Klinische Relevanz des Tumormetabolismus

### 1.4.1 Diagnostik: PET

Der verstärkte Glukosemetabolismus der Tumorzelle wird in der Tumordiagnostik verwendet. Hierbei wird mittels  $^{18}\text{F}$ Fluordeoxyglukose (FdG) die Stoffwechselaktivität der Gewebe in der Positronen Emissionstomographie (PET) sichtbar gemacht.

Durch die PET konnte gezeigt werden, dass nahezu alle primären Tumoren und Metastasen eine signifikant erhöhte Glukoseaufnahme haben. Die Sensitivität und Spezifität lagen bei den meisten Neoplasien bei 90% (Gambhir et al., 2001). Neben dem Nachweis des Primärtumors spielt die PET auch beim Staging eine wichtige Rolle bzw. kann Metastasen detektieren.

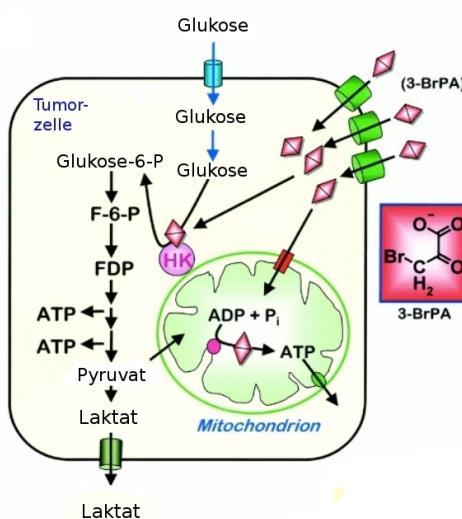
So nimmt die PET als diagnostischer und prognostischer Parameter eine immer wichtigere Rolle ein. Haioun et al. konnten zeigen, dass ein positiver PET-Befund in der „early PET“, durchgeführt nach 2 Zyklen Induktionschemotherapie bei aggressiven Lymphomen, mit einem schlechten Ausgang korreliert (Haioun et al., 2005). Eine negative „early PET“ entspricht dagegen einer sehr guten Prognose. Durch dieses prognostische Werkzeug kann in Zukunft die Therapie individueller angepasst werden. Patienten, die früh auf die Therapie reagieren, bleiben zu toxische Therapieregimes erspart, während Patienten, die kein Therapieansprechen zeigen, einer aggressiveren Therapie zugeführt werden können.

Ott et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Veränderungen im Tumormetabolismus während der Chemotherapie das Ergebnis und ein erneutes Auftreten prognostizieren konnten (Ott et al., 2006). Veränderungen im Tumorstoffwechsel waren dabei der einzige Faktor, der in der Lage war, einen Rückfall vorherzusagen. Genauso konnte durch wiederholte FDG-PET für Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome eine akkurate Vorhersage für das Therapieergebnis getroffen werden (Cerfolio et al., 2004). Die PET konnte durch den Vergleich von FMISO als Marker für Hypoxie und FDG als Marker für Glukosestoffwechsel in Tumoren außerdem beweisen, dass lokale Hypoxie und veränderter Glukosestoffwechsel nicht unbedingt miteinander korrelieren (Rajendran et al., 2003; Saga et al., 2009).

### 1.4.2 Neue Therapieansätze

Diese Erkenntnisse über den Tumorglukosemetabolismus eröffnen nicht nur neue Perspektiven für Diagnostik und Prognose, sondern auch für neue Therapieansätze. So konnte gezeigt werden, dass „dietary energy restriction“ der Tumorigenese entgegenwirkt, wohingegen übermäßige Kalorienaufnahme die Entstehung von Malignomen begünstigt (Zhu et al., 2005). Als möglicher Inhibitor der Glykolyse in Tumorzellen wurde 2-Deoxyglukose identifiziert, ein Inhibitor der Hexokinase II, des Schlüsselenzyms der Glykolyse, wodurch eine Energierestriktion im Tumor erzeugt wird (Zhu et al., 2005). Diese Energierestriktion führt zu Stressreaktionen der Tumorzellen, die auf Glukose als Energieträger angewiesen sind. Dieser zelluläre Stress macht sie auch anfälliger gegenüber Radiotherapie und hat synergistische Effekte mit verschiedenen Chemotherapeutika (Aghaee et al., 2012).

Auch 3-Bromopyruvat (3-BrPA) stellte sich als zuverlässiger Inhibitor der Hexokinase II heraus, mit dem eine effektive Hemmung der Glykolyse in Tumorzellen erreicht werden kann (Xu et al., 2005; Geschwind et al., 2002). Dadurch, dass die Hexokinase II vor allem in maligne entarteten Zellen extrem hoch exprimiert wird, da diese für ihren Energiegewinn auf die Glykolyse angewiesen sind, wird eine tumorspezifische Therapie denkbar.



**Abbildung 1.7: Inhibition der Glykolyse durch 3-Bromopyruvat.** 3-BrPA, das dem Pyruvat strukturell ähnelt, wird über Transporter in die Zelle aufgenommen und hemmt die Hexokinase, die den entscheidenden ersten Schritt in der Glykolyse katalysiert (Modifiziert nach Geschwind et al., 2002).

Dass dieser neue Ansatz auch bei fortgeschrittenen Tumoren erfolgreich ist, konnte bereits in einem Tiermodell bewiesen werden. Ko et al. waren in der Lage durch die Applikation von 3-Bromopyruvat alle 19 behandelten Ratten mit etablierten Tumoren zu heilen. Keines der Tiere zeigte auch nach über 7 Monaten ein erneutes Auftreten eines Tumors (Ko et al., 2004).

Von Zhang et al. konnte gezeigt werden, dass ein neu entwickeltes Molekül, Pyropheophorbide 2-Deoxyglucosamide, über den GLUT-Transporter in Tumorzellen aufgenommen, verstoffwechselt wird und sich dort anreichert, da der Tumorglukosemetabolismus den der normalen Körperzellen bei weitem übersteigt (Zhang et al., 2003). Nach Bestrahlung der Moleküle mit Laserlicht wurden die Zellen zerstört, während Zellen, die nicht bestrahlt wurden und Zellen, die bestrahlt wurden, das Molekül jedoch nicht aufgenommen hatten, verschont blieben. Durch den extrem erhöhten Glukosestoffwechsel der Neoplasien könnte so also ein tumorspezifischer Therapieansatz etabliert werden.

Bereits beschrieben ist auch die Positherapie, ein weiterer neuartiger Therapieansatz, dem der erhöhte Glukosemetabolismus der Tumorzellen zugrundeliegt. <sup>18</sup>F-2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glukose (FDG), das in der PET schon etabliert ist, wird über GLUT in erhöhtem Maße in die Tumorzellen aufgenommen, kann dort jedoch nicht weiterverstoffwechselt werden und ist somit gefangen. FDG gibt Positronen, das positiv geladene Äquivalent zu Elektronen, ab, die das umliegende Gewebe zerstören, wenn sie ihre kinetische Energie abgeben. Genau wie Elektronen töten sie also Tumorzellen ab. Im Tiermodell konnte dadurch bereits eine signifikante Verlängerung des Überlebens sowie eine deutliche Verlangsamung des Tumorwachstums erreicht werden (Moadel et al., 2005).

Durch diese neuen Therapieansätze, die auf den spezifischen Stoffwechsel der Malignome abzielen, werden in Zukunft neue Regimes denkbar, die alleine oder in Kombination mit Standard-Chemotherapien bessere Heilungschancen ermöglichen.

# Kapitel 2

## Zielsetzung

Aufgrund der großen klinischen Bedeutung des Glukosestoffwechsels in verschiedenen Tumoren und der engen Zusammenhänge zwischen Metabolismus und Immunsystem sollten in dieser Arbeit die Effekte von Milchsäure auf die Aktivierung von verschiedenen T-Zell-Populationen erforscht werden.

Unsere Annahme bestand darin, dass die hohe Produktion von Milchsäure durch Tumorzellen das Immunsystem supprimiert, so dass eine adäquate Immunantwort nicht mehr möglich ist.

Um dies zu überprüfen sollten verschiedene Aktivierungs-Parameter von T-Zellen untersucht werden: Proliferationsbestimmungen, Bestimmung der Zytokinexpression sowie Bestimmung der Zytokinsekretion. Außerdem sollte die Apoptoserate und die Transporterexpression und Laktataufnahme analysiert werden.

# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte

Autoklav	Walter, Geislingen
Beta-Counter	Berthold, Oakville, Kanada
Brutschränke	Heraeus, Osterode
Durchflusszytometer	Becton-Dickinson, USA
Durchflusszytometer	Beckman-Coulter, Krefeld
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader	MWG-Biotech, Ebersberg
Entwicklungsanlage	Agfa, Köln
LightCycler	Roche, Mannheim
Mikroskope	Leitz, Heidelberg
PCR-Thermocycler (Modell PTC-200)	MJ-Research/Biometra
Sterilbank (Lamin Air: HA 2472)	Heraeus, Osterode
Wallac Betaplate Counter	PerkinElmer, Gaithersburg, USA
Wallac Harvester	PerkinElmer, Gaithersburg, USA
Wasserbäder	Julabo, Seelstadt
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen: Elutriator, Avanti J-20XP	Beckman Coulter, USA
MegaFuge 3,0 R	Heraeus, Osterode
Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Kapillarelektrophorese HP3D-CE	Agilent Technologies, Palo Alto
Massenspektrometer MicrOTOF Focus	Bruker Daltonics, Bremen
CASY	Schärfe System, Reutlingen

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturplatten (6, 12, 24 Wells)	Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten (96 Wells)	Greiner, Nürtingen
Einmalpipetten	Costar, Cambridge, USA
Zentrifugenrörchen (15, 50, 225 ml)	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäß (0.5, 1.5, 2.0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Polystyrolrörchen für Durchflusszytometrie	Falcon, Heidelberg
Röntgenfilme (ECL)	Amersham, Braunschweig
Kryoröhrchen	Nunc, Naperville
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
PVDF Transfermembran	Millipore, Eschborn

### 3.1.3 Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt:  
Sigma (Deisenhofen)/ Merck (Darmstadt)

### 3.1.4 Medien und Zusätze

RPMI 1640-Medium	Gibco, Karlsruhe
humane AB-Serum	PAN-Biotech, Aidenbach
L-Glutamin (2 mM)	Gibco, Karlsruhe
MEM „Non-essential Amino Acids“	Gibco, Karlsruhe
MEM „Vitamins“ (1x)	Gibco, Karlsruhe
Natriumpyruvat (1 mM)	Gibco, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (100 U/ml)	Gibco, Karlsruhe
Mercaptoethanol (50 µM)	Gibco, Karlsruhe
T-Zell-stimulierender Faktor	Gewinnung aus Überständen
Ficoll/ Hypaque	Pharmacia, Berlin
Phosphate-Buffered-Solution (PBS)	Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco, Karlsruhe

### 3.1.5 Antikörper

#### Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
CD3 FITC	HIT3a	IgG2a	BD, Heidelberg
CD3 PE	SK7	IgG1	BD, Heidelberg
CD4 FITC	SK3	IgG1	BD, Heidelberg
CD8 FITC	SK1	IgG1	BD, Heidelberg
CD8 APC	RPA-T8	IgG1	Pharmingen, Heidelberg
CD14 FITC	My4	IgG2b	Coulter, Krefeld
CD20 FITC	B9E9	IgG2a	Immunotech, Krefeld
CD25 APC	2A3	IgG1	BD, Heidelberg
CD45 FITC	2D1	IgG1	BD, Heidelberg
CD45 PE	HI30	IgG1	Caltag, Hamburg
CD45 APC	HI30	IgG1	Caltag, Hamburg
IgGI FITC	X40	IgG1	BD, Heidelberg
IgGI PE	X40	IgG1	BD, Heidelberg
IgGI APC	ICIGG 1	IgG1	Caltag, Hamburg
IgG FITC	polyklonal		BD, Heidelberg
Annexin-V FITC			BD, Heidelberg

#### Zellstimulation

CD3	OKT-3	IgG2a	Cilag
CD28	L293	IgG1	BD, Heidelberg

#### Western Blot

$\beta$ -Aktin	polyklonal	Kaninchen	Sigma/A, Taufkirchen
MCT-1	polyklonal	Ziege	abcam, Cambridge, UK
Anti-rabbit + HRP	polyklonal	Ziege	DAKO, Glostrup, Dänemark
Anti-goat + HRP	polyklonal	Kaninchen	DAKO, Glostrup, Dänemark

### 3.1.6 Primer

IL-2:

Sense: 5' - CTCACCAGGATGCTCACATT - 3'

Antisense: 5' - TCCAGAGGTTGAGTTCTTCTTCT - 3'

IFN- $\gamma$ :

Sense: 5 - CTAATTATTCCGTAAC TGACTTGA - 3

Antisense: 5 - ACAGTTCAGCCATCACTTGGA - 3

18S:

Sense: 5 - ACCGATTGGATGGTTAGTGAG - 3

Antisense: 5 - CCTACGGAAACCTTGTACGAC - 3

### 3.1.7 Testsysteme

QuantiTect SYBR green	Qiagen, Hilden
Reverse Transkriptase SuperSkript II	Invitrogen, Karlsruhe
RNeasy mini Kit	Qiagen, Hilden
Taq PCR-mix	Promega, Madison, USA
Quantikine Human IL-2 Immunoassay	R&D Systems, Wiesbaden
ECL-Western Blotting Detection Reagents	Amersham
Kaleidoscope Prestained Standards	Biorad, CA, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Gewinnung und Kultur von Zellen

#### Medien und Zusätze

Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % humanem AB-Serum kultiviert.

Als Standardzusätze wurden zu 500 ml folgende Substanzen zugegeben:

- 5ml L-Glutamin (2 mM)
- 5ml MEM „Non Essential Amino Acids“ (1x)
- 2ml MEM „Vitamins“ (1x)
- 5ml Natriumpyruvat (1 mM)
- 2,5ml Penicillin-Streptomycin (100 U/ml)
- 1ml Mercaptoethanol (50  $\mu$ M in PBS)

Für die T-Zellkultur wurde ein T-Zell-stimulierender Faktor (T-cell growth factor, TCGF), der u.a. auch IL-2 enthält, nach ausgetester Konzentration verdünnt hinzugegeben, um die Zellen zur Proliferation zu stimulieren. Die Präparation erfolgte

wie zuvor beschrieben (Mackensen et al., 1994). Es wurden 2 ml TCGF zu 48 ml Medium gegeben. Um das T-Zellstimulationsmedium (im Weiteren bezeichnet als T-Zellmedium) zu erhalten, wurden von dieser Lösung 16 ml abgenommen und zu 32 ml Medium hinzugegeben.

### **Gewinnung von mononukleären Zellen (MNC) durch Dichtegradientenzentrifugation**

Mittels Leukapherese wurden einem gesunden Spender Leukozyten entnommen. Von diesen wurden mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation die MNC isoliert und von restlichen Erythrozyten abgetrennt. Dazu wurde je 15 ml Ficoll/Hypaque in 50-ml-Tubes pipettiert und mit 25 ml einer mit PBS 1:2 verdünnten Zellsuspension überschichtet. Die Zellen wurden jetzt 30 min bei 20 °C und 700 g ohne Bremse zentrifugiert. Die Röhrchen wiesen 4 Schichten auf: Blutplasma, MNC, Ficoll und zuunterst Erythrozyten sowie Granulozyten. Die Schicht der MNC wurde vorsichtig abgenommen und 3x mit 200 ml PBS gewaschen. Hierbei erfolgte die Zentrifugation bei 4 °C und 300 g 8 Minuten. Das Zellpellet wurde vorsichtig gelöst und die Zellen in Standardmedium suspendiert.

### **Bestimmung der Zellzahl**

Benötigte Materialien:

Neubauer-Zählkammer

Trypanblau-Lösung: 0,1 % Trypanblau in  
0,9 % NaCl

Von der Zellsuspension wurden 50  $\mu$ l entnommen, mit Trypanblau angefärbt und verdünnt. Jetzt konnte die Zellzahl der lebenden Zellen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Lebendige Zellen erschienen im Lichtmikroskop hell, während sich tote Zellen dunkel anfärbten. Es wurden jeweils 2 Großquadrate der Zählkammer ausgezählt und über folgende Formel die Zellzahl pro ml berechnet:

$$X \times V \times \text{Vol.} \times 0,01/2 = N \times 10^6$$

X: gezählte, lebende Zellen pro Quadrat

V: Verdünnungsfaktor

Vol.: Volumen der Suspension

N: Zellzahl der Suspension

## Einfrieren von Zellen

Dazu wurden die folgenden Lösungen benötigt:

- Standardmedium (50 %)
- Fötale Kälberserum (FCS) (40 %)
- DMSO (30 %)

MNC, welche nicht sofort in Versuche eingesetzt wurden, wurden bei -80 °C eingefroren und konnten so gelagert werden. Hierzu wurden pro Kryoröhrchen  $100 \times 10^6$  Zellen in 700  $\mu\text{l}$  Standardmedium aufgenommen, auf Eis in die Röhrchen transferiert und die Suspension mit jeweils 560  $\mu\text{l}$  FCS sowie 140  $\mu\text{l}$  DMSO aufgefüllt. Die Zellen wurden daraufhin bei -80 °C eingefroren.

## Auftauen der Zellen

Die tiefgefrorenen Kryoröhrchen wurden in der Hand angewärmt bis das Medium gerade geschmolzen war. Die Zellen wurden dann sofort in 15-20 ml vorgewärmtes Medium suspendiert, bei 400 g 8 min gewaschen und wieder in 15 ml T-Zellmedium aufgenommen. Im Anschluss erfolgte das Zählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer mit Hilfe von Trypanblau.

## Gewinnung von CD4+ und CD8+ Zellen durch Magnetic Cell Sorting (MACS)

Folgende Materialien kamen hier zum Einsatz:

- MACS Separator
- MACS LS Columns
- MACS CD4+ oder CD8+ T Cell Biotin Antibody Cocktail
- MACS Anti-Biotin Microbeads (Alle Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach)
- Waschpuffer: 0,3723 g EDTA gelöst in 50 ml 5 %iger BSA-Lösung + 450 ml PBS und steril filtriert (Porengröße des Filters: 0,2  $\mu\text{m}$ )

Eingesetzt wurden frische MNC direkt nach Aufreinigung durch Ficoll bzw. aufgetaute MNC. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zum Einsatz kamen jeweils  $100 \times 10^6$  bis  $200 \times 10^6$  Zellen.

Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers mittels Negativselektion. Die Zellen wurden mit dem Waschpuffer 8 min bei 400 g gewaschen und der Puffer abgegossen. Das Zellpellet wurde in 40  $\mu$ l Puffer pro  $10^7$  Zellen resuspendiert. Es wurden 10  $\mu$ l Biotin-Antibody Cocktail pro  $10^7$  Zellen zugegeben. Die Suspension wurde gut gemixt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. 30  $\mu$ l Puffer und 20  $\mu$ l Anti-Biotin Microbeads wurden pro  $10^7$  Zellen zugegeben und nach dem Mischen für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 15-20 ml Puffer gewaschen und bei 300 g 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und verworfen. Bis zu  $10^8$  Zellen wurden in 500  $\mu$ l Puffer resuspendiert. Jetzt wurde die MACS LS Säule im Separator angebracht und mit 3 ml Puffer gespült. Die Zell-Suspension wurde auf die Säule gegeben und die unmarkierten CD4+ bzw. CD8+ Zellen in einem 50-ml-Tube aufgefangen. Die Säule wurde 3x mit 3 ml Puffer gewaschen bis die letzten unmarkierten Zellen herausgelöst waren. Die Säule wurde jetzt aus dem Magnetfeld genommen und die magnetisch markierten Zellen, die die Fraktion der Positivselektion darstellten, mit 6 ml Puffer herausgelöst. Diese Zellen entsprachen der nicht-CD8+ Fraktion (im Nachfolgenden als CD8- Fraktion bezeichnet). In gleicher Weise wurde bei den nicht-CD4+ Zellen (entsprechen CD4-) Zellen verfahren. Von jeder Fraktion wurde die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Gereinigte und in Kultur stimulierte Melan-A-spezifische CD8+ zytotoxische T-Zellen (CTLs) wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Mackensen für verschiedene Versuche zur Verfügung gestellt. Die Zellen waren über mehrere Wochen expandiert und durch Dendritische Zellen und Melan-A stimuliert worden. Außerdem wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Edinger CD4+/25+ Zellen sowie CD4+/25- Zellen zur Verfügung gestellt. Die CD25+ Fraktion stellt einen kleinen Teil der CD4+ Zellen dar und wird auch als regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) bezeichnet. Die CD25- Zellen bezeichnen den restlichen Teilbereich der CD4+ Zellen. Die Zellen waren ebenfalls über einige Wochen in Kultur expandiert worden.

