AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Effekte von 2-Hydroxyglutarat auf humane Immunzellen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ines Marion Ugele

2016

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Effekte von 2-Hydroxyglutarat auf humane Immunzellen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ines Marion Ugele

2016

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Marina Kreutz
2. Berichterstatter:	PD Dr. Frank Haubner
Tag der mündlichen Prüfung:	06. Februar 2017

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis V

Tabellenverzeichnis VI

Abkürzungsverzeichnis VII

1 Einleitung 1

1.1 Immunsystem 1

1.1.1 Angeborene Immunität 1

1.1.2 Adaptive Immunität 2

1.1.3 DC als Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität 4

1.2 Induktion der T-Helfer 1-Immunantwort durch IL-12 5

1.2.1 Aufbau und Funktion der IL-12 Familie 5

1.2.2 Transkriptionelle Regulation von IL-12p70 und IL-23 9

1.2.3 Posttranskriptionelle Regulation von IL-12 13

1.3 Inhibierung der Immunantwort im Tumor 15

1.3.1 Lösliche Faktoren und Zell-assoziierte Mechanismen 15
1.3.2 Mutationen der IDH im Tumor 18

2 Zielsetzung 24

3 Material 26

3.1 Geräte und Ausstattung 26

3.2 Verbrauchsmaterialien 28

3.3 Reagenzien 30

3.4 Kits 35

3.5 Antikörper 36

3.5.1 Antikörper für FACS 36
3.5.2 Antikörper für Western Blot 38

3.6 Oligonukleotide und RNA-Standards 41

3.7 Software 42

4 Methoden 44

4.1 Zellbiologische Methoden 44

4.1.1 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität 44
4.1.2 Isolation humaner Monozyten 44
4.1.3 Generierung von DC 46

4.1.4 Gewinnung von DC und deren Überstände 47

4.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen 48

4.2 Immunologische Methoden 49

4.2.1 Gemischte Lymphozyten Reaktion 49

4.2.2 Durchflusszytometrie 51

4.2.3 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) 54

4.3 Proteinbiochemische Methoden 55

4.3.1 Herstellung von Zelllysaten mit RIPA-Puffer 55

4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration 57

4.3.3 Herstellung von Zelllysaten mit Hilfe von Phosphatase-Inhibitoren 58

4.3.4 Vorbereitung und Auftragen der Proben 63

4.3.5 Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 65

4.3.6 Western Blot 70

4.3.7 Immunodedektion 72

4.3.8 Auswertung 75

4.4 Molekularbiologische Methoden 75

4.4.1 Isolation von RNA aus DC 76

4.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR) 77

4.4.2.1 Reverse Transkription 78

4.4.2.2 Quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) 80

4.4.2.2.1 Reaktionsansatz der RT-qPCR 81

4.5 Bestimmung des Sauerstoffgehalts in Kulturen von DC 83

4.6 Messung der mitochondrialen Aktivität in DC 85

4.7 Statistische Auswertung 86

5 Ergebnisse 87

5.1 Einfluss von Na_2-2-HG auf die Zytokinsekretion von DC 88

5.1.1 Einfluss von Na_2-2-HG auf die IL-12p70-Sekretion 88

5.1.2 Einfluss von Na_2-2-HG auf die Sekretion von IL-10, TNF und MCP-1 90

5.2 Einfluss von Na_2-2-HG auf die IL-12p70 und IL-23 mRNA 93

5.2.1 Einfluss von Na_2-2-HG auf die mRNA-Expression der IL-12p70 Untereinheiten p35 und p40 93

5.2.2 Einfluss von Na_2-2-HG auf die mRNA-Expression der IL-23 Untereinheit p19 95

5.3 Analyse der Biosynthese der IL-12p70 Untereinheiten 99

5.3.1 Einfluss von Na_2-2-HG auf die Biosynthese der IL-12p70-Untereinheiten 99

5.3.2 Überprüfung der monoklonalen p35 und p40 Antikörper 101

5.4 Wirkung von Na_2-2-HG auf die Antigenpräsentation von DC 103

5.5 Einfluss von Na_2-2-HG auf die IDO Expression von DC 105

5.6 Einfluss von Na_2-2-HG auf die Laktatproduktion in DC 108

5.7 Einfluss von Diclofenac auf die Laktatproduktion und Zytokinsekretion in DC 110

5.7.1 Einfluss von Diclofenac auf die Laktatproduktion 111
5.7.2 Einfluss von Diclofenac auf die Zytokinsekretion 113
5.8 Wirkung von Metaboliten auf die Atmung von DC 117
5.8.1 Analyse des Sauerstoffverbrauchs unter Einfluss von Na_2-D-2-HG und Rotenon 117
5.8.2 Analyse der mitochondrialen Aktivität unter Einfluss von Na_2-D-2-HG und Nikotinamid 120
5.9 Expression von IκBα in DC 122
5.10 Einfluss von Na_2-2-HG auf die Expression der Proteinkinasen Akt und p38 in DC 126
6 Diskussion 132
6.1 Effekt von Na_2-2-HG auf die Sekretion von IL-12p70 und weitere Zytokine 133
6.2 Transkriptionelle Regulation von IL-12p70 und IL-23 136

6.3 Analyse der IL-12p70 Untereinheiten mittels Durchflusszytometrie 138

6.4 Einfluss von Na_2-2-HG auf die Antigenpräsentation 140

6.5 Stoffwechsel und Atmung unter Na_2-2-HG 142

6.6 Wirkung von Diclofenac auf den Zellmetabolismus..... 146

6.7 Untersuchung der LPS-Signaltransduktion unter Na_2-2-HG..... 150

7 Zusammenfassung.....160

8 Literaturverzeichnis.....163

9 Danksagung.....

10 Lebenslauf.....

11 Eidesstattliche Erklärung.....

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Mitglieder der IL-12 Familie 7
Abbildung 1.2: Transkriptionelle Regulation von IL-12p70 und IL-23.....11
Abbildung 1.3: Mutation der IDH im Tumor.....20
Abbildung 5.1: Einfluss von Na_2-D-2-HG und Na_2-L-2-HG auf die IL-12p70 Sekretion von DC 90
Abbildung 5.2: Einfluss von Na_2-D-2-HG und Na_2-L-2-HG auf die Zytokinsekretion von DC 92
Abbildung 5.3: RT-qPCR Analyse der IL-12A und IL-12B mRNA-Expression 95
Abbildung 5.4: RT-qPCR Analyse der IL-23A mRNA-Expression 98
Abbildung 5.5: Analyse der Synthese der Proteinuntereinheiten IL12p35 und p40 in DC 100

Abbildung 5.6: Bestimmung der p35-Proteinuntereinheit in DC 103
Abbildung 5.7: Effekt von Na_2-2-HG auf die T-Zellproliferation in einer MLR 105
Abbildung 5.8: IDO Synthese in DC 107
Abbildung 5.9: Effekt von Na_2-2-HG auf die Laktatproduktion in DC 109
Abbildung 5.10: Einfluss von Diclofenac auf die Laktatproduktion von DC 112
Abbildung 5.11: Einfluss von Diclofenac auf die Zytokinsekretion von DC 116
Abbildung 5.12: Sauerstoffverbrauch humaner DC nach Behandlung mit Na_2-2-HG 119
Abbildung 5.13: XTT-Messung von DC 122
Abbildung 5.14: Konzentration von IκBα in DC 125
Abbildung 5.15: Konzentration von IκBα in DC, Vergleich Na_2-D-2-HG zur LPS-Kontrolle 126
Abbildung 5.16: Synthese von pAkt und Akt in DC 129
Abbildung 5.17: Synthese von pp38 und p38 in DC 130

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1-1: Geräte 26
Tabelle 3.2-1: Verbrauchsmaterialien 28
Tabelle 3.3-1: Reagenzien 30
Tabelle 3.4-1: Kits 35
Tabelle 3.5-1: Antikörper für FACS 36
Tabelle 3.5-2: Isotypen für FACS 37
Tabelle 3.5-3: Antikörper für Western Blot 38
Tabelle 3.6-1: Oligonukleotide 41
Tabelle 3.6-2: RNA-Standards 42
Tabelle 3.7-1: Software 42
Tabelle 4.3-1: CEB-Puffer 59
Tabelle 4.3-2: „Pre-Equilibration“-Puffer 60
Tabelle 4.3-3: Lyse-Puffer 61
Tabelle 4.3-4: Herstellung von zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer 64
Tabelle 4.3-5: Erforderliche Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese 68
Tabelle 4.3-6: Herstellung des fünffach konzentrierten Laemmlipuffer 68

Tabelle 4.3-7: Herstellung der SDS-Gel-Stammlösungen 69
Tabelle 4.3-8: Herstellung von SDS-Polyacrylamid Gel 69
Tabelle 4.3-9: Herstellung des Anoden-Puffer A.....70
Tabelle 4.3-10: Herstellung des Anoden-Puffer B.....71
Tabelle 4.3-11: Herstellung des Kathoden-Puffer C.....71
Tabelle 4.3-12: Herstellung von zehnfach konzentriertem Trishydroxymethyl-Aminomethan gepufferte Salzlösung (TBS)-Puffer.....72
Tabelle 4.3-13: Herstellung von Waschpuffer 73
Tabelle 4.3-14: Herstellung von ECL-Lösung.....73
Tabelle 4.4-1: Ablauf der reversen Transkription.....79
Tabelle 4.4-2: Reaktionsansatz einer RT-qPCR 81
Tabelle 4.4-3: RT-qPCR-Programm 82

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Definition
2-HG	2-Hydroxyglutarat
Akt	Proteinkinasen B
AML	Akute Myeloische Leukämie
AP-1	Aktivierendes Protein 1 *(activator protein 1)*
APC	Allophycocyanin
APS	Ammonium Persulfat
cDNA	Komplementäre DNA
CEB	Zytoplasmatischer Extraktionspuffer *(cytoplasmic extraction buffer)*
CREB	cAMP-sensibles Element bindendes Protein
D-2-HG	D-2-Hydroxyglutarat
DC	Dendritische Zellen *(Dendritic Cells)*
dNTPs	2-Desoxy-Ribonukleosid-5`-Triphosphate
EBI-3	Epstein-Barr Virus induziertes Gen 3

ECL	*Enhanced chemiluminescence*
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest *(enzyme-linked immunosorbent assay)*
ERK	Durch extrazelluläres-Signal aktivierte Kinasen
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung *(fluorescence activated cell sorting)*
FCS	Fetales Kälberserum *(fetal calf serum)*
FITC	Fluorothioisocyanat
HIF	Hypoxie induzierbarer Faktor *(hypoxia inducible factor)*
HRP	Meerrettich Peroxidase *(horseraddish peroxidase)*
iDC	Nicht aktivierte DC
IDH	Isocitrat Dehydrogenase
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFNγ	Interferon γ
IgG	Immmunoglobulin G

IL	Interleukin
IRFs	Interferon-regulatorische Faktoren
IκBα	Nuklearer Faktor des kappa-leichten Polypeptidgen-Enhancers in B-Zellen, Inhibitor α *(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α)*
JAK	Janus Kinase
JHDM	JmjC-Domäne-beinhaltende Histondemethylase Proteine *(JmjC-domain-containing histone demethylase proteins)*
L-2-HG	L-2-Hydroxyglutarat
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MCP-1	Monozyten Chemotaktisches Protein 1 *(Monocyte Chemoattractant Protein 1)*
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex *(Major Histocompatibility Complex)*

MLR	Gemischte Lymphozyten Reaktion *(mixed lymphocyte reaction)*
M-MLV	Muriner Moloney Leukämie Virus *(Moloney-murine leukemia virus)*
MyD88	*Myeloid differentiation primary-response Gen 88*
Na_2-2-HG	Na_2-2- Hydroxyglutarat
Na_2-D-2-HG	Na_2-D-2-Hydroxyglutarat
Na_2-L-2-HG	Na_2-L-2-Hydroxyglutarat
NF-κB	Nuklearer Faktor κB *(nuclear factor κB)*
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NSAID	Nichtsteroidales Antirheumatikum
P38	Protein 38
pAkt	Phosphorylierte Proteinkinase B
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung *(phosphate buffered saline)*
PCR	Polymerasekettenreaktion *(polymerase chain reaction)*

PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PHD	Prolyl Hydroxylase Domäne
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Pp38	Phosphoryliertes Protein 38
RIPA	Radioimmunpräzipitationstest *(radioimmunoprecipitation assay)*
RPMI 1640	*Roswell Park Memorial Institute Medium 1640* (Entwicklungsort des Medium 1640)
RT-qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit *(real-time quantitative polymerase chain reaction)*
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEM	Standardfehler *(standard error of the mean)*
STAT	Signalüberträger und Aktivator der Transkription *(signal transducer and activator of transcription)*
Strep	Streptomycin

TBK1	TANK bindende Kinase 1
TBS	Trishydroxymethyl-Aminomethan gepufferte Salzlösung *(trishydroxy-methyl-aminomethan buffered saline)*
TEMED	N ,N ,N´,N´-Tetramethylethylendiamin
TET	Zehn-elf-Translokations-Methylcytosin Dioxygenase *(ten-eleven-translokation methylcytosine dioxygenase)*
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor β *(transforming growth factor β)*
Th	T Helfer
TIRAP	Toll-Interleukin 1 Rezeptor (TIR) Domäne-beinhaltendes Adapter Protein
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor *(toll-like receptor)*
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM	TRIF-verwandtes Adapter Molekül

TRIF	IFNβ-induzierendes TIR-Domäne-beinhaltendes Adapter Protein
Tris	Trihydroxymethyl-Aminomethan
TWEEN 20	Polyethylen Glycol Sorbitan Mono-laurate
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstums-faktor *(vascular endothelial growth factor)*
XTT	2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxani-lid

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Die humane Immunantwort besteht aus zwei Reaktionen, einer frühen Antwort, auch als angeborene Immunität bezeichnet, und einer späten Antwort, auch als adaptive Immunität bekannt (Abbas et al. 2012).

1.1.1 Angeborene Immunität

Die angeborene Immunität bildet die erste schnelle Antwort gegen infektiöse Agenzien. Sie besteht aus zellulären und biochemischen Abwehrmechanismen, die bereits von Geburt an vorhanden sind und phylogenetisch den ältesten Teil der Immunabwehr darstellen. Diese Mechanismen laufen immer gleich ab, das heißt bei Kontakt zu einem Antigen verändert sich die Immunantwort nicht.
Die Hauptkomponenten sind physikalische und chemische Barrieren, wie zum Beispiel Epitheloberflächen der Haut und der Schleimhäute oder lösliche Faktoren des Komplementsystems. Daneben spielen verschiedene Zellen, wie

zum Beispiel Phagozyten (Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen [DC]), natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Mastzellen eine wichtige Rolle.
Mononukleäre Phagozyten, wie Monozyten, Makrophagen und DC stammen alle von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab, nehmen Zellschrott auf und bauen ihn ab. Monozyten sind die mononukleären Phagozyten des Blutes. Sie wandern aus den Blutgefäßen in verschiedene Gewebe ein und differenzieren dort in DC oder Makrophagen. Während der Phagozytose werden Makrophagen und DC aktiviert und produzieren daraufhin Zytokine und Akute-Phase-Proteine. In der Folge kommt es zur Rekrutierung anderer Immunzellen an den Ort der Infektion (Stix G. 2009; Abbas et al. 2012).

1.1.2 Adaptive Immunität

Im Gegensatz zur angeborenen, verändert sich die adaptive Immunität mit häufigerer Antigenexposition. Die adaptive Immunität besteht aus B- und T-Lymphozyten. Diese können hochspezifisch auf fremde Antigene reagieren, indem Antigen-spezifische Antikörper durch aktivierte B-Zellen (Plasmazellen) gebildet werden, sowie

eine erregerspezifische Abwehrreaktion durch T-Zellen vermittelt werden kann. Dadurch können Krankheitserreger, die der angeborenen Immunität entkommen sind, eliminiert werden. Mit Hilfe sogenannter „Memory"-Zellen, kann sich die adaptive Immunität an infektiöse Antigene „erinnern". Dies ermöglicht bei einer erneuten Infektion mit diesem Antigen eine schnellere Immunantwort.

Antikörper befinden sich im Blut oder in Körpersekreten. Sie binden an Antigene auf Fremdkörpern, neutralisieren und eliminieren diese über verschiedene Effektormechanismen. Trifft ein naiver B-Lymphozyt auf ein fremdes Antigen, so wird er aktiviert und differenziert daraufhin in eine Antikörper produzierende Plasmazelle.

T-Lymphozyten erkennen mit ihrem spezifischen T-Zell-Rezeptor Antigene, die auf Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) präsentiert werden. Es gibt verschiedene T-Lymphozyten: $CD4^+$-Helferzellen, $CD8^+$-zytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen. $CD4^+$-Helferzellen sezernieren Zytokine und aktivieren dadurch Makrophagen, DC oder andere T-Zellen. Zytotoxische $CD8^+$-T-Zellen sind verantwortlich für die Zerstö-

rung von virusinfizierten Zellen und können auch Tumorzellen zerstören. Im Gegensatz dazu supprimieren regulatorische T-Zellen die Aktivität des Immunsystems und können aktivierte $CD4^+$-T-Zellen, $CD8^+$-T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen, Monozyten, Makrophagen und DC hemmen und dadurch eine Immunantwort begrenzen (Lowther und Hafler 2012; Abbas et al. 2012; Zhao et al. 2006; Lim et al. 2005; Azuma et al. 2003).

1.1.3 DC als Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität

DC agieren als Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Sie phagozytieren fremde Antigene oder Zellschrott und präsentieren sie mit Hilfe von MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche. Die Phagozytose induziert die Zytokinproduktion, die Reifung und die Einwanderung der DC in sekundäre Lymphorgane. Im Lymphknoten werden die Antigene naiven T-Zellen präsentiert, woraufhin die adaptive Immunantwort aktiviert wird (Hargadon 2013, Abbas et al. 2012).

1.2 Induktion der T-Helfer 1-Immunantwort durch IL-12

Die Zytokine der Interleukin (IL)-12 Familie werden von aktivierten dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen produziert. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der T-Zell Differenzierung sowie bei inflammatorischen Prozessen (Goriely und Goldman 2008; Gee et al. 2009).

1.2.1 Aufbau und Funktion der IL-12 Familie

Die Familie der IL-12 Zytokine besteht aus IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35. Diese Zytokine sind heterodimere Komplexe, mit jeweils einer α- und einer β-Untereinheit (Goriely und Goldman 2008) (s. Abb.1.1). Die α-Untereinheit p35 bzw. p19 bindet kovalent über Disulfidbrücken an die β-Untereinheit p40, woraus IL-12(p35/p40) bzw. IL-23(p19/p40) entsteht. Diese beiden Interleukine beeinflussen und modifizieren stark die CD4+ T-Zell Antwort. Die β-Untereinheit, Epstein-Barr Virus induziertes Gen 3 (EBI-3), bindet nichtkovalent die α-Untereinheit p35 oder p28 und bildet die Zytokine IL-35(p35/EBI-3) und IL-

27(p28/EBI-3) (Goriely und Goldman 2008; Carra et al. 2000).

Die Rezeptoren von IL-12p70, IL-23 sowie IL-27 gehören der Gruppe 1 Zytokinrezeptoren an und besitzen jeweils eine Immunglobulin-Domäne, eine Fibronectin-Domäne sowie eine zytoplasmatische Domäne mit Janus Kinase (JAK)-bindender Seite. Die Rezeptoren von IL-12p70 und IL-23 teilen sich die IL-12p70 Rezeptor ß1 Kette (IL-12Rß1). Abhängig von der Potenz des bindenden Ligand, werden verschiedene Mitglieder der JAK-Signalüberträger und Aktivator der Transkription (STAT)-Signalwege aktiviert, sowie die Interferon γ (IFNγ)-Bildung induziert. Monozyten, Makrophagen und vor allem DC werden zum Beispiel durch die Bindung eines bakteriellen Liganden (z.B. Lipopolysaccharid [LPS]) an den entsprechenden Rezeptor (z.B. Toll-ähnlicher Rezeptor 4 [TLR4]) angeregt, IL-12p70 zu bilden und zu sezernieren (Gee et al. 2009).

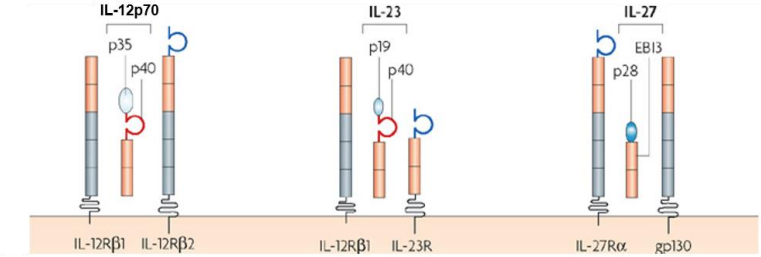

Abbildung 1.1: Mitglieder der IL-12 Familie
IL-12, IL-23, IL-27 und IL-35 sind die Zytokine der IL-12 Familie. Sie sind heterodimere Komplexe, mit jeweils einer α- und einer β-Untereinheit (Goriely und Goldman 2008). Die α-Untereinheit p35 bzw. p19 bindet kovalent über Disulfidbrücken an die β-Untereinheit p40, woraus IL-12(p35/p40) bzw. IL-23(p19/p40) entsteht. Die β-Untereinheit EBI-3 bindet die α-Untereinheit p35 oder p28 nichtkovalent und bildet die Zytokine IL-35(p35/EBI-3) und IL-27(p28/EBI-3). Die Zytokine IL-12, IL-23 und IL-27 binden alle an Heterodimere Rezeptoren vom Typ 1 Zytokinrezeptoren. IL-12 und IL-23 besitzen hierbei die gleiche Rezeptoruntereinheit IL-12Rβ1. Modifiziert nach (Goriely et al. 2008).

IL-12p70 führt zur Differenzierung von naiven T-Zellen zu T-Helfer (Th) 1-Effektor Zellen, welche IFNγ produzieren und somit die zelluläre Immunität vermitteln. Gleichzeitig hemmt IL-12p70 die Differenzierung von Th2-Zellen (Fukao et al. 2002). Auch NK-Zellen werden durch IL-12p70 zur IFNγ Produktion angeregt. IFNγ wirkt nun in Form einer positiven Regulation auf die IL-12p70 Expression, indem es Transkriptionsfaktoren, sogenannte „Interferon Regulatory Factors“, aktiviert. Diese Transkriptionsfaktoren steigern die Transkription von IL-

12p35 und IL-12p40. In Folge dessen kann vermehrt IL-12p70 durch humane DC und Makrophagen gebildet werden (Gee et al. 2009).
IL-12p70 bewirkt indirekt über die IFNγ Produktion der Th1-Zellen auch eine gesteigerte zytotoxische Aktivität von NK und CD8+ Zellen (Fukao et al. 2002).

IL-27 spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion von naiven T-Zellen zu Th1-Zellen. Das Interleukin induziert, ebenso wie IL-12p70, die IFNγ-Produktion (Gee et al. 2009). Zudem antagonisiert IL-27 die Entstehung von Entzündungen, welche durch Th17-Zellen induziert werden (Goriely et al. 2008).
Th17-Zellen sind IL-23 abhängige, pathogen wirkende CD4+ Effektor Zellen, welche durch ihre Produktion von IL-17 charakterisiert werden. Sie werden mit Autoimmunerkrankungen und Infektionen in Verbindung gebracht. IL-17 ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin, welches Gewebeschäden zumindest teilweise durch die Rekrutierung von Neutrophilen induziert. Erst kürzlich wurde von Gee et al. gezeigt, dass IL-35 von regulatorischen T-Lymphozyten sezerniert wird und eine Funktion bei der

Supprimierung von Entzündungen hat. Es ist noch unklar, ob bioaktives IL-35 auch von DC exprimiert wird (Goriely und Goldman 2008; Gee et al. 2009; Goriely et al. 2008).

1.2.2 Transkriptionelle Regulation von IL-12p70 und IL-23

Da vor allem die Zytokine IL-12p70 sowie IL-23 in der folgenden Arbeit untersucht wurden, wird im Weiteren auf diese beiden Mitglieder der IL-12 Familie eingegangen. Diese beiden Zytokine haben eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der Th1/Th17-Zellantwort, vor allem bei Autoimmunkrankheiten. Die Produktion und Sekretion von IL-12p70 und IL-23 wird über die Bindung von beispielsweise bakteriellen Liganden (z.B. LPS) an einen TLR und in der Folge über komplexe Signalwege reguliert (s. Abb. 1.2, Goriely et al. 2008; Molle et al. 2013). Die Signalübertragung erfolgt über *Myeloid differentiation primary-response Gen 88* (MyD88), welches an den TLR gekoppelt ist. Die LPS-abhängige Aktivierung von DC kann nach Bindung von LPS an TLR4 die Aktivierung der Mitogen abhängigen Protein Kinase (MAPK) durch extrazelluläres Signal aktivierte Kinase (ERK) bewirken. Über

eine MAPK (z.B. „FOS“) kann ERK die Phosphorylierung und Aktiverung von Transkriptionsfaktoren im Nukleus bewirken. Durch diesen Signalweg erfolgt eine verstärkte Expression der mRNA der IL-23p19 Untereinheit (Mills, Kingston H G 2011).

Über die Bindung von LPS an TLR4 wird auch die MAPK p38 aktiviert. In der Folge wird der Transkriptionsfaktor cAMP-sensibles Element bindendes Protein (CREB) phosphoryliert und dadurch aktiviert. Im Zellkern bewirkt CREB nun eine vermehrte Transkription des IL-10 Gens (Mills, Kingston H G 2011).

Ein weiterer dieser Signalwege verläuft über Nuklearer Faktor κB (NF-κB), einem Schlüsselenzym bei der Regulation von Immunantworten. NF-κB ist beteiligt bei der Kontrolle der Expression vieler Gene, welche in die Antigen präsentierende Funktion von DC involviert sind, wie beispielsweise die Expression der Gene, welche für IL-12p70 kodieren. Bindet ein Ligand (z.B. LPS) an einen TLR (z.B. TLR4), kann NF-κB aktiviert werden.

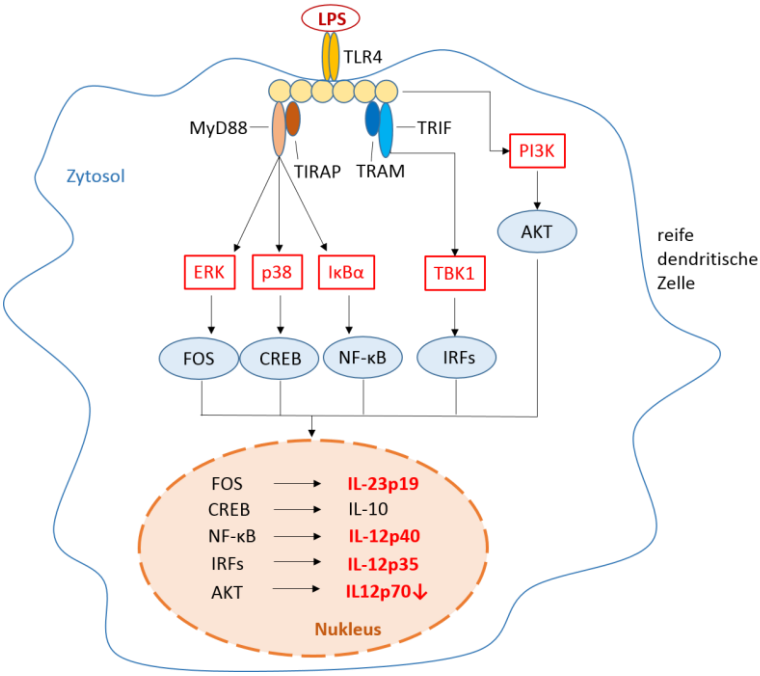

Abbildung 1.2: Transkriptionelle Regulation von IL-12p70 und IL-23
Die IL-12p70- und IL-23-Produktion wird durch TLR-Liganden (z.B. LPS) induziert. In der Folge werden über ERK, MAPK p38, IκBα und TBK1 die Transkriptionsfaktoren „FOS“, CREB, NF-κB und IRFs aktiviert. Diese wandern in den Zellkern und bewirken hier die Regulation der Expression von Genen, welche für IL-23p19, IL-10, IL-12p40 und IL-12p35 kodieren. Zudem erfolgt die LPS-Signaltransduktion über die Aktivierung von PI3K. In der Folge wird Akt aktiviert, welches die Expression der IL-12p70 Untereinheiten p35 und p40 und somit die IL-12p70 Synthese hemmt. (TIRAP=Toll-Interleukin 1 Rezeptor (TIR) Domäne-beinhaltendes Adapter Protein; TRAM=TRIF-verwandtes Adapter Molekül). Modifiziert nach Mills, Kingston H G 2011.