## Zellkultur

Die Kultur der Zellen, soweit nicht anders angegeben, erfolgte in 96-Well-Rundbohlenplatten. Benötigte Lösung:

- OKT-3: 1  $\mu$ g/ml
- antiCD28-AK: 1  $\mu$ g/ml
- Milchsäure (Sigma)

- Laktat (Sigma)

Um die Antikörper-Lösung (im Folgenden als „coating-solution“ bezeichnet) zu erhalten, mit der die Platten beschichtet werden sollten, um die Zellen zum Wachstum anzuregen, wurde je ein  $\mu\text{l}$  der OKT-3 sowie der antiCD28-AK zu einem ml PBS zugegeben.

Am Tag vorher wurden die Wells für die zu stimulierenden Zellen mit je 200  $\mu\text{l}$  der „coating-solution“ befüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Lösung abgezogen und die wells mit je 200  $\mu\text{l}$  PBS 2x gewaschen. Dann wurden pro well 78.000 Zellen in 250  $\mu\text{l}$  T-Zell-Medium eingesetzt, das je nach Ansatz 10 mmol oder 20 mmol Milchsäure enthält. Der Kontrollansatz wurde naiv belassen. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C bei 5 % CO<sub>2</sub> je nach Versuchsansatz einige Tage bebrütet, anschließend geerntet und in den Versuch eingesetzt.

### 3.2.2 Reinheitskontrolle in der Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie werden Zellen aufgrund ihrer Oberflächenproteine charakterisiert. Um die Reinheit der CD8+ und der CD4+ Fraktionen zu bestimmen, wurde im Anschluss an die Auf trennung mit MACS-Beads eine Untersuchung mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Als Kontrollen wurden jeweils ein Teil der gesamten MNCs sowie der nicht-CD8+ Fraktion bzw. der nicht-CD4+ Fraktion gefärbt. Die Oberflächenproteine der Zellen lassen sich mit farbstoffkonjugierten Antikörpern darstellen, in diesem Fall wurde als Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein-isothiozyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) verwendet.

Folgende Materialien wurden hierfür benötigt:

- Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (FACScan, FACS Calibur, beide Beckton Dickinson)
- FACS-Waschpuffer: 300 mg Sandoglobulin (0,6 mg/ml, Sandoz AG)
- 0,5g Natriumazid (0,1 %) in 500 ml PBS gelöst
- Fixierlösung (pH 7,0/NaOH): 1 g Paraformaldehyd (PFA, 1 %) in 100 ml PBS unter leichtem Erwärmen gelöst

Von jeder Fraktion (CD8+, CD8-, MNC bzw. CD4+, CD4-, MNC) wurden  $3 \times 10^6$  Zellen 6 min bei 1400 Umdrehungen abzentrifugiert, das Medium wurde verworfen und die Zellen 3x mit jeweils 3 ml FACS-Waschpuffer gewaschen. Vor dem 3. Waschvorgang wurden die Zellen einer Fraktion auf 6 FACS-Röhrchen aufgeteilt. Es wurden so jeweils  $0,5 \times 10^6$  Zellen gefärbt. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem

spezifischen Antikörper 30 min bei 4 °C inkubiert. Jeweils 10  $\mu$ l des Antikörpers wurden auf das gelöste Zellpellet gegeben; von dem CD14 Antikörper wurden nur 5  $\mu$ l benötigt, von dem CD20 Antikörper 20  $\mu$ l. Zum Einsatz kamen folgende Maus-anti-Mensch Antikörper:

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
Isotyp	polyklonal	IgG gesamt	BD
CD3	HIT3a	IgG2a	BD
CD4	SK3	IgG1	BD
CD8	SK1	IgG1	BD
CD14	My4	IgG2b	Coulter
CD20	B9E9	IgG2a	Immunotech

Im Anschluss wurden die Zellen 2x mit FACS-Waschpuffer gewaschen und in jeweils 300  $\mu$ l PFA aufgenommen. Jetzt konnten sie ca. eine Woche im Kühlschrank lichtgeschützt bis zur Messung gelagert werden, ohne an Fluoreszenz zu verlieren. Für die Messung in der Durchflusszytometrie wurden die Zellen suspendiert, pro Analyse wurden vom Gerät 10.000 Zellen ausgezählt. Die Zellen laufen in der Suspension durch eine dünne Kapillare, auf die ein Laserstrahl gerichtet ist, der von einem Detektor aufgefangen und in elektrische Signale konvertiert wird. So wird die Intensität des durch die Fluoreszenz emittierten Lichts bestimmt und kann als Maß für die Antigenexpression der Zelle gewertet werden. Das Ergebnis wird grafisch sowohl als Dotblot als auch als Kurve dargestellt und bezieht neben der Fluoreszenz auch die Granularität und die Größe der Zelle mit ein, da sich diese auf die Lichtstreuung auswirken und im „forward-scatter“ und „side-scatter“ wiedergegeben werden. In der Auswertung wurde der Anteil von nicht-CD4 Zellen in der CD4+ Fraktion bestimmt, um eine hohe Reinheit in den nachfolgenden Experimenten sicherzustellen. Zum Vergleich wurden auch die Fraktionen der nicht-CD4 Zellen und der MNCs ausgewertet. Gleiches galt natürlich ebenfalls für die CD8+ Zellen.

### 3.2.3 Proliferationsbestimmung mit $^3$ H-Thymidin

Benötigte Materialien:

- $^3$ H-Thymidin 1  $\mu$ l pro well, 1:10 verdünnt in T-Zellmedium (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)
- Szintillations-Flüssigkeit 50  $\mu$ l pro Well

- IL-2

Eingesetzt wurden native CD4+ und CD8+ Zellen nach Auftrennung durch MACS-Beads und Kultivierung für einige Tage in T-Zellmedium. Ein Teil der Zellen wurde in mit AK-beschichteten Wells inkubiert. In späteren Versuchen wurde außerdem getestet ob der Zusatz von IL-2 in der Lage ist, die Zellen vor Apoptose zu retten, die bei Kultivierung mit 20 mM Milchsäure auftritt. Dabei wurden 300 U/ml IL-2 zu der Zellkultur gegeben.

Außerdem wurden mit freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Edinger CD25+ und CD25- Zellen zur Verfügung gestellt. Die CD25+ Zellen stellen eine kleine Gruppe der CD4+ T-Helferzellen dar und werden auch als regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) bezeichnet. Die CD25- Zellen bezeichnen den restlichen Teilbereich der CD4+ Zellen. 10  $\mu$ l der verdünnten radioaktiven  $^3$ H-Thymidin-Lösung wurden pro well zu den Zellen gegeben und nochmals bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten geerntet. Dafür wurde der Zellharvester 2x gewaschen. Daraufhin konnten die Platten eingesetzt werden. Das Gerät besitzt 96 Pipetten spitzen, die mit Hilfe einer Pumpe die Wells aussaugen und in eine entsprechende Filterplatte transferieren. Im Anschluss wurden die Wells drei Mal gewaschen um die restliche Radioaktivität in den Filter zu überführen.

Die Filterplatten wurden im Brutschrank getrocknet und von unten mit Folie beklebt, um ein Auslaufen der Flüssigkeit zu verhindern. Jetzt wurde pro Well 50  $\mu$ l Szintillations-Flüssigkeit dazugegeben, die Platten wurden auch von oben mit Folie abgedeckt und in das  $\beta$ -Szintillationsmessgerät eingebracht. Das Gerät misst die Radioaktivität der einzelnen Filter, die den Vertiefungen einer Platte entsprechen und gibt sie in Zerfälle pro Minute (cpm) wieder.

### 3.2.4 Proliferationsbestimmung mit CFSE

#### Zellkultur

Benötigte Materialien:

- PBS
- PBS/10 % FCS
- „Färbelösung“: 4  $\mu$ l CFSE (5 mM) (Fluka, Buchs, Schweiz) in 5 ml PBS gelöst
- Phytohämagglutinin (PHA) (Sigma)

Die Zellen für diese Versuchsanordnung wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Mackensen zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um CD8+

zytotoxische T-Zellen (CTL), die gesammelt, über mehrere Wochen kultiviert und durch Dendritische Zellen und Melan-A stimuliert worden waren.

Die Zellen wurden aus den Rundbodenplatten geerntet und das Medium wurde abzentrifugiert. Daraufhin wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und gezählt. Pro 10 Mio. Zellen wurde dann 1 ml PBS auf das Pellet gegeben und 500000 Zellen wurden in ein 15-ml-Tube (Falcon) transferiert, abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen. Man setzte daraufhin die Färbelösung im Dunkeln an, da CFSE lichtempfindlich ist und sonst zerfallen würde. Dabei gab man  $4\mu\text{l}$  des 5-millimolaren CFSE zu 5 ml PBS. Um die Zellen zu färben, wurden  $500\mu\text{l}$  der Färbelösung und  $500\mu\text{l}$  PBS auf das Pellet gegeben und 4 min im Dunkeln inkubiert. Danach wusch man die Zellen sofort mit 12 ml PBS/10% FCS im ersten Schritt und mit Standardmedium im zweiten Schritt. Dann wurden die Zellen gezählt und auf 4 Ansätze aufgeteilt. Diese beinhalteten eine Negativkontrolle ohne Zusatz von Milchsäure, sowie die Ansätze, die 5 mM, 10 mM und 20 mM Milchsäure beinhalteten. Pro Ansatz wurden 5 Wells einer 96-well-Rundbodenplatte mit je 78000 Zellen in  $250\mu\text{l}$  T-Zellmedium befüllt. An den Messtagen wurde pro Ansatz ein Well geerntet und im FACS analysiert. Am Tag nach Versuchsbeginn wurde das erste Well mittels Durchflusszytometrie als Kontrolle gemessen. Die restlichen Ansätze wurden mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert, um die Proliferation anzuregen. PHA stellt einen starken, unspezifischen Stimulus für T-Zellen dar und spricht alle T-Zellen unabhängig vom T-Zell-Rezeptor an. PHA-L hat hohe mitogene und Leukozyten-agglutinierende Eigenschaften.

Pro Well und  $100\mu\text{l}$  gab man  $100\mu\text{g}$  PHA-L zu den Zellen. Hier befanden sich  $250\mu\text{l}$  im Well, das entsprach  $250\mu\text{g}$  PHA-L. Dazu wurden  $5\mu\text{l}$  der PHA-L Stocklösung zu  $125\mu\text{l}$  T-Zellmedium gegeben, von dieser Lösung gab man  $5\mu\text{l}$  zu jedem der Wells. Die Zellen wurden weiterhin im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  bebrütet. Am Tag 2 nach Versuchsbeginn wurde das PHA-L weggewaschen: Man nahm  $74,4\mu\text{l}$  des Mediums aus jedem Well ab und ersetzte es durch neues T-Zellmedium bzw. durch T-Zellmedium, das 5, 10 oder 20 mM Milchsäure enthielt. Bis zur Messung inkubierte man die Zellen weiterhin im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ .

### **Messung in der Durchflusszytometrie**

Benötigtes Material:

- FACS-Calibur
- CD25-Antikörper (APC)

- PBS
- FACS-Röhrchen

Für die FACS-Färbung erntete man von jedem Ansatz 1 well ab und überführte die Zellen in ein FACS-Röhrchen. Man wusch die Zellen mit PBS und gab danach  $2\mu\text{l}$  CD25-AK (APC) auf das Pellet, das man 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wusch man die Zellen erneut und löste dann das Pellet in  $200\mu\text{l}$  PBS. Am Tag 1 wurden außer den mit CFSE-gefärbten Ansätzen auch einen Ansatz mit ungefärbten Zellen als Negativkontrolle mitgemessen. Das Durchflusszytometer maß nun im Kanal 3 das CFSE und im Kanal 7 die mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbten CD25+ Zellen und gab das Ergebnis graphisch als Kurve aus. Die restlichen Wells wurden an den Tagen 3, 5, 6 und 8 nach Versuchsbeginn mit Antikörpern gefärbt und gemessen.

### 3.2.5 Bestimmung der Apoptoserate

#### Zellkultur

Aus MNCs aus der Aufreinigung nach Ficoll wurden mit Hilfe der MACS-Beads CD4+ und CD8+ Zellen herausgefiltert und in den Versuch eingesetzt. Es konnten auch wieder CD25+ und CD25- Zellen eingesetzt werden, die ich erneut freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Edinger bekommen habe. Pro Zellart sollte die Apoptoserate bei einer Milchsäurekonzentration von 10 mM und 20 mM sowie bei einer Negativkontrolle bestimmt werden. Pro Ansatz wurden 3 „gecoatete“ Wells einer 96-Well-Rundbodenplatte mit 78000 Zellen in  $225\mu\text{l}$  befüllt. Diese wurden vorerst ohne Milchsäure im Brutschrank inkubiert. Am Tag 4 wurden  $25\mu\text{l}$  der entsprechenden Milchsäureverdünnung zugegeben und die Zellen erneut im Brutschrank bebrütet.

#### Messung in der Durchflusszytometrie

Benötigtes Material:

- FACS-Calibur
- FACS-Röhrchen
- Je  $150\mu\text{l}$  Annexin V Puffer (BD)
- Je  $5\mu\text{l}$  Annexin V FITC (BD)
- Je  $1,5\mu\text{l}$  PI (Calbiochem)

Am Tag 5 wurden die Zellen in FACS-Röhrchen geerntet, zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Man gab den Annexin V Puffer dazu, addierte anschließend das Annexin V und inkubierte die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur. Man gab das PI zu den Zellen und führte sofort die Messung durch! Dabei wurde Annexin im 3. Kanal und PI im 5. Kanal gemessen. Das Ergebnis wurde als Dotplot und als Kurve ausgegeben.

### 3.2.6 Bestimmung der mRNA-Expression mittels quantitativer Real Time PCR (qRT-PCR)

#### Zellkultur

Benötigte Materialien:

- Je  $10 \mu\text{l}$  PMA (verdünnt 1:1000)
- Je  $10 \mu\text{l}$  Ionomycin (verdünnt 1:10)

MNCs nach Aufreinigung nach Ficoll sowie CD4+ und CD8+ Zellen wurden nach Separation mit MACS-Beads in den Versuch eingesetzt. Es wurden unstimulierte Zellen mit solchen, die durch PHA und Ionomycin stimuliert wurden, verglichen. Die Auswirkung einer Milchsäurekonzentration von 10 mM und von 20 mM wurde untersucht im Vergleich zu einer Negativkontrolle ohne Milchsäure-Zugabe. Die Zellen wurden in 24-Well-Platten kultiviert. Dabei wurden pro Ansatz 5 Wells mit je  $10^6$  Zellen in 1 ml T-Zellmedium befüllt. Für die Milchsäurekonzentration von 10 mM MS gab man  $5 \mu\text{l}$  der gelösten 2-molaren Milchsäure dazu, für die Konzentration von 20 mM nahm man  $10 \mu\text{l}$ . Man addierte PMA und Ionomycin zu den zu stimulierenden Zellen und inkubierte alle Ansätze für 2,5 h im Brutschrank.

#### RNA-Isolation

RNA wurde aus den Zellen mittels RNEasy-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Zellen wurden zusammen geerntet und in ein 50-ml-Tube (Falcon) überführt. Die Überstände wurden in Eppendorf-Cups für weitere Versuche bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

Die Zellen wurden lysiert und homogenisiert, um die gesamte RNA freizusetzen. Die Elution beruhte auf der spezifischen Bindung der RNA an Silicamembranen der Elutionssäulen während die anderen Zellbestandteile hindurchzentrifugiert wurden. Nach zweimaligem Waschen wurde die RNA aus der Membran mittels RNase-freiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch vermessen.

Die Kontrolle einer erfolgreichen Aufreinigung erfolgte mit Hilfe eines RNA-Gels. Dabei wurden die RNA-Stücke aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld durch ein Gel mit einer definierten Porengröße transportiert. Nach ca. einer Stunde waren die Fragmente eine bestimmte Strecke in dem Feld gewandert und konnten fotografisch dargestellt werden.

Benötigte Reagenzien:

MOPS 20x:                   42 g MOPS/ NaOH  
                                  4,1 g NaAc  
                                  3,7 g EDTA  
                                  500 ml H<sub>2</sub>O DEPC

Loading dye:                10 ml Formamid (deionisiert)  
                                 3,5 ml Formaldehyd  
                                 1 ml MOPS (20x)  
                                 0,8 ml Bromphenolblau  
                                 0,2 g Ficoll (in 2 ml H<sub>2</sub>O)  
                                 20 ml H<sub>2</sub>O  
                                 Gelagert in 1 ml Portionen bei -20 °C  
                                 5 µl Ethidiumbromid (nach dem Auftauen zugeben)

Für das Gel wurden 2,8 g Agarose mit 240 ml DEPC-Wasser aufgegossen und 2 min gekocht. Dann wurden 14 ml MOPS dazugegeben und gerührt, bis die Lösung nur noch lauwarm war. Man gab 28 ml Formaldehyd dazu. Die Gelkammer wurde mit Schlitten und 2 Kämmen bestückt und das Gel gegossen. Für den Laufpuffer verdünnte man MOPS (in 20-facher Konzentration) 1:20 mit Millipore-Wasser. Je Probenansatz gab man zu 10 µl Loading-dye in einem Eppendorf-Cup 1 µl RNA dazu. Die Proben wurden gemischt, abzentrifugiert, für 20 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend für 3 min auf Eis gestellt. Der Lauf erfolgte bei 100 V für ca. 1 h. Nach gelungener Aufreinigung konnte man die RNA im Anschluss auf der Photographie nachweisen (keine Abbildung).

### Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde der Kit Promega (Random Decamers) eingesetzt. Für die Bildung von cDNA wurde 1 µg RNA aus der Aufreinigung in 10 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt. Die Konzentration der gelösten RNA war aus der Photometrie bekannt. Einzelne Proben enthielten eine sehr geringe Konzentration an RNA, daher wurden 13 µl der Probe

eingesetzt und im nachfolgenden Schritt auf die  $3\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , die sich im Mastermix befanden, verzichtet. Die Random Decamers sowie die dNTPs wurden hier einzeln zum Ansatz gegeben. Für die übrigen Proben setzte man den Mastermix an, pro Probe wurden  $1\mu\text{l}$  des Primers Random Decamers,  $1\mu\text{l}$  dNTP und  $3\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  eingesetzt,  $5\mu\text{l}$  des Mastermix wurden also zum jeweiligen Ansatz gegeben. Die Proben wurden im PCR-Cycler 5 min bei  $65^\circ\text{C}$  inkubiert, auf Eis gestellt, zentrifugiert und es wurden  $4\mu\text{l}$  RT-Puffer zu jeder Probe gegeben. Man mischte gut und inkubierte 2 min bei  $42^\circ\text{C}$ . Daraufhin wurde je  $1\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase zugegeben und für die Reaktion 50 min bei  $42^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Denaturierung des Enzyms erfolgte dann in 15 min bei  $70^\circ\text{C}$ . Die Proben wurden zum Abkühlen auf Eis gestellt und für die Analyse im LightCycler (LC) 1:3 verdünnt ( $3\mu\text{l}$  cDNA +  $6\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ) und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### **quantitative Real Time PCR**

Die qRT-PCR bietet eine Möglichkeit zur Vervielfältigung der DNA mit gleichzeitiger Quantifizierung. Diese erfolgt mittels Fluoreszenzmessung, die proportional zur Quantität des PCR-Produkts zunimmt, während der PCR. Der verwendete Farbstoff (SYBR Green (Quiagen)) lagert sich in die DNA ein und wird vom Gerät quantitativ im Verlauf bestimmt.

Die qRT-PCR erfolgte im LightCycler (Roche) und wurde mit Hilfe des Kit QuantiTect SYBR Green PCR (Quiagen) durchgeführt. Die Präparation der Proben erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die verdünnte cDNA wird auf Eis aufgetaut. Es wurden die Primer für die Zytokine IL-2 und IFN $\gamma$  (biomers) eingesetzt. Pro Lauf wurden 29 Proben gemessen. Für den Lauf wurde ein Mastermix mit folgender Zusammensetzung pro Probe hergestellt.

- $10\mu\text{l}$  SYBR-Green-Mastermix
- $1\mu\text{l}$  IL-2-Primer „sense“
- $1\mu\text{l}$  IL-2-Primer „antisense“
- $6\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  (RNase-frei) (USB)

Gleiches galt ebenfalls für den IFN $\gamma$ -Primer.

Die Bestimmung der relativen Mengen des PCR-Produkts erfolgte mittels einer Standardkurve, die auf einer Verdünnungsreihe basiert:

unverdünnter Standard

cDNA einer Probe in der 1:3-Verdünnung

(1) 1:10-Verdünnung	2 $\mu$ l Standard-cDNA + 18 $\mu$ l H <sub>2</sub> O (RNase-frei)
(2) 1:100-Verdünnung	2 $\mu$ l aus (1) + 18 $\mu$ l H <sub>2</sub> O (RNase-frei)
(3) 1:200-Verdünnung	7 $\mu$ l aus (2) + 7 $\mu$ l H <sub>2</sub> O (RNase-frei)

Als Negativkontrolle diente RNase-freies Wasser.

Die Befüllung der LC-Kapillaren geschah im gekühlten Metallblock mit 2  $\mu$ l der 1:3 verdünnten cDNA bzw. für die Standardkurve mit einer Verdünnung oder RNase-freiem Wasser und 18  $\mu$ l des Mastermix. Die Kapillaren wurden nach Zentrifugation in den LightCycler eingebracht. Daraufhin wurde der Lauf gestartet.

Programm:	15 min	95 °C	Aktivierung der HotStar Taq Polymerase
	15 sec	95 °C	Denaturierung der DNA
	20 sec	57 °C	Annealing des Primers
	20 sec	72 °C	Extension des neuen Strangs
	0 sec	72 °C	Acquisition der Daten

Dieser Zyklus wurde 40x wiederholt, um eine ausreichende Menge an DNA zu generieren.

Als Housekeeping-Gen maß man in einem 2. Lauf die Expression der 18s-RNA, welche unabhängig von der Stimulation der Zellen gebildet wird und relativierte die Expression der Zytokine auf die entsprechenden Werte. Die Acquisition der Daten erfolgte hier bei 85 °C.

Mit Hilfe des slope (Steigung der Standardgeraden) wurde die Effizienz E eines Laufs berechnet:

$$E = 10 - 1/slope$$

### 3.2.7 Bestimmung des IL-2 mittels „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Mittels des ELISA wurde die Konzentration im Zellüberstand von IL-2 bei stimulierten und unstimulierten T-Lymphozyten mit und ohne Zugabe von Milchsäure gemessen. Das Prinzip ist hierbei, dass ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch IL-2 bindet, auf einer Mikroplatte fixiert wurde. Wenn jetzt Standards und Proben in die Wells pipettiert werden, wird lösliches IL-2 aus dem Überstand durch den Antikörper gebunden. Jetzt konnten alle ungebundenen Substanzen weggeschüttet werden und ein polyklonaler IL-2 spezifischer Antikörper, der mit einem Enzym verbunden ist, wurde hinzugegeben. Nach einem Mal Waschen, um ungebundene Antikörper-Enzym-Moleküle zu entfernen, wurde eine Substrat-Lösung dazugegeben und ein Farbumschlag entwickelte sich proportional zu der Konzentration an

gebundenem IL-2. Die Farbintensität wurde ausgewertet und so der Gehalt an IL-2 bestimmt. Für den Assay wurde der Quantikine Human IL-2 Immunoassay (R&D Systems) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### **Generierung der Zellkultur-Überstände**

Eingesetzt wurden die Überstände aus der Zellkultur für die RNA-Isolation. Die aufgereinigten CD4+ bzw. CD8+ Zellen wurden in T-Zellmedium für 2,5 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Je nach Versuchsansatz wurde zu den zu stimulierenden Zellen PMA und Ionomycin zugegeben bzw. die jeweilige Menge Milchsäure addiert. Nach Ernten der Zellen wurden die Überstände filtriert und als Aliquots bei -20 °C gelagert.

### **Vorbereitung**

Reagenzien aus dem Kit:

- Verdünnter Waschpuffer
- Stop-Lösung
- Calibrator Diluent RD5
- Calibrator Diluent RD6E
- Assay Diluent RD1A
- Conjugate
- Ungemixtes Farbreagenz A
- Ungemixtes Farbreagenz B
- Standard
- Mikroplatten

Weitere Geräte:

- ELISA-Reader (MWG-Biotech, Ebersberg)

Die Überstände sowie die Reagenzien wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. 20 ml des Waschpuffer wurden in 500 ml H<sub>2</sub>O dest. verdünnt. Die Farbreagenzien A und B wurden in gleichen Volumina zu der Substratlösung zusammengemischt

und vor Licht geschützt. Pro well wurden  $200\text{ }\mu\text{l}$  benötigt. Die Herstellung einer Verdünnungsreihe erfolgte mit dem IL-2 Standard und dem Calibrator Diluent RD5.

Stock-Lösung:	2000 pg/ml
1. Verdünnung:	1000 pg/ml
2. Verdünnung:	500 pg/ml
3. Verdünnung:	250 pg/ml
4. Verdünnung:	125 pg/ml
5. Verdünnung:	62,5 pg/ml
6. Verdünnung:	31,2 pg/ml
Negativ-Kontrolle:	Calibrator Diluent, 0 pg/ml

### Durchführung

100  $\mu\text{l}$  des Assay Diluent RD1A wurden zu jedem Well gegeben. 100  $\mu\text{l}$  Standard, Probe oder Kontrolle wurden hinzu pipettiert. Jede stimulierte Probe wurde als Stock und in einer Verdünnung von 1:10 gemessen. Die Überstände der unstimulierten Zellen wurden nicht verdünnt, da man keine große Produktion von IL-2 erwarten konnte. Die Platten wurden mit Folie beklebt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei erfolgte die Bindung von IL-2 an die fixierten Antikörper. Die Wells wurden abgezogen und 3 x gewaschen, indem 400  $\mu\text{l}$  Waschpuffer in jedes Well gefüllt wurde. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Platte auf Papiertüchern ausgeklopft, um jede restliche Flüssigkeit aus den Wells zu entfernen. 200  $\mu\text{l}$  IL-2 Konjugat wurde zu den Wells gegeben. Die Platte wurde erneut beklebt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Jetzt erfolgte die Bindung der polyklonalen Antikörper an das gebundene IL-2. Der Waschvorgang wurde wiederholt und die Flüssigkeit aus den Wells entfernt. 200  $\mu\text{l}$  Substratlösung wurden zu den Wells gegeben und lichtgeschützt für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das gebundene Enzym bewirkte dabei den Farbumschlag. 50  $\mu\text{l}$  Stoplösung wurden zu jedem Well gegeben um die Reaktion abzubrechen. Die optische Dichte jedes Wells wurde innerhalb von 30 min im ELISA-Reader mit einer Wellenlänge von 450 nm determiniert. Mit Hilfe der Korrektur von 540 nm bzw. 570 nm konnten optische Ungenauigkeiten ausgeschlossen werden.

### 3.2.8 Western Blot

Um die Expression des MCT-I Transporters in stimulierten und unstimulierten Zellen zu bestimmen wurde ein Western Blot durchgeführt. Hierbei werden Proteine

nach Auftrennung durch SDS-PAGE elektrisch auf eine PVDF-Membran transferiert und können immunologisch detektiert und photographisch dargestellt werden.

### Zellkultur

Eingesetzt wurden naive CD4+ und CD8+ Zellen nach Auftrennung durch MACS. Die Hälfte der Zellen wurde stimuliert und in mit CD3 und CD28 Antikörpern beschichteten Platten kultiviert. Die andere Hälfte blieb zur Kontrolle unstimuliert und wurde in unbeschichteten Rundbodenplatten inkubiert. Die Kultur erfolgte in T-Zellmedium, dem je nach Ansatz 10 mM bzw. 20 mM Milchsäure zugegeben wurden, für 4 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Außerdem wurden aufgereinigte CD25+ und CD25- Zellen eingesetzt, die über einige Wochen in Kultur stimuliert wurden. Diese wurden mir wieder freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Edinger zur Verfügung gestellt. Um stimulierte mit unstimulierten Zellen vergleichen zu können, wurde ein Teil der Zellen vor Versuchsbeginn 3 Tage ohne Antikörper in Standardmedium kultiviert und so ruhig gestellt. Die Zellen wurden ebenfalls mit bzw. ohne Milchsäure für 4 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### Reinheitskontrolle in der Durchflusszytometrie

Um eine ausreichende Reinheit der Zellen in der Analyse sicherzustellen, wurde eine Kontrolle mittels 3-Farben-Durchflusszytometrie durchgeführt.

Verwendete Antikörper:

Antigen	Klon	Isotyp	Firma
IgGI FITC	X40	IgG1	BD
IgGI PE	X40	IgG1	BD
IgGI APC		IgG1	Caltag
CD 45 FITC	2D1	IgG1	BD
CD 45 PE	HI30	IgG1	Caltag
CD 45 APC	HI30	IgG1	Caltag
CD 3 PE	SK7	IgG1	BD
CD 4 FITC	SK3	IgG1	BD
CD 8 APC	RPA-T8	IgG1	Pharmingen

Das Negativ-Eluat, das man nach der Auftrennung mit MACS erhält, wurde zur Kompensation eingesetzt und mit CD45 FITC, PE und APC gefärbt. Die Isotypen-Färbung wurde ebenfalls mit dem Negativ-Eluat durchgeführt und die CD4+ und

CD8+ Zellen jeweils mit den CD3, CD4 und CD8 Antikörpern gefärbt. Durchflusszytometrisch wurden im FACS-Calibur (BD) 25000 Zellen gemessen. Die Auswertung erfolgte über die Software CellQuest Pro im Density Plot.

### SDS-Page

Benötigte Reagenzien:

APS

TEMED

Biorad Kaleidoskop Marker

Trispuffer (1,25 M)	13 g	Tris/ HCl pH 6,8
	100 ml	aqua bidest.
SDS-lysis buffer (2x)	10 ml (20 %)	Glycerin
	5 ml (125 mM)	Trispuffer
	2 g (4 %)	SDS
	5 ml (10 %)	Mercaptoethanol
	10 mg (0,02 %)	Bromphenolblau
	50 ml	aqua bidest.
Untergelpuffer	90,83 g	Tris/ HCl pH 8,8
	500 ml	aqua bidest.
Untergelstammlösung (15 %)	25 ml	Untergelpuffer
	1 ml	SDS (10%)
	50 ml	Acrylamid (30%)
	100 ml	aqua bidest.
Obergelpuffer	30 g	Tris/ HCl H 6,8
	500 ml	aqua bidest.
Obergelstammlösung (5 %)	25 ml	Obergelpuffer
	1 ml	SDS (10%)
	16,65 ml	Acrylamid (30%)
	100 ml	aqua bidest.
Acrylamidstammlösung	146 g	Acrylamid
	4,0 g	Bisacrylamid
	500 ml	aqua bidest.
SDS-Lösung	10 g	SDS
	100 ml	aqua bidest.
Lämmli-Puffer (5x)	15 g (40 mM)	Tris
	216 g (0,95 M)	Glycin
	15 g (0,5 %)	SDS

3000 ml aqua bidest.

**Zellyse** Die Zellen wurden geerntet und nach Bestimmung der Zellzahl 2 x mit PBS gewaschen. Je nach Zellzahl wurden  $50\mu\text{l}$  SDS-lysis buffer zu  $10^6$  Zellen gegeben. Eingesetzt wurden je nach Wachstum und Stimulation der Zellen zwischen  $14 \times 10^6$  und  $1,3 \times 10^6$  Zellen. Die Proben wurden bei  $95^\circ\text{C}$  für 10 min geschüttelt und noch heiß gevortext, wodurch die DNA zerstört wurde. Jetzt konnten sie bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

**Gelpräparation** Das Untergel wurde am Vorabend gegossen, um eine vollständige Polymerisierung des Gels zu gewährleisten. Für 2 Gele à 5 ml wurden zu 11 ml Untergelstammlösung (15%)  $11\mu\text{l}$  TEMED und  $55\mu\text{l}$  10% APS (frisch angesetzt!) gegeben. Das Gel wurde in die Kammer gegossen und zum Sauerstoffausschluss mit 1 ml Milliporewasser überschichtet. Das Gel ließ man 20 min polymerisieren und überschichtete es über Nacht mit 1:3 verdünntem Untergelpuffer. Die Aufbewahrung erfolgte abgedeckt bei  $4^\circ\text{C}$ . Man goss den Untergelpuffer ab und spülte mit aqua bidest. Für 2 Obergele gab man zu 5 ml Obergelstammlösung (5%)  $5\mu\text{l}$  TEMED und  $40\mu\text{l}$  APS (10%). Man goss das Gel und ließ es mit Kamm 20 min polymerisieren. Die Gele wurden schließlich in die Laufapparatur eingesetzt und die Kammer mit Lämmli-Puffer befüllt. Die Lysate wurden aufgetaut und  $11\mu\text{l}$  bei  $10\mu\text{l}$  Gelbeladung aliquotiert. Die Aliquots wurden 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  geschüttelt und das Gel damit befüllt.

**Gellauf** Zu Beginn legte man konstant 60 V an, bis die Proben das Untergel erreicht hatten. Der Lauf im Untergel erfolgte bei 110-120 V, bis die Marker am unteren Rand angekommen waren.

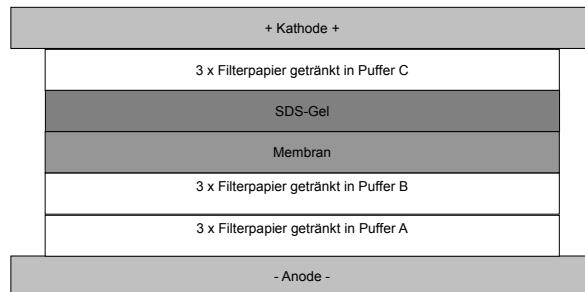
## Western Blotting

Benötigte Materialien:

PVDF-Membran Immobilon-P (Millipore)		
Puffer A	36,6 g (0,3 M)	Tris (pH 10,4)
	200 ml (20 %)	Methanol
	1000 ml	aqua bidest.
Puffer B		
	3,03 g (25 mM)	Tris (pH 10,4)
	1000 ml	aqua bidest.
Puffer C		
	5,20 g (4 mM)	Capronsäure (pH 7,6)
	200 ml	Methanol

1000 ml aqua bidest.

Je Puffer wurden 3 Filterpapiere sowie die Membran auf Gelgröße zugeschnitten. Die Filterpapiere wurden im jeweiligen Puffer getränkt, die Membran in Methanol geschwenkt und mit Puffer B benetzt. Man nahm die Gele aus der Kammer und entfernte das Obergel. Das Untergel wurde 10-20 s im Blotpuffer B geschwenkt. Die Membran wurde mit 1 ml Puffer B benetzt, bevor das Gel aufgelegt wurde. In der Blotkammer wurden Filterpapiere, Membran und SDS-Gel folgendermaßen aufgeschichtet:



**Abbildung 3.1:** Aufbau des Blot

Dabei wurde darauf geachtet, keine Luftblasen einzuschließen. Bevor die Filterpapiere C aufgelegt wurden, wurden noch überstehende Ränder der Membran entfernt. Der Lauf erfolgte für 30-40 ml mit  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  des Blots. Da hier 2 Gele geblottet wurden, legte man 98 mA an. Der Blot wurde als erfolgreich angesehen, wenn sich der überwiegende Anteil des Markers auf der Membran befand.

### 3.2.9 Immunhistochemische Färbung

Verwendete Reagenzien:

TBST 2x	4,8 g (40 mM)	Tris/HCl (pH 8,0)
	18 g (0,3 M)	NaCl
	0,74 g (2 mM)	ECTA
	50 mg (0,05 %)	NaN3
	1000 ml	aqua bidest.
TBST 1x	1:1 Verdünnung	

TBS 0,1% Tween 20	1 ml	Tween 20
	500 ml	TBST 2x
Milch (5%)	5 g	Magermilchpulver
	100 ml	TBST 1x

Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde die Membran für 1 h in 5 %iger Milch geschwenkt. Die Inkubation erfolgte mit dem spezifischen MCT-I Antikörper über Nacht bei 4 °C. Der Antikörper wurde in 5 %iger Milch in einer Verdünnung von 1:500 auf die Membran gegeben.

Am nächsten Tag wusch man die Membran 3 x mit TBST (1x) für 6 min und inkubierte mit dem Sekundärantikörper Rabbit-anti-goat HRP, 1:1000 verdünnt, für 1 h. Die Membran wurde erneut 3 x für 10 min gewaschen und mittels ECL-Kit entwickelt. Die beiden Entwicklungslösungen wurden aufgrund von Lichtempfindlichkeit erst kurz vor dem Entwicklungsschritt 1:1 gemischt und die Membran für 60 s in der Lösung geschwenkt. Das Enzym HRP, das durch den Sekundärantikörper am MCT-Protein fixiert ist, oxidiert dabei das Substrat Luminol. Die Chemolumineszenz, die dabei entsteht, wird auf dem Film (Amersham) visualisiert. Für die Exposition wurde der Film in der Dunkelkammer 6 min auf die Membran in der Blotkassette gelegt und anschließend entwickelt.

Als Kontrolle wurde die Membran jetzt mit spezifischem Antikörper für  $\beta$ -Aktin gefärbt, das in jeder Zelle gleich exprimiert wird. Der Entwickler wurde entfernt, indem die Membran 1 h in TBST geschwenkt wurde. Nach 10 min wurde der Puffer einmal gewechselt. Man inkubierte die Membran für 1 h mit 1:2000 verdünntem  $\beta$ -Aktin Antikörper und wusch 3 x. Die Membran wurde für eine weitere Stunde mit Goat-anti-rabbit HRP Antikörpern (Verdünnung 1:1000) inkubiert, 3 x gewaschen und entwickelt. Die Exposition erfolgte für 2 min.

### **3.2.10 Analyse der Laktat-Aufnahme mittels Massenspektrometrie**

Verwendete Materialien:

- Laktat-<sup>13</sup>C
- HCl
- Casyton, Schärfe System, Reutlingen
- Methanol, Fischer Scientific, Leicestershire, UK
- Chloroform, Merck, Darmstadt

Die Massenspektrometrie untersucht das Verhältnis Masse/Ladung eines Teilchens: m/q. Bei bekannter Ladung kann daraus die Masse eines Teilchens bestimmt werden.

Untersucht wurde die Aufnahme von radioaktiv-markiertem Laktat (Laktat-<sup>13</sup>C) in die Zellen bei neutralem und azidotischem pH. Als Kontrollen wurden die Zellen naiv in neutralem Medium sowie bei pH-Änderung gemessen.

Die Versuche wurden in freundlicher Kooperation am Institut für Funktionelle Genomik durchgeführt.

### **Zellkultur**

Eingesetzt wurden naive CD4+ und CD8+ Zellen nach Auftrennung mit MACS und Kultur in antikörperbeschichteten Platten in T-Zellmedium für 1 bzw. 7 d. Außerdem wurden CD25+ und CD25- Zellen verwendet, die mir freundlicherweise wieder von der Arbeitsgruppe Edinger zur Verfügung gestellt wurden. Des Weiteren wurden stimuliertes CTLs nach einigen Wochen in Kultur eingesetzt, die mir wieder freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Mackensen zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen wurden geerntet, gezählt und gewaschen. Die Kontrolle der Zellzahl nach Zentrifugation (Multifuge, Heraeus) im CASY (5 µl Zellsuspension in 10 ml Casyton) des Instituts für Funktionelle Genomik ergab eine Apoptoserate von 20-30% (Normalbefund). Diese wurde in einer Kontrollbestimmung im Durchflusszytometer (EPICS XL-MCL, Beckman-Coulter) bestätigt. Die Zellzahl wurde auf  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml T-Zellmedium eingestellt und die Zellen in eine 12-well Platte überführt. Hier erfolgte die Kultivierung von  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz. Es erfolgte die doppelte Durchführung jedes Ansatzes. Laktat-<sup>13</sup>C wurde 11,3 µl/ml zugesetzt, zur pH-Änderung wurden 30 µl/ml HCl verwendet und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C für 3 min bzw. für 30 min inkubiert. Die Überstände wurden abzentrifugiert, vorsichtig abgenommen und bei -80 °C für die weitere Analyse eingefroren. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen, der Überstand jedes Mal vorsichtig mit der Pipette abgenommen und verworfen. Nach dem 3. Waschvorgang beließ man 200 µl PBS bei den Zellen und resuspendierte das Pellet. Für die Proteinbestimmung entnahm man 5 µl und suspendierte sie in 45 µl PBS. Aus 5 µl aus dieser Suspension bestimmte man erneut die Zellzahl mittels CASY.