NF-κB ist ein Entzündung regulierendes Protein, dessen Aktivität durch posttranslationale Modifikation, ko-aktivierende sowie -hemmende Proteine reguliert wird. Im

Zytoplasma liegt NF-κB an den Nuklearen Faktor des κ-leichten Polypeptidgen-Enhancers in B-Zellen, Inhibitor α (IκBα) gebunden vor und ist in diesem Zustand inaktiv. Erfolgt nun ein proinflammatorischer Stimulus (z.B. durch LPS), wird IκBα phosphoryliert, ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. Hierbei löst sich NF-κB von IκBα, wandert in den Zellkern und aktiviert die Transkription proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie z. B. der Untereinheit p40 des IL-12p70. Zudem kann über den PI3K/Akt Signalweg die Aktivierung von NF-κB beeinflusst werden (Yang et al. 2012a; Goriely et al. 2008, Bhattacharyya et al. 2004).

Auch IFN-regulatorische Faktoren (IRFs) nehmen an der Synthese von IL-12p70 teil. Der TIR-Domänen-beinhaltendes Adapter Protein IFNβ-induzierend (TRIF)-abhängige Signalweg induziert hierbei über die TANK bindende Protease 1 (TBK1) die nukleäre Translokation von IRFs. Im Zellkern bewirken IRFs die Transkription von Genen, die für IL-12p35 kodieren (Goriely et al. 2008; Mills, Kingston H G 2011).

Ein weiterer Regulationsmechanismus der Produktion und Sekretion von IL-12p70 beeinflusst, erfolgt über den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Proteinkinase B (Akt) Signalweg. Über die Aktivierung des TLR4 (z.B. durch LPS), wird PI3K aktiviert. Aus der Phosphorylierung von Phosphoinositiden resultiert die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat, welches die Serin-Threonin Kinase Akt aktiviert. Akt bewirkt nun die Hemmung der IL-12p70 Produktion, wodurch proinflammatorische Prozesse, ausgehend von IL-12p70, reduziert werden (Martin et al. 2003; Fukao et al. 2002).

1.2.3 Posttranskriptionelle Regulation von IL-12

Wie bereits angesprochen, ist IL-12p70 ein Heterodimer, bestehend aus der α-Kette p35 sowie der β-Kette p40. Die IL-12p70 Produktion ist durch die transkriptionelle Kontrolle der p35 und p40 Untereinheiten streng reguliert (Murphy et al. 2000).

Die Regulation der Produktion der beiden Untereinheiten erfolgt über verschiedene Signalwege. Das Gen der α-Untereinheit wird in den meisten Zelltypen konstitutiv auf

niedrigem Niveau exprimiert, während das Gen der β-Untereinheit nur in den Zellen exprimiert wird, die die Fähigkeit besitzen, das Heterodimer IL-12p70 zu produzieren. Während p35 nur in Form des Heterodimers IL-12p70 von der Zelle abgegeben wird, kann die freie p40 Untereinheit isoliert sezerniert werden, besitzt dabei jedoch keine biologische Funktion.

Bevor IL-12p70 sezerniert wird, persistiert es intrazellulär für längere Zeit als unreifes Heterodimer. Carra et al. beobachteten in Monozyten, dass die Sekretion von IL-12p70 ausschließlich durch die N-Glykosylierung der p35 Untereinheit kontrolliert wird, während die posttranskriptionelle Modifikation von p40 keine Bedeutung zu haben scheint. Die N-Glycosylierung der p35 Untereinheit des Heterodimers initiiert die Sekretion des Interleukins. Diese posttranslationale Modifikation ermöglicht es, die unreife von der reifen Form des Interleukins zu unterscheiden (Carra et al. 2000).

1.3 Inhibierung der Immunantwort im Tumor

Obwohl Immunzellen potentiell dazu in der Lage sind, Tumorzellen zu erkennen und abzutöten, verhindern sogenannte „Immune-Escape“-Mechanismen diese Tumorabwehr.

1.3.1 Lösliche Faktoren und Zell-assoziierte Mechanismen

In vielen Fällen sezerniert der Tumor immunsupprimierende Faktoren, welche Immunzellen deaktivieren. Des Weiteren werden Erkennungsmechanismen, wie z.B. die Expression des MHC, herunterreguliert, so dass die Immunzelle den Tumor nicht mehr erkennen kann (Fridman et al. 2012).
Zudem verlieren Tumorzellen die Fähigkeit, Immunreaktionen auslösende Antigene zu exprimieren. Dies resultiert z.T. daraus, dass diese Zellen eine sehr hohe Mitoserate und eine große genetische Instabilität aufweisen, wodurch Mutationen in verschiedenen Genen auftreten. Des Weiteren können Tumoren durch vermehrte Glykokalixmole-

küle ihre Oberflächenantigene für Immunzellen unzugänglich machen und dadurch die Tumorabwehr verhindern (Abbas et al. 2012).

Auch der veränderte Stoffwechsel der Tumorzellen beeinflusst die Immunabwehr und verhindert gleichzeitig die Tumorabwehr. Wie bereits 1930 von Otto Warburg beschrieben, wird der Stoffwechsel von Tumorzellen auf die Durchführung der Glykolyse umgestellt, selbst wenn aerobe Bedingungen vorliegen. Die entstehende Hypoxie im Tumormilieu bewirkt eine Hochregulation von Genen, welche beispielsweise für Glukosetransporter oder auch die Laktat Dehydrogenase kodieren. Die Folge ist eine Anreicherung der Glykolyse-Endprodukte Milchsäure/ Laktat, welches zu einer Senkung des pH-Werts im Tumormilieu führen. Das hohe Laktatlevel führt zu einem Wachstumsvorteil des Tumors und bewirkt beispielsweise eine Hemmung der Proliferation zytotoxischer T-Zellen und deren Zytokinproduktion, wodurch die Tumorabwehr durch diese Immunzellen vermindert werden kann (Fischer et al. 2007).

Ein weiterer „Immune-Escape“-Mechanismus betrifft DC, welche wichtige Induktoren der Anti-tumor Immunantwort sind. DC können eine spezifische T-Zell Antwort gegen Tumorantigene induzieren. Wird nun durch den Tumor die Aktivität dieser DC direkt oder durch seine generierten Faktoren supprimiert, so kann keine effektive Tumorabwehr erfolgen (Hargadon 2013).

Des Weiteren haben Tumoren verschiedene Einflüsse auf die gemeinsamen Vorläuferzellen von DC, Monozyten und Neutrophilen, wodurch deren korrekte Differenzierung und Reifung gestört sind. Die aus diesen Vorläuferzellen entstehenden Immunzellen sind nicht richtig funktionsfähig, können daher keine effektive Tumorabwehr bewirken (Hargadon 2013).

Unreife Vorläuferzellen können außerdem direkt die Immunabwehr stören, indem sie vermehrt Indolamin 2,3-Dioxigenase (IDO) freisetzen. IDO ist das Schlüsselenzym des Tryptophan Abbaus und wird bei vielen malignen Erkrankungen überexprimiert. Durch den Abbau von Tryptophan im Tumormilieu, sowie durch die Ansammlung toxischer Metabolite, führt IDO indirekt zu einer verminderten Immunantwort von T-Zellen auf den Tumor, da diese

durch die verschiedenen Einflüsse inaktiv werden (Hargadon 2013; Soliman et al. 2010).

1.3.2 Mutationen der IDH im Tumor

Die erste Isocitrat Dehydrogenase (IDH)-Mutation, von der berichtet wurde, wurde 2006 in einem metastasierten Colonkarzinom entdeckt (Yen et al. 2010). Dang et al. stellten die Hypothese auf, dass D-2-Hydroxyglutarat (D-2-HG), ein Produkt der mutierten IDH, ein Onkometabolit ist, der zur Entstehung von Gliomen beiträgt, aber auch bei akuter myeloischer Leukämie (AML) auftritt (Dang et al. 2009; DiNardo et al. 2013). Bereits in frühen Glioblastom-Stadien wurden IDH-Mutationen festgestellt. Daraus geht hervor, dass es sich um eine Mutation handelt, die in frühen Tumorstadien erfolgt. Durch diese frühe Mutation können in späteren Tumorstadien erfolgende Mutationen begünstigt werden (Reitman und Yan 2010).

Patienten mit malignen Gliomen und anaplastischen Astrozytomen, welche IDH-Mutationen besaßen, zeigten verbessertes Überleben im Vergleich zu Patienten mit Tumoren, welchen diese Mutationen fehlten (Parsons et al.

2008; Yang et al. 2009; Kranendijk et al. 2010). Bei Patienten mit AML prognostizierte ein hohes 2-HG-Level im Serum der Patienten, als Folge der IDH-Mutation, eine kürzere Überlebenszeit (DiNardo et al. 2013).

Beim Gesunden katalysiert die IDH2 im Zitratzyklus die Umwandlung von Isocitrat zu α-Ketoglutarat, mit gleichzeitiger Reduktion von $NADP^+$ zu $NADPH/H^+$ (Dang et al. 2010). Eine weitere Isoform des Enzyms, die IDH1, ist im Zytosol lokalisiert und katalysiert hier die gleiche Reaktion (siehe Abb.1.3). Die beiden Enzyme besitzen außerdem die Fähigkeit, die inverse Reaktion voranzutreiben, wenn der „umgekehrte Zitratzyklus“ durch Glutaminolyse aufgefüllt wird. In diesem Fall wird Glutamin in Glutamat und letztendlich zu α-Ketoglutarat umgewandelt. Die IDH1/2 bewirkt hier die Umwandlung von α-Ketoglutarat in Isocitrat. Isocitrat wird weiter zu Zitrat verstoffwechselt, welches als Baustein für die Lipidsynthese in schnell proliferierenden Zellen dient (Smolková und Ježek 2012). Darüber hinaus kann α-Ketoglutarat in L-2-Hydroyglutarat (L-2-HG) umgewandelt werden (Dang 2009; Dang et al. 2009).

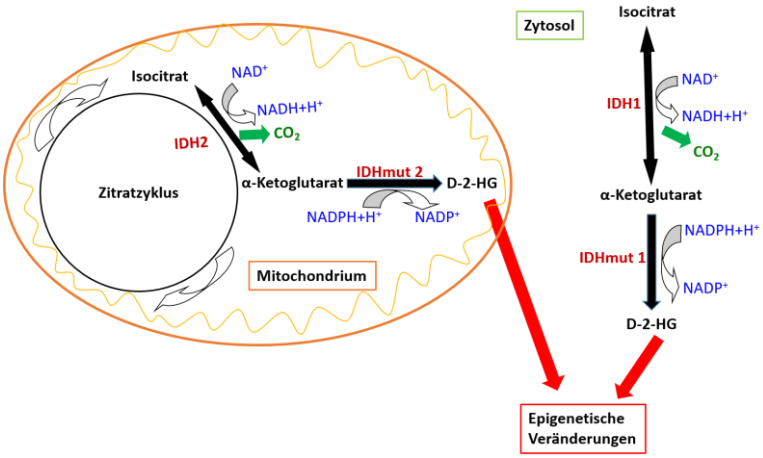

Abbildung 1.3: Mutation der IDH im Tumor
Im Zitratzyklus katalysiert die IDH2 die Umwandlung von Isocitrat zu α-Ketoglutarat, während im Zytosol die gleiche Reaktion durch die IDH1 katalysiert wird. Ist die IDH1/2 z.B. in Gliomen mutiert, gewinnt sie die Fähigkeit, α-Ketoglutarat in den Onkometboliten D-2-HG umzuwandeln. Tumore mit IDH1/2-Mutationen häufen große Mengen des Metaboliten D-2-HG an. Diese Ansammlung von 2-HG in Zellen mit IDH1/2-Mutationen werden in direkten Zusammenhang mit epigenetischen Veränderungen, durch die Inhibierung von Zehn-elf-Translokation Methylcytosin Dioxygenase (TET)1 und JmjC-Domäne-beinhaltende Histondemethylase Proteine (JHDM), gebracht. (IDHmut 1/2=mutierte IDH1/2; Young und Simon 2012; Dang et al. 2009).

Ist die IDH1/2 in Tumoren mutiert, erringt sie die neomorphe Fähigkeit, α-Ketoglutarat in den Onkometabolit D-2-HG umzuwandeln (siehe Abbildung 1.3, Dang et al. 2009; Ward et al. 2010). D-2-HG ist in Kulturüberständen von Zellen mit mutierter IDH1/2, sowie in Patientenseren messbar (Rakheja et al. 2011). DiNardo und Kollegen be-

richteten, dass sich das 2-HG-Level im Serum von Patienten mit mutierter IDH1 oder IDH2 nicht von Patienten mit nicht mutierter IDH1 oder IDH2 unterscheidet, sowie erhöhte 2-HG-Spiegel auch bei manchen Patienten mit AML ohne IDH-Mutation festgestellt werden konnten. L-2-HG und D-2-HG wurden auch bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinom, welche keine IDH-Mutationen trugen, festgestellt (Rakheja et al. 2011; Terunuma et al. 2014).

Wang et al. fanden heraus, dass bei AML mit mutierter IDH vermehrt gering differenzierte Zellen vorliegen. Dies zeigte sich daran, dass die Expression des Oberflächenmarkers CD38, der vermehrt auf reifen hämatopoetischen Zellen vorkommt, auf Zellen mit IDH Mutation vermindert vorlag. Dies lässt vermuten, dass die Differenzierung dieser Zellen durch die Mutation blockiert wird (Wang et al. 2013). Entsprechend zeigen Arbeiten von Rohle et al., dass ein Inhibitor der mutierten IDH die Differenzierung von Glioblastomzellen induziert und das Wachstum vermindert (Rohle et al. 2013).

Da durch die mutierte IDH die Umwandlung von α-Ketoglutarat in D-2-HG katalysiert wird, reichert sich dieser Metabolit in der Zelle an und führt Veränderungen im

Zellmetabolismus. Die hängt z.B. mit der von von Ohka et al. beschriebenen Inhibition von Prolyl-Hydroxylasen zusammen (Ohka et al. 2014).

Prolyl-Hydroxylasen sind verantwortlich für den Sauerstoff abhängigen Abbau des Hypoxie induzierbaren Faktor (HIF)-1α. Werden Prolyl-Hydroxylasen gehemmt, so resultiert daraus die Stabilisierung von HIF-1α. Der dadurch aktivierte HIF-1α Signalweg induziert nun die vermehrte Aktivierung der Glykolyse, sowie die Auslösung einer Vielfalt von tumorassoziierten Stoffwechselwegen, wie z.B. die Bildung von vaskulärem endothelialem Wachstumsfaktor (VEGF) und verschiedenen glykolytischen Enzymen (Zhao et al. 2009; Ohka et al. 2014).

Im Gegensatz dazu stellten andere Autoren die Hypothese auf, dass hohe Level an zellulärem 2-HG die Hydroxylierung von HIF-1α antreiben. Dies führt zu einer verminderten HIF-Expression und vermehrter Transformierung von Gliomen (Young und Simon 2012).

Zudem konkurriert 2-HG mit α-Ketoglutarat und inhibiert somit dessen Bindung an verschiedenen Histon-Demethylasen, einschließlich JmjC-Domäne-beinhaltende Histondemethylase Proteine (JHDM). Dies führt zu dem

aberranten Profil der Histonmethylierung (Young und Simon 2012).

Ferner inhibiert 2-HG sog. TET-Enzyme, 5´-Merthylcytosin Hydroxylasen, die für den entscheidenden Schritt der DNA-Demethylierung zuständig sind. Aus dieser Inhibierung resultiert eine DNA-Hypermethylierung.

Diese epigenetischen Dysregulationen, verursacht durch veränderte Level von 2-HG und α-Ketoglutarat in Zellen mit mutierter IDH1/2, könnten zu einer veränderten Regulierung der Genexpression in Karzinomen beitragen (Young und Simon 2012).

2 Zielsetzung

Somatische Mutationen der IDH1 und 2 wurden in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen. Das mutierte Enzym IDH1/2 erlangte die Fähigkeit, α-Ketoglutarat in den Onkometaboliten 2-HG zu konvertieren. Bei der AML ist bekannt, dass die Mutation der IDH1/2 positiv mit der Tumorprogression korreliert. Im Gegensatz dazu ist für Glioma und sekundäre Glioblastoma beschrieben, dass die Mutation mit einer guten Prognose korreliert. Auch beim Mamma Karzinom konnten erhöhte Level von 2-HG nachgewiesen werden, auch wenn keine Mutation der IDH vorlag. Bei dieser Tumorentität konnte gezeigt werden, dass die Höhe des 2-HG-Levels die Prognose negativ beeinflusst.

Bisher wird angenommen, dass insbesondere epigenetische Veränderungen der Tumorzelle, welche aus dem Vorhandensein des Metaboliten 2-HG resultieren, die Prognose beeinflussen. Aufgrund der wichtigen Rolle von Immunzellen für die Tumorentstehung und -entwicklung, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Effekt von 2-HG auf

Immunzellen untersucht werden. Hierbei sollten insbesondere DC untersucht werden, da diese Antigen präsentierenden Zellen essentiell sind für die Initiierung einer effektiven Anti-Tumor-Immunantwort.

Vordaten der Arbeitsgruppe zeigten, dass das Dinatrium von 2-HG die Interleukin-12p70 Sekretion von DC inhibiert. In dieser Arbeit sollte diese verminderte Sekretion bestätigt und der Mechanismus der Inhibition anhand verschiedener Parameter näher untersucht werden. Hierbei sollte die Expression der Interleukin Untereinheiten p35 und p40 auf mRNA Ebene, sowie die Biosynthese der Untereinheiten des Interleukins unter Einfluss von 2-HG analysiert werden.

Da eine effektive Differenzierung der DC die Basis der DC Aktivität darstellt, sollten weitere mögliche Effekte auf die Differenzierung und Aktivierung der DC anhand von verschiedenen Reifungsmarkern und metabolischen Markern untersucht werden.

3 Material

3.1 Geräte und Ausstattung

Tabelle 3.1-1: Geräte

Gerät	Firma, Ort
AMG Microskop Evos xl	Fischer Scientific, Deutschland
CASY Cell Counter und Analyzer System Model TT	Roche Innovatis AG, Deutschland
Electrophoresis device	Biometra, Deutschland
Elutriator Avanti J-20XP	Beckmann Coulter, Deutschland
Emax precision microplate reader	Molecular Devices, Deutschland
FACS Calibur	BD, Deutschland
FilterMate Cell Harvester	PerkinElmer, Deutschland
Heat Sealer 5290	Eppendorf, Deutschland
Inkubator BBD 6220	Heraeus, Deutschland
Image Reader	BioRad, Deutschland

Laminar Flow Air HA 2472	Heraeus, Deutschland
Multipipette Multipette plus	Eppendorf, Deutschland
NanoDrop ND1000	PeqLab, Deutschland
PCR-Thermocycler Modell PTC-200	MJ-Research/Bio-metra, Deutschland
pH-Meter	Hanna Instruments, Deutschland
Present SDR v4	Precision Sensing GmBH, Deutschland
Realplex Mastercycler epGradient S	Eppendorf, Deutschland
SensorDish-Reader	PreSens, Deutschland
SPECTRA Fluor Plus	TECAN, Deutschland
Top Count NXT	PerkinElmer, Deutschland
Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzer	PerkinElmer, Deutschland
Vortex	Scientific Industries, USA

Welding machine for PCR plates Fermant 400	Josten & Kettenbaum, Deutschland
Well wash 4 MK 2	Thermo Electron Corporation, Deutschland
Western-Blot-camera	Biometra, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20XP; Rotor JE 5.0	Beckmann, Deutschland
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 3,0 R	Heraeus, Deutschland

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2-1: Verbrauchsmaterialien

Material	**Firma, Ort**
Einmalkanülen	Becton Dickinson, Deutschland
Einmalspritzen	Becton Dickinson, Deutschland
ELISA-Plates (96 Wells), high binding, flat bottom	Costar, USA
Filterpapier 3 mm	Whatman,

	Deutschland
Fotofilm Hyperfilm™ ECL	Amersham, Deutschland
Heatsealing Film	Eppendorf, Deutschland
Immobilon-P Transfer Membrane	Millipore, Deutschland
Micropipettierplatte U-Bottom (96 Vertiefungen)	Falcon, Deutschland
Micropipettierplatten (6, 12, 96 Vertiefungen)	Falcon, Deutschland
Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Costar, USA
PreSens Oxodish OD24	Precision Sensing GmbH, Deutschland
Top Seal-A	PerkinElmer, Deutschland
Twin Technology PCR-Platten (96 Wells)	Eppendorf, Deutschland
Uni Filter-96, GF/C	PerkinElmer,

	Deutschland
UniFilter Platte	PerkinElmer, MD
Zellkulturflaschen	Costar, USA
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Deutschland

3.3 Reagenzien

Tabelle 3.3-1: Reagenzien

Reagenz	**Firma, Ort**
1,10-Phenantroline	Sigma, Deutschland
2-Mercaptoethanol, mind. 98%	Sigma, Deutschland
30% H_2O_2	Merck, Deutschland
^{3}H-Thymidin	Hartmann Analytics, Deutschland
70% Isopropanol	Braun, Deutschland
AB-Serum	Blutspendedienst des Bayrischen Roten Kreuzes, gemeinnützige GmbH
Ammoniumpersulfat	Merck, Deutschland

Aprotinin	Roche, Deutschland
Bestatin	Roche, Deutschland
Bromphenol blue sodium salt for electrophoresis	Sigma, Deutschland
Cell Proliferation Kit II (XTT), Electron coupling reagent	Roche, Deutschland
Cell Proliferation Kit II (XTT), XTT labeling reagent	Roche, Deutschland
Chymostatin	Roche, Deutschland
Coulter Isoton II Diluent	Beckman Coulter, Deutschland
Dimethyl sulfoxide	Sigma, Deutschland
Dithiothreitol	Sigma, Deutschland
D-α-Hydroxyglutaric acid disodium salt	Sigma, Deutschland
Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	Sigma, Deutschland
Ethylene Glycol Tetraacetic Acid	Sigma, Deutschland

Fetal calf serum für dendritische Zellen	PAA, Deutschland
Glycerin (Glycerol)	Merck, Deutschland
Glycin	Merck, Deutschland
Granulocyte-macrophageco-lony-stimulating factor	Peprotech, Deutschland
Interleukin 4	Peprotech, Germany
L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom, Deutschland
Leupeptin	Roche, Deutschland
L-Glutamic acid	Santa Cruz Biotechno-logy, Deutschland
L-Glutamic acid monosodium salt hydrate	Sigma, Deutschland
Lipopolysaccharid	Alexis Biochemicals, Deutschland
L-Lactic Acid Sodium	Sigma, Deutschland
L-α-Hydroxyglutaric acid disodium salt	Sigma, Deutschland
Magermilchpulver	Sucofin, Deutschland

Microscint 20	Perkin Elmer, Deutschland
N ,N ,N´,N´-Tetramethylethylendiamin	Sigma, Deutschland
N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-Agmatine	Roche, Deutschland
NaF	Sigma, Deutschland
NaOrthovanadate	Millipore, Deutschland
NaPyrophosphat	Sigma, Deutschland
Nicotinamide	Sigma, Deutschland
Nonidet P40	Roche, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	GIBCO, Deutschland
Pepstatin A	Roche, Deutschland
Phosphate buffered saline	Sigma, Deutschland
Polyethylene Glycol Sorbitan Monolaurate	Sigma, Deutschland
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1);	Roth, Deutschland

30% Acrylamidstamm-Lösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1	
RPMI 1640	Biotech GmbH, Deutschland
Trishydroxymethyl-Aminomethan	usb Corporation, USA
α- Ketoglutaric acid disodium salt	Sigma, Deutschland
α- Ketoglutaric acid sodium salt	Sigma, Deutschland
β-Glyzerophosphat Disodium	Sigma, Deutschland
ε-Amino-n-Capronsäure	Sigma, Deutschland

Na_2-D-2-Hydroxyglutarat, Na_2-L-2-Hydroxyglutarat, Na-α-Ketoglutarat, Na_2-α-Ketoglutarat, Glutamin und Glutamat wurden in Stock-Lösungen von 100 mM gelöst. Milchsäure wurde als Stocklösung in RPMI 1640 in einer Konzentration von 2 M gelöst.

3.4 Kits

Tabelle 3.4-1: Kits

Kits	Firma, Ort
Cytofix/Cytoperm Plus, Fixation/ Permeabilization Kit with BD GolgiStop	BD, Deutschland
D_C Protein Assay (Reagent A, B und S)	BioRad, Deutschland
dNTPs	NEB, Deutschland
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Deutschland
DuoSet ELISA IL-6, TNF, IL-10, IL-12, MCP-1	R&D Systems, Deutschland
ECL-Detection-Kit	Amersham, Deutschland
Kaleidoscope Pre-stained Precisision Plus Standard	BioRad, Deutschland
M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant	Promega, Deutschland
QuantiFast SYBR-Green	Qiagen, Deutschland

Random-Decamer-Primer	Ambion, Deutschland
ReBlot Plus Mild	Millipore, Deutschland
RIPA-Puffer	Sigma, Deutschland
RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Deutschland

3.5 Antikörper

3.5.1 Antikörper für FACS

Für den Nachweis von intrazellulären Zytokinen wurden folgende direkt mit Fluorochromen konjugierte monoklonale Antikörper verwendet:

Tabelle 3.5-1: Antikörper für FACS

Spezifität	**Isotyp**	**Klon**	**Spezies**	**Konjugat**	**Menge/ Test**	**Firma, Ort**
IL-12/IL-23 p40	IgG_{2b}	169503	Maus	FITC	0,25 µg pro Test	R&D Systems, Deutschland
IL-12/IL-35 p35	IgG_1	27537	Maus	APC	5 µg proTest	R&D Systems, Deutschland

IL-23 EBI-3	IgG_{2b}	218213	Maus	PE	0,03 µg pro Test	eBio-science, USA
IL-23 p19	IgG_{2b}	727753	Maus	PE	0,05 µg pro Test	R&D Systems, Deutsch-land

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

Tabelle 3.5-2: Isotypen für FACS

Isotyp	**Klon**	**Spe-zies**	**Kon-jugat**	**Menge/Test**	**Firma, Ort**
IgG_1	11711	Maus	APC	10 µl pro 10^6 Zellen	R&D Systems, Deutschland
IgG_{2b}	133303	Maus	FITC	5 µl pro Test	R&D Systems, Deutschland
IgG_{2b}	133303	Maus	PE	10 µl pro 10^6 Zellen	R&D Systems, Deutschland

3.5.2 Antikörper für Western Blot

Für den Proteinnachweis wurden folgende monoklonale Antikörper gegen humane Proteine verwendet:

Tabelle 3.5-3: Antikörper für Western Blot

Spezifität	Klon	Spezies	Konjugat	Eingesetzte Verdünnung	Firma, Ort
Anti-IDO	700838	Maus	Alexa Fluor 488	1:500	R&D Systems, Deutschland
Anti-Actin	A2066	Kaninchen	HRP	1:2000	Sigma, Deutschland
Anti-Akt	polyklonal	Kaninchen	HRP	1:1000	Cell Signaling Technology, Deutschland

Anti-IL-12/IL-23 p40	169503	Maus	FITC	1:500	R&D Systems, Deutschland
Anti-IL-12/IL-35 p35	27537	Maus	APC	1:500	R&D Systems, Deutschland
Anti-IgG Maus	P-0447	Ziege	HRP	1:2500	Dako, Deutschland
Anti-IgG Rabbit	P-0448	Ziege	HRP	1:2500	Dako, Deutschland
Anti-IκBα	L35A5	Maus	HRP	1:1000	Cell Signaling Technology, Deutschland

Anti-P38 MAPK (Thr180/ Tyr182)	mono-klonal	Kanin-chen	HRP	1:1000	Cell Signaling Techno-logy, Deutsch-land
Anti-Phospho-Akt (Ser473)	poly-klonal	Kanin-chen	HRP	1:1000	Cell Signaling Techno-logy, Deutsch-land
Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/ Tyr182)	mono-klonal	Kanin-chen	HRP	1:2000	Cell Signaling Techno-logy, Deutsch-land

3.6 Oligonukleotide und RNA-Standards

Bereits etablierte, mittels HPLC aufgereinigte Oligonukleotide für die quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (RT-qPCR) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Deutschland) bezogen.

Tabelle 3.6-1: Oligonukleotide

Gen		**Sequenz: 5´→ 3´**
Human IL-12A	Sense	GAAGATGTACCGG
	Antisense	TGGAGTTCAAGAC
		GCTCATCACTCTA
		TCAATAGTCACTG
		CC
Human IL-12B	Sense	ACCAGCAGCTTCT
	Antisense	TCATCAGGGACAC
		GCAGAATGTCAGG
		GAGAAGTAGGA
Human IL-23A	Sense	CCCAAGGACTCAG
	Antisense	GGACAACAGAGT
		AGGGAGGCATGA
		AGCTGG

18S rRNA	Sense	ACCGATTGGATGG
	Antisense	TTTAGTGAGCCTA CGGAAACTTGTTA CGAC

Tabelle 3.6-2: RNA-Standards

Gen	Standard
IL-12A und B:	DC+Interferon +LPS (cDNA)
IL-23A:	Monozyten +4 h LPS (cDNA)
18S rRNA:	Mel IM (cDNA)

3.7 Software

Tabelle 3.7-1: Software

Software	**Firma, Ort**
CellQuestPro	BD, Deutschland
FlowJo	TREE STAR Data Analysis Software, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, USA
Image Lab	BioRad, Deutschland
Mastercycler ep realplex	Eppendorf, Deutschland

SensorDish-Reader-Software	PreSens, Deutschland
SOFTmax	Molecular Devices, Deutschland

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Zellen nach dem Ernten oder zum Waschen für sieben Minuten bei 4° C mit 1300 rpm zentrifugiert.

4.1.1 Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität

Zellzahlen wurden mit Hilfe eines „CASY Cell Counter“ gemessen. Ein Volumen von 10 µl Zellsuspension wurde in 10 ml Casy-ton Lösung gegeben. Die Zellzahl wurde durch das Gerät als Mittelwert von drei unabhängigen Messungen bestimmt. Zusätzlich zur Zellzahl, ermittelte das Gerät den Zelldurchmesser sowie das Zellvolumen.

4.1.2 Isolation humaner Monozyten

Monozyten wurden freundlicherweise von Monika Wehrstein aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marina Kreutz, Universitätsklinikum Regensburg, isoliert und zur Verfügung gestellt. Mittels Leukapherese wurden hierfür von gesunden, freiwilligen Spendern Blutzellen gewonnen. Die mononukleären Zellen wurden mit Hilfe von Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll/Hypaque, von den

restlichen Leukozyten isoliert und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde dreimal durchgeführt (Johnson, Mei, Cohn 1977).

Nun erfolgte die Isolierung der Monozyten über Gegenstromelutriation, wie von Andreesen et al. beschrieben (Andreesen et al. 1990).

Um die Reinheit der erhaltenen Zellpopulation zu bestimmen, wurde mittels Durchfusszytometrie die Expression der Antigene CD14 (Monozytenmarker), CD3 (T-Zellmarker) und CD20 (B-Zellmarker) auf der Zelloberfläche bestimmt. Es konnte eine durchschnittliche Monozytenreinheit von mindestens 85 % festgestellt werden.

Nach Übernachtinkubation (1×10^6 Monozyten/2 ml RPMI 1640, 2 % humanes AB-Serum), wurde der Stimulierungsgrad der Zellen, durch die Bestimmung der Interleukin (IL)-6 Konzentration in den Kulturüberständen, kontrolliert. Hierdurch wurde sichergestellt, dass unstimulierte Monozyten verwendet wurden.

4.1.3 Generierung von DC

Zur Generierung von unreifen DC, wurden Monozyten in einer Konzentration von 1 x 10^6 Zellen/1,5 ml RPMI 1640 in Zellkulturflaschen ausgesät und, soweit nicht anders erwähnt, für sieben Tage bei 37° C, 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin versehen und für alle Versuche verwendet. Zudem wurden 225 U/ml Granulozyten/Makrophagen stimulierender Faktor und rekombinantes humanes IL-4 (144 U/ml) hinzugegeben (Inaba et al. 2009).

Nach sieben Tagen wurden die schwimmenden Zellen durch Abpipettieren geerntet und in einer Konzentration von 2 x 10^6 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte in jeweils 3,2 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin ausgesät. Die Aktivierung der DC erfolgte durch Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS), während eine Negativkontrolle unstimuliert blieb. In einige der Proben wurden die Metaboliten Na_2-D-2-Hydroxyglutarat (Na_2-D-2-HG), Na_2-L-2-

Hydroxyglutarat (Na_2-L-2-HG), Na-α-Ketoglutarat, Glutamin, Glutamat oder auch Milchsäure, hinzugefügt.

4.1.4 Gewinnung von DC und deren Überstände

Entsprechend des jeweiligen Versuchs, wurden die DC inklusive Kulturmedium nach vier, 16 oder 24 Stunden in ein 250 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert.
Ein Volumen von 1,5 ml der Kulturüberstände wurde vorsichtig abpippetiert, in 2 ml Röhrchen gesammelt und bei -20° C gelagert. Der restliche Überstand wurde verworfen.
Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration in den Überständen (Tumornekrosefaktor [TNF], IL-6, IL-10, IL-12p70 und Monozyten Chemotaktisches Protein 1 [MCP-1]) wurden industriell hergestellte Enzymgekoppelte Immunabsoptionstest (ELISA) Kits, dem Herstellerprotokoll entsprechend, verwendet.
Die DC wurden in ca. 5 ml RPMI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin resuspendiert und anschließend gezählt. Die für die jeweiligen Versuche benötigte Zellanzahl konnte somit berechnet und eingesetzt werden.

4.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung von Monozyten, wurden diese in einer Dichte von 50 x 10^6/500 µl in eiskaltem RPMI 1640 mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin aufgenommen. Von dieser Suspension wurden in jedes Kryoröhrchen jeweils 500 µl pipettiert. Es wurden 500 µl Einfriermedium aus 20 % Dimethyl Sulfoxid und 80 % FCS hinzugefügt und sofort sorgfältig mit der Zellsuspension vermischt. Für ein stufenweises Einfrieren der Zellen (1° C/min), wurden die Kryoröhrchen in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäß zunächst für zwei Stunden bei -20° C gelagert. Im Anschluss wurden die Röhrchen in -80° C überführt. Die dauerhafte Aufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen, wurden diese aus flüssigem Stickstoff auf Raumtemperatur gebracht. Nach dem Auftauen der Suspension, wurden die Zellen sofort in RPMI 1640 mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin überführt, zentrifugiert und in frischem RPMI 1640 mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin resuspendiert.

Im Anschluss wurden die Zellen gezählt und die benötigten Zellvolumina in Kulturflaschen zu Generierung von DC ausgesät.

4.2 Immunologische Methoden

4.2.1 Gemischte Lymphozyten Reaktion

Zur Bestimmung der Stimulationsaktivität unterschiedlich vorbehandelter DC, wurden diese als Stimulatorzellen in einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) mit allogenen naiven T-Lymphozyten als Responderzellen zusammen gebracht. Zur Quantifizierung der Proliferation der T-Lymphozyten, wurde die Radioaktivität von inkorporiertem radioaktiv markiertem [^{3}H]-Thymidin bestimmt, welches von proliferierenden Zellen in die DNA eingebaut wird.

Für diese Kokultur wurde RPMI 1640, versetzt mit 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 5 % humanem AB-Serum, verwendet.

Monozyten wurden entsprechend Protokoll gewonnen (siehe 4.1.2) und DC entsprechend Protokoll (siehe 4.1.3) generiert. Die Zellen wurden an Tag fünf in der Zellkul-

turflasche mit 10 ng/ml LPS stimuliert, während eine Kontrolle unstimuliert blieb. Am siebten Tag wurden die DC abpipettiert, in ein 50 ml Röhrchen überführt, gezählt und in verschiedenen Konzentrationen (von 1000 bis 10000 Zellen pro Kavität), in die Vertiefungen von 96-Well-Rundbodenplatten pipettiert. Die DC wurden mit allogenen T-Lymphozyten, in konstanter Konzentration von 100.000 Zellen pro Kavität, unter sterilen Bedingungen kokultiviert. Gleichzeitig wurden die Metaboliten Na_2-D- oder Na_2-L-2-HG (beide 10 mM) zugegeben, während eine Kontrolle unbehandelt blieb. Um die Zellen dicht zu packen und deren optimale Interaktion zu garantieren, wurde die Platte zentrifugiert und anschließend fünf Tage bei 37° C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert. Dabei hatten die Stimulator-Zellen Gelegenheit, die Responder-Zellen zur Proliferation anzuregen. Als Kontrollen dienten isoliert angesetzte DC bzw. allogene T-Lymphozyten. Nach fünf Tagen wurden zur Quantifizierung der Proliferation der Responderzellen, 0,5 mCi [^{3}H]-Thymidin pro Kavität hinzugegeben.

Zur quantitativen Messung der Responder-Proliferation, wurden nach weiteren 16 Stunden Inkubation, die Komplexe mit einem Wallac-Erntegerät (Filter Mate Cell Harvester) auf 96-Well-Uni Filter-Platten übertragen, mit 50 µl Szintillisationslösung Microscint 20 überschichtet und mit TopSeal-A-Folien verschlossen. Die Messung des [^{3}H]-Einbaus erfolgte mittels Top Count NXT Plattenzähler und wurde in „Zähler pro Minute“ (cpm, *counts per minute*) wiedergegeben. Jeder hierbei angegebene Messwert entsprach dem Mittelwert von jeweils vier Vertiefungen +/- Standardfehler (SEM).

Arbeitsschritte, die den Umgang mit radioaktiven Substanzen einschlossen, wurden freundlicherweise von Alice Peuker und Monika Wehrstein aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marina Kreutz, Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt.

4.2.2 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können zellgebundene Fluoreszenz-markierte Antikörper detektiert und somit Informationen über den Phänotyp der Zelle gewonnen werden. Einzelne Zellen passieren hierbei innerhalb eines Flüssigkleitsstroms einen fokussierten Laserstrahl. Sowohl die

Fluoreszenz der durch den Laserstrahl angeregten Farbstoffe, als auch die Lichtstreuung durch die einzelnen Zellen werden hierbei detektiert. Die jeweilige Richtung des Streulichts ermöglicht Rückschlüsse über die Größe (Vorwärts-Streulicht) und die Granularität (Seitwärts-Streulicht) der einzelnen Zellen. Das verwendete Messgerät (FACS Calibur) verfügte über zwei Laser. Damit war die Messung von insgesamt sechs Parametern pro Zelle möglich. Es wurden die Farbstoffkonjugate Fluorothioisocyanat (FITC), Allophycocyanin (APC) und Phycoerythrin (PE) bei der Färbung der Zellen verwendet.

Zur Färbung intrazellulärer Proteine, wurden 10 x 10^6 Monozyten in einem Volumen von 10 ml RPMI 1640 mit 10 % FCS, wie in 4.1.3 beschrieben, in kleinen Zellkulturflaschen kultiviert und DC generiert. An Tag sieben wurden die DC in den Flaschen mit 10 ng/ml LPS stimuliert und Metaboliten (Na_2-D-2-HG, Na-α-Ketoglutarat, Na_2-α-Ketoglutarat, alle 10 mM), gemeinsam mit Monensin (6,7 µl/10 ml), einer Substanz die den Transport von Proteinen im Golgi, und somit deren Sekretion blockiert (Brodie 1981), für 16 Stunden hinzugefügt.

Nach 16 Stunden wurden die Zellen durch Abpipettieren geerntet, inklusive Überstand in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt, gezählt und zentrifugiert. Nun wurde der Kulturüberstand verworfen, die Zellen in 1 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert, in ein Röhrchen überführt und erneut zentrifugiert (1600 rpm, 4 min, 4° C). Dieser Waschschritt mit PBS wurde zweimal durchgeführt. Im Anschluss wurde die PBS mit einer gelben Spitze entfernt und die DC mit 1 ml/10^7 Zellen 4 %-igem Paraformaldehyd (pH 7,0) für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach folgten erneut zwei Waschschritte mit PBS. Im Anschluss wurden die Zellen über Nacht bei 4° C gelagert.

Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1600 rpm, 4 min, 4° C), die PBS verworfen, die Zellen in ca. 2 ml Waschpuffer (aus Cytofix/Cytoperm Plus Kit) aufgenommen und auf Röhrchen verteilt. Nach erneutem Zentrifugieren (1600 rpm, 4 min, 4° C), wurde der Waschpuffer abgeschüttet und die jeweiligen Antikörper dem verbliebenen Zellpellet zugefügt. Entsprechend der Vorgabe der Antikörperhersteller, wurden die Zellen

ohne Licht für 30 Minuten bei Raumtemperatur bzw. bei 4° C inkubiert.

Im Anschluss wurden ca. 2 ml Waschpuffer (aus Cytofix/Cytoperm Plus Kit) in die Röhrchen zugegeben, ein weiterer Zentrifugationsschritt (1600 rpm, 4 min, 4° C) durchgeführt und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde anschließend nochmals mit Waschpuffer (aus Cytofix/Cytoperm Plus Kit) durchgeführt. Letztendlich wurden die Zellen in 400 µl 1 %-igem Paraformaldehyd aufgenommen und mittels FACS Calibur die intrazelluläre Expression verschiedener Proteine gemessen.

Die Analyse erfolgte anschließend mittels FlowJo Software.

4.2.3 Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA)

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration in den Überständen (Tumornekrosefaktor [TNF], IL-6, IL-10, IL-12p70 und MCP-1) wurden industriell hergestellte Enzymgekoppelte Immunabsoptionstest (ELISA) Kits verwendet. Die Kulturüberstände wurden hierfür, wie in 4.1.4 beschrieben, gewonnen.

Bei dieser Methode bindet das zu analysierende Antigen an den sogenannten Coating-Antikörper. Dieser „Coating“-Antikörper ist an die feste Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden. An das gebundene Antigen bindet anschließend der Detektionsantikörper, der mit einem Marker (hier ein Enzym) gekoppelt ist. Dieser Marker lässt bei der Umsetzung eines zugegebenen Substrats einen Farbstoff entstehen. Über die Stärke der Fluoreszenz können Rückschlüsse auf die Konzentration des gesuchten Antigens gezogen werden (Freudig und Sauermost 2004). Die Analyse der einzelnen Zytokine erfolgte mittels „Duo-Set ELISA“, entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die Messungen wurden mit einem „Emax precision microplate reader“ durchgeführt.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Herstellung von Zelllysaten mit RIPA-Puffer

Für die Herstellung von Zelllysaten mit Hilfe von RIPA-Puffer, wurden Monozyten entsprechend Protokoll ge-

wonnen (siehe 4.1.2), DC nach Protokoll (siehe 4.1.3) generiert und in 6-Well-Platten kultiviert. Gleichzeitig erfolgte die Aktivierung der Zellen mit 100 ng/ml LPS, während eine Negativkontrolle unstimuliert blieb. Zudem wurden die DC mit jeweils einem der Metaboliten Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM) behandelt.

Nach 24 Stunden wurde mit der Lysatherstellung begonnen. Hierfür wurde ein gebrauchsfertiger Lysepuffer (RIPA-Puffer), dem zuvor eine Tablette von *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets* zugesetzt wurde, verwendet (Gesamtvolumen 10 ml). Der Lysepuffer wurde bei -20° C aufbewahrt und erst kurz vor der Anwendung aufgetaut.

Die Zellsuspensionen aus den Kavitäten der 6-Well-Platten wurden in 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1300 rpm, 7 min, 4° C) und zweimal im Röhrchen mit PBS gewaschen (siehe 4.2.2). Parallel wurden die einzelnen Vertiefungen der 6-Well-Platten zweimal mit PBS gespült, um einige adhärente Zellen zu lösen. Nach dem zweiten Waschschritt wurde die PBS aus den Vertiefungen zur Zellsuspension

hinzugegeben und die vereinigten Zellen in ein 1,2 ml Röhrchen überführt und gezählt, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Anschließend wurden in jede Vertiefung 50 µl RIPA-Puffer-Gemisch gegeben, die restlichen verbliebenen Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und das Lysat aus den Vertiefungen in die 1,2 ml Röhrchen mit den gewaschenen Zellen überführt. Nun wurden die Proben eine Minute geschüttelt und im Anschluss für fünf Minuten bei -20° C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben wieder aufgetaut, erneut für eine Minute geschüttelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um sie nun für mindestens 24 Stunden bei -80° C aufbewahrt.

4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde ermittelt, um später bei der Gelelektrophorese gleiche Proteinmengen auftragen zu können. Dies erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad D_C Protein Assay, dessen Prinzip auf die Methode nach Lowry zurückzuführen ist (Lowry et al. 1951). Bei der sogenannten Biuret-Reaktion bildet sich zwischen

Cu^{2+}-Ionen und den Peptidbindungen der Proteine in alkalischer Lösung ein blau-violetter Komplex. Im nächsten Schritt kommt es zur Reduktion der Cu^{2+}- zu Cu^{+}-Ionen, welche nun das gelbliche Folin-Ciocalteu-Reagenz (Mischung aus Molybdän- und Wolfram-Heteropolysäuren) zu Molybdän- und Wolframblau reduzieren. Die entstehende blaue Färbung kann bei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben mit einer Probenverdünnung von 1:5. Als Standard diente Rinderserum-Albumin, dessen Messobergrenze bei 1,5 mg/ml festgelegt wurde.

4.3.3 Herstellung von Zelllysaten mit Hilfe von Phosphatase-Inhibitoren

Für die Herstellung von Zelllysaten mit Hilfe von Phosphatase-Inhibitoren, wurden Monozyten entsprechend Protokoll gewonnen (siehe 4.1.2), DC nach Protokoll (siehe 4.1.3) generiert und in 6-Well-Platten kultiviert. Hierbei erfolgte die Aktivierung der Zellen mit 100 ng/ml LPS, während eine Negativkontrolle unstimuliert blieb. Zudem wurden die DC mit jeweils einem der Metaboliten Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat,

Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM) behandelt. Nach einer oder 24 Stunden wurde mit der Lysatherstellung begonnen. Dazu wurde zunächst ein zytoplasmatischer Extraktionspuffer (CEB-Puffer) hergestellt, der über Monate bei 4° C gelagert werden kann. Des Weiteren wurden ein „Pre-Equilibration"-Puffer, sowie ein Lyse-Puffer frisch zubereitet.

Diese Art der Lysatherstellung ermöglicht, mit Hilfe der Phosphatase-Inhibitoren, den Erhalt der Phosphorylierung der verschiedenen Proteine. In der Folge können die Proteine im phosphorylierten, sowie im nicht-phosphorylierten Zustand mittels Western Blot nachgewiesen werden.

Herstellung der erforderlichen Puffer:

Tabelle 4.3-1: CEB-Puffer

Substanz	Pufferkonzentration
Ethylendiaminessigsäure	1 mM
KCL	60 mM
Trishydroxymethyl-Aminomethan, pH 7,9	1 M

In destilliertem H_2O

Tabelle 4.3-2: „Pre-Equilibration“-Puffer

Substanz	**Stock-Lösung**	**Pufferkonzentration**
Aprotinin	2 mg/ml	2 µg/ml
Dithiothreitol	100 mM	1 mM
Ethylendiaminessigsäure, pH 8,0	500 mM	1,5 mM
Ethylenbis (oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure	200 mM	1 mM
Leupeptin	1 mg/ml	2 µg/ml
NaF	1 M	50 mM
NaOrthovanadat	200 mM	1 mM
NaPyrophosphat	250 mM	25 mM
Pepstatin A	1 mg/ml	2 µg/ml
ß-Glyzerophosphat	1 M	50 mM

in CEB-Puffer

Tabelle 4.3-3: Lyse-Puffer

Substanz	**Stock-Lösung**	**Pufferkonzentration**
1,10-Phenantrolin	0,1 mg/ml	1 mM
Bestatin	5 mg/ml	10 µg/ml
Chymostatin	20 mg/ml	100 µg/ml
N[N-(L-3-trans-Carboxyoxirane-2-Carbonyl)-L-Leucyl-Agmatin	3 mg/ml	3 µg/ml
Nonidet P40	10 %	0,4 %

in Pre-Equilibration-Puffer

Die Zellen wurden nach der Inkubationsdauer aus den 6-Well-Platten abpipettiert, in 15 ml Röhrchen überführt, gezählt und zentrifugiert (3500 rpm, 4 min, 4° C). Der Überstand wurde abpipettiert, für ELISA in 1,5 ml Röhrchen aliquotiert und bei -20° C aufbewahrt.

Wenige, in den 6-Well-Platten verbliebene adhärente DC, wurden mit PBS gespült, und die PBS in das 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellen in den 15 ml Röhrchen wurden in der PBS resuspendiert, abzentrifugiert (3500 rpm,

4 min, 4° C) und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde zweimal durchgeführt und die Zellen hierbei in ein 1,5 ml Röhrchen überführt.

Die Wasch-PBS wurde nun mit einer Pipette vollständig entfernt. In jede Vertiefung der 6-Well-Platten, sowie in jedes Röhrchen, wurden 500 µl „Pre-Equilibration"-Puffer gegeben. Die Behandlung der Zellen mit „Pre-Equilibration"-Puffer, der hauptsächlich Protease- und Phosphataseinhibitoren enthielt, diente der Vorbereitung der Zellen auf die nachfolgende Lyse mit dem Lyse-Puffer. Anschließend wurden die Platten vier Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurde der Puffer von den Vertiefungen in die Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden erneut abzentrifugiert (3500 rpm, 4 min, 4° C) und der Überstand abpipettiert und verworfen.

Im Anschluss wurden in jede Vertiefung 50 µl Lyse Puffer pro 10 x 10^6 Zellen pipettiert. Mit einem Zellschaber wurden die verbliebenen adhärenten Zellen in den Kavitäten der Platten abgekratzt, der Puffer mit den lysierten Zellen aus den Kavitäten in die 1,5 ml Röhrchen überführt und diese für zehn Minuten auf Eis inkubiert.

Danach wurden jeder Probe 60 µl 2 x Sodium Dodecyl

Sulfat (SDS)-Probenpuffer (s. 4.3-4) hinzugefügt und mit einer Pipettenspitze gut durchmischt. Die Röhrchen wurden für zehn min bei 95° C unter Schütteln gekocht und der Probeninhalt auf jeweils drei 1,5 ml Röhrchen aufgeteilt. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80° C.
Eine Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben war bei dieser Methode nicht möglich, da SDS den Nachweis stört (s.4.3.4).

4.3.4 Vorbereitung und Auftragen der Proben

Nach Herstellung der Lysate, sowie der Proteinbestimmung wurden die Proben für die Gelelektrophorese vorbereitet. Die Proteinproben (mit RIPA-Puffer gewonnen) wurden aufgetaut und abzentrifugiert (3500 rpm, 4 min). 20 µg Protein wurden entnommen und mit PBS auf 20 µl aufgefüllt. Mit zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer (s.u.) wurden die Proben 1 + 1 verdünnt (Proteinkonzentration nun 0,5 µg/µl) und für zehn Minuten bei 95° C unter Schütteln gekocht. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert und bis zur Verwendung auf Eis gestellt.

Proben, die mit Hilfe von Phosphatase-Inhibitoren hergestellt wurden, wurden ohne Verdünnen zehn Minuten bei 95° C gekocht, anschließend kurz abzentrifugiert und direkt aufgetragen.

Tabelle 4.3-4: Herstellung von zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer

SDS	2 g
Bromphenolblau	10 mg
Glycerin	10 ml
Trishydroxymethyl-Aminomethan-Puffer (1,07 M; pH 6,8)	5 ml
2-Mercaptoethanol	5 ml

In 50 ml destilliertem H_2O

Glycerin besitzt eine hohe Dichte wodurch das Gemisch aus Probe und Probenpuffer bei Auftragen in die Geltaschen besser absinkt und dort verbleibt. Die Zugabe von Bromphenolblau ermöglicht das bessere Beobachten des Laufverhaltens der Proben während der Gelelektophorese. Gleichzeitig werden die Disulfidbrücken der Proteine, welche einzelne Polypeptidketten miteinander verbinden,

durch das 2-Mercaptoethanol reduziert. Durch die Bindung des SDS an die Proteine, wird deren Eigenladung überlagert. Zudem stoßen sich die stark negativ geladenen SDS-Moleküle gegenseitig ab, wodurch ihre Anlagerung an Proteine deren Faltung löst. Durch diese Vorgänge geht der Einfluss von Struktur und Eigenladung der Proteine auf die Gelelektrophorese verloren und es kann eine Auftrennung erfolgen, die nur von der Größe und damit der Masse der Proteine abhängt (Freudig und Sauermost 2004).

4.3.5 Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von denaturierten Proteinen mit einem diskontinuierlichen Gelsystem. Diese von Laemmli 1970 entwickelte Methode, bewirkt die Wanderung der Proteine vom Minus- zum Pluspol, des aus Acrylamid und Bisacrylamid bestehenden Gelnetzes. Das Gelnetz ist diskontinuierlich, da es sich aus einer Sammelgel- und einer Trenngelschicht zusammensetzt, welche sich in ihrer Salz- und Acrylamid-Konzentration unter-

scheiden. Durch diesen Versuchsaufbau werden die Proteine im Bereich des Sammelgels so gestapelt, dass sie gleichzeitig in das Trenngel eintreten können (Laemmli 1970).

In dieser Arbeit wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 12 % und Sammelgele mit einer Acrylamidkonzentration von 5 % eingesetzt. Das SDS-Gel wurde am Tag vor der Gelelektrophorese gegossen, um ein vollständiges Auspolymerisieren zu garantieren. Entsprechend der Tabelle 4.3.-7 wurde die Stammlösung des Trenngels vorbereitet und sofort verwendet. Durch Zugabe der Ammonium-Persulfat (APS)-Lösung als Polymerisationsinitiator und N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin 0,775 g/ml (TEMED) als Polymerisationskatalysator wurde die Polymerisation gestartet.

Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten, die über Gummidichtungen abgedichtet wurden, gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet. Zur Auspolymerisierung wurde es ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Sammelgel entsprechend Tabelle 4.3-8 gemischt, das Isopropanol entfernt und stattdessen das Sammelgel luftblasenfrei zwischen die

zwei Glasplatten eingefüllt. In das Sammelgel wurde ein Kamm gedrückt, welcher zur Aussparung von Probentaschen in dem Gel führte. Nach der Auspolymerisierung wurde das Gel in feuchte Tücher gewickelt und über Nacht bei 4° C aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurde das SDS-Gel in eine Elektrophoresekammer montiert und mit 1 x Laemmlipuffer (1:5 in destilliertem H_2O, Endvolumen 500 ml) gefüllt und überschichtet. Der Kamm wurde vorsichtig aus dem Sammelgel entfernt und die im Gel befindlichen Probentaschen vorsichtig mit einer Spritze mit Laemmlipuffer gespült. In einen Kamm mit zehn oder elf Taschen wurden jeweils 10 µg (10 µg/10 µl bei Nuklearen Faktor des κ-leichten Polypeptidgen-Enhancers in B-Zellen, Inhibitor α [NFκB]) oder 2,5 µg (2,5 µg/5 µl bei Indolamin 2,3-Dioxygenase [IDO]) der vorbereiteten Proben (s. 4.3.4) aufgetragen. Von den Proben, die mit Hilfe von Phosphatase-Inhibitoren hergestellt wurden, wurden jeweils 15 µl in eine Tasche pipettiert. Eine Tasche wurde mit 5 µl Kaleidoscope Prestained Precision Plus Standard, als Molekulargewichtsstandard, beladen.

Tabelle 4.3-5: Erforderliche Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Sammelgel-puffer	0,5 M Trishydroxy-methyl-Aminome-than, pH 8,8	in destilliertem H_2O (500 ml)
Trenngel-puffer	1,5 M Trishydroxy-methyl-Aminome-than, pH 8,8	in destilliertem H_2O (500 ml)
SDS (10 %)	10 % SDS	in destilliertem H_2O (100 ml)
APS (10 %)	10 % APS	in destilliertem H_2O (1 ml), vor jeder An-wendung frisch herstellen

Tabelle 4.3-6: Herstellung des fünffach konzentrierten Laemmli-puffer

Trishydroxymethyl-Aminomethan	40 mM
Glycin	0,95 M
2x SDS	0,5 %

In destilliertem H_2O lösen

Tabelle 4.3-7: Herstellung der SDS-Gel-Stammlösungen

Zugegebene Lösung	**Trenngel-Stammlösung (12 %)**	**Sammelgel-Stammlösung (5 %)**
Sammelgelpuffer	-	25 ml
Trenngelpuffer	25 ml	-
SDS (10 %)	1 ml	1 ml
Rotiphorese Gel 30	40 ml	16,65 ml
Mit destilliertem H_2O auf jeweils 100 ml Endvolumen auffüllen		

Tabelle 4.3-8: Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gel

Zugegebene Lösung	**Trenngel, 12 %**	**Sammelgel, 5 %**
Sammelgel-Stammlösung	-	6 ml
Trenngel-Stammlösung	5 ml	-
TEMED	5 µl	6 µl
APS (10 %)	40 µl	30 µl

Über dem Gel wurde für ca. 20 Minuten eine Spannung von 80 Volt angelegt, bis die Proben in das Sammelgel hineingelaufen waren. Nun erhöhte man die Spannung auf 100 Volt und ließ die Banden durch das Sammelgel hindurchwandern. Bei Erreichen des Trenngels wurde die Spannung für ca.100 Minuten auf 120 Volt erhöht. Erreichte die Lauffront den unteren Rand des Gels, wurde die Gelelektrophorese beendet.