### **Methanol-Chloroform-Extraktion**

Das genaue Volumen der Zellsuspension wurde bestimmt und die Hälfte der restlichen Suspension wurde jetzt entnommen und für die Methanol-Chloroform-Extraktion eingesetzt. Die entsprechende Menge wurde in Glasrörchen transferiert, 0,6 ml Methanol zugegeben und gut gemischt. Die Proben wurden 15 min auf Eis inkubiert.

Die Zellen sonifizierte man jetzt 10 s mit 2 Pulsfrequenzen und wenig Leistung auf Eis, um die Membranen komplett zu zerstören. 0,6 ml aqua dest. wurden zugegeben und gut gemischt. 0,6 ml Chloroform wurden addiert und erneut gemischt. Jetzt wurden die Proben bei -20 °C für 3-4 h gelagert.

Die Ansätze wurden bei 20.000 g (4.300 rpm) 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Hierbei fand die Phasentrennung der Methanol-Wasserphase, der Chloroformphase und der Fettphase, die den zerstörten Zellmembranen entspricht, statt.

Die Methanol-Wasserphase wurde abgenommen, die Choroformphase entnahm man mit ausgezogenen Glas-Pasteur-Pipetten und lagerte beide bei -80 °C bis zur massenspektrometrischen Analyse. Die Fettphase wurde verworfen.

### **Bestimmung von Protein mittels Perchlorsäure**

Die verbleibende Hälfte der Proben wurde bis zur Analyse in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **Massenspektrometrische Analyse**

Die weitere Aufarbeitung der Proben sowie die massenspektrometrische Analyse wurde freundlicherweise vom Institut für Funktionelle Genomik durchgeführt.

# Kapitel 4

## Ergebnisse

### 4.1 Proliferation von T-Zellen nach Inkubation mit Milchsäure

#### 4.1.1 Proliferationsbestimmung mit $^3\text{H}$ -Thymidin

Es ist bekannt, dass viele Tumore einen gesteigerten Glukosemetabolismus haben und dass sich Milchsäure bzw. Laktat im Tumormilieu anreichert. In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Milchsäure auf humane T-Zellen analysiert werden. Hierzu wurden zunächst mononukleäre Zellen (MNC) untersucht. MNC enthalten Monozyten sowie eine Mischung verschiedener T- und B-Lymphozyten.

Eingesetzt wurden 78.000 Zellen pro Vertiefung (im Nachfolgenden bezeichnet als „Well“) in gerundeten 96-well Platten. Die Inkubation erfolgte im T-Zellmedium, einem RPMI 1.640-Medium mit 10% humanem Serum, Zusatz von T-Zell-stimulierendem Faktor und oben genannten Standardzusätzen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über 4-5 Tage. Die Milchsäure wurde für die gesamte Inkubationszeit von 4-5 Tagen zugegeben. Schließlich erfolgte die Markierung mit  $^3\text{H}$ -Thymidin und 24 Stunden später die Proliferationsbestimmung im  $\beta$ -Szintillationsmessgerät.

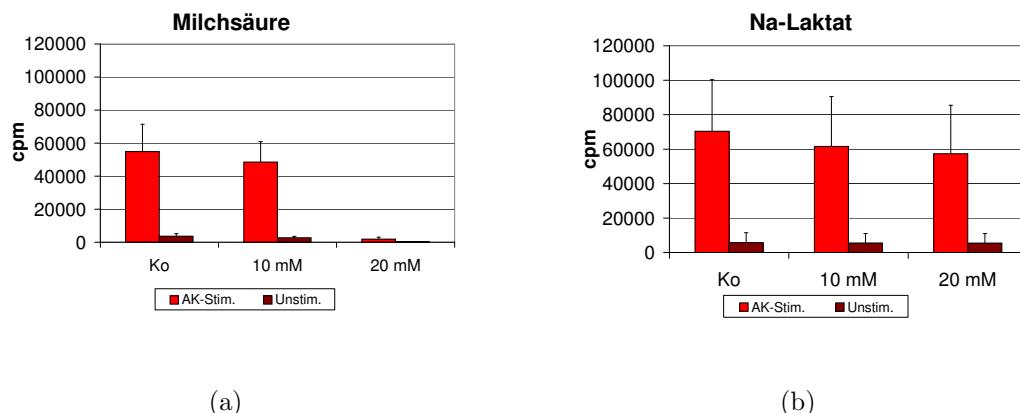
Um eine Stimulation und ein Wachstum der T-Zellen zu erreichen, wurden die Zellen in mit OKT-3 und CD28-Antikörper-beschichteten Wells inkubiert, im Nachfolgenden als „AK-stimuliert“ bezeichnet (Abb. 4.1(a)). Als Kontrolle wurden auch Zellen ohne Zusatz von Antikörpern inkubiert.

#### MNC

MNCs wurden in T-Zellstimulationsmedium mit den angegebenen Konzentrationen Milchsäure kultiviert. Als Kontrolle diente die Inkubation mit Natrium-Laktat, dem

Salz der Milchsäure, das zu keiner pH-Änderung führt. Nach der angegebenen Inkubationszeit von 4-5 Tagen in Anwesenheit von Milchsäure wurden die Zellen geerntet und die Proliferation der Zellen anhand der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Aufnahme bestimmt.

Der hemmende Effekt der Milchsäure ist in der höchsten Konzentration (20 mM) deutlich (Abb. 4.1(a)), während Na-Laktat ohne pH-Änderung keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen zeigt (Abb. 4.1(b)). Eine Konzentration von 10 mM hatte nur einen geringen Effekt auf das Zellwachstum.



**Abbildung 4.1: Inhibition der Proliferation der MNC durch Milchsäure.** T-Zellen wurden für 4-5 Tage mit Milchsäure bzw. Na-Laktat in An- oder Abwesenheit von AK inkubiert (Kontrolle: Ko). Der Einfluss von Milchsäure (a) oder Na-Laktat (b) auf die Zellproliferation wurde mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von mindestens  $n = 3$  Experimenten.

In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass eine alleinige pH-Änderung, z.B. mit HCl, wenig Einfluss auf die Zellproliferation hat.

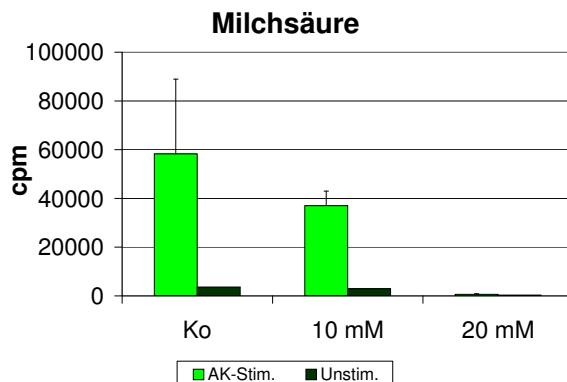
Um herauszufinden, ob der Zeitpunkt der Zugabe von Milchsäure relevant für das Zellwachstum ist, wurde im nächsten Versuch Milchsäure bzw. Laktat erst nach drei Stunden Inkubation zu den Zellen gegeben und die Zellen erneut für 4 Tage kultiviert.

Es kam zu einer mäßigen Hemmung der Proliferation bei mittleren Konzentrationen von 10 mM MS und zu einer nahezu kompletten Unterdrückung des Wachstums bei Konzentrationen von 20 mM. Das Salz Na-Laktat blieb auch hierbei ohne Einfluss auf die Proliferation (ohne Abbildung).

Daraus konnte man also schließen, dass der Zeitpunkt der Zugabe der Milchsäure nicht ausschlaggebend für die Hemmung der Proliferation ist.

## CD8+ und CD4+ Zellen

Um das Wachstum bestimmter T-Zell-Populationen im Milchsäuremilieu untersuchen zu können, wurden aus MNCs mittels der Miltenyi-Methode im Negativverfahren CD4+ und CD8+ Zellen aufgereinigt. Es wurden wieder 78000 Zellen pro Well in 96-well-Rundbodenplatten kultiviert.



**Abbildung 4.2: Inhibition der Proliferation der CD8+ Zellen durch Milchsäure.** T-Zellen wurden für 4 Tage mit Milchsäure in An- bzw. Abwesenheit von AK inkubiert (Kontrolle: Ko). Der Einfluss von MS auf die Zellproliferation wurde mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von  $n = 3$  Experimenten.

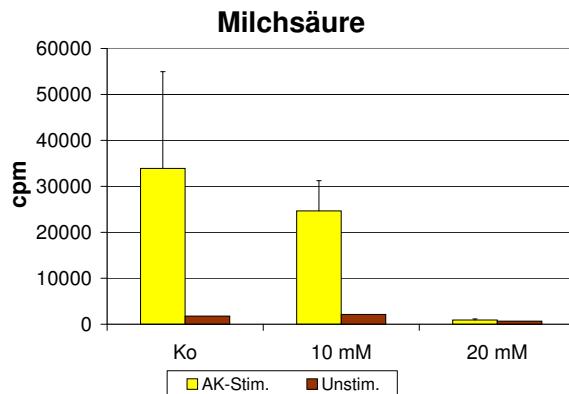
Die Zellen wurden wie oben angegeben in T-Zellmedium mit Milchsäure in angegebenen Konzentrationen für einige Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Um die Proliferation der T-Zellen zu induzieren, wurden die Wells mit OKT3/CD28 beschichtet. Als Kontrolle dienten auch hier unstimulierte T-Zellen.

Es zeigte sich ein leichter Rückgang in der Proliferation der CD8+ Zellen bei Inkubation mit 10 mM Milchsäure. Bei Kultivierung der Zellen mit 20 mM MS, war kaum noch Proliferation nachweisbar (Abb. 4.2).

Das Wachstum der CD4+ Zellen zeigte bei Kultur mit Milchsäure ebenfalls einen deutlichen Rückgang (Abb. 4.3). Konzentrationen von 10 mM führten zu einem leichten Rückgang in der Wachstumsrate. Bei 20 mM ging die Proliferationsrate auf einen minimalen Wert zurück.

## CD4+/25+ und CD4+/25- Zellen

Als weiterer Schritt in der differenzierten Analyse der T-Zellen wurde die Auftrennung der CD4+ Zellen durchgeführt, um spezifisch die Reaktion der T-regulato-



**Abbildung 4.3: Inhibition der Proliferation der CD4+ Zellen durch Milchsäure.** T-Zellen wurden für 4 Tage mit Milchsäure in An- bzw. Abwesenheit von AK inkubiert (Kontrolle: Ko). Der Einfluss von MS auf die Zellproliferation wurde mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von  $n = 3$  Experimenten.

rischen Zellen (CD4+/CD25+ bzw. T-Regs) untersuchen zu können. Diese Zellen wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Edinger/Hoffmann zur Verfügung gestellt.

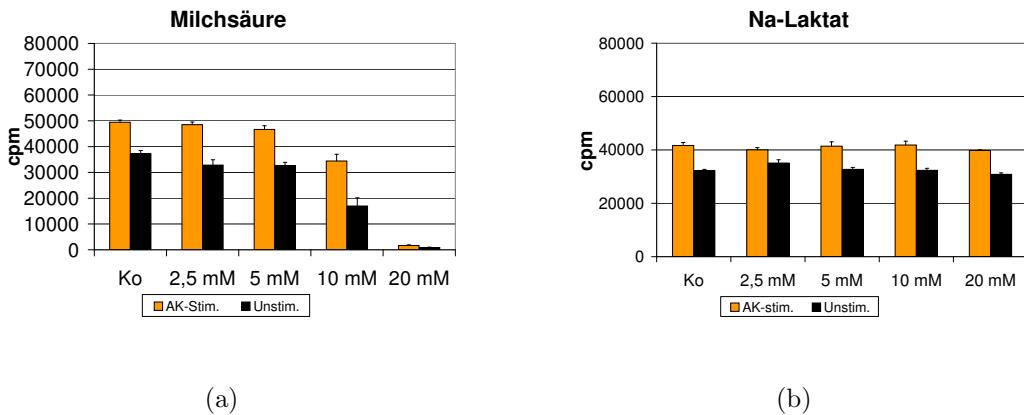
Es wurde die Proliferation bei Milchsäurekonzentrationen von 2,5 mM, 5 mM, 10 mM und 20 mM untersucht. Ein Teil der Zellen wurde mit AK stimuliert. Die Milchsäure wurde sofort für 24 h zugegeben.

Wie auch bei den Gesamt-CD4+ Zellen zeigte sich eine deutliche Reduktion im Zellwachstum bei hohen MS-Konzentrationen von 20 mM Milchsäure. Auch 10 mM hatten noch einen deutlichen Effekt während niedrigere Konzentrationen keinen Einfluss auf die Proliferation hatten (s. Abb. 4.4(a)).

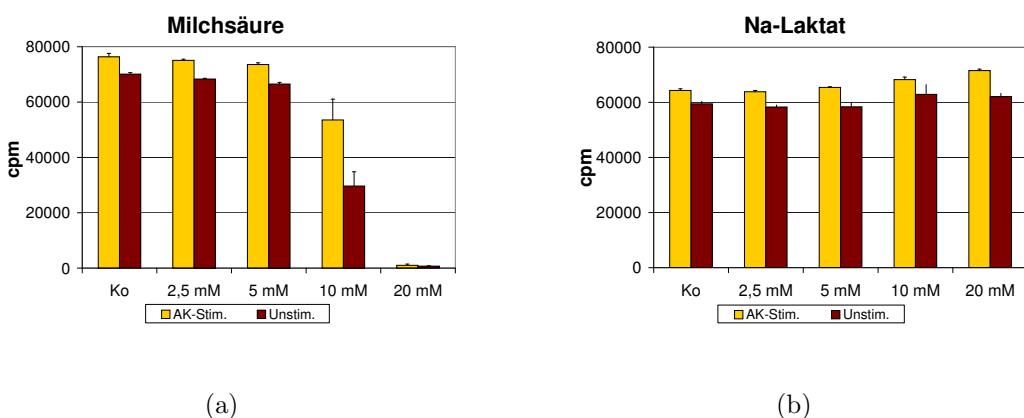
Der Unterschied zwischen AK-stimulierten CD25+ und CD25- Zellen war gering (s. Abb. 4.5(a)). Beide Populationen zeigten ein ähnliches Verhalten. Ein hemmender Einfluss des Salzes Laktat war in beiden Gruppen nicht nachweisbar (Abb. 4.4(b) und 4.5(b)).

#### 4.1.2 Proliferationsbestimmung mit Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)

Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester ist ein Zell-permeabler Farbstoff, der in hohen Konzentrationen toxisch auf die Zellen wirkt, in niedrigen Konzentrationen jedoch zu einer Färbung führt.



**Abbildung 4.4: Inhibition der Proliferation der CD25+ Zellen durch Milchsäure.** CD25+ Zellen nach Expansion über einige Wochen wurden für 24 Stunden mit Milchsäure in An- bzw. Abwesenheit von AK inkubiert (Kontrolle: Ko). Der Einfluss von Milchsäure (a) oder Na-Laktat (b) auf die Zellproliferation wurde mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von  $n = 3$  Ansätzen in einem Experiment.

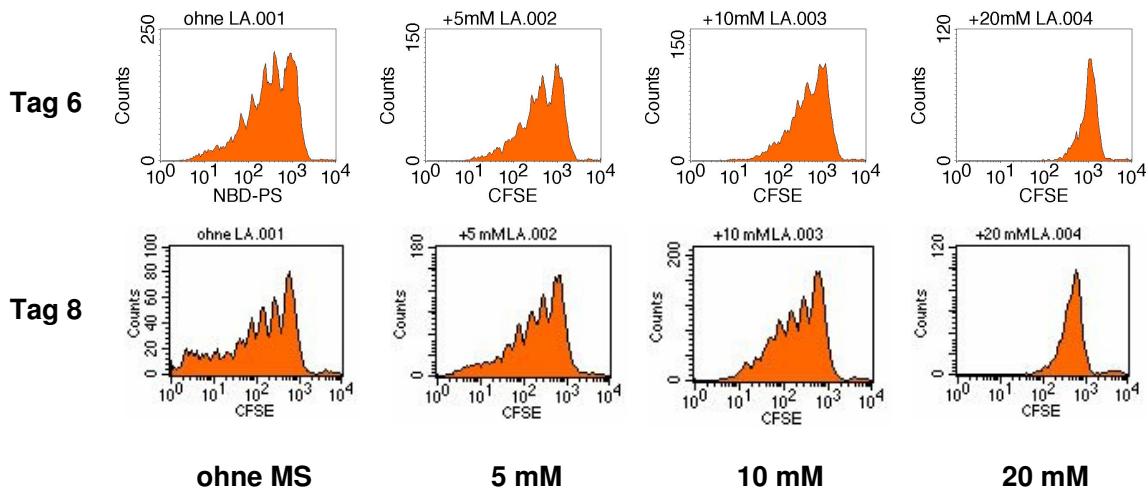


**Abbildung 4.5: Inhibition der Proliferation der CD25- Zellen durch Milchsäure.** CD25- Zellen nach Expansion über einige Wochen wurden für 24 Stunden mit Milchsäure in An- bzw. Abwesenheit von AK inkubiert (Kontrolle: Ko). Der Einfluss von Milchsäure (a) oder Na-Laktat (b) auf die Zellproliferation wurde mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM von  $n = 3$  Ansätzen in einem Experiment.

CFSE dringt über Diffusion in die Zelle ein und wird durch intrazelluläre Esterasen metabolisiert. Das Produkt besitzt eine Fluoreszenz und bindet kovalent an Amingruppen. In den ersten 24 h wird ein Teil des CFSE wieder ausgeschieden. Danach bleibt die intrazelluläre Konzentration relativ stabil in Zellen, die sich nicht teilen. Wenn sich eine Zelle teilt, wird der Farbstoff gleichermaßen zwischen den Tochterzellen aufgeteilt, die somit eine Fluoreszenz von 50 % der Mutterzelle aufweisen. Bis zu 8 aufeinanderfolgende Zellteilungen sind hiermit nachvollziehbar. Die Analyse erfolgt schließlich in der Durchflusszytometrie, wobei sich jede erfolgte Zellteilung als ein Peak darstellt.

Eingesetzt wurden expandierte zytotoxische CD8+ Lymphozyten (CTL), die mit CFSE markiert und anschließend mit PHA stimuliert wurden, um zu testen ob die Zellen auch nach einem starken polyclonalen Stimulus genauso anfällig für die hemmenden Eigenschaften der Milchsäure sind bzw. ob der Effekt alle proliferierenden Zellen oder nur eine Subpopulation trifft.

Die Inkubation erfolgte für 6 Tage bzw. 8 Tage mit 5 mM, 10 mM und 20 mM Milchsäure. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Milchsäure. Schließlich wurde die Fluoreszenz der lebenden Zellen in der Durchflusszytometrie analysiert.



**Abbildung 4.6: Proliferation expandierter CTL.** Die CFSE-Messung erfolgte an Tag 6 und 8 nach Inkubation der CTL mit Milchsäure. Die Stimulation mit PHA erfolgte zeitgleich für 24h.

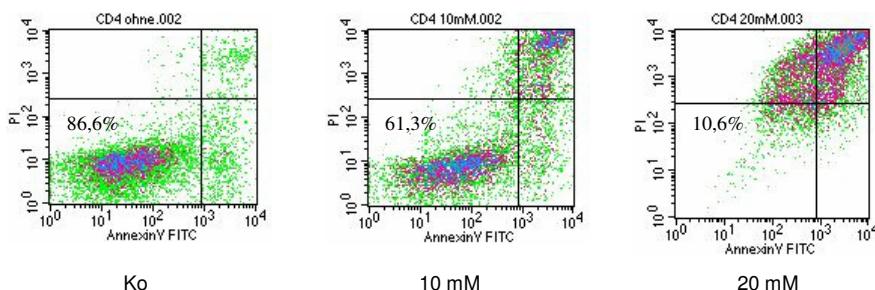
In Abb. 4.6 kann man im Histogramm der Durchflusszytometrie deutlich den Rückgang in der Proliferation bei ansteigenden Milchsäurekonzentrationen erkennen. Während man im Kontrollansatz ohne MS und auch bei 5 mM noch einzelne

Peaks erkennen kann, zeigte sich bei 10 mM ein deutlicher inhibitorischer Effekt. Bei 20 mM war nur noch eine einzelne schmalbasige Zacke ohne erkennbare Wachstumsrate sichtbar.

Auch nach 8 Tagen konnte man keine Proliferation im Ansatz „20 mM“ erkennen, während die Ansätze „Kontrolle“ und „5 mM“ deutlich weiter proliferierten. Bei Konzentrationen von 10 mM zeigte sich ebenfalls eine reduzierte Proliferation. Hiermit ließ sich also ein weiterer Beweis für die hemmende Wirkung von Milchsäure auf das Wachstum der Zellen erbringen.

## 4.2 Apoptoseinduktion durch Milchsäure

Um festzustellen, wie viele Zellen bei 20 mM noch am Leben sind, wurde nach der Proliferationsrate nun auch die Apoptoserate der Zellen unter dem Einfluss von Milchsäure analysiert.



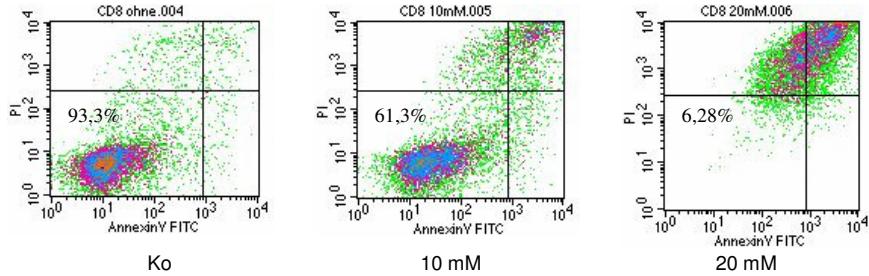
**Abbildung 4.7: Apoptoserate der CD4+ Zellen.** Die Inkubation der Zellen erfolgte nach 3 Tagen mit Milchsäure für 24 Stunden. Lebende Zellen sind als Prozent angegeben.

Eingesetzt wurden CD4+, CD8+ sowie CD4+/25+ und CD4+/25- Zellen, wieder jeweils 78000 Zellen pro Well in 96-Well-Rundbodenplatten. Die Inkubation erfolgte erneut im T-Zellmedium, einem 1640-RPMI-Medium mit 10 % humanem Serum und oben genannten Standardzusätzen für 3 Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Am 4. Tag wurden die entsprechenden Konzentrationen Milchsäure dazugegeben und am 5. Tag mit Annexin V und PI gelabelt. Die Analyse erfolgte in der Durchflusszytometrie. Es wurde auf lebende Zellen gegatet, die Ausgabe erfolgte als Dotplot.

Hierbei wurde deutlich, dass bei ansteigenden Milchsäurekonzentrationen ebenfalls die Apoptoserate der Zellen ansteigt. Während bei den CD4+ Zellen ohne Milchsäure noch 86,6 % der Zellen am Leben waren, sank der Wert auf 61,3 % bei

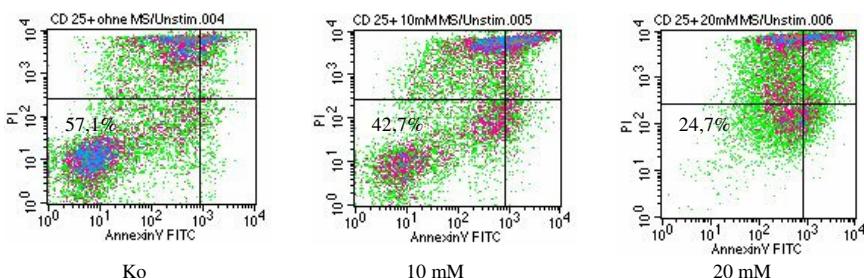
den Zellen, die mit 10 mM MS inkubiert worden waren und auf 10,6 % bei dem Ansatz mit 20 mM MS (s. Abb. 4.7).



**Abbildung 4.8: Apoptoserate der CD8+ Zellen.** Die Inkubation der Zellen erfolgte nach 3 Tagen mit Milchsäure für 24 Stunden. Lebende Zellen sind als Prozent angegeben.

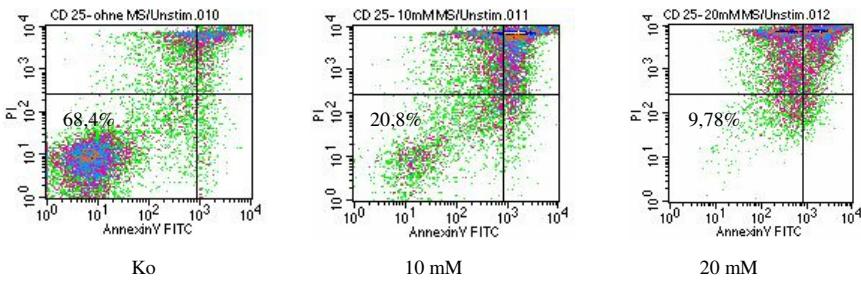
Die CD8+ Zellen wiesen im Vergleich zu den CD4+ Zellen ein ähnliches Verhalten auf. Bei Inkubation ohne MS waren 93,3 % der Zellen am Leben. Nach Zugabe von 10 mM MS sank der Anteil der lebenden Zellen auf 75,5 %, bei dem Ansatz mit 20 mM MS waren bis auf 6,28 % alle Zellen apoptotisch (Abb. 4.8).

Als nächstes wurden auch hier wieder die CD4+/CD25+ und die CD4+/CD25- Zellen getrennt untersucht, um Unterschiede zwischen den T-regulatorischen Zellen und den „normalen“ T-Helferzellen in Bezug auf ihre Empfindlichkeit auf Milchsäure ausfindig zu machen.



**Abbildung 4.9: Apoptoserate der CD4+/CD25+ Zellen.** Die Inkubation der Zellen erfolgte nach 3 Tagen mit Milchsäure für 24 Stunden. Lebende Zellen sind als Prozent angegeben.

Die T-Regs zeigten sich resistenter gegenüber Milchsäure, während die CD25- Zellen ein ähnliches Verhalten wie die Gesamt-CD4+ T-Zellen zeigten (s. Abb. 4.9 und 4.10).



**Abbildung 4.10: Apoptoserate der CD4+/CD25- Zellen.** Die Inkubation der Zellen erfolgte nach 3 Tagen mit Milchsäure für 24 Stunden. Lebende Zellen sind als Prozent angegeben.

### 4.3 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) zur Bestimmung von IFN $\gamma$ - und IL-2-mRNA

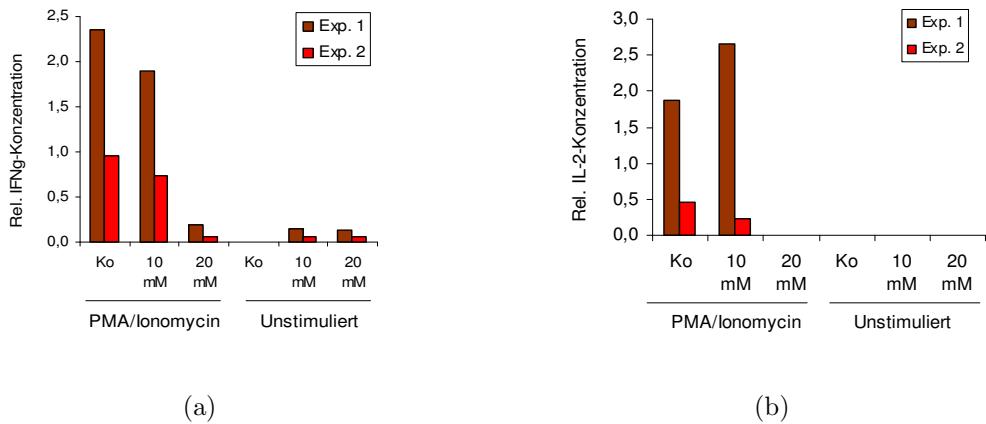
Als nächstes wollten wir untersuchen, warum Milchsäure die Apoptose von T-Zellen induziert. Eine Möglichkeit wäre, dass Milchsäure die Expression des essentiellen Wachstumsfaktors IL-2 supprimiert. Daher wurden Kurzzeitexperimente durchgeführt, da aus anderen Vorarbeiten bekannt war, dass Milchsäure nach kurzer Exposition keine Apoptose induziert (Fischer et al., 2007).

Dazu wurden MNC sowie CD4+ und CD8+ Zellen eingesetzt und in 24-Well-Platten mit je 1 Million Zellen pro Well in T-Zellstimulationsmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit aufsteigenden Konzentrationen Milchsäure inkubiert. Die Stimulation erfolgte mit PMA und Ionomycin für 2,5 Stunden. Als Kontrolle dienten Zellen ohne Stimulus, die mit Milchsäure über den gleichen Zeitraum bei gleichen Verhältnissen inkubiert wurden. Die Zellen wurden lysiert, die RNA wurde aufgereinigt und mittels reverser Transkriptase nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Diese analysierten wir mittels quantitativer Real Time PCR (qRT-PCR).

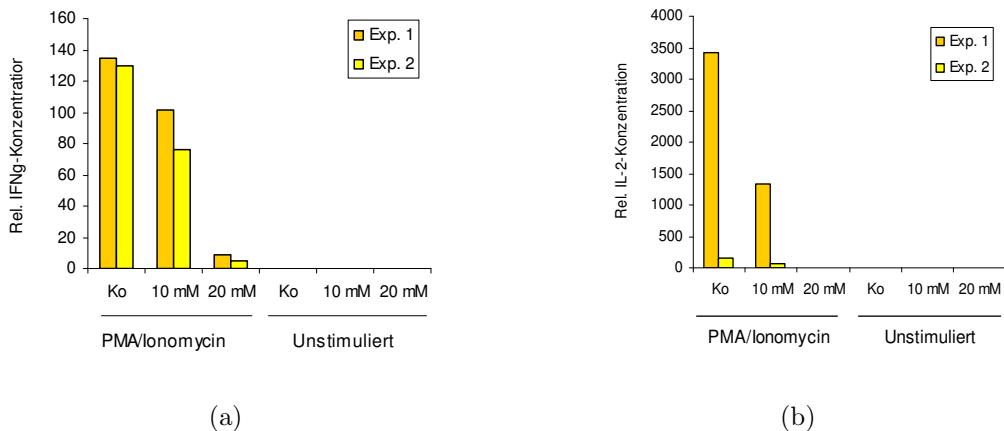
Analog zu den Ergebnissen aus den Proliferationsanalysen konnten wir auch hier eine Inhibition durch 20 mM MS der Transkription sowohl von IFN $\gamma$  als auch von IL-2 feststellen. Bei den unstimulierten Kontrollansätzen war erwartungsgemäß kaum eine Transkription von Zytokinen nachzuweisen.

Bei 10 mM MS zeigten MNC keine Hemmung der Transkription von IL-2 und IFN $\gamma$ . 20 mM MS inhibierten die Transkription beider Zytokine vollständig. Zwischen den beiden Experimenten zeigten sich zwar große Unterschiede, der Trend war jedoch eindeutig.

Bei den CD4+ Zellen war bereits bei 10 mM MS eine Inhibition der Transkription von IFN $\gamma$  und IL-2 feststellbar. Bei hohen Konzentrationen an Milchsäure von



**Abbildung 4.11: Expression der IFN $\gamma$ -mRNA (a) und IL-2-mRNA (b) in MNC.** Die Zellen wurden mit PMA/ Ionomycin stimuliert und gleichzeitig mit MS für 2,5 Stunden inkubiert. Der Kontrollansatz wurde unstimuliert belassen. Nach Aufreinigung der RNA und Reverser Transkription erfolgte die qRT-PCR Analyse. Die Werte wurden mit 18s normalisiert. Dargestellt sind jeweils zwei Experimente mit Zellen eines Spenders.

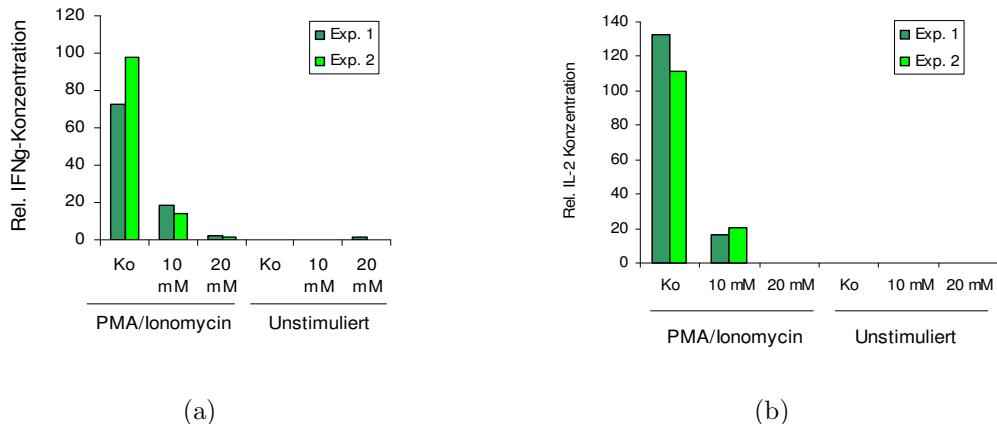


**Abbildung 4.12: Expression der IFN $\gamma$ -mRNA (a) und IL-2-mRNA (b) in CD4+ Zellen.** Die Zellen wurden mit PMA/ Ionomycin stimuliert und gleichzeitig mit MS für 2,5 Stunden inkubiert. Der Kontrollansatz wurde unstimuliert belassen. Nach Aufreinigung der RNA und Reverser Transkription erfolgte die qRT-PCR Analyse. Die Werte wurden mit 18s normalisiert. Dargestellt sind jeweils zwei Experimente mit Zellen eines Spenders.

20 mM erfolgte wiederum eine komplett Inhibition (Abb. 4.12). Auch hier zeigten sich große Unterschiede zwischen beiden IL-2-Experimenten, beide zeigten jedoch das gleiche Resultat.

Im Vergleich zu den CD4+ T-Zellen reagierten die CD8+ Zellen sogar noch empfindlicher auf die Milchsäure. Hier kam es bereits bei Konzentrationen von 10 mM

zu einem starken Abfall der Transkription von  $\text{IFN}\gamma$  und IL-2. Bei 20 mM MS war bei den CD8+ Zellen ebenfalls keine Transkription mehr nachzuweisen (Abb. 4.13). Die CD8+ Zellen reagierten also am sensibelsten auf die Hemmung bezüglich der Zytokinexpression. Hingegen sind MNC insgesamt am unempfindlichsten gegenüber hemmenden Effekten der Milchsäure (Abb. 4.11).

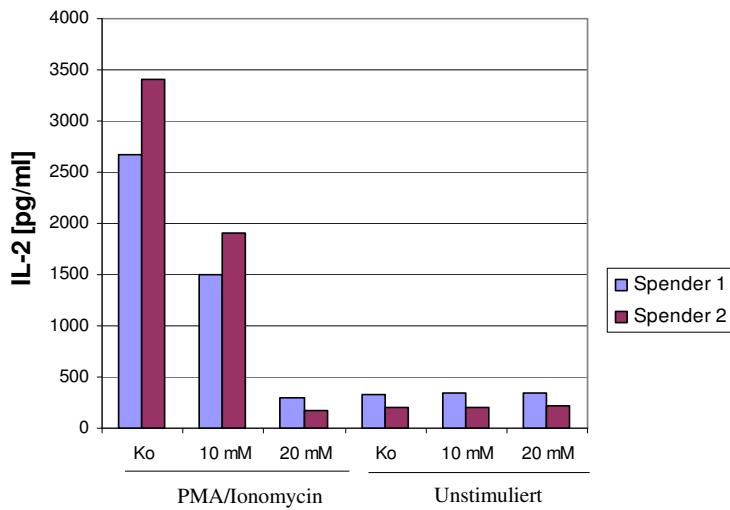


**Abbildung 4.13: Expression der  $\text{IFN}\gamma$ -mRNA (a) und IL-2-mRNA (b) in CD8+ Zellen.** Die Zellen wurden mit PMA/ Ionomycin stimuliert und gleichzeitig mit MS für 2,5 Stunden inkubiert. Der Kontrollansatz wurde unstimuliert belassen. Nach Aufreinigung der RNA und Reverser Transkription erfolgte die qRT-PCR Analyse. Die Werte wurden mit 18s normalisiert. Dargestellt sind jeweils zwei Experimente mit Zellen eines Spenders.

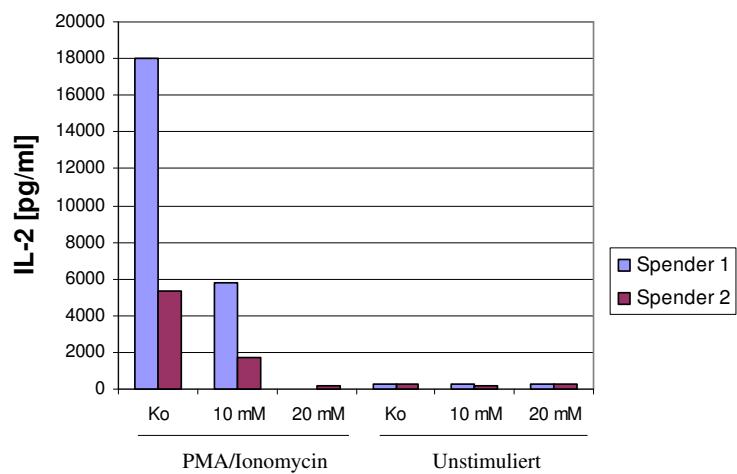
## 4.4 IL-2 von T-Zellen in Zellüberständen nach Inkubation mit Milchsäure

Um unsere Ergebnisse auf Proteinebene zu verifizieren, wurde nun die Ausschüttung der T-Zell-Zytokine in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. Eingesetzt wurden die Überstände der Kulturen aus der RNA-Isolation nach Stimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin bzw die unstimulierten Kontrollen in An- bzw. Abwesenheit von Milchsäure.

Wie zu erwarten kam es bei allen getesteten Zellpopulationen und Spendern zu einem Abfall der Zytokinkonzentration in den Überständen bei ansteigender Milchsäurekonzentration. Zwei Spender wurden getestet und sind im Diagramm dargestellt. Die nicht-stimulierten Zellen wiesen erwartungsgemäß nur eine geringe Produktion der Zytokine auf (Abb 4.14).

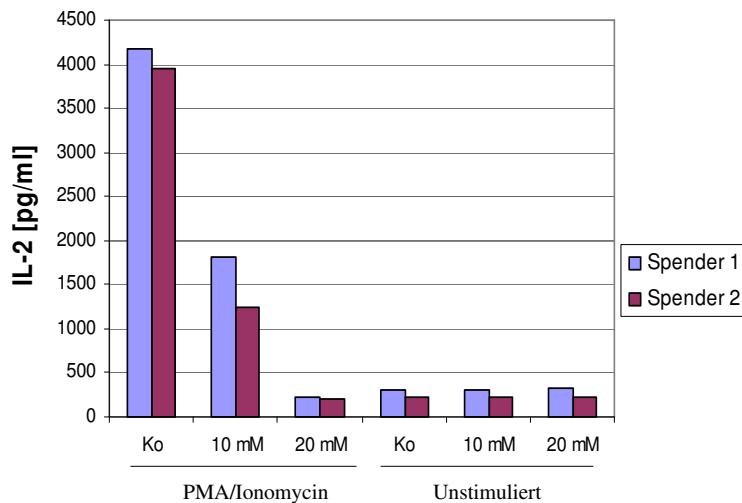


**Abbildung 4.14: Inhibition der IL-2-Sekretion von MNC nach Inkubation mit Milchsäure.** IL-2 wurde mittels ELISA in den Überständen aus den Zellkulturen der RNA-Isolation nach Stimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin und gleichzeitiger Inkubation mit MS für 2,5 h bestimmt.