4.3.6 Western Blot

Nach dem Auftrennen der Proteine mit SDS-PAGE, wurden die Proteine aus dem SDS-Gel mit Hilfe eines semitrockenen Systems elektrophoretisch auf eine Immobilon-P Transfer Membran transferiert (Towbin et al. 1979). Dadurch konnten bestimmte Proteine immunologisch nachgewiesen werden.

Hierfür wurden zunächst drei Puffer zubereitet:

Tabelle 4.3-9: Herstellung des Anoden-Puffer A

Trishydroxymethyl-Aminomethan (pH 10,4)	36,3 g
Methanol	200 ml

mit destilliertem H_2O auf 1 l Endvolumen auffüllen

Tabelle 4.3-10: Herstellung des Anoden-Puffer B

Trishydroxymethyl-Aminomethan (pH 10,4)	3,03 g
Methanol	200 ml
mit destilliertem H_2O auf 1 l Endvolumen auffüllen	

Tabelle 4.3-11: Herstellung des Kathoden-Puffer C

ε-Amino-n-Capronsäure (pH 7,6)	5,2 g
Methanol	200 ml
mit destilliertem H_2O auf 1 l Endvolumen auffüllen	

Die Immobilon-P Transfer Membran wurde in etwa auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten und in Isopropanol für zwei Minuten getränkt. Anschließend wurde sie in Anoden-Puffer B äquilibriert. Zudem wurden Whatman 3 mm Filterpapiere auf Größe des SDS-Gels zugeschnitten und jeweils drei davon in einem der Puffer getränkt. Die drei in Anoden-Puffer A getränkten Filterpapiere wurden luftblasenfrei auf eine Halbtrockenzelle (Anode) gelegt. Darüber wurden bündig die drei in Anoden-Puffer B getränkten Filterpapiere (ebenfalls luftblasenfrei) plaziert. Das SDS-Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen und vorsichtig in Anoden-Puffer B gelegt. Nun

wurde die angefeuchtete Membran auf die Filterpapiere gelegt und das SDS-Gel luftblasenfrei darauf gebettet. Die drei in Kathoden-Puffer C befindlichen Filterpapiere wurden auf dem SDS-Gel luftblasenfrei plaziert und die Halbtrockenzelle mit dem oberen Teil, der Kathode, verschlossen. Der Blot erfolgte für eine Stunde bei 11 V. Die angelegte Spannung bewirkte eine Wanderung der Protein-SDS-Komplexe in Richtung Anode, welche hierbei in der Membran hängen blieben.

4.3.7 Immunodedektion

Die anschließende Immunodedektion zur Visualisierung des Blots, fand nach dem Prinzip der Chemilumineszenz statt, welche spezifische Antikörper und ein „enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Detection Kit beinhaltet.

Benötigte Puffer:

Tabelle 4.3-12: Herstellung von zehnfach konzentriertem Trishydroxymethyl-Aminomethan gepufferte Salzlösung (TBS)-Puffer

Trishydroxymethyl-Aminomethan	45,8 g
Natriumchlorid	175,5 g
Salzsäure	pH 7,4 einstellen
Mit destilliertem H_2O auf 2 l Endvolumen auffüllen	

Tabelle 4.3-13: Herstellung von Waschpuffer

10-facher TBS-Puffer	100 ml
Polyethylen Glycol Sorbitan Monolaurate (TWEEN 20)	1 ml

mit destilliertem H_2O auf 1 l Endvolumen auffüllen

Tabelle 4.3-14: Herstellung von ECL-Lösung

Trishydroxymethyl-Aminomethan (1 M, pH 8,5)	20 ml
p-Coumarin-Säure	13,14 g
Luminol	100 mg
Dimethyl Sulfoxid	2 ml

mit destilliertem H_2O auf 200 ml Endvolumen auffüllen

Die geblottete PVDF-Membran wurde zweimal für zehn Minuten in ca. 10 ml Waschpuffer unter Schütteln gewaschen. Daraufhin wurde der Waschpuffer abgegossen und die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 %-Magermilchlösung (5 g Magermilchpulver in 100 ml Waschpuffer, filtriert) geschüttelt. Die Membran wurde über Nacht bei 4° C in einer dem Primär-Antikörper entsprechend verdünnten Lösung (s. 3.5.2) in 5 %-Magermilchlösung inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der überschüssige Antikörper, der nicht gebunden hatte, in drei Waschschritten mit Waschpuffer (jeweils zehn Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur), entfernt. Daraufhin wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem sekundärem Antikörper (eingesetzte Verdünnung s. 3.5.2), der die Fc-Region des Primär-Antikörpers erkennt, in 5 %-Magermilchlösung geschüttelt.

Es folgten erneut drei Waschschritte (jeweils 10 min) und anschließend zwei Minuten Inkubation mit einer Substratlösung aus 5 ml ECL-Lösung, versetzt mit 1,5 µl 30 %-igem H_2O_2. Die Position der aneinander gekoppelten Antikörper konnte mit Hilfe dieser ECL-Färbung ermittelt werden.

Die Membran wurde nun in eine Fotokassette gelegt und fixiert. In einer Dunkelkammer wurde ein autoradiographischer Film auf die Membran in die Kassette gelegt und abhängig von der Signalstärke des jeweiligen Antikörpers unterschiedlich lang belichtet (1 s bis 20 min). Nach Entwicklung des autoradiographischen Films, wurde dieser erneut auf die Membran gelegt und der geblottete Standard

nachgezeichnet. Nach lösen der Membran aus der Kassette und erneutem Waschschritt, erfolgte die Behandlung mit Reblot Plus Mild (entsprechend Herstellerangaben), um den gebundenen Antikörper von der Membran zu lösen und dadurch den Nachweis eines anderen Antikörpers zu ermöglichen. Zur Feststellung, wie viel Protein in den einzelnen Proben vorhanden war, wurden alle Membranen mit Anti-Aktin-Antikörper als Kontrollen behandelt und mit Hilfe eines autoradiographischen Films entwickelt.

4.3.8 Auswertung

Die entwickelten Filme wurden mittels Image Reader und der Software Image Lab eingelesen und digitalisiert. Anschließend erfolgte die zweifache Auswertung der Daten mit den Funktionen „Volume“ und „Line and Bands“ der Image Lab Software.

4.4 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Methoden und Arbeiten wurden mit RNase-/DNase-freien Filterspitzen und RNase/DNase-freiem H_2O (PCR-Wasser) durchgeführt.

4.4.1 Isolation von RNA aus DC

Für die Durchführung einer Genexpressionsanalyse, musste zunächst die RNA der Zellen gewonnen werden. Nach Gewinnung von Monozyten (siehe 4.1.2) und Generierung von DC (siehe 4.1.3), wurden diese in 6-Well-Platten kultiviert. Die Aktivierung der DC erfolgte mit 100 ng/ml LPS, während eine Negativkontrolle unstimuliert blieb. Einige der Proben wurden mit jeweils einem der Metaboliten Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) und Milchsäure (15 mM) behandelt (siehe 4.1.3). Nach vier Stunden Inkubation, wurden die Zellen durch Abpipettieren geerntet, inklusive Überstand in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt, gezählt und mit 1300 rpm für sieben Minuten zentrifugiert. Nun wurde der Kulturüberstand abgenommen und aliquotiert, sowie die Zellen in PBS resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und dieser Waschvorgang mit PBS wiederholt. Anschließend wurden die wenigen verbliebenen Zellen in den Vertiefungen der Platte mit 350 µl RLT-Puffer (aus dem RNeasy Mini-Kit) versetzt und mit einem Zellschaber lysiert. Der Puffer mit den lysierten Zellen wurde nun aus

der Vertiefung in das 50 ml Röhrchen mit dem Zellpellet überführt. Nach Zugabe von 2 % β-Mercaptoethanol, wurde das Zellpellet mehrmals durch eine Spritze mit gelber Kanüle (20 G) gezogen und die Zellen somit lysiert.
Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini-Kit, den Herstellerangaben entsprechend. Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde photometrisch mit Hilfe des Spektralphotometers NanoDrop ND1000 bestimmt.
Die isolierte RNA wurde entweder sofort in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben oder bis zur reversen Transkription bei -80° C gelagert.

4.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der PCR werden spezifische DNA-Fragmente in vitro amplifiziert. Um den zu amplifizierenden Bereich der DNA zu flankieren, werden eine DNA-Vorlage, eine hitzestabile DNA-Polymerase, sowie ein sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer benötigt (Mullis et al. 1986). In dieser Arbeit wurde eine spezielle Form der PCR angewendet, die quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (RT-qPCR), welche die Quantifizierung der Expressionsstärke von Genen ermöglicht. Hierfür musste die

gewonnene RNA zunächst durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden (siehe 4.3.2.1), da eine RNA-Amplifikation durch die eingesetzten DNA-Polymerasen nicht möglich ist.

4.4.2.1 Reverse Transkription

Die Transkription der isolierten RNA in cDNA, erfolgte unter Verwendung des Promega Kit, mit Hilfe der reversen Transkriptase aus einem murinen Leukämie Virus (Stamm Moloney; M-MLV), Deka-Nukleotid-Primern mit zufälliger Sequenz (Random-Decamer-Primer) und 2-Desoxy-Ribonukleosid-5`-Triphosphaten (dNTPs). Jeweils 500 ng einer isolierten RNA-Probe wurden zur Bildung von cDNA verwendet. Die Reaktion wurde in dickwandigen Reaktionsgefäßen angesetzt und in einer PCR-Thermocycler inkubiert.

Tabelle 4.4.1: Ablauf der reversen Transkription

Denaturierungsschritt:	
Isolierte RNA (500 ng)	0,5µg
Random-Decamer-Primer	1 µl
dNTPs (je 10 µM)	1 µl
PCR-Wasser	12,5 µl
5 min Inkubation bei 65° C, auf Eis stellen, abzentrifugieren.	
Inkubationsschritt:	
M-MLV-Puffer (5x)	4 µl
2 min Inkubation bei 42° C.	
Reverse Transkription:	
M-MLV Reverse Transkriptase	1 µl
50 min Inkubation bei 42° C	
Inaktivierung der M-MLV:	
15 min Inkubation bei 70° C	
Gesamtvolumen der Reaktion:	20µl

4.4.2.2 Quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Nach der Transkription der zu untersuchenden RNA in cDNA (siehe 4.3.2.1), erfolgte die Amplifikation der DNA mit Hilfe der RT-qPCR. Bei dieser Methode wird ein Farbstoff verwendet (z.B."SYBR-Green"), welcher sich in doppelsträngige DNA einlagert und in dieser gebundenen Form fluoresziert. Nach jedem PCR-Zyklus wird vom PCR-Gerät (Realplex Mastercycler epGradient S) die Fluoreszenzmenge registriert und bestimmt. Die Fluoreszenzmenge ist zur Menge der amplifizierten DNA proportional. In der frühen und zugleich exponentiellen Phase der PCR, erfolgt die Quantifizierung der PCR-Produkte. Hierbei wurde ein sogenannter "cycle threshold" (ct)-Wert für jede gemessene Probe vom PCR-Gerät bestimmt. Dieser ct-Wert beschreibt den PCR-Zyklus, in dem die Fluoreszenz in einer Probe erstmals den Wert der Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Durch Amplifikation von cDNA aus Positivkontrollen und den daraus ermittelten ct-Werten, wurde für jedes untersuchte Gen eine Standardgerade erstellt. Mit Hilfe dieser Standardgeraden konnte dem ct-

Wert einer Probe, die relative cDNA-Menge zugeordnet werden.

4.4.2.2.1 Reaktionsansatz der RT-qPCR

Die quantitative RT-qPCR wurde mit Hilfe des QuanFast SYBR-Green-Kit durchgeführt.

In PCR-Platten mit 96 Vertiefungen in einem Volumen von 10 µl wurden die Reaktionen angesetzt. Die verwendete cDNA wurde 1:10 in PCR-Wasser verdünnt.

Der Reaktionsansatz enthielt je Vertiefung:

Tabelle 4.4.1: Reaktionsansatz einer RT-qPCR

Quantifast SYBR-Green-Mischung	5,0 µl
Sense-Primer (10 µM)	0,5 µl
Antisense-Primer (10 µM)	0,5 µl
PCR-H_20	3,0 µl
cDNA-Probe	1 µl

Jede Probe wurde in Triplikaten aufgetragen und gemessen.

Die PCR-Platte wurde vorsichtig mit einem Heatsealing-Film überzogen und mit einem „Heat Sealer“ versiegelt.

Kurz vor dem Beginn des PCR-Verfahrens, wurde die Platte zentrifugiert und heruntergekühlt. Die RT-qPCR erfolgte mit Hilfe des Realplex Mastercycler epGradient S nach dem folgenden Programm:

Tabelle 4.4.1: RT-qPCR-Programm

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

Zur Quantifizierung und Effizienzkontrolle der Reaktion, wurde eine Standardkurve angelegt. Hierfür wurde bei jeder RT-qPCR-Messung, neben den zu analysierenden Proben, eine Verdünnungsreihe angelegt (unverdünnt, 1:10,

1:50, 1:100, 1:500, 1:1000), welche eine für das zu untersuchende Gen positive Probe enthielt.

Die Realplex-Software berechnete die relative cDNA-Menge in den einzelnen Proben, indem sie die Steigung der Standardgeraden sowie den Schnittpunkt der Standardgeraden mit dem y-Achsenabschnitt ermittelte.

Anhand des Verlaufs der jeweiligen Schmelzkurve wurde die spezifische Amplifikation des gewünschten PCR-Produktes kontrolliert. Die erhaltenen Daten wurden auf die jeweilige Menge von 18S rRNA in den Proben, welche ebenfalls durch RT-qPCR ermittelt wurden, normalisiert.

4.5 Bestimmung des Sauerstoffgehalts in Kulturen von DC

Die Bestimmung des Sauerstoffgehalts in Kulturen humaner DC, erfolgte mit Hilfe des nicht-invasiven Sensor-Dish-Reader-Systems. Hierbei werden spezielle 24-Well-Mikrotiterplatten (PreSens Oxodish OD24 Platten) benötigt. Diese besitzen in den Vertiefungen einen fluoreszierenden Farbstoff, der als Sauerstoffsensor fungiert. Während der Messung stehen die speziellen Mikrotiterplatten

auf einer Messeinheit (SensorDish Reader) in einem Brutschrank. Der fluoreszierende Farbstoff in den Vertiefungen der Platte reagiert nun auf die verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen in der Kultur und wird von der Messeinheit mittels Leuchtdiode angeregt. Anschließend registriert die Photodiode der Messeinheit das emittierte Licht des Farbstoffs. Das gewonnene Signal wird über einen angeschlossenen Computer in die SensorDish-Reader-Software importiert und in mg/l Sauerstoff umgerechnet.
Für diese Methode wurden Monozyten entsprechend Protokoll gewonnen (siehe 4.1.2) und DC entsprechend Protokoll generiert (siehe 4.1.3). Nach sieben Tagen wurden die Zellen abpipettiert, gezählt und in einer Konzentration von 1 x 10^6 DC/Vertiefung in einer PreSens Oxodish OD24 Platte ausgesät. Zugleich erfolgte die Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS), sowie die Behandlung mit den Metaboliten D-2-Hydroxyglutarat (10 mM) oder Rotenon (0,5 µM).
Für die Messung der Sauerstoffkonzentration in den Überständen der Zellen, wurde die PreSens Oxodish OD24

Platte bei 5 % CO_2 inkubiert. Die Aufzeichnung des Sauerstoffgehalts in den Zellüberständen der einzelnen Vertiefungen, erfolgte über 24 Stunden (Messung alle 30 s).

4.6 Messung der mitochondrialen Aktivität in DC

Zur Analyse der Aktivität mitochondrialer Enzyme in DC, wurde die 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid (XTT)-Methode verwendet. Hierbei wird XTT auf der Zellaußenseite von metabolisch aktiven Zellen zu einem Formazan-Farbstoff reduziert. Dieser orange-gelbe Farbstoff wird photometrisch erfasst, wobei die Absorption durch den Farbstoff zur Zellzahl proportional ist. Es wird davon ausgegangen, dass die erfasste Reduzierung des XTT dem $NADH/H^+$-Status der Zellen entspricht, der hauptsächlich aus dem Zitratzyklus der Mitochondrien herrührt (Berridge et al. 2005; Scudiero et al. 1988).

Monozyten wurden entsprechend Protokoll gewonnen (siehe 4.1.2) und DC wurden entsprechend Protokoll generiert (s. 4.1.3). Nach sieben Tagen wurden die Zellen abpipettiert und gezählt. Die Zellen wurden in einer 96-Well-

Platte in einer Konzentration von 100000 DC/1 ml/Vertiefung ausgesät und mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Des Weiteren wurden die Metaboliten Na_2-D-2-HG (10 mM) oder Nikotinamid (1 mM und 10 mM), ein Inhibitor von Sirtuinen (NAD^+ abhängige Protein Deacetylasen, Jang et al. 2012), hinzugegeben. Zusätzlich wurden 50 µl der XTT-Lösung (4 ml XTT labeling reagent + 60 µl Electron coupling reagent) pro Vertiefung hinzugegeben. Nun wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h) die Veränderung der Mediumfarbe der Vertiefungen photometrisch mit Hilfe des SPECTRA Fluor Plus gemessen. Bei der Analyse wurde der Nullwert (Farbe des Mediums ohne Zellen, ohne Metabolit und ohne XTT-Lösung) von der gemessenen Fluoreszenz abgezogen.

4.7 Statistische Auswertung

Der Messwerte der Versuche wurden gemittelt, sowie die Standardabweichung berechnet. Signifikanzen zwischen verschiedenen Versuchsansätzen wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 6 unter Verwendung des two-tailed Mann-Whitney U Test ermittelt.

5 Ergebnisse

Vordaten zeigten, dass das Di-Natriumsalz von 2-Hydroxyglutarat (2-HG) die Interleukin (IL)-12p70 Sekretion von dendritischen Zellen (DC) konzentrationsabhängig vermindert. Ein signifikanter Effekt ergab sich bei einer Konzentration von 10 mM. Aufbauend auf diesen Daten, wurde in den folgenden Experimenten Na_2-2-Hydroxyglutarat (Na_2-2-HG) in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt.

Als Kontrollmetaboliten wurden Glutamin und Glutamat verwendet, da sie enge Strukturverwandte des Metaboliten Na_2-2-HG sind. Zudem wurde das Dinatrium Salz von α-Ketoglutarat (Na_2-α-Ketoglutarat) verwendet, da dieses Salz den gleichen pH-Wert sowie die gleichen chemischen Eigenschaften besitzt wie Na_2-2-HG. Das Mononatrium Salz von α-Ketoglutarat (Na-α-Ketoglutarat) wurde ebenfalls eingesetzt, um zu überprüfen, ob das Mononatrium Salz eine Auswirkung im Vergleich zu den Dinatrium Salzen hat. Milchsäure, ein bekannter immunsupprimierender Metabolit, wurde als Kontrolle eingesetzt.

Da nur primäre Zellkulturen verwendet wurden, traten erwartungsgemäß große Abweichungen zwischen den einzelnen Spendern auf. Hierdurch ergaben sich zum Teil sehr große Standardabweichungen. Daher wurde in den dargestellten Auswertungen (soweit nicht anders vermerkt) die Lipopolysaccharid (LPS)-Kontrolle auf 100 % gesetzt und die Daten darauf bezogen.

5.1 Einfluss von Na_2-2-HG auf die Zytokinsekretion von DC

5.1.1 Einfluss von Na_2-2-HG auf die IL-12p70-Sekretion

Um den Effekt von Na_2-2-HG auf die Zytokinproduktion von DC zu analysieren, wurden Monozyten entsprechend Protokoll gewonnen, DC generiert und in 6-Well Platten in einer Dichte von 2 x 10^6 DC/3,2 ml/Vertiefung kultiviert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die Aktivierung der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 100 ng/ml LPS, während eine Negativkontrolle unstimuliert blieb. Die DC wurden mit Na_2-D-2-Hydroxyglutarat (Na_2-D-2-HG), Na_2-L-2-Hydroxyglutarat (Na_2-L-2-HG), Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM)

behandelt. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37° C, wurde der Zytokingehalt im Überstand mittels Enzymgekoppeltem Immunabsorptionstest (ELISA) bestimmt (siehe 4.2.3).

Wie erwartet stimulierte LPS die IL-12p70 Produktion in DC. Na_2-D- sowie auch Na_2-L-2-HG hemmten diese Stimulation signifikant. Ebenfalls eine signifikante Hemmung zeigte sich bei dem Kontrollmetaboliten Milchsäure, wobei Na_2-D- und Na_2-L-2-HG einen stärkeren Effekt hatten.

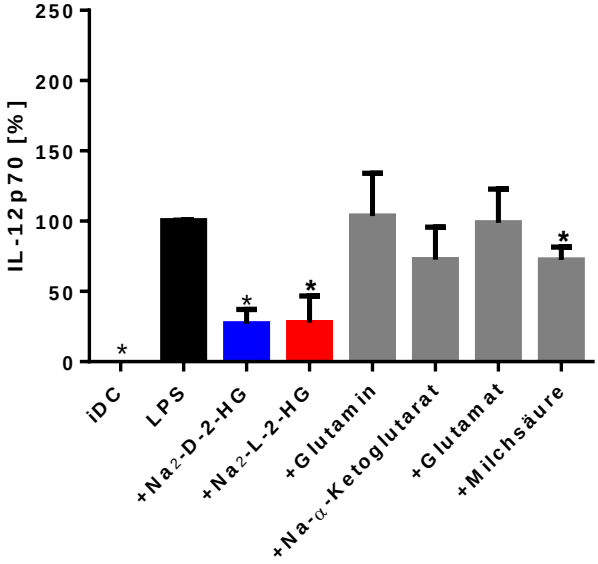

Abbildung 5.1: Einfluss von Na_2-D-2-HG und Na_2-L-2-HG auf die IL-12p70 Sekretion von DC
Aus humanen Monozyten wurden entsprechend Protokoll DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die DC wurden mit 100 ng/ml LPS aktiviert. Gleichzeitig wurde Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM) hinzugegeben. Überstände wurden nach 24 h gesammelt und darin die IL-12p70 Konzentration mit Hilfe eines ELISA gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM von vier unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels two-tailed Mann-Whitney U Test. *= signifikant gegenüber der LPS-Kontrolle; iDC= nicht aktivierte DC.

5.1.2 Einfluss von Na_2-2-HG auf die Sekretion von IL-10, TNF und MCP-1

Zum Vergleich wurden die Zytokine IL-10, IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF) und Monozyten Chemotaktisches

Protein 1 (MCP-1) in den gewonnenen Überständen bestimmt.

Die Sekretion dieser untersuchten Zytokine wurde durch LPS stark induziert. Na_2-D-2-HG und Na_2-L-2-HG führten zu einer signifikant verstärkten Sekretion von IL-10 gegenüber der LPS-Kontrolle. Auch die Kontrollmetaboliten Glutamin und Na-α-Ketoglutarat steigerten die IL-10 Sekretion signifikant. Dies deutet an, dass dieser Effekt nicht spezifisch für Na_2-D-2-HG und Na_2-L-2-HG ist. Zudem reduzierte Na_2-D-2-HG die Sekretion von TNF signifikant gegenüber der LPS-Kontrolle. Na_2-L-2-HG sowie die Kontrollmetaboliten Glutamin, Na-α-Ketoglutarat und Glutamat hatten keinen Einfluss auf die Expression von TNF. Die Sekretion von IL-6 und MCP-1 wurde von Na_2-D-2-HG und Na_2-L-2-HG, sowie den Kontrollmetaboliten Glutamin, Na-α-Ketoglutarat und Glutamat nicht beeinflusst. Milchsäure führte bei allen vier Zytokinen zu einer signifikant reduzierten Sekretion.

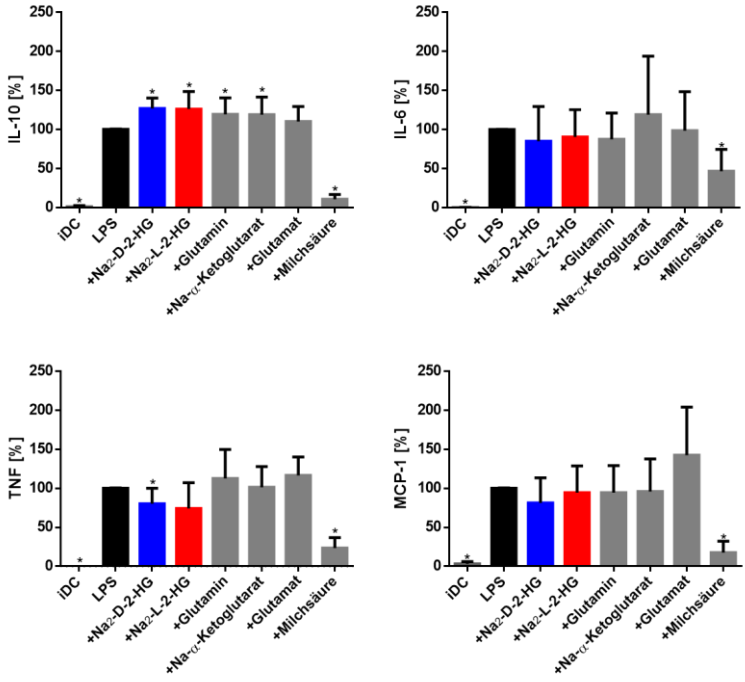

Abbildung 5.2: Einfluss von Na_2-D-2-HG und Na_2-L-2-HG auf die Zytokinsekretion von DC

Aus Monozyten wurden entsprechend Protokoll DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die DC wurden mit 100 ng/ml LPS aktiviert. Gleichzeitig wurde Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM) hinzugegeben. Überstände wurden nach 24 h gesammelt und darin die Konzentration von IL-10, IL-6, TNF und MCP-1 mittels ELISA gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM von vier unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mittels two-tailed Mann-Whitney U Test. *= signifikant gegenüber der LPS-Kontrolle; iDC= nicht aktivierte DC.

5.2 Einfluss von Na_2-2-HG auf die IL-12p70 und IL-23 mRNA

Da sich durch die Verminderung der IL-12p70 Sekretion in DC ein spezifischer Effekt durch Na_2-2-HG ergab, sollte die relative IL-12p70 mRNA-Menge unter Einfluss von Na_2-2-HG, mit Hilfe einer quantitativen Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) bestimmt werden.

5.2.1 Einfluss von Na_2-2-HG auf die mRNA-Expression der IL-12p70 Untereinheiten p35 und p40

Hierfür wurden aus Monozyten entsprechend Protokoll DC generiert und in 6-Well Platten in einer Dichte von 2 x 10^6 DC/3,2 ml/Vertiefung kultiviert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die Aktivierung erfolgte durch die Zugabe von 100 ng/ml LPS, während eine Negativkontrolle unstimuliert bieb. Die DC wurden mit Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM) behandelt. Nach vier Stunden Inkubation (37° C) wurde mittels RT-qPCR entsprechend Protokoll (siehe 4.4.2) die Genexpression der Untereinheiten des IL-12p70 (p35 und p40) analysiert (siehe Abb. 5.3).

Das Gen IL-12A kodiert für die Proteinuntereinheit p35, während das Gen IL-12B für die Untereinheit p40 kodiert (Goriely et al. 2008).

Es zeigte sich, dass nahezu keine Expression der Untereinheiten in inaktiven DC vorliegt. Nach Stimulation der DC mit LPS, ergab sich eine starke Expression der Untereinheiten. Nach Behandlung der aktivierten DC mit Na_2-2-HG, verminderte sich die Expression beider Untereinheiten, eine stärkere Reduktion der Expression ergab sich bei der Untereinheit IL-12B. Auch die Kontrollmetaboliten Na-α-Ketoglutarat und Glutamin führten zu einer verminderten Expression der beiden Gene, die stärkste Reduktion bewirkte Milchsäure. Bei der Behandlung mit dem Kontrollmetaboliten Glutamat kann aufgrund einer sehr großen Standardabweichung keine Tendenz beschrieben werden.

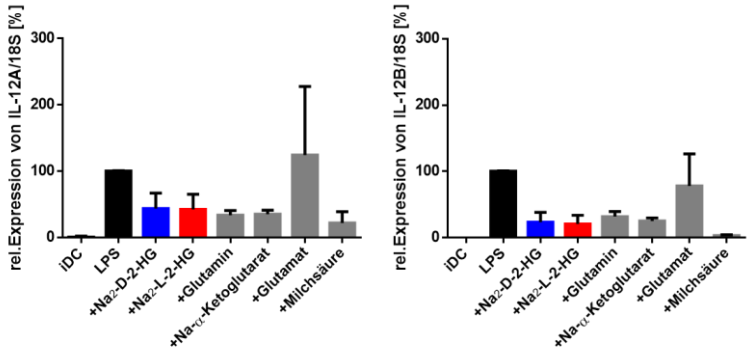

Abbildung 5.3: RT-qPCR Analyse der IL-12A und IL-12B mRNA-Expression
Aus Monozyten wurden entsprechend Protokoll DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die DC wurden mit 100 ng/ml LPS aktiviert. Gleichzeitig wurde Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM) hinzugegeben. Nach vier Stunden Inkubation wurden Zelllysate hergestellt und daraus RNA isoliert. Nach erfolgter reverser Transkription wurden die Proben mittels RT-qPCR (3.5) analysiert. Die Daten zeigen die Genexpression der IL-12p70 Untereinheiten IL-12A und IL-12B in Bezug auf die 18S RNA in DC. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des two-tailed Mann-Whitney U Test. iDC= nicht aktivierte DC.

5.2.2 Einfluss von Na_2-2-HG auf die mRNA-Expression der IL-23 Untereinheit p19

Zudem sollte die Expression eines weiteren Mitglieds der IL-12p70-Familie, des IL-23, auf mRNA-Ebene untersucht werden. IL-23 setzt sich aus den Untereinheiten p40, kodiert durch das Gen IL-12B, und p19, kodiert durch das

Gen IL-23A, zusammen (Goriely et al. 2008). Da die Untereinheit p40 auch eine Untereinheit des IL-12p70 darstellt, wird dessen Analyse nicht erneut beschrieben (siehe 5.2.1).

Aus Monozyten wurden entsprechend Protokoll DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3) und nach sieben Tagen in 6-Well-Platten in einer Konzentration von 2 x 10^6 DC/3,2 ml/Vertiefung ausgesät. Gleichzeitig wurden die DC mit 100 ng/ml LPS aktiviert, während eine Negativkontrolle unstimuliert blieb. Zudem erfolgte die Behandlung der DC mit Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM). Nach vier Stunden Inkubation (37°C) wurde mittels RT-qPCR entsprechend Protokoll (siehe 4.4.2) die Genexpression der Untereinheit p19 des IL-23 analysiert.

Bei der Analyse der mRNA mittels RT-qPCR zeigte sich, dass auch das Gen IL-23A bei inaktiven DC kaum exprimiert wurde, die Expression jedoch bei mit LPS aktivierten DC stark anstieg. Wie in Abb. 5.4 zu sehen ist, hatte keiner der Metaboliten einen signifikanten Effekt auf die Expression des Gens. Na_2-2-HG führte zu einer tendenziellen Reduktion der Expression des Gens IL-23A, wobei

das L-Enantiomer einen stärkeren Effekt ausübte. Die Kontrollmetaboliten Glutamin und Na-α-Ketoglutarat reduzierten die Expression ebenfalls, wobei Na-α-Ketoglutarat den stärksten aller Effekte auf das Gen ausübte. Glutamat und Milchsäure führten tendenziell zu einer erhöhten Expression des Gens, jedoch zeigte sich hierbei eine große Abweichung der Einzelwerte.

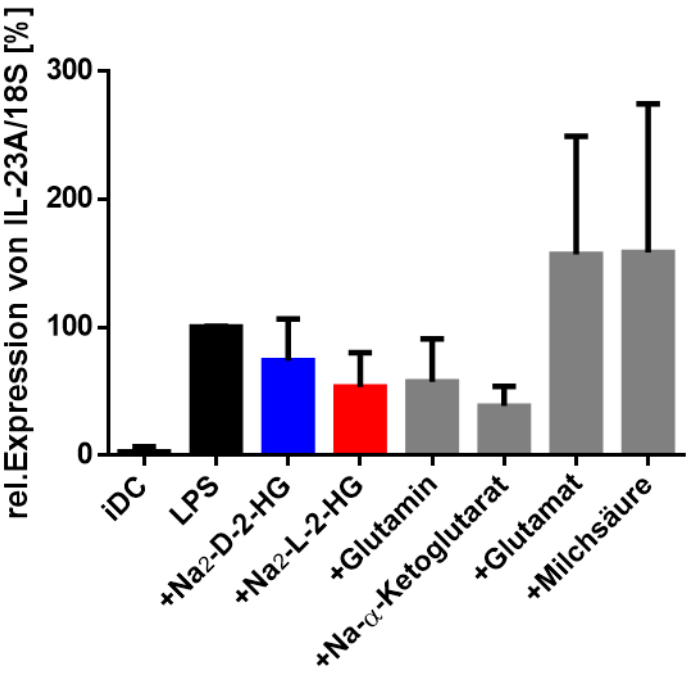

Abbildung 5.4: RT-qPCR Analyse der IL-23A mRNA-Expression
Aus Monozyten entsprechend Protokoll DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die DC wurden mit 100 ng/ml LPS aktiviert. Gleichzeitig wurde Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM) hinzugegeben. Nach vier Stunden Inkubation wurden Zelllysate hergestellt und daraus RNA isoliert. Nach erfolgter reverser Transkription wurden die Proben mittels RT-qPCR (3.5) analysiert. Die Daten zeigen die Genexpression von IL-23A der mRNA in Bezug auf die 18S RNA in DC. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM von jeweils drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des two-tailed Mann-Whitney U Test. iDC= nicht aktivierte DC.

5.3 Analyse der Biosynthese der IL-12p70 Untereinheiten

Zur Analyse, inwieweit die Expression der mRNA IL-12p70-Untereinheiten mit deren Proteinsynthese in DC, bei Behandlung mit Na_2-2-HG übereinstimmt, wurde eine intrazelluläre Bestimmung der IL-12 Proteine mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Zudem wurde zur Kontrolle der Antikörper ein Western Blot der Untereinheiten durchgeführt.

5.3.1 Einfluss von Na_2-2-HG auf die Biosynthese der IL-12p70-Untereinheiten

Für die Durchflusszytometrie wurden Monozyten entsprechend Protokoll gewonnen und daraus DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Nach sieben Tagen Inkubation wurden die Zellen in der Zellkulturflasche mit 1 mg/ml Monensin behandelt. Monensin blockiert im Golgi Apparat den Transport der gebildeten Proteine (Brodie 1981), wodurch die gebildeten Proteine nicht mehr aus der Zelle herausgeschleust werden können und sich im Zytoplasma der Zelle ansammeln. Zusätzlich wurden die DC mit 10 ng/ml LPS stimuliert und Na_2-D-2-HG (10 mM) zugegeben, während

jeweils eine Negativkontrolle unbehandelt blieb. Nach 16 Stunden Inkubation wurden die behandelten DC nach Protokoll (siehe 4.2.2) intrazellulär gefärbt.

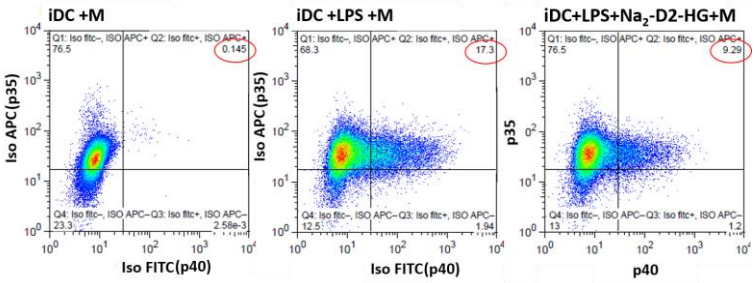

Abbildung 5.5: Analyse der Synthese der Proteinuntereinheiten IL12p35 und p40 in DC
Aus Monozyten wurden entsprechend Protokoll DC gewonnen (siehe 4.1.2 und 4.1.3) und nach sieben Tagen Inkubation für 16 Stunden mit 1 mg/ml Monensin inkubiert (linkes Diagramm). Zusätzlich wurden DC mit 10 ng/ml LPS aktiviert (Diagramm Mitte) und 10 mM Na_2-D-2-HG zugegeben (rechtes Diagramm). Nach der Inkubation wurden die Zellen wie in 3.8 beschrieben fixiert und mit Anti-p35 (APC) und Anti-p40 (FITC) Antikörper markiert. Die Analyse erfolgte mittels FlowJo Software (n=1). iDC= nicht aktivierte DC.

Die Analyse der Versuchsergebnisse zeigte, dass die Proteinuntereinheit p35, kodiert durch das Gen IL-12A, bereits „konstitutiv“ in nicht stimulierten DC vorlag, während die p40 Untereinheit, kodiert durch das Gen IL-12B, in diesen Zellen nicht nachweisbar war. Nach der Aktivierung mit LPS, konnten 17,3 % doppelt positive (p35 + p40) Zellen detektiert werden. Die gleichzeitige Zugabe

von Na_2-D-2-HG reduzierte die Zahl der doppelt positiven Zellen auf 9,29 %.

5.3.2 Überprüfung der monoklonalen p35 und p40 Antikörper

Zur Überprüfung, ob die monoklonalen p35 und p40 Antikörper auch im Western Blot anwendbar sind, wurden sie mit dieser Methode getestet.

Hierzu wurden aus Monozyten entsprechend Protokoll gewonnen DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3) und in 6-Well Platten in einer Konzentration von 2 x 10^6 DC/3,2 ml/Vertiefung ausgesät. Die Aktivierung der Zellen erfolgte mit 100 ng/ml LPS. Gleichzeitig erfolgte die Behandlung mit Monensin (1 mg/ml) und den Metaboliten Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG oder Na_2-α-Ketoglutarat in einer Konzentration von 10 mM. Jeweils eine Negativkontrolle blieb unstimuliert. Nach 16 Stunden wurden aus den Zellen Zelllysate mit Hilfe von RIPA-Puffer hergestellt (siehe 4.3.1) und ein Western Blot durchgeführt (siehe 4.3.5 und 4.3.6). Als Kontrolle wurde die β-Aktin Menge der Proben bestimmt.

Die Abbildung 5.6 zeigt, dass in nicht aktivierten DC nur wenig p35 nachgewiesen werden konnte. Bei Aktivierung

der DC mit LPS stieg die Menge an p35 in den Zellen stark an, bei Behandlung der DC mit zusätzlich Na_2-2-HG (vor allem bei Einsatz des D-Enantiomers) stieg die Proteinmenge noch stärker an. Durch gleichzeitige Zugabe von Monensin, wurde der Anstieg gehemmt. Bei der Inkubation der Zellen mit Na_2-α-Ketoglutarat wurde nur die Probe mit Monensin aufgetragen. Hier war ein Anstieg der Proteinmenge entsprechend der Behandlung mit Na_2-L-2-HG und Monensin zu sehen. Trotz zum Teil widersprüchlicher Ergebnisse in der Durchflusszytometrie und im Western Blot, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die verminderte IL-12p70 Menge im Überstand von mit Na_2-2-HG behandelten DC, wohl nicht auf eine Hemmung der Biosynthese der IL-12p35 Einheit zurückzuführen sind.

Die p40-Proteinunterheit konnte im Western Blot nicht bestimmt werden, da dies mit dem FACS-Antikörper nicht möglich war und kein weiterer, gut funktionierender Antikörper zur Verfügung stand.

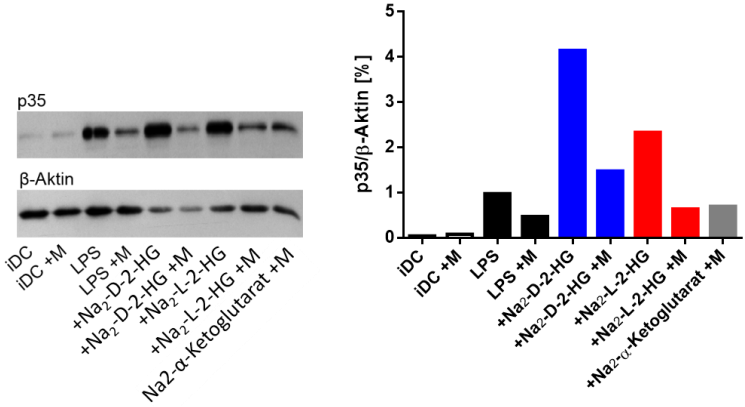

Abbildung 5.6: Bestimmung der p35-Proteinuntereinheit in DC
Aus Monozyten wurden entsprechend Protokoll DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die DC wurden teilweise mit 100 ng/ml LPS aktiviert. Gleichzeitig erfolgte teilweise die Behandlung mit Monensin (1 mg/ml), Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG oder Na_2-α-Ketoglutarat (10 mM). Nach 16 Stunden Inkubation, wurden Zellysate entsprechend 3.4.1 hergestellt. Die Lysate wurden mittels Western Blot analysiert. β-Aktin wurde als Kontrolle der Proteinbeladung verwendet. Die densitometrische Berechnung dreier unabhängiger Experimente erfolgte mittels Image Lab Program. iDC= nicht aktivierte DC.

5.4 Wirkung von Na_2-2-HG auf die Antigenpräsentation von DC

Da DC wichtige antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems sind (Abbas et al. 2012), sollte mit Hilfe einer Kokultur mit T-Lymphozyten, der Einfluss von Na_2-2-HG auf diese Fähigkeit der Zellen, untersucht werden.

Aus Monozyten wurden entsprechend Protokoll DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Nach fünf Tagen wurde die Aktivierung der Zellen durch Zugabe von 10 ng/ml LPS induziert. Am siebten Tag wurde eine gemischte Lymphozyten Reaktion (MLR) angesetzt (siehe 4.2.1). Verschiedene Konzentrationen DC wurden mit jeweils 100000 T-Zellen kokultiviert. Hierbei wurden die Metaboliten Na_2-D-2-HG oder Na_2-L-2-HG in einer Konzentration von 10 mM hinzugefügt, während eine Negativkontrolle unbehandelt blieb. Die Proliferation der T-Zellen wurde mittels Zugabe von [^{3}H]-Thymidin bestimmt. Dies ist problemlos möglich, da DC nicht proliferieren und somit kein [^{3}H]-Thymidin einbauen.

In Anwesenheit von Na_2-D-2-HG zeigte sich erst bei 5000 DC/Well eine leichte Reduktion des [^{3}H]-Thymidin-Einbaus. Bei Behandlung mit Na_2-L-2-HG war der Einbau des radioaktiven Markers in die DNA deutlich vermindert. Allerdings sind diese Unterschiede nicht statistisch signifikant und sollten in weiteren Experimenten bestätigt werden.

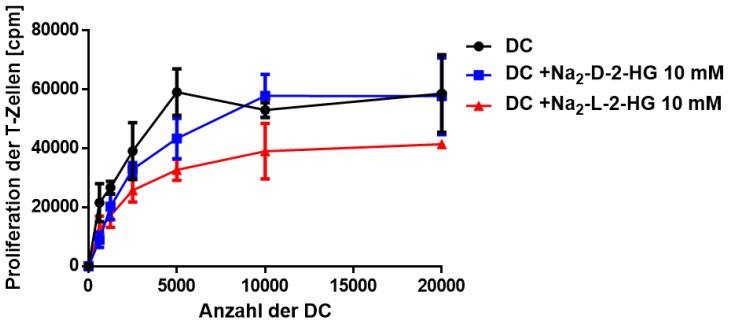

Abbildung 5.7: Effekt von Na_2-2-HG auf die T-Zellproliferation in einer MLR
Aus Monozyten wurden entsprechend Protokoll DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3) und am fünften Tag mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Entsprechend 3.6 wurde eine MLR angelegt und die Metaboliten Na_2-D-2-HG oder Na_2-L-2-HG (beide 10 mM) hinzugegeben. Nach fünf Tagen Inkubation wurden die Zellen zwei Tage mit [^{3}H]-Thymidin inkubiert und dessen Einbau in die DNA der T-Lymphozyten gemessen. Die Graphik zeigt ein exemplarisches Experiment mit jeweils dreifachen Werten. Aufgetragen ist die eingebaute Radioaktivität in Abhängigkeit der zugegebenen Anzahl DC pro Well (cpm= Zähler pro Minute).

5.5 Einfluss von Na_2-2-HG auf die IDO-Expression von DC

Elmaagacli et al. konnten zeigen, dass auch das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), welches L-Tryptophan zu N-Formyl-L-Kynurenin oxidiert und eine wichtige Rolle in bestimmten Zellen des Immunsystem spielt, nach Stimulation mit LPS in DC hochreguliert wird (Elmaagacli et al. 2014). Zudem zeigten Hargadon et.al, dass

bei vielen Tumorerkrankungen eine Überexpression von IDO vorliegt, woraus ein erhöhter Tryptophanabbau resultiert. Daraus entstehende toxische Substanzen führten zu einem Wachstumsvorteil von verschiedenen malignen Tumorerkrankungen. Es sollte deshalb analysiert werden, ob Na_2-2-HG einen Effekt auf die Expression von IDO ausübt und über diesen Weg die Tumorabwehr beeinflusst (Hargadon 2013).

Monozyten wurden gewonnen und DC entsprechend Protokoll (siehe 4.1.2 und 4.1.3) generiert. Nach sieben Tagen wurden die DC in 6-Well Platten, in einer Konzentration von 2 x 10^6/3,2 ml/Vertiefung, ausgesät. Die Aktivierung der Zellen erfolgte mit 100 ng/ml LPS. Gleichzeitig wurden die Metaboliten Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM) zugegeben, während eine Negativkontrolle unstimuliert blieb. Nach 24 Stunden Inkubation, wurden aus diesen Zellen RIPA-Zelllysate entsprechend Protokoll (siehe 4.3.2) hergestellt und ein Western Blot (siehe 4.5.5 und 4.3.6) durchgeführt.

Wie Abb. 5.8 zeigt, konnte die Stimulation von IDO in DC mit LPS bestätigt werden. Die eingesetzten Metaboliten hatten jedoch keinen Einfluss auf diese Stimulation.

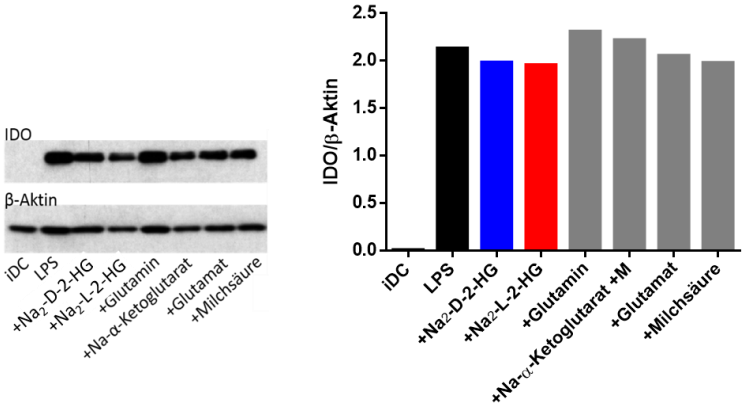

Abbildung 5.8: IDO Synthese in DC
Aus Monozyten wurden entsprechend Protokoll DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die DC wurden mit 100 ng/ml LPS aktiviert. Gleichzeitig erfolgte die Behandlung mit Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM). Nach 24 Stunden Inkubation wurden Zelllysate entsprechend 3.4.1 hergestellt. Die Lysate wurden mittels Western Blot analysiert. Die Daten zeigen ein exemplarisches Experiment (n=1). Es zeigte sich kein Einfluss der Metaboliten auf die Proteinmenge von IDO. β-Aktin wurde als Kontrolle der Proteinbeladung verwendet. Die densitometrische Berechnung erfolgte mittels Image Lab Program. iDC= nicht aktivierte DC.

5.6 Einfluss von Na_2-2-HG auf die Laktatproduktion in DC

Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Immunzellen mit LPS deren Glukose-Metabolismus steigert. Gleichzeitig nimmt hierbei die Bildung von Laktat im Rahmen der Glykolyse zu (Jantsch et al. 2008; Gottfried et al. 2013). Es sollte analysiert werden, ob Na_2-2-HG einen Einfluss auf diese Aktivierung hat, indem die Laktatproduktion LPS-aktivierter DC unter Einfluss von Na_2-2-HG und Kontrollmetaboliten gemessen wurde.

Monozyten wurden gewonnen und DC entsprechend Protokoll generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Nach sieben Tagen wurden die Zellen in 6-Well Platten in einer Konzentration von 2 x 10^6 DC/3,2 ml/Vertiefung ausgesät. Die Aktivierung der DC erfolgte in der Platte mit 100 ng/ml LPS, während eine Negativkontrolle unstimuliert blieb. Gleichzeitig wurden die Metaboliten Na_2-D-2-HG), Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat oder Glutamat (alle 10 mM) hinzugegeben. Nach 24 Stunden wurde der Überstand der Zellen geerntet und die darin befindliche Laktatkonzentration gemessen.

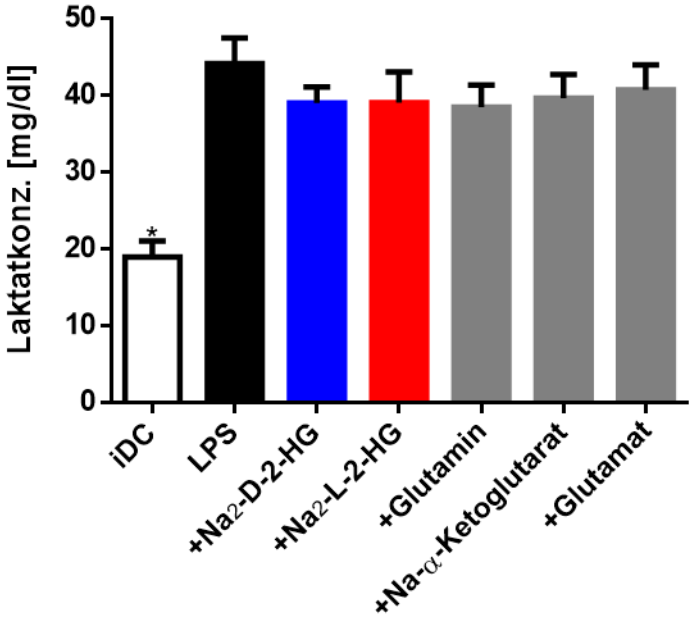

Abbildung 5.9: Effekt von Na_2-2-HG auf die Laktatproduktion in DC
DC wurden entsprechend Protokoll generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die DC wurden mit 100 ng/ml LPS aktiviert. Gleichzeitig erfolgte die Behandlung mit Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat oder Glutamat (alle 10 mM). Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Laktatmessung in den Kulturüberständen im Zentrallabor des Universitätsklinikums Regensburg. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM (n=4). Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des two-tailed Mann-Whitney U Test. *= signifikant gegenüber der LPS-Kontrolle; iDC= nicht aktivierte DC.

Es zeigte sich (siehe Abb. 5.9), dass bei aktivierten DC die Laktatmenge im Überstand, im Vergleich zu nicht aktivierten DC, stark anstieg. Die Metaboliten Na_2-D-2-HG,

Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat und Glutamat führten zwar zu einer leichten Verminderung der Laktatkonzentration im Überstand, jedoch ohne Signifikanz.

5.7 Einfluss von Diclofenac auf die Laktatproduktion und Zytokinsekretion in DC

Wie bereits beschrieben, steigert die Aktivierung von Immunzellen mit LPS deren Glukose-Metabolismus und vermindert gleichzeitig die mitochondriale Atmung der Zellen. In der Folge steigt die Produktion von Laktat stark an. Das nichtsteroidale Antirheumatikum (NSAID) Diclofenac fungiert als Hemmer der Laktatsekretion in Tumorzellen. (Jantsch et al. 2008; Gottfried et al. 2013). Da Na_2-2-HG ebenfalls einen leicht hemmenden Einfluss auf die Laktatsekretion hatte, sollte nun untersucht werden, inwieweit Diclofenac einen Einfluss auf die Laktatproduktion aktivierter DC hat. Zudem sollte analysiert werden, inwieweit die Behandlung mit Diclofenac die Zytokinproduktion von DC ähnlich wie Na_2-2-HG beeinflusst.

5.7.1 Einfluss von Diclofenac auf die Laktatproduktion

Aus Monozyten wurden DC entsprechend Protokoll generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3) und nach sieben Tagen in 6-Well-Platten in einer Konzentration von 2 x 10^6 DC/3,2 ml/Vertiefung ausgesät. Gleichzeitig wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS aktiviert und der Metabolit Diclofenac in drei verschiedenen Konzentrationen (0,05 mM; 0,1 mM; 0,2 mM) hinzugegeben. Eine Negativkontrolle blieb unbehandelt. Nach 24 Stunden wurden die Überstände der Zellen, wie in 4.1.4 beschrieben, gewonnen und die Laktatkonzentration gemessen.

Wie bereits in 5.9 gezeigt, produzierten nicht aktivierte DC signifikant geringere Mengen Laktat, als mit LPS-aktivierte DC. Bei Behandlung der Zellen mit Diclofenac, zeigte sich mit steigender Diclofenac Konzentration, zunehmend verminderte Laktatwerte im Kulturüberstand (siehe Abb. 5.10). Gegenüber der LPS-Kontrolle fiel die Reduktion der Laktatproduktion bei Behandlung mit Diclofenac, unabhängig von der eingesetzten Konzentration, signifikant aus.

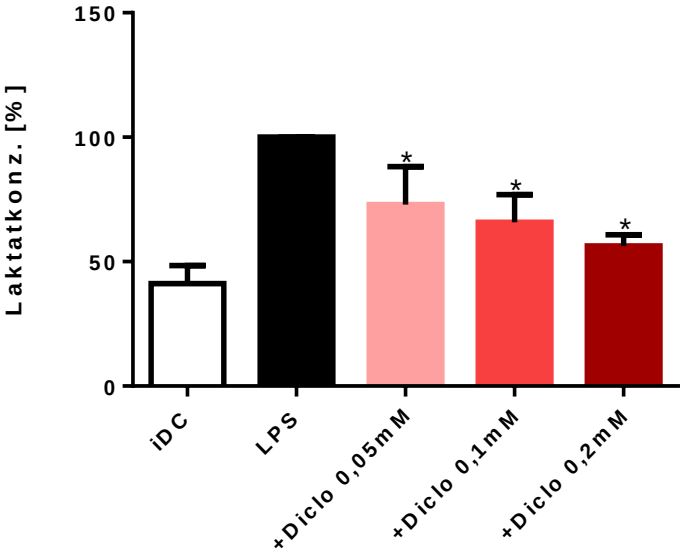

Abbildung 5.10: Einfluss von Diclofenac auf die Laktatproduktion von DC

Monozyten wurden gewonnen, DC wurden entsprechend Protokoll generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die DC wurden mit 100 ng/ml LPS aktiviert. Gleichzeitig wurde Diclofenac in drei verschiedenen Konzentrationen (0,05 mM; 0,1 mM; 0,2 mM) zugegeben. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte die Laktatmessung in den Kulturüberständen im Zentrallabor des Universitätsklinikums Regensburg. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des two-tailed Mann-Whitney U Test. *= signifikant gegenüber der LPS-Kontrolle; iDC= nicht aktivierte DC.

5.7.2 Einfluss von Diclofenac auf die Zytokinsekretion

Wie bereits zuvor gezeigt, war die IL-12p70 Konzentration im Überstand von LPS-aktivierten DC signifikant höher, als im Überstand von nicht aktivierten DC (siehe 5.1.1). Zudem zeigte sich, dass die Behandlung der aktivierten Zellen mit Na_2-2-HG eine signifikant verminderte Produktion des Zytokins bewirkte (siehe Abb. 5.1). Es stellte sich daher die Frage, ob DC das Zytokin IL-12p70 abhängig von der Glykolyse und der Laktatproduktion sezernieren.

Da Diclofenac zu einer signifikant verminderten Laktatproduktion in DC führte (siehe Abb. 5.10), wurde nun analysiert, ob es zu einer Reduktion der IL-12p70 Produktion in DC unter Behandlung mit Diclofenac kommt.

Monozyten wurden gewonnen, DC wurden entsprechend Protokoll generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3) und nach sieben Tagen in 6-Well-Platten in einer Konzentration von 2 x 10^6 DC/3,2 ml/Vertiefung kultiviert. Zeitgleich erfolgte die Aktivierung der Zellen mit 100 ng/ml LPS sowie die Behandlung mit Diclofenac in den Konzentrationen 0,05

mM, 0,1 mM und 0,2 mM. Eine Negativkontrolle blieb unbehandelt. Nach 24 Stunden Inkubation wurde der Überstand, wie in 4.1.4 beschrieben, gewonnen und die Interleukin (IL)-12p70-Konzentration mittels Immungekoppeltem Immunabsorptionstest (ELISA) darin gemessen.

Diclofenac bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der IL-12p70 Sekretion LPS-aktivierter DC, die sehr viel stärker ausfiel, als die Hemmung der Laktatproduktion. Dies ähnelt dem Effekt von Na_2-2-HG auf die IL-12p70 und Laktatproduktion, wenngleich Diclofenac eine stärkere Wirkung hat. Die unterschiedliche Inhibition der Laktat- und IL-12p70-Sekretion bei der Behandlung mit den jeweiligen Substanzen, lässt annehmen, dass die IL-12p70-Sekretion in DC wohl unabhängig von der Glykolyse und der Laktatproduktion stattfindet.