**Abbildung 4.15: Inhibition der IL-2-Sekretion von CD4+ Zellen nach Inkubation mit Milchsäure.** IL-2 wurde mittels ELISA in den Überständen aus den Zellkulturen der RNA-Isolation nach Stimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin und gleichzeitiger Inkubation mit MS für 2,5 h bestimmt.

Bei den CD4+ Zellen zeigte Spender 1 eine deutlich höhere Produktion an IL-2 im Vergleich zu Spender 2. Beide Zellpopulationen wiesen jedoch den erwarteten Abfall in der Zytokinproduktion auf und zeigten bei 10 mM MS etwa ein Drittel der Zytokinsekretion. Bei 20 mM ließen sich kaum noch Zytokine nachweisen (Abb. 4.15).



**Abbildung 4.16: Inhibition der IL-2-Sekretion von CD8+ Zellen nach Inkubation mit Milchsäure.** IL-2 wurde mittels ELISA in den Überständen aus den Zellkulturen der RNA-Isolation nach Stimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin und gleichzeitiger Inkubation mit MS für 2,5 h bestimmt.

Die CD8+ Zellpopulationen beider Spender zeigten ein ähnliches Verhalten. Auch hier wurde bei ansteigenden Konzentrationen die Ausschüttung beider Zytokine supprimiert (Abb. 4.16).

## 4.5 Proliferation in Abhängigkeit von IL-2

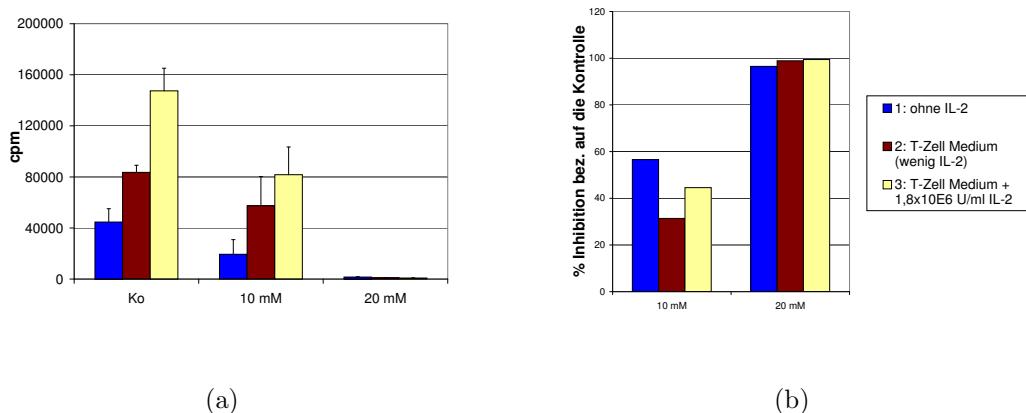
Nachdem wir zeigen konnten, dass Milchsäure sowohl die Ausschüttung als auch die Transkription und Produktion von Zytokinen, insbesondere von IL-2, in einer frühen Phase der T-Zellaktivierung inhibiert, wollten wir testen, ob durch Zugabe von IL-2 der negative Effekt der Milchsäure revertierbar ist.

Hierzu wurde eine erneute Proliferationsbestimmung mit  $^3\text{H}$ -Thymidin durchgeführt. Die Zellkultur erfolgte in T-Zellstimulationsmedium, das wenig IL-2 enthält, sowie in T-Zellstimulationsmedium mit zusätzlicher Gabe von  $1,8 \times 10^6$  U/ml IL-2.

Als Kontrolle diente eine Population in Kulturmedium ohne IL-2. Alle Zellen wurden mit CD3 und CD28 AK stimuliert. Die Zellen wurden in 96-Well-Rundbodenplatten mit je 78000 Zellen pro Well für 5 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Milchsäure wurde beim ersten Experiment sofort dazugegeben, beim zweiten Experiment erst nach 4 Tagen Inkubation. Dargestellt ist hier die prozentuale Inhibition bezogen auf die Kontrolle.

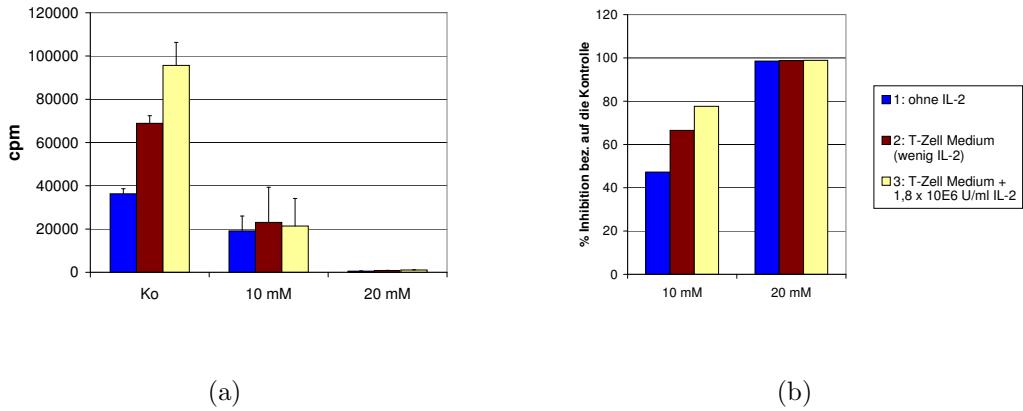
#### 4.5.1 MNC

Es zeigte sich, dass die MNC tatsächlich stärker proliferierten, je höher die Konzentration von IL-2 im Medium war. Jedoch ging die Proliferation bei allen Ansätzen bereits bei 10 mM MS deutlich zurück.



**Abbildung 4.17: Proliferation der MNC in Abhängigkeit von IL-2.** Die Milchsäure wurde sofort für 5 Tage zugegeben. Alle Zellen wurden mit AK-stimuliert. Zu Ansatz „1“ wurde kein IL-2 zugegeben. Bei Ansatz „2“ wurden die Zellen in T-Zellstimulationsmedium (enthält IL-2) inkubiert. Zu Ansatz „3“ wurde zu T-Zellstimulationsmedium  $1,8 \times 10^6$  U/ml IL-2 zugesetzt. In (a) ist die Proliferation der Zellen in Abhängigkeit von IL-2 in counts per minute (cpm) dargestellt. In (b) wird die relative Wachstumshemmung bezogen auf die Kontrolle bei 10 mM und 20 mM gezeigt. Dargestellt sind  $n = 4$  Ansätze in einem Experiment.

Bei 20 mM fand auch bei hohen Konzentrationen von IL-2 im Medium keine Proliferation mehr statt und die Inhibition lag bei annähernd 100 % (Abb. 4.17). Ein hoher IL-2 Spiegel im Milieu der Zellen konnte also auch bei hohen Konzentrationen Milchsäure den Effekt nicht revertieren.



**Abbildung 4.18: Proliferation der MNC in Abhängigkeit von IL-2.** Die MS wurde nach 4 Tagen für 24 h zugegeben. Alle Zellen wurden mit AK-stimuliert. Zu Ansatz „1“ wurde kein IL-2 zugegeben. Bei Ansatz „2“ wurden die Zellen in T-Zellstimulationsmedium (enthält IL-2) inkubiert. Zu Ansatz „3“ wurde zu T-Zellstimulationsmedium  $1,8 \times 10^6$  U/ml IL-2 zugesetzt. In (a) ist die Proliferation der Zellen in Abhängigkeit von IL-2 in counts per minute (cpm) dargestellt. In (b) wird die relative Wachstumshemmung bezogen auf die Kontrolle bei 10 mM und 20 mM gezeigt. Dargestellt sind  $n = 4$  Ansätze in einem Experiment.

#### 4.5.2 CD4+ und CD8+ Zellen

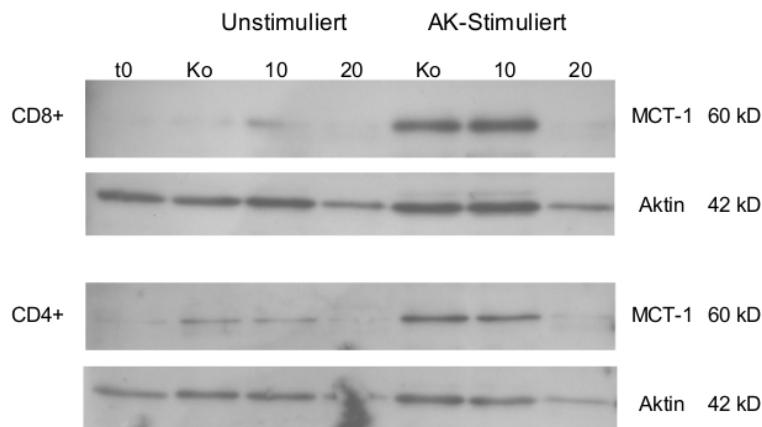
Bei isolierten CD4+ und CD8+ Zellen konnte die Zugabe von IL-2 zum Medium die nachteiligen Effekte der Milchsäure ebenfalls nicht aufheben. Die Zellen verhielten sich ähnlich wie die MNC. Auch in Kurzzeitexperimenten mit Inkubation der Zellen von nur 24 Stunden mit Milchsäure konnten die Effekte nicht revertiert werden (keine Abbildungen).

### 4.6 MCT-1-Expression

Unsere nächste Überlegung galt dem Mechanismus der Milchsäurewirkung auf T-Zellen. Zytotoxische T-Zellen haben einen hohen Energiebedarf, den sie außer durch die Atmungskette auch mit einer hohen Rate an Glykolyse decken, wobei Milchsäure anfällt, die von den Zellen ausgeschleust werden muss, um die glykolytische Aktivität zu erhalten (Cham und Gajewski, 2005; Frauwirth und Thompson, 2004). In Vorexperimenten war bereits Milchsäure im Überstand von exponentiell wachsenden CTL nachgewiesen worden. Daher untersuchten wir die Expression von Laktattransportern sowie eine mögliche Aufnahme der Milchsäure in T-Zellen.

Im Metabolismus der T-Zellen spielt das Transportprotein MCT-1 als Kotransporter von Laktat und Protonen bei der Ausschleusung von Milchsäure aus der Zelle

eine zentrale Rolle (Murray et al., 2005). In Vorversuchen konnte MCT-1 bis MCT-4 in Melan-A-spezifischen CTL nachgewiesen werden und wir untersuchten nun die MCT-Expression von T-Zellen in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus sowie der Milchsäure-Exposition.

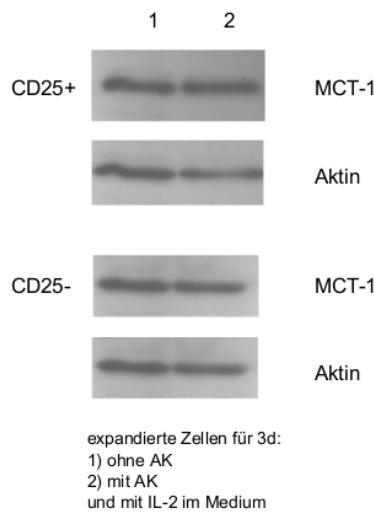


**Abbildung 4.19: Analyse der MCT-1-Expression in CD4+ und CD8+ Zellen zum Zeitpunkt 0 und nach Inkubation über 4 Tage.** Die Stimulation der Zellen erfolgte mit CD3/CD28 Antikörper (AK-Stimuliert) bei gleichzeitiger Zugabe von Milchsäure. Unstimulierte T-Zellen sind als Kontrolle dargestellt. Die Zellen wurden an Tag 0 und Tag 4 lysiert und eine Western Blot Analyse wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen MCT-1 durchgeführt. Die Proteinbeladung wurde mittels Aktin-Färbung kontrolliert.

Eingesetzt wurden frische CD8+ und CD4+ Zellen zum Zeitpunkt 0 nach Aufreinigung sowie nach Kultur für 4 Tage im Brutschrank mit und ohne Stimulus durch AK bei gleichzeitiger Zugabe der jeweiligen Konzentration Milchsäure. Weiterhin wurden wieder CD4+/CD25+ und CD4+/CD25- Zellen eingesetzt, die über einige Wochen kultiviert worden waren. Die Inkubation der Zellen erfolgte erneut in 96-Well-Rundbodenplatten mit je 78000 Zellen pro Well in T-Zellstimulationsmedium im Brutschrank. Ein Teil der Zellen wurde für 4 Tage mit AK stimuliert, ein Teil wurde als Kontrolle ohne Stimulus eingesetzt.

Bei den CD4+ sowie bei den CD8+ Zellen zeigte sich eine deutliche Induktion der MCT-1-Expression nach Stimulation der Zellen (s. Abb. 4.19). Beide Populationen zeigten auch unstimuliert eine geringe Expression des MCT-1. Bei 20 mM konnten wir keine nennenswerte Expression des MCT-1 mehr nachweisen, was durch die hohe Apoptoserate erklärbar ist, wie man auch an der schwachen Expression von Aktin in diesen Ansätzen erkennen kann.

Die Ergebnisse sowohl der CD25+ als auch der CD25- Zellen zeigten keinen nennenswerten Unterschied im Ausmaß der Expression des MCT-1 im Vergleich



**Abbildung 4.20: Analyse der MCT-1-Expression in CD4+CD25+ und CD4+CD25- Zellen zum Zeitpunkt 0 und nach Inkubation über 4 Tage.** Die Stimulation der Zellen erfolgte mit CD3/CD28 Antikörper (AK-Stimuliert) bei gleichzeitiger Zugabe von Milchsäure. Unstimulierte T-Zellen sind als Kontrolle dargestellt. Die Zellen wurden an Tag 0 und Tag 4 lysiert und eine Western Blot Analyse wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen MCT-1 durchgeführt. Die Proteinbeladung wurde mittels Aktin-Färbung kontrolliert. Die eingesetzten Zellen waren vorher bereits über einige Wochen expandiert worden.

von unstimulierten und stimulierten Zellen. Diese Zellen waren jedoch vorher über einige Wochen stimuliert und expandiert worden, was einer konstanten Aktivierung entspricht (s. Abb. 4.20).

## 4.7 Laktataufnahme in verschiedenen T Zellpopulationen

Da aktivierte T-Zellen also MCT-1 exprimieren sind sie potentiell dazu in der Lage, Laktat aufzunehmen oder abzugeben. Da der Transport passiv in Abhängigkeit vom Laktatgradienten erfolgt, sollte somit die Zugabe von Milchsäure in hoher Konzentration zu einer Aufnahme in die Zelle führen. Um diese Laktataufnahme auch quantitativ zu bestimmen, wurde eine Messung mittels Massenspektrometrie durchgeführt.

Untersucht wurde die Aufnahme von markiertem Laktat (Laktat-<sup>13</sup>C) in die Zellen bei neutralem und saurem pH, da der Transport des Laktatanions durch MCT-1 im Kotransport mit Protonen erfolgt. Als Kontrollen wurden die Zellen ohne Laktat in neutralem Medium sowie bei alleiniger pH-Änderung gemessen.

Wir setzten frische CD4+ und CD8+ Zellen ein, die für 1 Tag bzw. für 7 Tage durch Antikörper stimuliert worden waren. Für die Messung nach einem Tag wurden die Zellen in eine 12-Well-Platte gegeben mit je 1,5 Millionen Zellen pro Well und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Für die Messung nach 7 Tagen wurden 96-Well-Rundbodenplatten mit CD3/CD28 Antikörpern beschichtet um eine Stimulation der Zellen zu erreichen und 78000 Zellen pro Well eingesetzt. Die Inkubation erfolgte auch hier wieder im T-Zellstimulationsmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

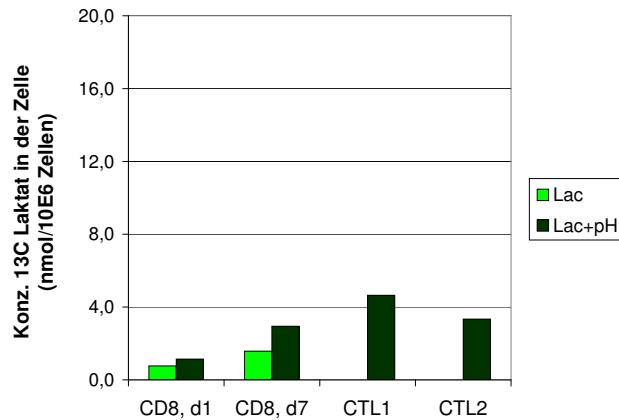
Außerdem wurden erneut CD4+/CD25+ und CD4+/CD25- Zellen, die vorher für einige Wochen stimuliert worden waren, in den Versuch eingesetzt, genauso wie über einige Wochen expandierte CTL.

30 Minuten vor der Messung wurden dann zu einem Ansatz Na-Laktat, zu einem Ansatz HCl und zu einem Ansatz beide Substanzen zugegeben. So konnten wir Unterschiede in der Laktat-Aufnahme ohne und mit pH-Änderung bestimmen sowie Auswirkungen einer reinen pH-Änderung analysieren. Der letzte Ansatz wurde als Kontrolle ohne Zusatz belassen.

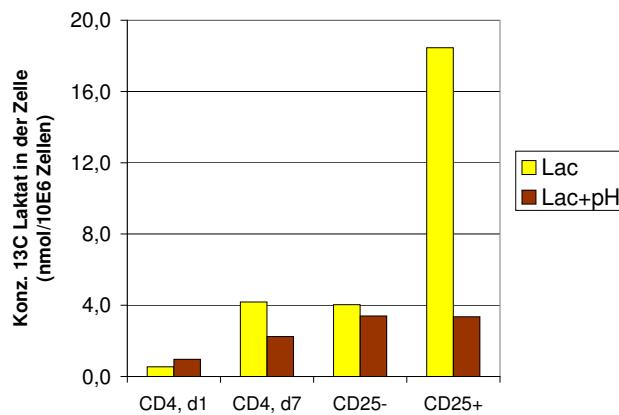
Die Zellen wurden mittels Methanol-Chloroform-Extraktion aufgearbeitet und mittels Sonifikation lysiert. In der Zentrifuge erfolgte bei 20000g (4300 rpm) über 30 Minuten bei 4 °C die Phasentrennung. Die Fettphase, entsprechend den zerstörten Zellmembranen wurde verworfen, mit der Methanol- und der Chloroformphase wurde die Massenspektrometrie durchgeführt. Analyse und Auswertung der Massenspektrometrie wurden freundlicherweise von Dr. Kathrin Renner im Institut für Funktionelle Genomik durchgeführt.

Abb. 4.21 zeigt, dass alle CD8+ Zellen Laktat aufnehmen. Jedoch gab es sowohl bei frisch isolierten CD8+ Zellen als auch bei länger kultivierten Zellen deutliche Unterschiede in der Aufnahme in Abhängigkeit vom pH. In saurem pH wurde deutlich mehr Laktat aufgenommen als in neutralem pH. Es zeigte sich auch ein Anstieg der Laktataufnahme in Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation. Die expandierten CTL nahmen im Vergleich am meisten Laktat auf, jedoch nur in saurem pH. Bei der Messung ohne pH-Änderung ließ sich keine erkennbare Aufnahme nachweisen.

Die CD4+ Zellen unterschieden sich von den CD8+ Zellen im Hinblick auf die Laktataufnahme. Die Aufnahme war tendentiell höher. Es erfolgte keine stärkere Aufnahme von Laktat bei saurem pH. CD25+ Zellen zeigten die insgesamt stärkste Aufnahme von Laktat in neutralem pH. (Abb. 4.22).



**Abbildung 4.21: Massenspektrometrische Analyse der Laktataufnahme in CD8+ Zellen.** Messung der frisch isolierten Zellen an Tag 1 und an Tag 7 nach 7-tägiger Stimulation mit Antikörpern. Zusätzlich wurden CTL von 2 Spendern nach mehrwöchiger Stimulation untersucht. Nach Zugabe von Na-Laktat und Anwesenheit („Lac+pH“) bzw. Abwesenheit („Lac“) von HCl für 30 Minuten wurden die Zellen lysiert und mittels Massenspektrometrie analysiert. Angabe der Konzentration des intrazellulären Laktats in nmol/10<sup>6</sup> Zellen.