Im Vergleich zur IL-12p70-Sekretion, wurden noch die Zytokinkonzentrationen von TNF, IL-10 und MCP-1 im Überstand der DC bestimmt.

Die Messung der TNF-Konzentration mittels ELISA in den Kulturüberständen dieser Versuche zeigte, dass von nicht aktivierten DC kein TNF gebildet wird. Bei Aktivierung der DC mit 100 ng/ml LPS, kam es zu einem starken

Anstieg der TNF-Menge im Überstand. Durch die Behandlung der aktivierten DC mit Diclofenac, reduzierte sich die Sekretion von TNF mit steigender Diclofenac-Konzentration.

Auch die Bildung von IL-10 und MCP-1 wurde durch die LPS-Aktivierung der DC signifikant gesteigert. Durch die Behandlung der Zellen mit Diclofenac reduzierte sich die Menge an sezerniertem Interleukin ebenfalls konzentrationsabhängig. Bei den Diclofenac Konzentrationen 0,1 mM und 0,2 mM war Hemmung der IL-10 Sekretion signifikant reduziert, verglichen mit den nur LPS stimulierten DC. Die MCP-1 Sekretion wurde bei der Diclofenac Konzentration von 0,2 mM signifikant reduziert.

Insgesamt fiel die Hemmung der IL-12p70 Sekretion durch Diclofenac sehr viel stärker aus, als bei den Zytokinen TNF, IL-10 und MCP-1. Des Weiteren zeigte sich eine stärkere Reduktion der Sekretion von TNF im Vergleich zu IL-10 und MCP-1. Die Effekte sind somit nur teilweise mit den Effekten von Na_2-2-HG zu vergleichen. Zwar reduzieren beide Substanzen stark die IL-12 Sekretion, aber Diclofenac hat zusätzlich auch signifikante Effekte auf die Sekretion von IL-10 und MCP-1.

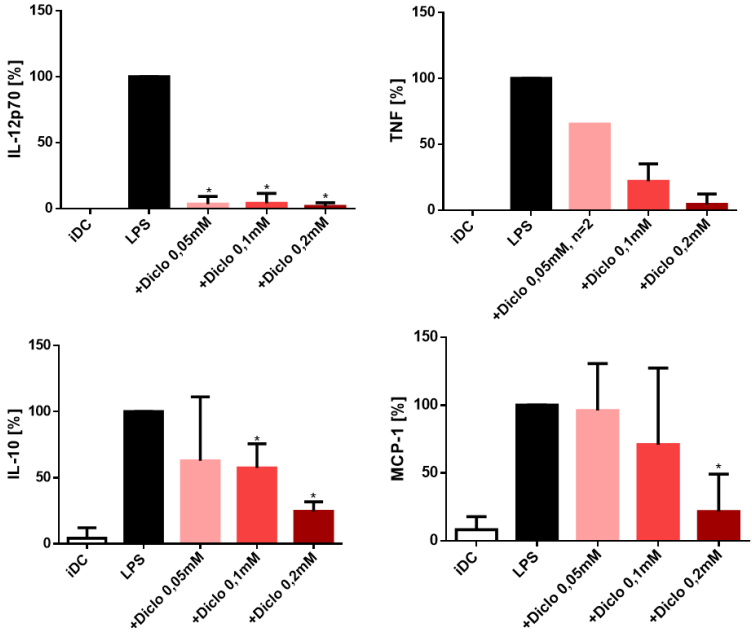

Abbildung 5.11: Einfluss von Diclofenac auf die Zytokinsekretion von DC

Aus Monozyten wurden entsprechend Protokoll DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die DC wurden mit 100 ng/ml LPS aktiviert, während eine Negativkontrolle unstimuliert blieb. Gleichzeitig wurde Diclofenac in drei verschiedenen Konzentrationen (0,05 mM; 0,1 mM; 0,2 mM) hinzugegeben. Nach 24 Stunden wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-12p70, IL-10, TNF und MCP-1 in den Kulturüberständen mittels ELISA gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM (n=3). Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des two-tailed Mann-Whitney U Test. iDC= nicht aktivierte DC.

5.8 Wirkung von Metaboliten auf die Atmung von DC

5.8.1 Analyse des Sauerstoffverbrauchs unter Einfluss von Na_2-D-2-HG und Rotenon

Da sich zeigte, dass 2-Hydroxyglutarat in einer Konzentration von 10 mM die Produktion von IL-12p70 in DC signifikant vermindert (siehe Abb. 5.1) und auch die Laktatproduktion durch den Metaboliten reduziert wurde (siehe Abb. 5.9), sollte nun analysiert werden, ob Na_2-2-HG einen Einfluss auf die Atmung von DC hat. Rotenon, ein Inhibitor der Ubichinon Oxidoreduktase des ersten Komplexes der Atmungskette (Azevedo-Martins et al. 2014), wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

Der Sauerstoffverbrauch der Zellen wurde über 24 Stunden mittels SensorDish-Reader-Systems ermittelt. Monozyten wurden gewonnen und DC nach Protokoll generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die Zellen wurden, wie in 4.5, beschrieben, nach sieben Tagen in einer Konzentration von 1 x 10^6 DC/Vertiefung in einer PreSens Oxodish OD24 Platte ausgesät. Zugleich erfolgte die Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml LPS, sowie die Behandlung mit

den Metaboliten D-2-Hydroxyglutarat (10 mM) oder Rotenon (0,5 µM). Die DC wurden für 24 Stunden bei 37° C inkubiert und gleichzeitig der Sauerstoffgehalt in den Zellüberständen mittels eines SensorDish Reader (alle 30 s) gemessen. Daraus konnte auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen zurückgeschlossen werden.

In Abbildung 5.12 ist zu sehen, dass der Sauerstoffverbrauch von LPS-aktivierten DC in den ersten zwei Stunden vermindert war. Anschließen steigerte sich der Sauerstoffverbrauch der aktivierten DC und die Sauerstoffkonzentration der Kultur pendelte sich im Bereich von 4 mg/l ein. Im Vergleich dazu war nach einem verminderten Sauerstoffverbrauch in den ersten zwei Stunden, der Verbrauch der nicht aktivierten DC sehr viel höher und die Sauerstoffkonzentration lag im weiteren Messzeitraum bei ca. 2,5 mg/l. Verglichen mit den LPS aktivierten DC, zeigte sich mit Na_2-D-2-HG in den ersten zwei Stunden ein etwas verstärkter Sauerstoffverbrauch, der bis ca. zwölf Stunden anhielt (Maximum des Verbrauchs bei sechs Stunden und ca. 3 mg/l), sich aber im weiteren Zeitverlauf der Kurve der LPS-aktivierten DC anglich. Ro-

tenon blockierte den Sauerstoffverbrauch der DC wie erwartet, von Beginn an komplett und in diesen Kulturen waren Sauerstoffkonzentrationen von ca. 5,7 mg/l messbar.

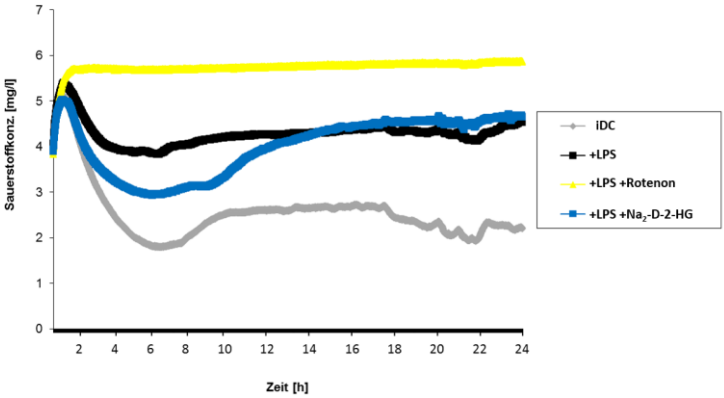

Abbildung 5.12: Sauerstoffverbrauch humaner DC nach Behandlung mit Na_2-2-HG
Monozyten wurden gewonnen, DC wurden entsprechend Protokoll generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3) und wie in 4.5 beschrieben, in einer PreSens Oxodish OD24 Platte, kultiviert. Hierbei wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS stimuliert und mit Na_2-D-2-HG (10 mM) oder Rotenon (0,5 µM) behandelt. Im Anschluss wurde 24 Stunden bei 37° C inkubiert und dabei der Sauerstoffgehalt im Medium der Wells gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert des Sauerstoffgehalts von jeweils drei Wells in Abhängigkeit von der Zeit (n=1). iDC= nicht aktivierte DC.

5.8.2 Analyse der mitochondrialen Aktivität unter Einfluss von Na_2-D-2-HG und Nikotinamid

Da sich ein direkter Einfluss von Na_2-D-2-HG auf den Sauerstoffverbrauch der DC nach LPS-Stimulation zeigte (s. 5.8.1), sollte die mitochondriale Aktivität der Zellen näher untersucht werden.

Mit Hilfe der 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid (XTT)-Methode, sollte die Enzymaktivität der Mitochondrien von DC unter Einfluss von Na_2-D-2-HG ermittelt werden. Als Kontrolle wurde Nikotinamid eingesetzt. Nikotinamid ist ein Inhibitor von Sirtuinen (NAD^+-abhängige Deacetylasen), welche insbesondere mit der Regulation des Zellmetabolismus in Verbindung gebracht werden (Jang et al. 2012). Es ist beschrieben, dass mitochondriale Sirtuine die Funktion der Mitochondrien beeinflussen und regulieren. Eine Hemmung der Sirtuine durch Nikotinamid kann daher zu einer gestörten Funktion der Mitochondrien und folglich zu einer verminderten Zellatmung führen (Shih und Donmez 2013).

Monozyten wurden gewonnen und DC wurden entsprechend Protokoll generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Nach sieben Tagen wurden die DC in einer 96-Well-Platte in einer Konzentration von 100000 DC/1 ml/Vertiefung ausgesät. Gleichzeitig wurden die Zellen mit 10 ng/ml LPS aktiviert, Na_2-D-2-HG (10 mM) oder Nikotinamid (1 mM oder 10 mM) behandelt. Zudem wurden 50 µl der XTT-Lösung/Vertiefung zugegeben. Eine Negativkontrolle blieb unbehandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (5 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h) wurde die Veränderung der Mediumfarbe der Vertiefungen photometrisch gemessen.

Wie in Abbildung 5.13 zu erkennen ist, stieg die Floureszenz kontinuierlich mit der Inkubationzeit an. Die Zugabe von LPS und Na_2-D-2-HG hatte, im Gegensatz zu den Ergebnissen der PreSens-Methode, keinen Einflus auf diesen Anstieg. Auch Nikotinamid bewirkte, entgegen der Erwartungen, keine Veränderung der mitochondrialen Aktivität der DC.

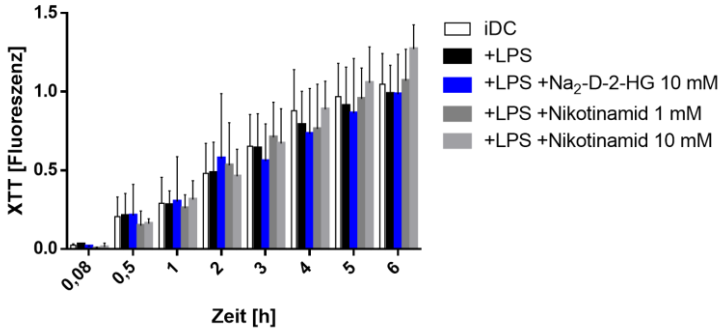

Abbildung 5.13: XTT-Messung von DC
Aus Monozyten wurden entsprechend Protokoll DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Nach sieben Tagen wurden die Zellen entsprechend 3.9 ausgesät.Gleichzeitig erfolgte die Aktivierung der Zellen mit 100 ng/ml LPS. Die Zellen wurden mit Na_2-D-2-HG (10 mM) oder Nikotinamid (1 und 10 mM) behandelt. Zudem wurden 50 µl der XTT-Lösung/Vertiefung zugegeben. Eine Negativkontrolle blieb unbehandelt. Aufgetragen ist die gemessene Fluoreszenz des XTT nach 0,08 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h und 6 h (n=2). (XTT=2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid). iDC= nicht aktivierte DC.

5.9 Expression von IκB*α* in DC

In den bisherigen Versuchen konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Regulation des Metabolismus durch Na_2-2-HG und der Regulation der IL-12 Sekretion festgestellt werden.

Die Signaltransduktion nach Bindung des Liganden LPS an einen Rezeptor von DC, spielt eine wichtige Rolle für die Aktivierung der Zellen. Daher wurde nun analysiert,

inwieweit Na_2-2-HG einen Einfluss auf die LPS-Signaltransduktion hat. Der Transkriptionsfaktor Nuklearer Faktor κB (NF-κB) ist hierbei ein Schlüsselprotein für die Regulation inflammatorischer Prozesse. Er wird im Zytoplasma von IκBα in seiner inaktiven Form gehalten und wirkt dadurch indirekt antiinflammatorisch (Weichhart und Säemann 2008). Nach Aktivierung von Immunzellen, beispielsweise durch LPS, löst sich IκBα von NF-κB und wird im Proteasom der Zelle degradiert. Gleichzeitig wandert NF-κB in den Zellkern und bewirkt dort die Transkription proinflammatorischer Botenstoffe (Yang et al. 2012a, Rescigno et al. 1998).
Um zu untersuchen, ob 2-Hydroxyglutarat einen Einfluss auf diesen Weg der LPS-Signaltrans-duktion hat, wurde ein Western Blot zur Quantifizieruung des frei in der Zelle vorliegenden IκBα durchgeführt, um anschließend Rückschlüsse auf die frei in der Zelle vorliegende Menge von NF-κB ziehen zu können.

Monozyten wurden, wie in 4.1.2 beschrieben, gewonnen. Dendritische Zellen (DC) wurden entsprechend Protokoll (siehe 4.1.3) generiert und in 6-Well Platten in einer

Dichte von 2 x 10^6 DC/3,2 ml/Vertiefung ausgesät. Gleichzeitig wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS aktiviert und mit Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG oder Na_2-α-Ketoglutarat (alle 10 mM) behandelt. Nach einer Stunde Inkubation, wurden die Zellen abpipettiert und Zelllysate mit RIPA-Puffer hergestellt (siehe 4.3.1). Anschließend wurde ein Western Blot mit den Proben durchgeführt. Als Primärantikörper wurde Anti-IκBα Antiserum verwendet. Zur Kontrolle der Proteinbeladung, wurde die Menge von β-Aktin in den Proben bestimmt. Der Kontrollmetabolit Na_2-α-Ketoglutarat wurde verwendet, da das Di-Natriumsalz eine große strukturelle Ähnlichkeit zu dem Dicarboxylat Na_2-2-HG besitzt und, im Gegensatz zu Na-α-Ketoglutarat, den gleichen pH-Wert wie Na_2-2-HG in Kultur aufweist.

In Abbildung 5.14 zeigte sich im Blot, nach Stimulation der Zellen mit LPS, eine verminderte Menge von IκBα in der Bande. Bei der Behandlung der Zellen mit Na_2-D-2-HG, zeigte sich im Vergleich zur LPS-Kontrolle eine verringerte Menge IκBα, Na_2-L-2-HG hatte jedoch keinen zusätzlichen Effekt auf die Menge IκBα im Vergleich zur

LPS-Kontrolle. Auch der Kontrollmetabolit Na_2-α-Ketoglutarat beeinflusste die Degradation von IκBα nicht.

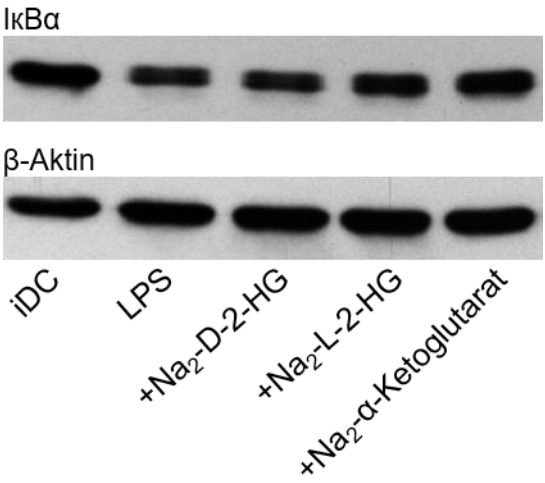

Abbildung 5.14: Konzentration von IκBα in DC
Monozyten wurden gewonnen, DC wurden entsprechend Protokoll generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die Aktivierung der DC erfolgte für eine Stunde mit 100 ng/ml LPS. Gleichzeitig wurden Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG und Na_2-α-Ketoglutarat (alle 10 mM) zugegeben. Zelllysate wurden entsprechend 3.4.1 hergestellt. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels Western Blot. Die Daten zeigen die Konzentration von IκBα in DC eines exemplarischen Experiments. β-Aktin wurde als Kontrolle der Proteinbeladung verwendet. iDC= nicht aktivierte DC.

In weiteren unabhängigen Experimenten der Arbeitsgruppe, wurde diese Beobachtung nur unter Einsatz des Metaboliten Na_2-D-2-HG im Vergleich zur LPS-Kontrolle bestätigt (siehe Abb. 5.15).

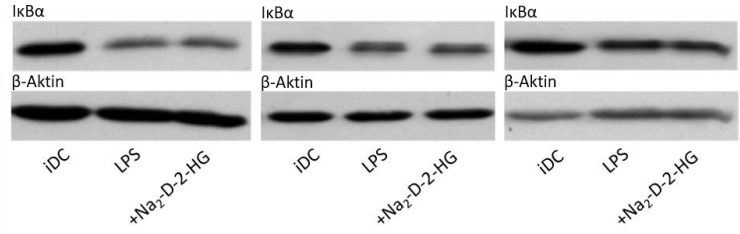

Abbildung 5.15: Konzentration von IκBα in DC, Vergleich Na_2-D-2-HG zur LPS-Kontrolle
Monozyten wurden gewonnen, DC wurden entsprechend Protokoll generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die Aktivierung der DC erfolgte für eine Stunde mit 100 ng/ml LPS. Gleichzeitig wurde Na_2-D-2-HG in einer Konzentration von 10 mM zugegeben. Zelllysate wurden entsprechend 3.4.1 hergestellt. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels Western Blot. Die Daten zeigen die Konzentration von IκBα in DC dreier unabhängiger Experimente. β-Aktin wurde als Kontrolle der Proteinbeladung verwendet. iDC= nicht aktivierte DC.

5.10 Einfluss von Na_2-2-HG auf die Expression der Proteinkinasen Akt und p38 in DC

Ein weiterer Weg der LPS-Signaltransduktion bewirkt die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Diese bewirkt die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphat in Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat, welches an die Serin-Threonin Proteinkinase B (Akt) bindet. Über die Phosphorylierung von Akt wird in der Folge die Genexpression von IL-12p70 gehemmt (Martin

et al. 2003). Des Weiteren bewirkt die Aktivierung humaner Immunzellen durch LPS, die Aktivierung der Mitogen aktivierten Protein Kinase (MAPK) p38, welche die Immunantwort zusätzlich steigert (Zhang und Kaplan 2000). Es sollte nun untersucht werden, ob Na_2-2-HG über diese Wege Einfluss auf die LPS-Signaltransduktion in DC hat.

Hierfür wurden Monozyten gewonnen und DC entsprechend Protokoll (siehe 4.1.2 und 4.1.3) generiert. Die Zellen wurden in 6-Well-Platten in einer Konzentration von 2 x 10^6 DC/3,2 ml/Vertiefung kultiviert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS aktiviert und die Metaboliten Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM) zugegeben, während eine Negativkontrolle unbehandelt blieb. Nach 24 Stunden Inkubation, wurden aus den Zellen Zelllysate mit Phosphatase-Inhibitoren entsprechend Protokoll (siehe 4.3.3) hergestellt. Phosphatase-Inhibitoren verhindern die Degradation von Proteinen bei der Herstellung von Lysaten und erhalten sie in ihrer phosphorylierten Form. Die phosphorylierten Proteine lassen sich an-

schließend mit bestimmten Antikörpern spezifisch detektieren und es kann der spezifische Einfluss von Na_2-2-HG auf die verschiedenen Proteinformen festgestellt werden.
Mit den Lysaten wurde ein Western Blot durchgeführt. Zur Analyse wurden bei den Proben zunächst die Anti-Phosphoryliertes Akt (pAkt) und Anti-Phosphoryliertes Protein 38 (pp38) Antiseren und anschließend die Anti-Akt und Anti-Protein 38 (p38) MAPK-Antiseren verwendet. Erstere erkennen spezifisch nur die phosporylierte Form des jeweiligen Proteins. Zur Normierung wurde anschließend die β-Aktin Menge in den einzelnen Proben bestimmt.
Sowohl bei pAkt, als auch bei Akt, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben gemessen werden. Tendenziell nahm die Menge an pAkt durch die Stimulierung mit LPS zu, während die Menge der Kinase Akt eher abnahm, jedoch lag eine sehr große Standardabweichung vor (siehe Abb. 5.16).

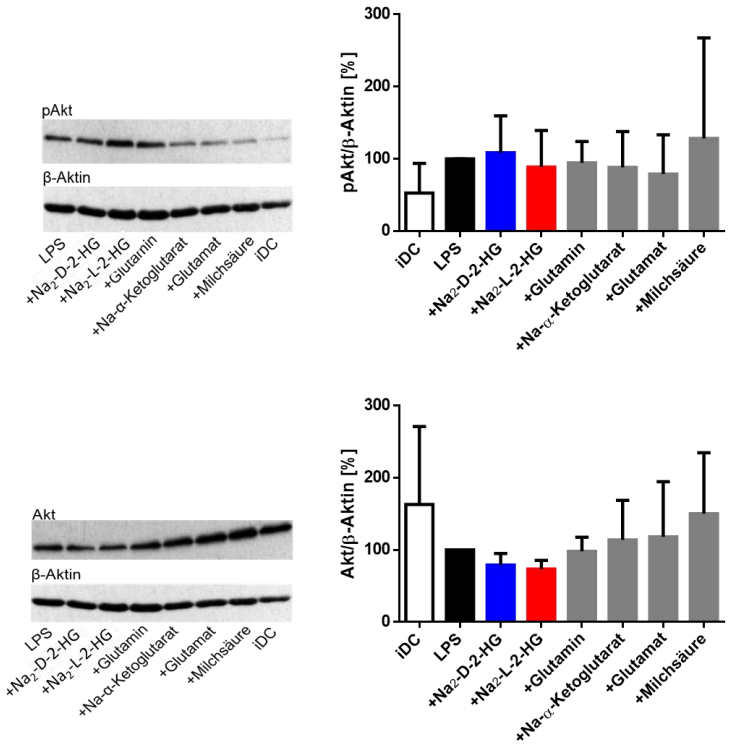

Abbildung 5.16: Synthese von pAkt und Akt in DC
Monozyten wurden gewonnen, DC wurden entsprechend Protokoll generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die Aktivierung der DC erfolgte mit 100 ng/ml LPS. Gleichzeitig wurden Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM) zugegeben. Zelllysate wurden nach 24 Stunden entsprechend 3.4.2 hergestellt. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels Western Blot mit Anti-Phospho-Akt (oben) und anschließend mit Anti-Akt Antiserum (unten). Zur Kontrolle der Proteinbeladung wurde zusätzlich β-Aktin bestimmt. Die densitometrische Berechnung dreier unabhängiger Experimente erfolgte mittels Image Lab Program. iDC= nicht aktivierte DC.

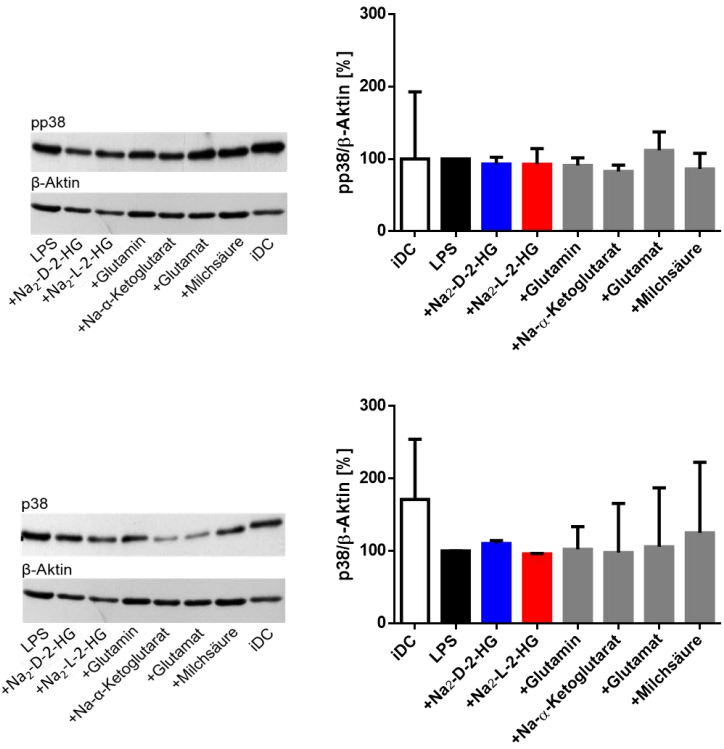

Abbildung 5.17: Synthese von pp38 und p38 in DC
Aus Monozyten wurden entsprechend Protokoll DC generiert (siehe 4.1.2 und 4.1.3). Die Aktivierung der DC erfolgte mit 100 ng/ml LPS. Gleichzeitig wurden Na_2-D-2-HG, Na_2-L-2-HG, Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat (alle 10 mM) oder Milchsäure (15 mM) zugegeben. Zelllysate wurden entsprechend 3.4.2 hergestellt. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels Western Blot mit Anti-Phospho-p38 (oben) und anschließend mit Anti-p38 Antiserum (unten). Zur Kontrolle der Proteinbeladung wurde zusätzlich β-Aktin bestimmt. Die densitometrische Berechnung dreier unabhängiger Experimente erfolgte mittels Image Lab Program. iDC= nicht aktivierte DC.

Auch bei der MAPK p38 konnten, weder bei der phosphorylierten, noch bei der nicht phosphorylierten Form des

Proteins signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben gemessen werden. Tendenziell nahm die Menge der nicht phosphorylierten Form durch die Stimulierung mit LPS ab (siehe Abb. 5.17).

6 Diskussion

Es wurde gezeigt, dass Mutationen der Isocitrat Dehydrogenase die Prognose von Patienten mit Glioblastom und akuter myeloischer Leukämie (AML) beeinflussen (Parsons et al. 2008; Reitman und Yan 2010). Das mutierte Enzym erlangt die neuartige Fähigkeit, α-Ketoglutarat in den Onkometabolit D-2-Hydroxyglutarat (D-2-HG) umzuwandeln (Dang et al. 2009; Gross et al. 2010; Ward et al. 2010). In Vorarbeiten wurde der Effekt von 2-Hydroxyglutarat (2-HG) auf verschiedene Immunzellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Na_2-2-Hydroxyglutarat (Na_2-2-HG) die Interleukin (IL)-12p70-Produktion von Lipopolysaccharid (LPS)-aktivierten dendritischen Zellen (DC) inhibiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Na_2-2-Hydroxyglutarat (Na_2-2-HG) auf DC näher untersucht und mögliche, zugrunde liegende Mechanismen analysiert werden. Neben der Zytokinsekretion (IL-12p70 im Vergleich zu Tumornekrosefaktor [TNF], IL-6, IL-10 und IL-23), sollte die transkriptionelle Regulation der Untereinheiten von IL-12p70 untersucht werden. Außerdem sollten relevante intrazelluläre Signalwege der IL-12p70 Produktion analysiert werden.

6.1 Effekt von Na_2-2-HG auf die Sekretion von IL-12p70 und weitere Zytokine

Es ist bekannt, dass DC, Monozyten und Makrophagen Teil des Mikromilieus von Tumoren sind. Die Immunzellen sind hierbei in die anti-Tumorantwort involviert (Gottfried et al. 2006), können jedoch auch immunsuppressiv wirken, indem sie zum Beispiel regulatorische T-Lymphozyten veranlassen, die Aktivierung von Lymphozyten zu hemmen (Fecci et al. 2006; Gustafson et al. 2010).