**Abbildung 4.22: Massenspektrometrische Analyse der Laktataufnahme in CD4+ Zellen.** Messung der frisch isolierten Zellen an Tag 1 und an Tag 7 nach 7-tägiger Stimulation mit Antikörpern. Zusätzlich wurden CD 25+ und CD25- Zellen nach mehrwöchiger Stimulation untersucht. Nach Zugabe von 11,3 µl/ml Na-Laktat und Anwesenheit („Lac+pH“) bzw. Abwesenheit („Lac“) von 30 µl/ml HCl für 30 Minuten wurden die Zellen lysiert und mittels Massenspektrometrie analysiert. Angabe der Konzentration des intrazellulären Laktats in nmol/10<sup>6</sup> Zellen.

# Kapitel 5

## Diskussion

### 5.1 Tumormetabolismus

Trotz Infiltration der Tumoren durch CTL und andere Effektorzellen des Immunsystems, leidet eine große Anzahl Patienten an den unterschiedlichsten Manifestationen von Tumorerkrankungen. Und auch die Immuntherapie, die sich das körpereigene Immunsystem durch Impfung mit dem Tumoraligen oder durch Infusion tumor-spezifischer Lymphozyten zu Nutze macht, führt bisher nur in Einzelfällen zur Regression des Tumors (Lee et al., 1999; Turcotte et al., 2011). Für Tumore stellt die Sekretion bestimmter Metabolite einen möglichen Mechanismus dar, dem Immunsystem des Körpers zu entgehen. Verschiedene Stoffwechselwege im Tumor sind verändert und die daraus resultierenden Metabolite modulieren in verschiedener Weise die Immunantwort.

Neben verschiedenen anderen Veränderungen im Tumormetabolismus ist die aerobe Glykolyse der Tumorzellen, nach ihrem Entdecker als Warburg-Effekt benannt, die Ursache einer hohen Laktatanreicherung im Tumormilieu (Walenta und Mueller-Klieser, 2004).

Die hohe Glukoseaufnahme von Tumoren ist auch die Grundlage für den erfolgreichen Einsatz der PET zum Nachweis des Tumormetabolismus in der Diagnostik. Ein frühzeitiger Nachweis eines Hochrisikotumors oder eines Karzinoms mit niedrigem Risiko ist möglich und die darausfolgenden Therapiemöglichkeiten können individuell auf den Patienten und sein Risikoprofil abgestimmt werden (Haioun et al., 2005). Durch Veränderungen im Tumormetabolismus können das Ansprechen auf die Therapie, die Prognose und ein möglicher Rückfall vorausgesagt werden (Ott et al., 2006). Die PET, die den Glukosemetabolismus bildhaft darstellt, ist dabei eine präzisere Methode und liefert exaktere Vorhersagewerte als die CT, die lediglich Veränderungen in der Tumorgröße sichtbar machen kann.

Der verstärkte Glukose-Metabolismus in Tumoren ist also schon seit langem bekannt und wird auch bereits diagnostisch genutzt. Im Gegensatz zu anderen Stoffwechselwegen (bspw. dem Aminosäuremetabolismus von Arginin und Tryptophan) sind jedoch noch kaum Untersuchungen zu den Auswirkungen des Glukosemetabolismus auf das Immunsystem vorhanden. Lediglich die Auswirkungen auf myeloide Zellen wurden bereits erforscht. So konnte bspw. gezeigt werden, dass Milchsäure im Tumor den Phänotyp sowie die Antigenpräsentation von dendritischen Zellen verändert (Gottfried et al., 2006). Shime et al. konnten nachweisen, dass Milchsäure dosisabhängig die Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-23 induziert (Shime et al., 2008). Dietl et al. konnten erst kürzlich zeigen, dass Milchsäure im Tumormilieu die TNF-Ausschüttung durch Monozyten hemmt (Dietl et al., 2010). Daher wollten wir in dieser Arbeit die Effekte von Milchsäure auf T-Zellen näher untersuchen.

## 5.2 Einfluss von Milchsäure auf T-Zellen

### 5.2.1 Inhibition der Proliferation verschiedener T-Zellpopulationen durch Milchsäure

Im Vorfeld konnte bereits gezeigt werden, dass Milchsäure die Fähigkeit zur Antigenpräsentation in dendritischen Zellen verändert (Gottfried et al., 2006). Unsere Ergebnisse der Proliferationsbestimmung als typischem Marker für T-Zellaktivierung mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin und CFSE erweitern diese Befunde. Zunächst wurde eine gemischte Zellpopulation (MNC) eingesetzt und es zeigte sich, dass nach 10 mM eine leichte Inhibition der Proliferation nachzuweisen war. Bei 20 mM war kein Zellwachstum mehr festzustellen. Das Salz Na-Laktat hatte hingegen keinerlei Effekt auf die Proliferation und aus Vorarbeiten war bekannt, dass ein azidotischer pH lediglich geringe Auswirkungen auf das Zellwachstum verursacht (Fischer et al., 2007).

Anschließend wurden mit CD4+ und CD8+ Zellen verschiedene T-Zellsubpopulationen eingesetzt. Tendenziell reagieren beide Populationen ähnlich wie die MNC. Weiterhin untersuchten wir verschiedene CD4-Subpopulationen, CD25+ und CD25-Zellen. Die CD25+ (T-regulatorische Zellen,  $\text{T}_{\text{reg}}$ ) erwiesen sich tendenziell am stabilsten gegenüber einer Exposition mit Milchsäure.

Bisher waren in der Literatur noch keine Daten zur Auswirkung von Milchsäure auf die Proliferation von T-Zellen vorhanden. Bei humanen T-Zellen zeigten Feder-Mengus et al., dass 20 mM Milchsäure die IFN-Produktion sowie die Fähigkeit zur Antigenerkennung von humanen CTL hemmt, d.h. es wurde ebenfalls eine Hemmung

der Aktivierung nachgewiesen (Feder-Mengus et al., 2007).

### **5.2.2 Induktion von Apoptose durch Milchsäure**

Aufgrund der starken Effekte von Milchsäure auf die Aktivierung bzw. Proliferation von T-Zellen untersuchten wir, ob eine längere Inkubation mit Milchsäure zur Apoptose-Induktion führt. CD4+ und CD8+ Zellen erwiesen sich hierbei als sehr sensibel. Nach einer Inkubation über 6 Tage mit 20 mM Milchsäure waren über 90% der T-Zellen in Apoptose. Daher gehen wir davon aus, dass die Effekte von Milchsäure nach Langzeitinkubation über mehrere Tage weitgehend auf der Induktion der Apoptose von T-Zellen beruhen. Dies ist durchaus relevant für die Tumorsituation, da auch im Tumormilieu Laktat-Konzentrationen von 20 mM nachgewiesen wurden (Walenta et al., 2004; Fischer et al., 2007). Weiterführende Experimente bewiesen jedoch, dass die inhibitorische Wirkung von Milchsäure auf die Zytokinproduktion in CTL reversibel ist. Nach einer Inkubationszeit von 24 h in milchsäurefreiem Medium gewannen sie ihren ursprünglichen Phänotyp zurück (Fischer et al., 2007).

CD4+/CD25+ Zellen zeigten sich resistenter gegenüber Milchsäure, was auch die Hypothese bestätigt, dass Milchsäure vor allem auf stark proliferierende Zellen inhibitorisch wirkt, da nur diese Zellen in aktiviertem Zustand verstärkt den Laktat-Transporter MCT-I exprimieren (Sommer et al., 1994). Regulatorische T-Zellen finden sich gehäuft in Tumoren, die sie infiltrieren und regulieren dort das Immunsystem herunter, indem sie u.a. die CTL funktionell hemmen (Seo et al., 2001). Da sie resistenter gegen Milchsäure sind, können sie im Tumormilieu noch in ihren Funktionen aktiv sein und die Immunantwort supprimieren (Beyer und Schultze, 2006).

### **5.2.3 Suppression der Zytokin-Expression durch Milchsäure**

Auf der Suche nach dem zugrunde liegenden Mechanismus für die Induktion der Apoptose wurde IL-2 als wichtiger parakriner Wachstumsfaktor untersucht. Wir führten eine Kurzzeitinkubation mit Milchsäure über 2,5 h durch, da die Zellen bei kurzer Inkubation nicht apoptotisch werden. Wir konnten sowohl in den Zellüberständen im ELISA auf Proteinebene als auch auf RNA-Ebene in der qRT-PCR nachweisen, dass die Expression von IL-2 in allen Zellpopulationen gehemmt wird.

Dagegen zeigten Roth und Dröge, dass das Natriumsalz der Milchsäure, Na-Laktat, die IL-2-Sekretion von CD4-Zellen steigert (Roth und Dröge, 1991). Hierbei handelte es sich jedoch um Maus-Zellen, also ein komplett anderes Zellmodell,

die mit PHA stimuliert wurden. Unsere Ergebnisse zeigten, dass Na-Laktat keine immuninhibitorischen Wirkungen bei humanen T-Zellen hat. Allerdings führte Na-Laktat auch nicht zu einer Stimulation.

Auch die Expression von  $IFN\gamma$  wurde durch Milchsäure gehemmt. Man konnte hier bereits bei 10 mM MS einen starken Rückgang, insbesondere bei CD8+ T-Zellen, nachweisen. Auch Feder-Mengus et al. konnten eine Abnahme in der Expression von  $IFN\gamma$  in CTL in einem 3D-Tumormodell nachweisen (Feder-Mengus et al., 2007).

Unsere nächste Übelegung galt der Frage, ob ein Zusatz von IL-2 die negativen Effekte der Milchsäure revertieren könnte, da IL-2 ein wichtiger parakriner Wachstumsfaktor für T-Zellen ist. Eine Proliferationsbestimmung mit steigenden Konzentrationen IL-2 zeigte jedoch, dass bei hohen Konzentrationen Milchsäure von 20 mM auch das künstlich zugesetzte IL-2 die negativen Wirkungen der Milchsäure nicht ausgleichen konnte. Der Mangel an IL-2 ist also nicht für die Apoptoseinduktion verantwortlich.

#### **5.2.4 Untersuchung des Laktat-Transporters**

Nachdem wir zeigen konnten, dass der IL-2-Mangel nicht der Grund für die fehlende Proliferation bzw. die Apoptoseinduktion ist, suchten wir weiter nach dem zugrunde liegenden Mechanismus. Da expandierende T-Zellen einen hohen Energiebedarf haben, führen sie selber Glykolyse in hohem Ausmaß durch, um ihren enormen Energiebedarf für Zellwachstum und Proliferation zu decken. Dadurch fällt intrazellulär Milchsäure an, die die Zellen im Konzentrationsgradient nach außen abgeben, um die Glykolyse aufrecht zu erhalten (Cham und Gajewski, 2005; Frauwirth und Thompson, 2004). Murray konnte zeigen, dass eine Blockade des MCT-1 in T-Zellen zur Inhibition der Aktivierung führt (Murray et al., 2005).

Unsere Hypothese war nun, dass der Milchsäuretransport durch Zugabe von exogenem Laktat gestört wird, da sich der Gradient umkehrt und dadurch Milchsäure in die Zelle aufgenommen wird. Hierdurch kommt die Glykolyse zum Erliegen, was den Zelltod induziert, da den T-Zellen die energetische Grundlage entzogen wird.

Zur Abgabe und Aufnahme von Milchsäure bzw. Laktat exprimieren aktivier- te T-Lymphozyten den Monocarboxylat-Transporter MCT-1. Dieser transportiert Laktat zusammen mit  $H^+$  in beide Richtungen entsprechend dem Konzentrationsgradienten (Sommer et al., 1994; Halestrap und Price, 1999). Der Nachweis dieses Transporters gelang uns mittels Western Blot in stimulierten Zellen unabhängig von der Milchsäurekonzentration. Die Tatsache, dass bei Konzentrationen von 20 mM MS keine Expression des Transportproteins feststellbar war, lässt sich vor allem darauf zurückführen, dass bei dieser hohen Konzentration der Großteil der Zellen bereits

apoptotisch geworden ist. In unstimulierten Zellen war der Transporter hingegen kaum nachweisbar, er wurde also erst durch Aktivierung hochreguliert.

Dies stimmt auch mit Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (Sommer et al., 1994; Murray et al., 2005) überein, die besagen, dass die Laktataufnahme von der Aktivierung der Lymphozyten abhängig ist. Die MCT-Expression in aktivierten T-Zellen bedeutet also, dass Laktat grundsätzlich in die Zelle aufgenommen werden kann. In weiteren Untersuchungen wurde analysiert inwieweit Laktat tatsächlich aufgenommen wird.

### **5.2.5 Quantifizierung der Laktataufnahme**

Um die Laktataufnahme quantifizieren zu können, wurden eine massenspektrometrische Analysen mit  $^{13}\text{C}$ -Laktat durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass alle untersuchten T-Zellen Laktat aufnehmen können. Zudem war ein deutlicher Unterschied zwischen CD8+ und CD4+ Zellen nachweisbar. Während CD8+ Zellen v.a. Laktat in saurem Milieu in Abhängigkeit von ihrem Stimulationsgrad aufnahmen, zeigten CD4+ Zellen den Peak bei ihrer Aufnahme in neutralem pH. Vor allem die CD4+/CD25+ Zellen wiesen eine deutliche Anreicherung von intrazellulärem Laktat in neutralem Milieu auf. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Arbeiten (Sommer et al., 1994; Murray et al., 2005) zeigten frisch isolierte unstimulierte T-Zellen kaum eine Aufnahme von Laktat.

Unsere Schlussfolgerung ist somit, dass stimulierte T-Zellen exogene Milchsäure aufnehmen. Hierdurch wird die Glykolyse blockiert und dadurch eine Hemmung der Aktivierung bzw. eine Induktion der Apoptose ausgelöst. In weiteren Arbeiten unserer Gruppe konnte die Blockade der Glykolyse durch Milchsäure in Monozyten nachgewiesen werden (Dietl et al., 2010). Bei B-Zellen konnte außerdem gezeigt werden, dass selbst in Anwesenheit ihres Wachstumsfaktors IL-4 eine Blockade der Glykolyse die Apoptose der Zellen verursacht (Dufort et al, 2007). Darüberhinaus ist z.B. auch die IFN-Produktion von Maus T-Zellen vom Glukosestoffwechsel abhängig (Cham und Gajewski, 2005). Eine Blockade des Laktattransports blockiert folglich die Glykolyse und hemmt dadurch die Aktivierung der T-Zellen.

## **5.3 Klinische Relevanz durch neue Ansätze in der Therapie**

Unsere Erkenntnisse könnten zu neuen Therapieansätzen führen, da auch in der Literatur zunehmend diskutiert wird, Glykolysehemmer einzusetzen, um das Tu-

morwachstum zu kontrollieren. Da durch Glykolysehemmstoffe wie 2-Deoxyglukose und 3-BrPA eine komplette Remission im Tiermodell erzielt werden konnte (Ko et al., 2004), stellt sich die Frage, ob dies teilweise auch auf einer Reaktivierung der Immunantwort beruhen könnte. Hierbei könnte durch die Glykolysehemmung die Sekretion von Milchsäure so deutlich zurückgehen, dass eine Immunantwort innerhalb des Tumors ermöglicht wird. Die wieder-funktionstüchtigen CTL sind dann in der Lage, die entarteten Zellen abzutöten und somit den Tumor zu bekämpfen.

Als weiterer Ansatz wäre auch eine Neutralisierung des pH z.B. durch Bicarbonat denkbar, da die Lymphozyten nach einem Ausgleich der Azidose auch in Anwesenheit von Na-Laktat ihre Funktionen zurückgewinnen, wie Mendler et al. zeigen konnte (Mendler et al, 2012).

Durch Glykolyse-inhibierende Substanzen (Zhu et al., 2005) wird die Proliferation der Tumorzellen gehemmt. Daher stehen möglicherweise auch den T-Lymphozyten lebenswichtige Substrate wie z.B. Arginin und Tryptophan wieder zur Verfügung. Diese erhöhen wiederum die Funktionalität der Immunzellen, die dadurch wieder in einen aktiven Zustand versetzt werden und ihre Aufgaben wieder ausführen können.

Interessanterweise sind regulatorische T-Zellen scheinbar resistenter gegenüber Milchsäure und CD8+ T-Zellen sehr sensibel. Dies könnte die Anreicherung von  $T_{reg}$  in manchen Tumoren erklären. In vielen Tumoren ist sowohl die Zahl als auch die Funktion der regulatorischen T-Zellen erhöht (Strauss et al., 2009). Michalek et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass Metabolismus und T-Zelldifferenzierung eng zusammenhängen (Michalek et al, 2011). Wenn CD4+ T-Zellen ein hohes Glukoseangebot vorfinden, differenzieren sie sich vorwiegend zu Effektor-T-Zellen ( $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ,  $T_{H17}$  CD4+ T-Zellen).  $T_{regs}$  zeigten sich weit weniger abhängig vom Glukosemetabolismus und gewannen ihre Energie über Lipidoxidation (Michalek et al, 2011). Daher können T-Zellen auch in Tumoren, die viel Glukose verbrauchen, überleben, da sie auf andere Substrate ausweichen können.

Die hier vorliegenden Ergebnisse müssen in weiterführenden Versuchen überprüft werden. Vor allem die Auswirkungen des Glukosemetabolismus der Tumoren auf T-regulatorische Zellen könnte überaus interessante Ergebnisse auch für zukünftige Therapieansätze liefern, da diese Zellen ein wichtiger Mediator der Immunantwort sind und eine große Rolle in der Inhibition der Immunantwort auf Tumore spielen.

# Kapitel 6

## Zusammenfassung

Die Immunreaktion im Tumormilieu wird unter anderem vom Metabolismus der Tumorzellen beeinflusst. Neben dem Aminosäuremetabolismus spielt auch der Glukosestoffwechsel eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Immunantwort. Diese Arbeit zeigt, dass das Stoffwechselprodukt Milchsäure die Proliferation von MNC, CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten sowie CD4+/CD25+ und CD4+/CD25- Zellen hemmt und sie bei hohen Konzentrationen sogar in die Apoptose treibt. Hierbei zeigten sich die CD25+ T-Lymphozyten am wenigsten sensibel gegenüber der Milchsäure, die CD8+ Zellen am empfindlichsten. Auch die Transkription und Ausschüttung wichtiger Zytokine wie IL-2 und IFN $\gamma$  wird inhibiert, wie wir in der qRT-PCR sowie im ELISA nachweisen konnten. Selbst im IL-2-reichen Milieu konnten MNC und T-Zellen in Gegenwart von Milchsäure nicht zum Wachstum anregt werden, wie unsere Proliferationsbestimmungen zeigten. Weiterhin konnten wir zeigen, dass sowohl HCl wie auch Natrium-Laktat keinen Einfluss auf die Wachstumsrate der Zellen hatten.

Die Zellen exprimieren im aktivierte Stadium MCT-I, ein Transportprotein für bidirektionale, konzentrationsabhängigen Transport von organischen Anionen, wie wir mittels Western Blot nachweisen konnten. Über Monocarboxylattransporter wird Milchsäure von allen untersuchten T-Lymphozyten in die Zellen aufgenommen, wenn im Extrazellulärraum der Milchsäurespiegel deutlich erhöht ist und der Konzentrationsgradient in das Zellinnere gerichtet ist, wobei hier CD4+/CD25+ Zellen die größte Aufnahme zeigten, wie mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnte.

Unsere Hypothese ist daher, dass der Glukosemetabolismus der Tumoren eine Form des „Immune Escape“ darstellt. Die in die Zellen aufgenommene Milchsäure verhindert Proliferation und Funktion der immunologischen Effektorzellen und führt deren Apoptose herbei. Dieser Mechanismus stellt einen vielversprechenden Angriffs-

punkt für zukünftige Therapieformen dar.