DC bilden zudem die wichtigste Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität, indem sie fremde Antigene oder Zellschrott phagozytieren und diese Peptide auf ihrer Oberfläche präsentieren. Durch die Phagozytose werden die DC aktiviert und wandern in sekundäre Lymphorgane. Dort präsentieren sie die phagozytierten Antigene T-Lymphozyten. Die naiven T-Lymphozyten werden dadurch aktiviert und polarisiert. Zusätzlich sezernieren aktivierte DC pro- und antiinflammatorische Zytokine, was ihnen die Fähigkeit gibt, die Qualität und das Ausmaß der Immunantwort zu regulieren (Abbas et al. 2012; Rescigno et al. 1998, Bhattacharyya et al. 2004, Liu et al. 1998). Besonders die Menge an sezerniertem Interleukin

IL-12p70 durch DC, bestimmt die Art der darauffolgenden Reaktion von T-Lymphozyten (Fukao et al. 2002; Liu et al. 1998). Auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) werden durch IL-12p70 aktiviert, beginnen IFNγ zu produzieren und haben in der Folge einen proinflammatorischen Effekt auf die Immunantwort (Gee et al. 2009). Aufgrund der Bedeutung von IL-12p70 für die Regulation der Immunantwort nach Eindringen eines beispielsweise bakteriellen Antigens in den Organismus, wurde die IL-12p70 Sekretion von DC unter Einfluss von Na_2-2-HG und Kontrollmetaboliten untersucht.

Die Messung der IL-12p70 Konzentration im Überstand von mit LPS aktivierten DC zeigte, dass die Produktion dieses Zytokins bei einer Konzentration von 10 mM Na_2-D- und Na_2-L-2-Hydroxyglutarat (Na_2-D- und Na_2-L-2-HG) signifikant gehemmt wird. Dies unterstützt die Annahme von Dang et al., dass 2-HG als Onkometabolit agiert und zur Immunsuppression beiträgt sowie die Antitumorantwort, welche u.a. durch IL-12p70 induziert wird, inhibiert (Dang et al. 2009). Da beschrieben ist, dass 2-HG im Brustkrebs bis zu einer Konzentration von 20 mM (Terunuma et al. 2014) und in Gliomgewebe bis zu 4 mM

akkumuliert (Navis et al. 2013), handelt es sich bei den eingesetzten Na_2-2-HG Konzentrationen um physiologisch relevante Konzentrationen.

Als Kotrollmetaboliten wurden Glutamin, Na-α-Ketoglutarat und Glutamat eingesetzt, da sie Strukturverwandte des Na_2-2-HG sind und ebenfalls im Rahmen des Zitronensäurezyklus gebildet werden (Mullen et al. 2012). Eine weitere Kontrolle war Milchsäure, welche als Immunsuppressor bekannt ist (Gottfried et al. 2006). Von diesen Kontrollmetaboliten zeigten nur Na-α-Ketoglutarat und Milchsäure ebenfalls einen inhibierenden Effekt, der jedoch signifikant unterschiedlich zum Effekt von Na_2-2-HG war. Zudem wurde der Einfluss von Na_2-D- und Na_2-L-2-HG auf die Sekretion anderer Zytokine, wie IL-10, TNF, IL-6 und Monozyten Chemotaktisches Protein 1 (MCP-1) in LPS-aktivierten DC untersucht. Es zeigte sich eine nicht signifikant erhöhte Produktion von IL-10 und eine leicht reduzierte Bildung von TNF, IL-6 und MCP-1, die allerdings nicht signifikant unterschiedlich zur LPS-Kontrolle waren. Die Kontrollmetaboliten Glutamin, Na-α-Ketoglutarat und Glutamat zeigten hier keinen Effekt.

Nur durch die Milchsäure wurde die Produktion der Zytokine signifikant vermindert, wie bereits von Gottfried et al. beschrieben (Gottfried et al. 2006).

6.2 Transkriptionelle Regulation von IL-12p70 und IL-23

Basierend auf den oben genannten Resultaten, wurde die transkriptionelle Regulation der Genexpression von IL-12 sowie IL-23, einem weiteren Mitglied der IL-12-Familie, untersucht. Während IL-12p70 die T-Helfer (Th)1-Zellantwort induziert und indirekt über eine gesteigerte Interferon γ (IFNγ) Produktion die Differenzierung von Th17-Zellen hemmt, stabilisiert IL-23 die Aktivität von Th17-Zellen (Goriely et al. 2008; Goriely und Goldman 2008).
IL-12p70 besteht aus den Untereinheiten p35 und p40, die von den Genen IL-12A und IL-12B kodiert werden. IL-23 ist ein Dimer der Untereinheiten p40 (kodiert von IL-12B) und p19 (kodiert von IL-23A). Die Regulation der Produktion und Sekretion dieser beiden Zytokine erfolgt über die Bindung eines Antigens, zum Beispiel LPS, an einen Toll-ähnlichen Rezeptor (TLR) und darauf folgende komplexe Signalwege, welche die Transkription der kodierenden

Gene für diese Zytokine, induzieren (Goriely et al. 2008; Molle et al. 2013).

Bei der Analyse der Regulation der Genexpression dieser Untereinheiten, zeigte sich sowohl bei Inkubation der LPS-aktivierten DC mit Na_2-D-2-HG, als auch mit Na_2-L-2-HG eine verminderte Expression von IL-12A, IL-12B und IL-23A. Der Kontrollmetabolit Na-α-Ketoglutarat führte ebenfalls zu einer verminderten Expression von IL-12A, IL-12B und IL-23A. Die Genexpression der mRNA von IL-12A und B korrelierte nicht mit der Proteinexpression des IL-12p70 im Zellkulturüberstand. Hier ergab sich ein signifikant stärkerer Effekt von Na_2-2-HG gegenüber dem Kontrollmetaboliten Na-α-Ketoglutarat. Dies deutet daraufhin, dass der Einfluss von Na_2-2-HG auf die IL-12p70 Produktion bzw. Sekretion in DC, neben der transkriptionellen Regulation, über weitere Mechanismen erfolgt.

6.3 Analyse der IL-12p70 Untereinheiten mittels Durchflusszytometrie

Um die Proteinexpression der IL-12p70-Untereinheiten (p35, p40) in der Zelle näher zu untersuchen, wurden mittels intrazellulärer Färbung die Untereinheiten in reifen und unreifen DC mittels Durchflusszytometrie detektiert. Hierbei wurde der Transport der Zytokine im Golgi mit Monensin blockiert (Brodie 1981). Dadurch wird die Sekretion der produzierten Proteine aus der Zelle verhindert und sie lassen sich intrazellulär nachweisen.

In der Durchflusszytometrie zeigte sich, dass die Untereinheit p35 bereits in nicht aktivierten DC konstitutiv vorlag. Bereits von Devergne et al. sowie von Carra et al. wurde gezeigt, dass das Gen der p35 Untereinheit konstitutiv von den meisten Zelltypen auf niedrigem Niveau exprimiert wird. Zudem ist beschrieben, dass die p40 Expression in DC induzierbar ist und auch nur von den Zellen exprimiert werden kann, welche die Fähigkeit besitzen, das Heterodimer IL-12p70 zu bilden. Murphy et al. zeigten, dass die IL-12p70 Produktion vor allem durch die transkriptionelle

Kontrolle der p35 Untereinheit, sowie deren posttranslationalen Modifikation, v.a. der N-Glykosylierung, gesteuert wird. Im Gegensatz dazu kann p40 von aktivierten DC auch isoliert als Monomer sezerniert werden und liegt in dieser Form ohne bekannte Funktion vor (Murphy et al. 2000; Devergne et al. 1997; Carra et al. 2000).
Nach der Reifung der Zellen mit LPS, konnten p35/p40 doppelt-positive Zellen detektiert werden. Der Anteil der doppelt-positiven DC reduzierte sich bei Zugabe von Na_2-D-2-HG deutlich. Die verminderte Anzahl doppelt-positiver Zellen, sowie die leichte Reduktion der Untereinheit p40 nach Zugabe von Na_2-D-2-HG lässt vermuten, dass durch Na_2-D-2-HG die Produktion von p40 in aktivierten DC reduziert wird. Daraus könnte eine verminderte Synthese von IL-12p70 resultieren, da die p40 Untereinheit für die Bildung des Dimers fehlt.

Bei der Überprüfung der Antikörper mittels Western Blot, zeigte die densitometrische Auswertung von p35 bei der Behandlung mit Monensin jeweils geringere Proteinmengen, als bei den Behandlungen ohne Monensin. Zudem

stieg die p35 Menge bei Zugabe von Na_2-2-HG im Vergleich zur LPS-Kontrolle leicht an, was konträr zu den Ergebnissen der Durchflusszytometrie ist. Die Diskrepanz der Ergebnisse in der Durchflusszytometrie und im Western Blot ist letztendlich nur über eine unspezifische Bindung des Antikörpers erklärbar, welcher laut Hersteller nur für die Durchflusszytometrie, aber nicht für Western Blot ausgetestet war. Es wurde versucht, den Antikörper auch im Western Blot einzusetzen, was jedoch nicht möglich war. Diese Daten müssen daher mit einem weiteren Antikörper für Western Blot bestätigt werden.

6.4 Einfluss von Na_2-2-HG auf die Antigenpräsentation

DC sind wichtige antigenpräsentierende Zellen, die sich physiologisch vor allem in der Haut oder im Darm befinden. Nach Aktivierung (z.B. mit LPS), wandern sie in nächstgelegene Lymphknoten. Hier präsentieren sie naiven T-Lymphozyten das jeweilige Antigen und initiieren dadurch die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen. Über die Bildung von IL-12p70 werden NK-Zellen sowie CD8+ T-Zellen induziert, IFNγ und andere Zytokine zu

produzieren. Diese Zytokine tragen zur Aktivierung von Makrophagen bei. In der Folge kommt es zu vermehrter Bildung von IL-12p70, zu erhöhter Zytotoxizität von NK und CD8+ T-Zellen, sowie zur erneuten Induktion von Th1-Zellen und deren IFNγ Produktion (Gee et al. 2009; Rescigno et al. 1998; Liu et al. 1998).

Mit Hilfe einer gemischten Lymphozyten Reaktion (MLR) wurde untersucht, inwieweit es in Gegenwart von Na_2-2-HG zur Stimulation und Proliferation allogener T-Lymphozyten kommt. Erste Ergebnisse zeigen eine leicht verminderte Stimulation von T-Lymphozyten unter Na_2-2-HG. Ob es sich hierbei um einen direkten Effekt von Na_2-2-HG auf die DC handelt, was bedeuten würde, dass die DC unter Na_2-2-HG in ihrer Funktion, Antigene zu präsentieren und T-Lymphozyten zu aktivieren, eingeschränkt sind, oder um einen Effekt von Na_2-2-HG auf die T-Lymphozyten und deren Funktionalität handelt, muss in weiteren Experimenten mit verschiedenen Kulturbedingungen geklärt werden.

6.5 Stoffwechsel und Atmung unter Na_2-2-HG

Eine Aktivierung von Immunzellen, beispielsweise durch LPS, führt zu einer Umstellung des Stoffwechsels der Zellen. Bei verschiedenen Zellen wurde gezeigt, dass diese Aktivierung die Glykolyse der Zellen hochreguliert und dadurch z.T. die Atmung vermindert ist. Durch die vermehrte Glykolyse fällt bei dieser Stoffwechselumstellung auch vermehrt Pyruvat an, welches weiter in Laktat umgewandelt wird. Des Weiteren akkumuliert Laktat auch bei inflammatorischen Prozessen, beispielsweise in Wunden oder Tumoren. Hierdurch wird die lokale Abwehrfunktion sowie der Stoffwechsel von Immunzellen beeinflusst. Es wurde beschrieben, dass Laktat inhibierende Effekte auf die Glykolyse humaner, LPS-aktivierter Monozyten hat. Im Tumormilieu anfallende hohe Laktatlevel können dem Tumor einen Wachstumsvorteil verschaffen, indem die Tumorabwehr durch eine Hemmung der Proliferation zytotoxischer T-Zellen und deren Zytokinproduktion vermindert wird (Fischer et al. 2007; Dietl et al. 2010; Peter et al. 2015).

Um die Umstellung LPS-aktivierter Immunzellen auf ver-

mehrte Glykolyse zu bestätigen und gleichzeitig den Einfluss von Na_2-2-HG auf die Laktatproduktion LPS-aktivierter DC zu untersuchen, wurde die Laktatkonzentration im Überstand behandelter DC gemessen.

Die Messung der Laktatkonzentration im Überstand zeigte, wie bereits von Peter et al. in Monozyten beschrieben, einen starken Anstieg der Laktatproduktion in LPS-aktivierten, im Vergleich zu unreifen DC. Nach Behandlung mit Na_2-2-HG und den Kontrollmetaboliten Glutamin, Na-α-Ketoglutarat und Glutamat, ergab sich tendenziell eine Reduktion der Laktatkonzentration, jedoch ohne signifikanten Unterschied zur LPS-Kontrolle.

Da gezeigt wurde, dass die Aktivierung von Immunzellen mit LPS, neben der Hochregulierung der Glykolyse, z.T. die Atmung der Zellen hemmt (Dietl et al. 2010), wurde des Weiteren analysiert, inwieweit die Atmung von DC durch Na_2-2-HG im Vergleich zu Kontrollmetaboliten beeinflusst wird. Zur Analyse des Sauerstoffverbrauchs über 24 Stunden, wurde die PreSens Methode verwendet.

Die Messung der Sauerstoffkonzentration zeigte, das unreife DC den stärksten Sauerstoffverbrauch aufwiesen. Bei

Stimulation der Zellen mit LPS nahm die Glykolyse (wie bereits gezeigt, s.o.) zu und als Konsequenz daraus der Sauerstoffverbrauch wie erwartet zunächst ab. Im Anschluss pendelte sich der Sauerstoffverbrauch im Bereich des Ausgangswertes ein.

Auch die Reifung der Zellen mit LPS und die gleichzeitige Behandlung mit Na_2-D-2-HG ergab zunächst eine kurze Abnahme des Sauerstoffverbrauchs der DC. Im Laufe der Zeit stieg der Konsum jedoch zunehmend, sogar über den Ausgangswert, so dass die Sauerstoffkonzentration im Überstand der Zellen vermindert war. Hierbei fiel der Effekt von Na_2-D-2-HG im Vergleich zur LPS Kontrolle zunächst stärker aus, jedoch pendelten sich beide Werte mit der Zeit wieder im Bereich des Ausgangswertes ein.

Gleichzeitig wurde die Behandlung LPS-aktivierter DC mit Rotenon durchgeführt. Azevedo-Martins et al. zeigten, dass Rotenon ein starker Inhibitor der Ubichinon Oxidoreduktase des ersten Komplexes der Atmungskette ist, d.h. bei Behandlung der DC mit dieser Substanz wird die Funktion der Mitochondrien blockiert und die zelluläre Atmung ist nicht mehr möglich (Azevedo-Martins et al.

2014). Rotenon diente daher in diesem Versuch als Positivkontrolle, die den Sauerstoffverbrauch der Zellen hemmt. Diese Behandlung führte wie erwartet sofort zu einem stark verminderten Sauerstoffverbrauch der DC.

Insgesamt konnte also ein Effekt auf den Sauerstoffverbrauch bei Behandlung mit Na_2-D-2-HG im Vergleich zur LPS Kontrolle festgestellt werden. Diese Verstärkung der Atmung durch Na_2-D-2-HG, die sich nach einer initialen Verminderung des Sauerstoffverbrauchs zeigte und in höherem Maße ausfiel als bei der LPS-Kontrolle, scheint jedoch nur ein temporärer Effekt zu sein, der in weiteren Versuchen genauer untersucht werden sollte.
Die Aktivität der mitochondrialen Enzyme von DC wurde des Weiteren mittels 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid (XTT)-Methode untersucht. Als Kontrollsubstanz wurde bei diesen Versuchen Nikotinamid, ein Inhibitor von Sirtuinen (NAD^+-abhängige Deacetylasen), verwendet. Mitochondriale Sirtuine regulieren unter anderem die Funktion von Mitochondrien. Eine Hemmung der Sirtuine durch Niko-

tinamid kann daher zu einer gestörten Funktion der Mitochondrien und folglich zu einer verminderten Zellatmung führen (Shih und Donmez 2013).

Bei den Untersuchungen mittels PreSens-Methode, begann sich nach ca. zwei Stunden ein Effekt abzuzeichnen, welcher bei ca. sechs Stunden seinen Höhepunkt erreichte. Demnach erwartete man bei der XTT-Methode einen ähnlichen Effekt bzw. eine Korrelation der Versuchsergebnisse. Die Analyse der mitochondrialen Atmung der DC mittels der XTT-Methode, ergab keinen Effekt von Na_2-2-HG auf die mitochondriale Aktivität. Auch die Stimulation der Zellen mit LPS veränderte die Atmung wider Erwarten nicht.

6.6 Wirkung von Diclofenac auf den Zellmetabolismus

Um den Metabolismus LPS-aktivierter humaner DC weiter zu untersuchen, sollte mit Diclofenac, neben Rotenon und Nikotinamid, eine weitere Substanz eingesetzt werden, die den Stoffwechsel beeinflusst. Gottfried et al. fanden heraus, dass der Metabolit Diclofenac in Tumorzellen zu einer reduzierten Laktatsekretion führte. Gleichzeitig

kam es zu einer intrazellulären Anreicherung von Laktat. Hieraus schlossen Gottfried et al., dass Diclofenac einen direkt hemmenden Einfluss auf die Ausschleusung von Laktat aus den Zellen hat (Gottfried et al. 2013). Bei der Behandlung der DC mit Diclofenac, sollte untersucht werden, ob sich die Beobachtungen von Gottfried et al. für DC bestätigen lassen und ob der Metabolit eine Wirkung auf die Zytokinsekretion der DC hat. Gleichzeitig sollte analysiert werden, ob die Wirkung von Diclofenac auf den Metabolismus der Immunzellen analog zum Einfluss von Na_2-2-HG erfolgt, oder ob sich hierbei Unterschiede zeigen.

Bei der Analyse der Laktatsekretion LPS-aktivierter DC nach Behandlung mit den Diclofenac Konzentrationen 0,05 mM, 0,1 mM und 0,2 mM, zeigten sich verminderte Laktatkonzentrationen im Überstand der Zellen. Entsprechend der verwendeten Konzentration, sank die Laktatsekretion mit zunehmender Diclofenac Menge im Vergleich zur LPS-Kontrolle. Dies scheint die Beobachtungen von Gottfried et al. für DC zu bestätigen.

Die LPS-aktivierten DC wurden im Vergleich mit Na_2-2-HG behandelt und die Laktatkonzentration im Überstand der Zellen gemessen. Der Metabolit Na_2-2-HG reduzierte die Laktatproduktion in LPS-aktivierten DC im Gegensatz zu Diclofenac nicht signifikant. Beide Substanzen hatten jedoch einen stark inhibierenden Einfluss auf die IL-12 Sekretion. Die Beeinflussung der Laktatsekretion und damit der Glykolyse scheinen somit nicht ursächlich für den Effekt von Na_2-2-HG auf die IL-12 Sekretion zu sein.

Dietl et al. konnten zeigen, dass Laktat die Zytokinsekretion humaner Immunzellen vermindert. Gleichzeitig zeigten Dietl et al., dass ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Laktatkonzentration und der Glykolyseaktivität der Zellen besteht und in der Folge die Zytokinsekretion von der Glykolyse abhängig sein muss (Dietl et al. 2010). Auch Fischer et al. zeigten, dass durch intrazellulär angereichertes Laktat, Metabolismus und Funktion von Immunzellen, also auch deren Zytokinproduktion, gestört werden (Fischer et al. 2007).

Es sollte nun analysiert werden, ob auch Diclofenac, welches zu einer intrazellulären Laktatanreicherung führt, die Zytokinproduktion der DC reduziert.

Bei der Messung der IL-12p70 Konzentration im Überstand der LPS-aktivierten und mit Diclofenac behandelten DC zeigte sich ein starker inhibitorischer Effekt des Metaboliten auf die Zytokinsekretion der Zellen. Unabhängig von der eingesetzten Diclofenac Konzentration, ergab sich eine signifikante, fast maximale Hemmung der IL-12p70 Sekretion. Die Messung der Zytokine TNF, IL-10 und MCP-1 im Überstand der mit Diclofenac behandelten Zellen, zeigte ebenfalls eine Reduktion der Zytokinsekretion. Hierbei kam es mit steigender Diclofenac Konzentration zu einer zunehmend geringeren Zytokinsekretion.

Die verminderte Sekretion von IL-12p70 von, mit Diclofenac behandelten, LPS-aktivierten DC, bestätigen die Beobachtungen von Dietl et al., dass eine Hemmung der Glykolyse und intrazelluläre Laktatanreicherung die Zytokinsekretion von Immunzellen hemmt (Dietl et al. 2010). Zudem kann die Aussage von Chirasni et al., dass erhöhte Laktatlevel signifikant die Fähigkeit muriner DC IL-12p70 zu produzieren hemmt, für humane DC bestätigt

werden (Chirasani et al. 2013). Insgesamt zeigen diese Daten, dass Diclofenac und Na_2-2-HG zwar beide die IL-12 Sekretion hemmen, jedoch über verschiedene Mechanismen. Während bei Diclofenac wahrscheinlich die sehr starke Hemmung der Glykolyse und Laktatsekretion zu einer Inhibition der Zytokinantwort führt, scheint bei Na_2-2-HG die Hemmung der Glykolyse keine Rolle zu spielen.

6.7 Untersuchung der LPS-Signaltransduktion unter Na_2-2-HG

DC haben die spezifische Aufgabe, körperfremde Antigene zu binden und auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, um dadurch die zelluläre Immunität zu induzieren (Liu et al. 1998). Die Folge ist eine Entzündung im betroffenen Gewebe durch die Rekrutierung von u.a. NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten (Gee et al. 2009). Die Aktivierung von DC und deren Zytokinproduktion durch den bakteriellen Liganden LPS spielt hierbei eine wichtige Rolle. LPS bindet zunächst an einen TLR, wie beispielsweise TLR4 und kann dadurch verschiedene Signalwege in Gang setzen. (Bhattacharyya et al. 2004). Erfolgt nach der Bindung von LPS an TLR4 die Signalübertragung

über das *Myeloid differentiation primary-response Gen 88* (MyD88), so kann auf unterschiedlichen Wegen die Regulation der Expression von Genen, die für IL-23p19, IL-10, IL-12p70 und IL-12p35 kodieren, beeinflusst werden (Molle et al. 2013; Goriely et al. 2008).

Einer der Wege der LPS Signaltransduktion verläuft über den Nuklearen Faktor κB (NF-κB). Im Zytoplasma liegt NF-κB gebunden an IκBα vor. In diesem Zustand ist NF-κB inaktiv. Bindet nun LPS an TLR4, so löst sich IκBα von NF-κB und wird im Proteasom abgebaut. NF-κB jedoch wandert in den Zellkern und aktiviert die Transkription von IL-12p40, einer Untereinheit des Dimers IL-12p70 (Bhattacharyya et al. 2004; Goriely et al. 2008; Rescigno et al. 1998).
Da gezeigt werden konnte, dass Na_2-2-HG die Sekretion von IL-12p70 in LPS-aktivierten DC signifikant hemmt, sollte nun untersucht werden, ob dieser Effekt über die Hemmung des NF-κB Signalweges erfolgt. Hierfür wurde das regulatorisch wirkende IκBα in Zelllysaten von DC mittels Western Blot analysiert.

Im Blot eines beispielhaften Experiments, zeigte sich eine Verminderung der Bande nach Stimulation der Zellen mit LPS, im Vergleich zu nicht aktivierten DC. Dies entspricht der Aussage von Rescigno et al., bezüglich der Degradierung von IκBα nach LPS-Stimulation (Rescigno et al. 1998). Die Behandlung der LPS-aktivierten Zellen mit Na_2-D-2-HG zeigte eine zusätzliche Verminderung der IκBα-Menge in den Zellen, die Behandlung der DC mit Na_2-L-2-HG zeigte keinen zusätzlichen Effekt. Auch der Kontrollmetabolit Na_2-α-Ketoglutarat bewirkte keine Veränderung der Proteinmenge in LPS-aktivierten DC. Na_2-α-Ketoglutarat wurde in diesem Fall anstelle von Na-α-Ketoglutarat eingesetzt, da Na_2-α-Ketoglutarat den gleichen pH-Wert wie Na_2-2-HG in der Kultur besaß. Bei vorherigen Behandlungen mit Na-α-Ketoglutarat wurde ein niedrigerer pH gemessen.

Um den beobachteten Effekt von Na_2-D-2-HG auf die IκBα-Menge in LPS-aktivierten DC zu bestätigen, wurden von der Arbeitsgruppe weitere unabhängige Experimente durchgeführt. Die Metaboliten Na_2-L-2-HG und Na_2-α-Ketoglutarat wurden bei diesen Versuchen nicht eingesetzt. Der Effekt von Na_2-D-2-HG auf die IκBα-Menge in

LPS-aktivierten DC, konnte hierbei erneut gezeigt werden.

Es resultiert, dass Aktivierung der DC mit LPS zu der erwarteten Degradation und somit Verminderung von IκBα führt. Der Metabolit Na_2-D-2-HG zeigte eine zusätzliche Verminderung der IκBα-Menge im Vergleich zur LPS-Kontrolle, was in weiteren Experimenten bestätigt werden konnte. Die Behandlung der LPS-aktivierten DC mit Na_2-L-2-HG oder Na_2-α-Ketoglutarat, beeinflussten den Transkriptionsfaktor NF-κB über die regulatorische Einheit IκBα nicht. Daraus ergibt sich, dass die Reduktion der IL-12p70 Expression in LPS-aktivierten DC nach Behandlung mit Na_2-D-2-HG, u.a. über diesen Signalweg erfolgen muss, das Enantiomer Na_2-L-2-HG jedoch keinen Einfluss auf diesen Signalweg hat. Der Effekt von Na_2-L-2-HG auf die IL-12p70 Expression in LPS-aktivierten DC, muss daher über einen anderen Signalweg erfolgen.

Eine weitere Möglichkeit der LPS-Signaltransduktion führt nach Bindung von LPS an TLR4 zu einer Weiterleitung des Signals über den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Akt Signalweg. Die Aktivierung von PI3K durch

die Bindung von LPS an TLR4 bewirkt über die Phosphorylierung von Phosphoinositiden die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphat. In der Folge wird die Serin-Threonin Kinase Akt durch Phosphorylierung aktiviert, wandert in den Zellkern und führt dort zu einer Hemmung der IL-12p70 Produktion (Martin et al. 2003; Fukao et al. 2002).

Im Allgemeinen dient IL-12p70 der Protektion des Körpers gegen die Invasion schädlicher Fremdkörper, indem es aktivierend auf die angeborene und adaptive Immunität wirkt. Wird das Zytokin übermäßig von Immunzellen sezerniert, so kommt es zu einer überschießenden, den eigenen Organismus tangierenden, Immunantwort. Der PI3K-Akt Signalweg bewirkt eine Hemmung der IL-12p70 Sekretion und erlaubt die Regulation der induzierten Immunantwort. Gleichzeitig wird die Bildung von IL-10 induziert, welches zusätzlich die IL-12p70 Produktion hemmt und den Körper vor einer Autoimmunreaktion schützt (Martin et al. 2003; Fukao et al. 2002).

Um zu untersuchen, inwieweit Na_2-2-HG einen Einfluss auf diesen Signalweg hat, wurden Western Blots mit Zelllysaten von DC durchgeführt. Die Zellen wurden mit LPS

aktiviert und mit Na_2-D- oder Na_2-L-2-HG behandelt. Hierbei wurde phosphorylierte Proteinkinase B (pAkt) sowie nicht phosphorylierteProteinkinase B (Akt) detektiert. Bei der Analyse des phosphorylierten Proteins ergab sich kein Effekt, weder von Na_2-D- noch von Na_2-L-2-HG. Das nicht phosphorylierte Protein lag bei Behandlung mit Na_2-2-HG vermindert vor, jedoch nicht signifikant gegenüber der LPS-Kontrolle. Die Kontrollmetaboliten Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat sowie Milchsäure zeigten keine Wirkung auf die Expression von pAkt und Akt.
Es konnte gezeigt werden, dass Na_2-2-HG die IL-12p70 Sekretion in LPS-aktivierten DC reduziert (siehe 5.1.1) und scheinbar einen Einfluss auf die IL-12p40 Expression hat (siehe 5.3.1). Im Western blot ergab sich kein Einfluss von Na_2-2-HG auf den PI3K-Akt Signalweg, woraus geschlossen werden kann, dass Na_2-2-HG über andere Signalwege in die IL-12p70 Regulation eingreifen muss.

Die Weiterleitung des Signals der LPS-Bindung an TLR4 kann auch zur Aktivierung der Mitogen abhängigen Protein Kinase (MAPK) p38 führen. Die aktivierte Kinase

p38 phosphoryliert den Transkriptionsfaktor cAMP-sensibles Element bindendes Protein (CREB). Das phosphorylierte CREB wandert in den Zellkern und führt dort zu einer vermehrten Transkription der Gene, die für IL-10 kodieren. Aus der induzierte IL-10 Sekretion resultiert, wie bereits beschrieben, eine Hemmung der IL-12p70 Produktion (Martin et al. 2003; Mills, Kingston H G 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass Na_2-2-HG die Sekretion von IL-12p70 signifikant hemmt (siehe 5.1.1). Würde Na_2-2-HG über den p38-CREB Signalweg der LPS-Signaltransduktion wirken, so müsste durch Na_2-2-HG dieser Signalweg verstärkt werden, um über eine vermehrte IL-10 Sekretion die Bildung von IL-12p70 zu hemmen.

Der Einfluss von Na_2-2-HG auf die Regulation der MAPK p38 in DC wurde ebenfalls mittels Western Blot untersucht. Auch hier wurde die Konzentration der aktivierten phosphorylierten Kinase im Vergleich zur nicht phosphorylierten Form analysiert.

Die densitometrische Auswertung zeigte, dass weder Na_2-D- noch Na_2-L-2-HG eine Wirkung auf die Konzentration von phosphoryliertem p38 (pp38) hat. Auch die Kontroll-

metaboliten Glutamin, Glutamat und Milchsäure veränderten die Quantität des Proteins im Vergleich zur LPS-Kontrolle nicht. Na-α-Ketoglutarat führte zu einer leichten Reduktion von pp38, jedoch ohne signifikanten Unterschied zur LPS-Kontrolle.

Bei der Analyse des nicht phosphorylierten Proteins, hatten die Kontrollmetaboliten Glutamin, Na-α-Ketoglutarat, Glutamat und Milchsäure keinen Effekt auf die MAPK p38. Die Behandlung mit Na_2-D-2-HG ergab eine minimale Steigerung der p38-Proteinkonzentration gegenüber der LPS-Kontrolle, jedoch ohne Signifikanz.

Aus diesen Ergebnissen resultiert, dass Na_2-2-HG die LPS-Signaltransduktion über den p38-CREB Signalweg nicht signifikant beeinflusst. Die leichte Erhöhung der Quantität des nicht phosphorylierten p38 durch Na_2-D-2-HG, führt in der Folge zu einer verminderten Aktivität des p38-CREB Signalwegs, wodurch folglich die Transkription von IL-10 vermindert induziert wird. Da durch eine verminderte Transkription von IL-10, die IL-12p70 Sekretion weniger durch IL-10 gehemmt wird, würde daraus eine erhöhte Sekretion von IL-12p70 resultieren (Martin et al. 2003).

Da mittels ELISA im Überstand von mit Na_2-2-HG behandelten DC gezeigt werden konnte, dass Na_2-2-HG die Sekretion von IL-12p70 signifikant hemmt, widerspricht dieses Ergebnis den Untersuchungen des p38-CREB Signalweges im Western Blot. Daher kann angenommen werden, dass die Hemmung der IL-12p70 Sekretion und somit die Wirkung von Na_2-2-HG nicht über diesen Weg der LPS-Signaltransduktion wirkt.

Weitere Wege der LPS-Signaltransduktion verlaufen über den extrazelluläres Signal aktivierte Kinase (ERK) Signalweg oder auch den TANK bindende Kinase (TBK)1-Interferon-regulto-rische Faktoren (IRFs) Signalweg.
Die MAPK ERK wird durch die Bindung von LPS an TLR4 und eine Weiterleitung des Signals über MyD88 aktiviert. Über beispielsweise die MAPK „FOS“ kann ERK die Transkription der Gene, die für die IL-23 Untereinheit p19 kodieren, steuern.
Auch TBK1 wird durch die Bindung von LPS an TLR4 aktiviert. Die Weiterleitung der LPS-Bindung erfolgt hier über das IFNβ-induzierende TIR-Domänen-beinhaltende

Adapter Protein (TRIF), welches TBK1 aktiviert. Das aktivierte TBK1 bewirkt nun eine Translokation von IRFs in den Nukleus. Hier kann durch IRFs die Transkription von Genen, die für IL-12p35 kodieren, induziert werden (Mills, Kingston H G 2011; Goriely et al. 2008).

Diese Signalwege wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht und sollten in weiteren Experimenten analysiert werden.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Na_2-2-HG spezifisch die IL-12p70 Produktion von LPS-aktivierten DC beeinflusst, jedoch keine Veränderung der Produktion anderer Zytokine bewirkt. Es zeigte sich zwar eine leichte Erhöhung der IL-10 Konzentration sowie eine leichte Reduktion der TNF Konzentration im Überstand der Zellen, diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant.

Neben der Sekretion von IL-12p70 im Zellüberstand, wurde die Genexpression der IL-12p70 Untereinheiten p35 und p40 durch Na_2-2-HG reduziert, jedoch ohne Signifikanz. Die Untersuchung der Genexpression der Untereinheit p19 des IL-23 zeigte ebenfalls keinen spezifischen Effekt von Na_2-2-HG. Auf Proteinebene führte Na_2-2-HG zu einer Reduktion des IL-12p70-Dimers sowie zur Verminderung der p40 Untereinheit. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses sollten noch weitere Versuche durchgeführt werden.

In der MLR schien sich ein leichter Effekt vor allem durch das L-Enantiomer von Na_2-2-HG im Vergleich zur LPS-Kontrolle vorzuliegen, da jedoch bisher nur ein Versuch

durchgeführt wurde, müssen weitere Versuche diese Tendenz bestätigen.

Bei der Untersuchung des Stoffwechsels der DC, wurden das Enzym Indolamin 2,3-Dioxigenase (IDO), die Atmung und die Laktatproduktion der Zellen unter Einfluss von Na_2-2-HG analysiert.

Die Untersuchung von IDO sowie der Laktatproduktion zeigten keinen Effekt von Na_2-2-HG auf diese Stoffwechselwege.

Die Untersuchung der Atmung der Zellen ergab eine leichte Verstärkung der Atmung nach ca. drei Stunden, dieser Effekt war aber transient und sollte in weiteren Versuchen genauer untersucht werden.

Um den Mechanismus der Beeinflussung des Zellmetabolismus durch Na_2-2-HG genauer zu untersuchen, wurden erste Analysen von LPS-Signaltranduktionswegen durchgeführt.

Weder die Degradation von IκBα, noch dessen Phosphorylierung wurden hierbei durch Na_2-2-HG beeinflusst. Auch bei der Untersuchung der MAPK Akt und p38 und deren Phosphorylierung konnte kein Effekt von Na_2-2-HG festgestellt werden.

Da in dieser Arbeit der spezifische Effekt von Na_2-2-HG auf die IL-12p70 Produktion in DC bestätigt werden konnte, bei den weiteren Untersuchungen sich jedoch nur bei der Zellatmung ein signifikanter Effekt durch den Metaboliten ergab, sollte in weiteren Experimenten der mögliche Zusammenhang zwischen beiden Effekten analysiert werden.

8 Literaturverzeichnis

Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew H.; Pillai, Shiv (2012): Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders.

Andreesen, R.; Scheibenbogen, C.; Brugger, W.; Krause, S.; Meerpohl, H. G.; Leser, H. G. et al. (1990): Adoptive transfer of tumor cytotoxic macrophages generated in vitro from circulating blood monocytes: a new approach to cancer immunotherapy. In: *Cancer Res* 50 (23), S. 7450–7456.

Azevedo-Martins, A. C.; Machado, A C L; Klein, C. C.; Ciapina, L.; Gonzaga, L.; Vasconcelos, A T R et al. (2014): Mitochondrial respiration and genomic analysis provide insight into the influence of the symbiotic bacterium on host trypanosomatid oxygen consumption. In: *Parasitology*, S. 1–11. DOI:10.1017/S0031182014001139.

Azuma, Takeshi; Takahashi, Tsuyoshi; Kunisato, Atsushi; Kitamura, Tadaichi; Hirai, Hisamaru (2003): Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. In: *Cancer Res* 63 (15), S. 4516–4520.

Berridge, Michael V.; Herst, Patries M.; Tan, An S. (2005): Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. In: *Biotechnol Annu Rev* 11, S. 127–152.

DOI:10.1016/S1387-2656(05)11004-7.

Bhattacharyya, Sandip; Sen, Pradip; Wallet, Mark; Long, Brian; Baldwin, Albert S Jr; Tisch, Roland (2004): Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity. In: *Blood* 104 (4), S. 1100–1109. DOI:10.1182/blood-2003-12-4302.

Brodie, D. A. (1981): Bead rings at the endoplasmic reticulum-Golgi complex boundary: morphological changes accompanying inhibition of intracellular transport of secretory proteins in arthropod fat body tissue. In: *The Journal of cell biology* 90 (1), S. 92–100.

Carra, G.; Gerosa, F.; Trinchieri, G. (2000): Biosynthesis and posttranslational regulation of human IL-12. In: *J Immunol* 164 (9), S. 4752–4761.

Chirasani, Sridhar R.; Leukel, Petra; Gottfried, Eva; Hochrein, Jochen; Stadler, Katrin; Neumann, Bernhard et al. (2013): Diclofenac inhibits lactate formation and efficiently counteracts local immune suppression in a murine glioma model. In: *Int J Cancer* 132 (4), S. 843–853. DOI:10.1002/ijc.27712.

Dang, L. (2009): Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. In: *Nature* (462(7274)), S. 739–744.

Dang, Lenny; Jin, Shengfang; Su, Shinsan M. (2010): IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. In: *Trends Mol Med* 16 (9), S. 387–397. DOI: 10.1016/j.molmed.2010.07.002.

Dang, Lenny; White, David W.; Gross, Stefan; Bennett, Bryson D.; Bittinger, Mark A.; Driggers, Edward M. et al. (2009): Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. In: *Nature* 462 (7274), S. 739–744. DOI:10.1038/nature08617.

Devergne, O.; Birkenbach, M.; Kieff, E. (1997): Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (22), S. 12041–12046.

Dietl, Katrin; Renner, Kathrin; Dettmer, Katja; Timischl, Birgit; Eberhart, Karin; Dorn, Christoph et al. (2010): Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184 (3), S. 1200–1209. DOI: 10.4049/jimmunol.0902584.

DiNardo, Courtney D.; Propert, Kathleen J.; Loren, Alison W.; Paietta, Elisabeth; Sun, Zhuoxin; Levine, Ross L. et al. (2013): Serum 2-hydroxyglutarate levels predict isocitrate dehydrogenase mutations and clinical outcome in acute myeloid leukemia. In: *Blood* 121 (24), S. 4917–4924. DOI:10.1182/blood-2013-03-493197.

Elmaagacli, A. H.; Ditschkowski, M.; Steckel, N. K.; Gromke, T.; Ottinger, H.; Hillen, U. et al. (2014): Human chorionic gonadotropin and indolamine 2,3-dioxygenase in patients with GVHD. In: *Bone Marrow Transplant* 49 (6), S. 800–805. DOI:10.1038/bmt.2014.59.

Fecci, Peter E.; Mitchell, Duane A.; Whitesides, John F.; Xie, Weihua; Friedman, Allan H.; Archer, Gary E. et al. (2006): Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. In: *Cancer Res.* 66 (6), S. 3294–3302. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-05-3773.

Fischer, Karin; Hoffmann, Petra; Voelkl, Simon; Meidenbauer, Norbert; Ammer, Julia; Edinger, Matthias et al. (2007): Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. In: *Blood* 109 (9), S. 3812–3819. DOI:10.1182/blood-2006-07-035972.

Freudig, D.; Sauermost, R. (Hg.) (2004): Lexikon der Biologie. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.

Fridman, Wolf Herman; Pagès, Franck; Sautès-Fridman, Catherine; Galon, Jérôme (2012): The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. In: *Nat. Rev. Cancer* 12 (4), S. 298–306. DOI:10.1038/nrc3245.

Fukao, Taro; Tanabe, Masanobu; Terauchi, Yasuo; Ota, Takayuki; Matsuda, Satoshi; Asano, Tomoichiro et al. (2002): PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. In: *Nat Immunol* 3 (9), S. 875–881. DOI: 10.1038/ni825.

Gee, Katrina; Guzzo, Christina; Che Mat, Nor Fazila; Ma, Wei; Kumar, Ashok (2009): The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. In: *Inflamm Allergy Drug Targets* 8 (1), S. 40–52.

Goriely, Stanislas; Goldman, Michel (2008): Interleukin-12 family members and the balance between rejection and tolerance. In: *Curr Opin Organ Transplant* 13 (1), S. 4–9. DOI:10.1097/MOT.0b013e3282f406c4.

Goriely, Stanislas; Neurath, Markus F.; Goldman, Michel (2008): How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8 (1), S. 81–86. DOI:10.1038/nri2225.

Gottfried, Eva; Kunz-Schughart, Leoni A.; Ebner, Stephanie; Mueller-Klieser, Wolfgang; Hoves, Sabine; Andreesen, Reinhard et al. (2006): Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. In: *Blood* 107 (5), S. 2013–2021. DOI:10.1182/blood-2005-05-1795.

Gottfried, Eva; Lang, Sven A.; Renner, Kathrin; Bosserhoff, Anja; Gronwald, Wolfram; Rehli, Michael et al. (2013): New aspects of an old drug--diclofenac targets MYC and glucose metabolism in tumor cells. In: *PLoS One* 8 (7), S. e66987. DOI:10.1371/journal.pone.0066987.

Gross, Stefan; Cairns, Rob A.; Minden, Mark D.; Driggers, Edward M.; Bittinger, Mark A.; Jang, Hyun Gyung et al. (2010): Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. In: *J. Exp. Med.* 207 (2), S. 339–344. DOI:10.1084/jem.20092506.

Gustafson, Michael P.; Lin, Yi; New, Kent C.; Bulur, Peggy A.; O'Neill, Brian Patrick; Gastineau, Dennis A.; Dietz, Allan B. (2010): Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DRlo/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone. In: *Neuro-oncology* 12 (7), S. 631–644. DOI:10.1093/neuonc/noq001.

Hargadon, Kristian M. (2013): Tumor-altered dendritic cell function: implications for anti-tumor immunity. In: *Front Immunol* 4, S. 192. DOI:10.3389/fimmu.2013.00192.

Inaba, Kayo; Swiggard, William J.; Steinman, Ralph M.; Romani, Nikolaus; Schuler, Gerold; Brinster, Carine (2009): Isolation of dendritic cells. In: *Curr Protoc Immunol* Chapter 3, S. Unit 3.7. DOI:10.1002/0471142735.im0307s86.

Jang, Kyu Yun; Noh, Sang Jae; Lehwald, Nadja; Tao, Guo-Zhong; Bellovin, David I.; Park, Ho Sung et al. (2012): SIRT1 and c-Myc promote liver tumor cell survival and predict poor survival of human hepatocellular carcinomas (9).

Jantsch, Jonathan; Chakravortty, Dipshikha; Turza, Nadine; Prechtel, Alexander T.; Buchholz, Bjorn; Gerlach, Roman G. et al. (2008): Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180 (7), S. 4697–4705.

Johnson, Mei, Cohn (1977): The separation, long-term cultivation, and maturation of the human monocyte. In: *The Journal of Experimental Medicine* 146 (6), S. 1613–1626. Online verfügbar unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2181917/.

Kranendijk, Martijn; Struys, Eduard A.; van Schaftingen, Emile; Gibson, K. Michael; Kanhai, Warsha A.; van der Knaap, Marjo S et al. (2010): IDH2 mutations in patients with D-2-hydroxyglutaric aciduria. In: *Science* 330 (6002), S. 336. DOI:10.1126/science.1192632.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.

Lim, H. W.; Hillsamer, P.; Banham, A. H.; Kim, C. H. (2005): Cutting Edge: Direct Suppression of B Cells by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. In: *The Journal of Immunology* 175 (7), S. 4180–4183. DOI:10.4049/jimmunol.175.7.4180.

Liu, L.; Rich, B. E.; Inobe, J.; Chen, W.; Weiner, H. L. (1998b): Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. In: *Int Immunol* 10 (8), S. 1017–1026.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J Biol Chem* 193 (1), S. 265–275.

Lowther, Daniel E.; Hafler, David A. (2012): Regulatory T cells in the central nervous system. In: *Immunol. Rev.* 248 (1), S. 156–169. DOI:10.1111/j.1600-065X.2012.01130.x.

Martin, Michael; Schifferle, Robert E.; Cuesta, Natalia; Vogel, Stefanie N.; Katz, Jannet; Michalek, Suzanne M.

(2003): Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. In: *J Immunol* 171 (2), S. 717–725.

Mills, Kingston H G (2011): TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. In: *Nat Rev Immunol* 11 (12), S. 807–822. DOI:10.1038/nri3095.

Molle, Céline; Zhang, Tong; Ysebrant de Lendonck, Laure; Gueydan, Cyril; Andrianne, Mathieu; Sherer, Félicie et al. (2013): Tristetraprolin regulation of interleukin 23 mRNA stability prevents a spontaneous inflammatory disease (9).

Mullen, Andrew R.; Wheaton, William W.; Jin, Eunsook S.; Chen, Pei-Hsuan; Sullivan, Lucas B.; Cheng, Tzuling et al. (2012): Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. In: *Nature* 481 (7381), S. 385–388. DOI:10.1038/nature10642.

Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, S. 263–273.

Murphy, F. J.; Hayes, M. P.; Burd, P. R. (2000): Disparate intracellular processing of human IL-12 preprotein subunits: atypical processing of the P35 signal peptide. In: *J Immunol* 164 (2), S. 839–847.

Navis, Anna C.; Niclou, Simone P.; Fack, Fred; Stieber, Daniel; van Lith, Sanne; Verrijp, Kiek et al. (2013): Increased mitochondrial activity in a novel IDH1-R132H mutant human oligodendroglioma xenograft model: in situ detection of 2-HG and α-KG. In: *Acta Neuropathol Commun* 1 (1), S. 18. DOI:10.1186/2051-5960-1-18.

Ohka, Fumiharu; Ito, Maki; Ranjit, Melissa; Senga, Takeshi; Motomura, Ayako; Motomura, Kazuya et al. (2014): Quantitative metabolome analysis profiles activation of glutaminolysis in glioma with IDH1 mutation. In: *Tumour Biol.* 35 (6), S. 5911–5920. DOI:10.1007/s13277-014-1784-5.

Parsons, D. Williams; Jones, Siân; Zhang, Xiaosong; Lin, Jimmy Cheng-Ho; Leary, Rebecca J.; Angenendt, Philipp et al. (2008): An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. In: *Science* 321 (5897), S. 1807–1812. DOI:10.1126/science.1164382.

Peter, Katrin; Rehli, Michael; Singer, Katrin; Renner-Sattler, Kathrin; Kreutz, Marina (2015): Lactic acid delays the inflammatory response of human monocytes. In: *Biochemical and biophysical research communications* 457 (3), S. 412–418. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.01.005.

Rakheja, Dinesh; Boriack, Richard L.; Mitui, Midori; Khokhar, Shama; Holt, Shelby A.; Kapur, Payal (2011): Papillary thyroid carcinoma shows elevated levels of 2-hydroxyglutarate. In: *Tumour Biol.* 32 (2), S. 325–333. DOI:10.1007/s13277-010-0125-6.

Reitman, Zachary J.; Yan, Hai (2010): Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 102 (13), S. 932–941. DOI:10.1093/jnci/djq187.

Rescigno, M.; Martino, M.; Sutherland, C. L.; Gold, M. R.; Ricciardi-Castagnoli, P. (1998): Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. In: *J Exp Med* 188 (11), S. 2175–2180.

Rohle, Dan; Popovici-Muller, Janeta; Palaskas, Nicolaos; Turcan, Sevin; Grommes, Christian; Campos, Carl et al. (2013): An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. In: *Science* 340 (6132), S. 626–630. DOI:10.1126/science.1236062.

Scudiero, D. A.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T. H. et al. (1988): Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. In: *Cancer Res* 48 (17), S. 4827–4833.

Shih, Jennifer; Donmez, Gizem (2013): Mitochondrial Sirtuins as Therapeutic Targets for Age-Related Disorders. In: *Genes & Cancer* 4 (3-4), S. 91–96. DOI:10.1177/1947601912474931.

Smolková, Katarína; Ježek, Petr (2012): The Role of Mitochondrial NADPH-Dependent Isocitrate Dehydrogenase in Cancer Cells. In: *Int J Cell Biol* 2012, S. 273947. DOI:10.1155/2012/273947.

Soliman, Hatem; Mediavilla-Varela, Melanie; Antonia, Scott (2010): Indoleamine 2,3-dioxygenase: is it an immune suppressor? In: *Cancer J* 16 (4), S. 354–359. DOI:10.1097/PPO.0b013e3181eb3343.

Stix G. (2009): Bösartige Entzündungen. In: Spektrum der Wissenschaft Dossier, S. 24–31.

Terunuma, Atsushi; Putluri, Nagireddy; Mishra, Prachi; Mathé, Ewy A.; Dorsey, Tiffany H.; Yi, Ming et al. (2014): MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. In: *J. Clin. Invest.* 124 (1), S. 398–412. DOI:10.1172/JCI71180.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (9), S. 4350–4354.

Wang, Fang; Travins, Jeremy; DeLaBarre, Byron; Penard-Lacronique, Virginie; Schalm, Stefanie; Hansen, Erica et al. (2013): Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. In: *Science* 340 (6132), S. 622–626. DOI:10.1126/science.1234769.

Ward, Patrick S.; Patel, Jay; Wise, David R.; Abdel-Wahab, Omar; Bennett, Bryson D.; Coller, Hilary A. et al. (2010): The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. In: *Cancer Cell* 17 (3), S. 225–234. DOI:10.1016/j.ccr.2010.01.020.

Weichhart, T.; Säemann, M. D. (2008): The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications. In: *Ann. Rheum. Dis.* 67 Suppl 3, S. iii70-4. DOI:10.1136/ard.2008.098459.

Yang, Chendong; Sudderth, Jessica; Dang, Tuyen; Bachoo, Robert M.; Bachoo, Robert G.; McDonald, Jeffrey G.; DeBerardinis, Ralph J. (2009): Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. In: *Cancer Res.* 69 (20), S. 7986–7993. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-2266.

Yang, Hongying; Zhang, Wei; Pan, Heng; Feldser, Heidi G.; Lainez, Elden; Miller, Christine et al. (2012a): SIRT1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of NF-kappaB activity. In: *PLoS One* 7 (9), S. e46364. DOI:10.1371/journal.pone.0046364.

Yang, Hui; Ye, Dan; Guan, Kun-Liang; Xiong, Yue (2012b): IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives. In: *Clin. Cancer Res.* 18 (20), S. 5562–5571. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-12-1773.

Yen, K. E.; Bittinger, M. A.; Su, S. M.; Fantin, V. R. (2010): Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. In: *Oncogene* 29 (49), S. 6409–6417. DOI:10.1038/onc.2010.444.

Young, Regina M.; Simon, M. Celeste (2012): Untuning the tumor metabolic machine: HIF-α: pro- and antitumorigenic? In: *Nat. Med.* 18 (7), S. 1024–1025. DOI:10.1038/nm.2865.

Zhang, S.; Kaplan, M. H. (2000): The p38 mitogen-activated protein kinase is required for IL-12-induced IFN-gamma expression. In: *J Immunol* 165 (3), S. 1374–1380.

Zhao, Dong-Mei; Thornton, Angela M.; DiPaolo, Richard J.; Shevach, Ethan M. (2006): Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. In: *Blood* 107 (10), S. 3925–3932. DOI:10.1182/blood-2005-11-4502.

Zhao, Shimin; Lin, Yan; Xu, Wei; Jiang, Wenqing; Zha, Zhengyu; Wang, Pu et al. (2009): Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. In: *Science* 324 (5924), S. 261–265. DOI:10.1126/science.1170944.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an **Prof. Dr. Marina Kreutz**, für die gute Betreuung meiner Arbeit sowie die Offenheit und Geduld für alle Fragen. Ebenso wurde mir durch die zahlreichen Montags-Diskussionen die wissenschaftliche Denkweise näher gebracht und ich durfte auch immer Gedanken mit einbringen. Danke, dass du dich so gekümmert hast und das Projekt unter deine direkte Obhut genommen hast! Ich habe sehr viel gelernt in meiner Zeit im Labor, hatte sehr viel Spaß an der Arbeit und hatte das Gefühl mich immer gut einbringen zu können.

Liebe **Moni**, vielen Dank für all die Hilfe, deine Geduld, deine Ruhe und die vielen guten Gespräche während diversen ELISAs und Phospho-Lysaten! Du warst immer gelassen, auch wenn mal etwas schief ging und all die verzwickten Experimente wurden mit dir durch viel Überlegung und Planung nach und nach zur Routine, auch wenn ich dafür oftmals zu sehr undankbaren Zeiten aufstehen musste. Danke für die Freundschaft und die

vielen schönen Momente, das Motorrad wird mich immer daran erinnern!

Gabi danke, dass du immer im Labor warst und immer ein Ohr für meine unzähligen Fragen und immer Lösungen für Probleme hattest, für das geduldige Beibringen von Realplex und WesternBlot und die vielen guten Gespräche, auch wenn sie nichts mit dem Labor zu tun hatten!
Alice, danke für die Hilfe bei diversen Experimenten!
Danke **Katrin Renner** für die vielen FACS Analysen und die gute Mitbetreuung!
Danke an alle anderen aus der AG Kreutz und AG Rehli, es war eine schöne Zeit mit euch.

Eli danke für die lustigen Momente, das viele Lachen, die unendlichen ELISAs und unsere geliebten MLRs.
Danke auch **Carina** für die vielen lustigen Kaffee- und Mittagspausen.

Liebe **Steffi**, danke für die vielen sinnvollen und sinnlosen Worte, die Zeit in den Vorlesungen und Kursen, die Zeit danach und alles was dazu gehört!

Von Herzen danke ich meinen **Eltern** für den Beistand, die Hilfe und die Geduld, auch während meines Studiums! Die vielen Gespräche und Diskussionen, das Korrekturlesen und auch die konstruktive Kritik. Danke für die große Unterstützung, die ich von euch erhalten habe und dass ihr immer für mich da seid!

René, danke für alles und die vielen Kilometer, die du mit mir zurückgelegt und die du mir zugehört hast!

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ines Marion Ugele
Geburtsdatum	13.08.1989
Geburtsort	Tübingen
Anschrift	Tulpenstraße 2 93197 Zeitlarn Tel.: 0176/97302569 E-mail: Ines.Ugele@web.de
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Berufserfahrung

Praktisches Jahr

02/2016 – 04/2016	Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Regensburg, Direktor Prof. Dr. Wolfgang Herr
12/2015 – 02/2016	Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Regensburg, Direktor Prof. Dr. Lars Maier
09/2015 – 12/2015	Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohren-Heilkunde, Universitätsklinikum Regensburg, Direktor Prof. Dr. Jürgen Strutz
05/2015 – 09/2015	Universitätsklinik für Viszerale Chirurgie und Medizin, Inselspital Bern, Direktor Prof. Dr. Dr. Daniel Candinas

Famulaturen

03/2013 – 04/2013	Praxis für Allgemeinmedizin, Iggensbach, Dr. Stefan Putz
02/2013 – 03/2013	Abteilung für Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation, Universitätsklinikum Regensburg, Abteilungsleiter Prof. Dr. Selim Corbacioglu
08/2012 – 09/2012	Praxis für Allgemeinchirurgie und plastische Chirurgie, Pfaffenhofen a.d.Ilm, Dr. Harald Spiess
02/2012 – 03/2012	Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum Ingolstadt, Direktor Prof. Dr. Babür Aydeniz

Promotion

Seit 03/2013	„*Effekte von 2-Hydroxyglutarat auf humane Immunzellen*“, Betreuung: Prof. Dr. Marina Kreutz, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Regensburg

Zusätzliche berufliche Erfahrungen

08/2013	Praktikum in der Praxis für Allgemeinmedizin, Thalmassing, Dr. Peter Perzl

02/2011 – 03/2011	Pflegepraktikum in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Ilmtalklinik Pfaffenhofen a.d.Ilm, Abteilungsleiter PD Dr. Reinhard Lange
08/2010 – 09/2010	Pflegepraktikum in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar München, Direktor Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe
03/2010 – 04/2010	Pflegepraktikum in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Ilmtalklinik Pfaffenhofen a.d.Ilm, Abteilungsleiter PD Dr. Reinhard Lange

Hochschulausbildung

04/2012 – 06/2016	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
10/2009 – 04/2012	Studium der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilian-Universität München
05/2016	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „sehr gut“
04/2015	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note „gut“
09/2011	Physikum, Gesamtnote „befriedigend“

Schulausbildung

09/1996 – 05/2009	Grundschule und Gymnasium in Pfaffenhofen a.d.Ilm Abschluss: Abitur, Note 1,4

Zeitlarn, den
15.10.2016,

Ines Marion Ugele

11 Eidesstattliche Erklärung

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

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

_____ _____

(Ort, Datum) (Ines Marion Ugele)