# Literaturverzeichnis

- Airley, R., Lancaster, J., Davidson, S., Bromley, M., Roberts, S., Patterson, A., Hunter, R., Stratford, I., and West, C. (2001). Glucose transporter glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res*, 7(4):928–934.
- Aghaee, F., Islamian J. P., Baradaran, B. (2012). Enhanced radiosensitivity and chemosensitivity of breast cancer cells by 2-deoxy-d-glucose in combination therapy. *J Breast Cancer*, 15(2):141–147.
- Ashrafian, H. (2006). Cancer's sweet tooth: the janus effect of glucose metabolism in tumorigenesis. *Lancet*, 367(9510):618–621.
- Beyer, M. and Schultze, J. L. (2006). Regulatory t cells in cancer. *Blood*, 108(3):804–811.
- Boasso, A., Herbeuval, J.-P., Hardy, A. W., Winkler, C., and Shearer, G. M. (2005). Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-trna-synthetase by cta-4-fc in human cd4+ t cells. *Blood*, 105(4):1574–1581.
- Bogdan, C. (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2(10):907–916.
- Brepoels, L. and Stroobants, S. (2008). Pet scanning and prognosis in hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Oncol*, 20(5):509–516.
- Bronte, V., Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F., and Viola, A. (2005). Boosting antitumor responses of t lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J Exp Med*, 201(8):1257–1268.
- Bronte, V. and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by l-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*, 5(8):641–654.

- Cairns, R. A., Harris, I. S., Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, 2(2): 85–95.
- Cerfolio, R. J., Bryant, A. S., Winokur, T. S., Ohja, B., and Bartolucci, A. A. (2004). Repeat fdg-pet after neoadjuvant therapy is a predictor of pathologic response in patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 78(6):1903–9; discussion 1909.
- Cham, C. M. and Gajewski, T. F. (2005). Glucose availability regulates ifn-gamma production and p70s6 kinase activation in cd8+ effector t cells. *J Immunol*, 174(8):4670–4677.
- Cheng, P. N. M., Leung, Y. C., Lo, W. H., Tsui, S. M., and Lam, K. C. (2005). Remission of hepatocellular carcinoma with arginine depletion induced by systemic release of endogenous hepatic arginase due to transhepatic arterial embolisation, augmented by high-dose insulin: arginase as a potential drug candidate for hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 224(1):67–80.
- Clifton, G. T. (2009). Overcoming cancer immune tolerance and escape. *Clinical Cancer Research*, 15(3):749.
- Costa Leite, T., Da Silva, D., Guimarães Coelho, R., Zancan, P., Sola-Penna, M. (2007). Lactate favours the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochem J*, 408(1):123–130.
- Demanet, C. (2004). Down-regulation of hla-a and hla-bw6, but not hla-bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from ctl and nk attack? *Blood*, 103(8):3122.
- Dietl, K., and Renner, K., Dettmer, K., Timischl, B., Eberhart, K., Dorn, C. and Hellerbrand, C., Kastenberger, M., Kunz-Schughart, L. A. and Oefner, P. J. and Andreesen, R., Gottfried, Eva and Kreutz, M. P. (2010). Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J Immunol*, 184(3):1200–1209.
- Dufort, F. J., Bleiman, B. F., Gumina, M. R., Blair, D., Wagner, D. J., Roberts, M. F., Abu-Amer, Y., Chiles, T. C. (2007) Cutting edge: IL-4-mediated protection of primary B lymphocytes from apoptosis via Stat6-dependent regulation of glycolytic metabolism. *J Immunol*, 179(8):4953–4957.

- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M.-L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory t cells. *Nat Immunol*, 4(12):1206–1212.
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Volpi, C., Santamaria, P., Fioretti, M. C., and Puccetti, P. (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate t cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive t cells. *J Immunol*, 176(11):6752–6761.
- Feder-Mengus, C., Ghosh, S., Weber, W. P., Wyler, S., Zajac, P., Terracciano, L., Oertli, D., Heberer, M., Martin, I., Spagnoli, G. C., Reschner, A. (2007). Multiple mechanisms underlie defective recognition of melanoma cells cultured in three-dimensional architectures by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Br J Cancer*, 96(7):1072–1082.
- Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., Renner, K., Timischl, B., Mackensen, A., Kunz-Schughart, L., Andreesen, R., Krause, S. W., and Kreutz, M. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human t cells. *Blood*, 109(9):3812–3819.
- Frauwirth, K. A. and Thompson, C. B. (2004). Regulation of t lymphocyte metabolism. *J Immunol*, 172(8):4661–4665.
- Gambhir, S. S., Czernin, J., Schwimmer, J., Silverman, D. H., Coleman, R. E., and Phelps, M. E. (2001). A tabulated summary of the fdg pet literature. *J Nucl Med*, 42(5 Suppl):1S–93S.
- Gatenby, R. A. and Gawlinski, E. T. (2003). The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. *Cancer Res*, 63(14):3847–3854.
- Gatenby, R. A. and Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, 4(11):891–899.
- Geschwind, J.-F. H., Ko, Y. H., Torbenson, M. S., Magee, C., and Pedersen, P. L. (2002). Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of atp production. *Cancer Res*, 62(14):3909–3913.

- Gladden, L. B. (2004). Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol*, 558(Pt 1):5–30.
- Gottfried, E., Kunz-Schughart, L. A., Ebner, S., Mueller-Klieser, W., Hoves, S., Andreesen, R., Mackensen, A., and Kreutz, M. (2006). Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood*, 107(5):2013–2021.
- Haioun, C., Itti, E., Rahmouni, A., Brice, P., Rain, J.-D., Belhadj, K., Gaulard, P., Garderet, L., Lepage, E., Reyes, F., and Meignan, M. (2005). [18f]fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography (fdg-pet) in aggressive lymphoma: an early prognostic tool for predicting patient outcome. *Blood*, 106(4):1376–1381.
- Halestrap, A. P. and Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (mct) family: structure, function and regulation. *Biochem J*, 343 Pt 2:281–299.
- Kellum, J. A., Song, M., and Li, J. (2004). Science review: extracellular acidosis and the immune response: clinical and physiologic implications. *Crit Care*, 8(5):331–336.
- Ko, Y. H., Smith, B. L., Wang, Y., Pomper, M. G., Rini, D. A., Torbenson, M. S., Hullihen, J., and Pedersen, P. L. (2004). Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete atp. *Biochem Biophys Res Commun*, 324(1):269–275.
- Koukourakis, M. I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Bougioukas, G., Didilis, V., Gatter, K. C., and Harris, A. L. (2003). Lactate dehydrogenase-5 (ldh-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br J Cancer*, 89(5):877–885.
- Lamprecht, B. (2008). Aberrant expression of the th2 cytokine il-21 in hodgkin lymphoma cells regulates stat3 signaling and attracts treg cells via regulation of mip-3 . *Blood*, 112(8):3339.
- Lardner, A. (2001). The effects of extracellular ph on immune function. *J Leukoc Biol*, 69(4):522–530.
- Lee, K. H., Wang, E., Nielsen, M. B., Wunderlich, J., Migueles, S., Connors, M., Steinberg, S. M., Rosenberg, S. A., and Marincola, F. M. (1999). Increased vaccine-specific t cell frequency after peptide-based vaccination correlates with

- increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression. *J Immunol*, 163(11):6292–6300.
- Lee, S. Y., Choi, H. K., Lee, K. J., Jung, J. Y., Hur, G. Y., Jung, K. H., Kim, J. H., Shin, C., Shim, J. J., In, K. H., Kang, K. H., and Yoo, S. H. (2009). The immune tolerance of cancer is mediated by ido that is inhibited by cox-2 inhibitors through regulatory t cells. *J Immunother*, 32(1):22–28.
- Mackensen, A., Carcelain, G., Viel, S., Raynal, M. C., Michalaki, H., Triebel, F., Bosq, J., and Hercend, T. (1994). Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J Clin Invest*, 93(4):1397–1402.
- Maher, J. C., Savaraj, N., Priebe, W., Liu, H., and Lampidis, T. J. (2005). Differential sensitivity to 2-deoxy-d-glucose between two pancreatic cell lines correlates with glut-1 expression. *Pancreas*, 30(2):e34–e39.
- Mapara, M. Y. (2004). Tolerance and cancer: Mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *Journal of Clinical Oncology*, 22(6):1136.
- Maschek, G., Savaraj, N., Priebe, W., Braunschweiger, P., Hamilton, K., Tidmarsh, G. F., De Young, L. R., and Lampidis, T. J. (2004). 2-deoxy-d-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res*, 64(1):31–34.
- Matarese, G. and La Cava, A. (2004). The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends Immunol*, 25(4):193–200.
- Mendler, A. N., Hu, B., Prinz, P., Kreutz, M., Gottfried, E., Noessner, E. (2012). Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. *Int. J. Cancer*, 131(3):633–640.
- Michalek, R. D., Gerriets, V. A., Jacobs, S R., Macintyre, A. N., MacIver, N. J., Mason, E. F., Sullivan, S. A., Nichols, A. G., Rathmell, J. C. (2011). Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *J Immunol*, 186(6):3299–3303.
- Moadel, R. M., Weldon, R. H., Katz, E. B., Lu, P., Mani, J., Stahl, M., Blaufox, M. D., Pestell, R. G., Charron, M. J., and Dadachova, E. (2005). Positotherapy: targeted nuclear therapy of breast cancer with 18f-2-deoxy-2-fluoro-d-glucose. *Cancer Res*, 65(3):698–702.

- Mori, Y., Tsukinoki, K., Yasuda, M., Miyazawa, M., Kaneko, A., and Watanabe, Y. (2007). Glucose transporter type 1 expression are associated with poor prognosis in patients with salivary gland tumors. *Oral Oncol*, 43(6):563–569.
- Muller, A. J., DuHadaway, J. B., Donover, P. S., Sutanto-Ward, E., and Prendergast, G. C. (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med*, 11(3):312–319.
- Munder, M., Schneider, H., Luckner, C., Giese, T., Langhans, C.-D., Fuentes, J. M., Kropf, P., Mueller, I., Kolb, A., Modolell, M., and Ho, A. D. (2006). Suppression of t-cell functions by human granulocyte arginase. *Blood*, 108(5):1627–1634.
- Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2008). *Immunobiology*. Garland Science.
- Murray, C. M., Hutchinson, R., Bantick, J. R., Belfield, G. P., Benjamin, A. D., Brazma, D., Bundick, R. V., Cook, I. D., Craggs, R. I., Edwards, S., Evans, L. R., Harrison, R., Holness, E., Jackson, A. P., Jackson, C. G., Kingston, L. P., Perry, M. W. D., Ross, A. R. J., Rugman, P. A., Sidhu, S. S., Sullivan, M., Taylor-Fishwick, D. A., Walker, P. C., Whitehead, Y. M., Wilkinson, D. J., Wright, A., and Donald, D. K. (2005). Monocarboxylate transporter mct1 is a target for immunosuppression. *Nat Chem Biol*, 1(7):371–376.
- Nelson, D. and Cox, M. (2001). *Lehninger Biochemie*. Springer.
- Nielsen, J., Holm, T. L., and Claesson, M. H. (2004). Cd4+cd25+ regulatory t cells: II. origin, disease models and clinical aspects. *APMIS*, 112(10):642–650.
- Ochoa, A. C., Zea, A. H., Hernandez, C., and Rodriguez, P. C. (2007). Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 13(2 Pt 2):721s–726s.
- Ott, K., Weber, W. A., Lordick, F., Becker, K., Busch, R., Herrmann, K., Wieder, H., Fink, U., Schwaiger, M., and Siewert, J.-R. (2006). Metabolic imaging predicts response, survival, and recurrence in adenocarcinomas of the esophagogastric junction. *J Clin Oncol*, 24(29):4692–4698.
- Overwijk, W. (2005). Breaking tolerance in cancer immunotherapy: time to act. *Current Opinion in Immunology*, 17(2):187.
- Petersen, J., Wurzbacher, S. J., Williamson, N. A., Ramarathinam, S. H., Reid, H. H., Nair, A. K. N., Zhao, A. Y., Nastovska, R., Rudge, G., Rossjohn, J., and

- Purcell, A. W. (2009). Phosphorylated self-peptides alter human leukocyte antigen class i-restricted antigen presentation and generate tumor-specific epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Pezzutto, A., Ulrichs, T., and Burmester, G.-R. (2006). *Taschenatlas der Immunologie*. Thieme.
- Pouyssegur, J., Dayan, F., and Mazure, N. M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, 441(7092):437–443.
- Rajendran, J. G., Wilson, D. C., Conrad, E. U., Peterson, L. M., Bruckner, J. D., Rasey, J. S., Chin, L. K., Hofstrand, P. D., Grierson, J. R., Eary, J. F., and Krohn, K. A. (2003). [(18)f]fmiso and [(18)f]fdg pet imaging in soft tissue sarcomas: correlation of hypoxia, metabolism and vegf expression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30(5):695–704.
- Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A. H., Piazuelo, M. B., Delgado, A., Correa, P., Brayer, J., Sotomayor, E. M., Antonia, S., Ochoa, J. B., and Ochoa, A. C. (2004). Arginase i production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits t-cell receptor expression and antigen-specific t-cell responses. *Cancer Res*, 64(16):5839–5849.
- Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., and Ochoa, A. C. (2007). L-arginine availability regulates t-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*, 109(4):1568–1573.
- Roth, S. and Dröge, W. (1991). Regulation of interleukin 2 production, interleukin 2 mrna expression and intracellular glutathione levels in ex vivo derived t lymphocytes by lactate. *Eur J Immunol*, 21(8):1933–1937.
- Rudd, C. E. (2009). Ctla-4 co-receptor impacts on the function of treg and cd8+ t-cell subsets. *Eur J Immunol*, 39(3):687–690.
- Saga, T., Koizumi, M., Furukawa, T., Yoshikawa, K., and Fujibayashi, Y. (2009). Molecular imaging of cancer: evaluating characters of individual cancer by pet/spect imaging. *Cancer Sci*, 100(3):375–381.
- Sakaguchi, S. (2006). Regulatory t cells: Meden agan. *Immunological Reviews*, Vol. 212: 5-7.
- Schmielau, J. and Finn, O. J. (2001). Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res*, 61(12):4756–4760.

- Scott, L., Lamb, J., Smith, S., and Wheatley, D. N. (2000). Single amino acid (arginine) deprivation: rapid and selective death of cultured transformed and malignant cells. *Br J Cancer*, 83(6):800–810.
- Seo, N., Hayakawa, S., Takigawa, M., Tokura, Y. (2001). Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4(+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology*, 103(4):449–457.
- Shime, H., Yabu, M., Akazawa, T., Kodama, K., Matsumoto, M., Seya, T., Inoue, N. (2008) Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J Immunol*, 180(11):7175–7183.
- Shurin, M. R. (2006). Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(3):333.
- Sommer, F., Bischof, S., Röllinghoff, M., and Lohoff, M. (1994). Demonstration of organic anion transport in t lymphocytes. l-lactate and fluo-3 are target molecules. *J Immunol*, 153(8):3523–3532.
- Steinman, L. (2007). A brief history of th17, the first major revision in the th1/th2 hypothesis of t cell-mediated tissue damage. *Nature Medicine*, 13(2):139.
- Strauss, L., Bergmann, C., and Whiteside, T. L. (2009). Human circulating cd4+cd25highfoxp3+ regulatory t cells kill autologous cd8+ but not cd4+ responder cells by fas-mediated apoptosis. *J Immunol*, 182(3):1469–1480.
- Tan, M. C. B., Goedegebuure, P. S., Belt, B. A., Flaherty, B., Sankpal, N., Gillanders, W. E., Eberlein, T. J., Hsieh, C.-S., and Linehan, D. C. (2009). Disruption of ccr5-dependent homing of regulatory t cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol*, 182(3):1746–1755.
- Tennant, D. A., Durán, R. V., Gottlieb, E. (2010). Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 10(4):267–77.
- Turcotte, S., Rosenberg, S. A. (2011). Immunotherapy for metastatic solid cancers. *Adv Surg*, 45:341–360.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*, 9(10):1269–1274.

- Veech, R. L. (1991). The metabolism of lactate. *NMR Biomed*, 4(2):53–58.
- Vollmar, A. and Dingermann, T. (2005). *Immunologie, Grundlagen und Wirkstoffe*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Walenta, S. and Mueller-Klieser, W. F. (2004). Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin Radiat Oncol*, 14(3):267–274.
- Walenta, S., Schroeder, T., and Mueller-Klieser, W. (2004). Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem*, 11(16):2195–2204.
- Warburg, O., Posener, K., and Negelein, E. (1924). über den stoffwechsel der carcinomzelle. *Biochem. Zeitschr.*, 152:309–344.
- Weber, W. P., Feder-Mengus, C., Chiarugi, A., Rosenthal, R., Reschner, A., Schumacher, R., Zajac, P., Misteli, H., Frey, D. M., Oertli, D., Heberer, M., and Spagnoli, G. C. (2006). Differential effects of the tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid on the proliferation of human cd8+ t cells induced by tcr triggering or homeostatic cytokines. *Eur J Immunol*, 36(2):296–304.
- Xu, R.-H., Pelicano, H., Zhou, Y., Carew, J. S., Feng, L., Bhalla, K. N., Keating, M. J., and Huang, P. (2005). Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res*, 65(2):613–621.
- Zhang, M., Zhang, Z., Blessington, D., Li, H., Busch, T. M., Madrak, V., Miles, J., Chance, B., Glickson, J. D., and Zheng, G. (2003). Pyropheophorbide 2-deoxyglucosamide: a new photosensitizer targeting glucose transporters. *Bioconjug Chem*, 14(4):709–714.
- Zheng, X., Koropatnick, J., Li, M., Zhang, X., Ling, F., Ren, X., Hao, X., Sun, H., Vladau, C., Franek, J. A., Feng, B., Urquhart, B. L., Zhong, R., Freeman, D. J., Garcia, B., and Min, W.-P. (2006). Reinstalling antitumor immunity by inhibiting tumor-derived immunosuppressive molecule ido through rna interference. *J Immunol*, 177(8):5639–5646.
- Zhu, Z., Jiang, W., McGinley, J. N., and Thompson, H. J. (2005). 2-deoxyglucose as an energy restriction mimetic agent: effects on mammary carcinogenesis and on mammary tumor cell growth in vitro. *Cancer Res*, 65(15):7023–7030.

# Danksagung

Hier möchte ich an erster Stelle Frau Prof. Dr. rer. nat. Marina Kreutz danken für die hervorragende, kompetente, ausdauernde und intensive Betreuung meiner Arbeit sowie für die harmonische Arbeitsatmosphäre, die stets vorherrschte. Das Thema, die Arbeitsmöglichkeiten sowie das Arbeitsumfeld haben mich bis zum Schluss motiviert und mich für die Forschung begeistert.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Reinhard Andreesen für die Ermöglichung dieser Arbeit in seiner Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie.

Auch bei dem ganzen Team, das mich stets in Rat und Tat unterstützt hat, bedanke ich mich. Hier möchte ich vor allem Dr. rer. nat. Karin Fischer, Dr. rer. nat. Simon Völkl, Dr. rer. nat. Sabine Hoves, Dr. rer. nat. Eva Gottfried, Alexandra Müller, Alice Peuker, Claudia Reichelt-Busch sowie Dr. rer. nat. Michael Rehli mit seiner gesamten Arbeitsgruppe danken für ihre ausführlichen Erklärungen und tatkräftige Unterstützung! Mein Dank gilt auch der ganzen Arbeitsgruppe für manchen gemeinsamen lustigen Abend.

Weiterhin möchte ich der Arbeitsgruppe Hoffmann/Edinger danken für die aufgereinigten CD4/CD25+ und CD4/CD25- Zellen, die mir zur Verfügung gestellt wurden. Und mein Dank gilt ebenso Dr. rer. nat. Kathrin Renner, Dr. rer. nat. Birgit Timischl und Irene Ritter vom Institut für Funktionelle Genomik der Universität Regensburg für die Anleitung und Durchführung der Massenspektrometrie sowie Prof. Dr. rer. nat. Peter Oefner für die Ermöglichung dieser Zusammenarbeit.

Mein großer Dank gilt auch meiner Familie, vor allem meinen Eltern, die mich mit ihrer Liebe und Unterstützung durchs Studium begleitet haben. Danke, dass ihr immer da wart, wenn ich ein offenes Ohr oder eine helfende Hand gebraucht habe. Und Danke auch an meinen Bruder Julian für die zahlreichen Tipps und Tricks zur EDV, fürs Computereinrichten und Ferndiagnosen stellen und für manches tolle Gespräch und manche Ermutigung.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen in Anspruch genommen habe.

Sabine Schwartz