

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

## **Rolle der CD73 bei B16-F10-induzierter Tumorprogression**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Xuan Gong

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Schrader

Zweitgutachter: Prof. Dr. Schulz

# Zusammenfassung

In den letzten Jahren häufen sich in der Literatur Hinweise, nach denen in der Tumormikroumgebung das durch Tumor- und Immunzellen freigesetzte ATP über die Ecto-Nukleotidasen CD39 und CD73 zu Adenosin abgebaut wird. Adenosin soll in diesem Milieu supprimierend auf das Immunsystem wirken und stimulierend auf die Angiogenese, wodurch das Tumorwachstum insgesamt gefördert wird.

Vor diesem Hintergrund untersuchte die vorliegende Arbeit den Einfluss der körpereigenen Ecto-5'-Nukleotidase (CD73), welche AMP zu Adenosin dephosphoryliert, auf die Tumorentwicklung in Mäusen denen B16-F10 Melanomzellen subkutan und intradermal appliziert wurde. B16-F10 Melanomzellen selbst zeigen in Kultur nur eine sehr geringe enzymatische AMPase Aktivität.

Folgende wesentliche Ergebnisse wurden erhoben:

1. Nach subkutaner Injektion von einer in der Literatur üblichen Dosis von B16-F10 Zellen ( $25 \times 10^4$ ) zeigten CD73<sup>-/-</sup> Mäuse keinen Unterschied im Tumorwachstum gegenüber WT Mäusen (Tumorgröße mit MRT bestimmt).
2. Intratumoral fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung verschiedener Immunzellpopulationen, was CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup> Zellen betraf (FACS).
3. In den tumordrainierenden regionären Lymphknoten fanden sich keine Unterschiede im Grad der Metastasierung nach subkutaner Zellapplikation.
4. Ein endothelspezifischer *Knockout* der CD73 bzw. ein selektiver Verlust der CD73 auf hämatopoetischen Zellen der durch Knochenmarktransplantation generiert wurde, änderte nicht das Tumorwachstumsverhalten.
5. Eine Reduktion der Zellzahl ( $1 \times 10^4$ ) bei subkutaner Applikation führte zwar zu einem signifikant gehemmten Tumorwachstum in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen (Messung der Tumorgröße mit Kaliper). Allerdings infiltrierte der Tumor in Gegensatz zu den vorherigen Versuchen mit höherer Zellzahl die Haut nur flächig, ohne diese sichtbar vorzuwölben.
6. Nach intradermaler Injektion ( $1 \times 10^6$ ) war das peritumorale Ödem, nicht aber die Tumorgröße, bei CD73<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant verkleinert (MRT). Intratumoral fanden sich keine Unterschiede in der Immunzellzusammensetzung in den CD73<sup>-/-</sup> Mäusen.
7. Knochenmarktransplantierte Mäuse mit selektivem Verlust der CD73 auf hämatopoetischen Zellen zeigten keinen Unterschied im Tumorödem (MRT), sodass dieser Effekt wahrscheinlich durch die CD73 auf nicht-hämatopoetischen Zellen (wie z.B. Endothelzellen) bedingt sein könnte.
8. Nach intravenöser Injektion ( $25 \times 10^4$  Zellen) wurden keine Unterschiede in der hämatogenen Lungenmetastasierung in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt (metastatische Knoten auf der Lungenoberfläche).

In der Summe fanden sich – im Gegensatz zur Literatur – keine robusten stimulierenden Effekte der CD73 körpereigener Zellen auf das Tumorwachstum und die Metastasierung von B16-F10 Zellen. Auch änderte der Verlust der CD73 auf Körperzellen nicht die Immunzellzusammensetzung im Tumor. Verantwortlich hierfür könnten der Gesundheitszustand der Tiere, unterschiedliche experimentelle Protokolle oder Probleme mit der Statistik sein. Das in Literatur propagierte Modell zur Adenosinwirkung im Tumormikromilieu für B16-F10 Melanomzellen muss daher kritisch gesehen werden.

# Abkürzungsverzeichnis

(c)AMP	(zyklisches) Adenosinmonophosphat
(c)DNA	<i>(complementary) deoxyribonucleic acid</i>
(m)RNA	<i>(messenger) ribonucleic acid</i>
(q)PCR	<i>(quantitative) polymerase chain reaction</i>
(S-)EDTA	(Saline-)Ethyldiamintetraacetat
A1R	Adenosin A1 Rezeptor
A2AR	Adenosin A2A Rezeptor
A2BR	Adenosin A2B Rezeptor
A3R	Adenosin A3 Rezeptor
ADA	Adenosindesaminase
ADP(ase)	Adenosindiphosphat(ase)
AK	Adenosinkinase
AMP(ase)	Adenosinmonophosphat(ase)
AOPCP	Adenosin 5'-( $\alpha,\beta$ -methylene) diphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
ATP(ase)	Adenosintriphosphat(ase)
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
eCD73 <sup>-/-</sup>	endothelialer CD73 <i>Knockout</i>
etheno-Adenosin	1,N <sup>6</sup> -Ethenoadenosin
etheno-AMP	1,N <sup>6</sup> -Ethenoadenosin 5'-Monophosphat
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	fötales bovines Serum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOV	<i>field of view</i>
Foxp3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IFN	Interferon

IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
LLC	<i>Lewis lung carcinoma</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated</i> Proteinkinase
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MRT	Magnetresonanztomographie
NDP	Nukleosiddiphosphat
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK Zelle	Natürliche Killer Zelle
NMP	Nukleosidmonophosphat
P1R	Adenosinrezeptor
P2R	ATP Rezeptor
P2XR	ATP P2X Rezeptor
P2YR	ATP P2Y Rezeptor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RARE	<i>rapid acquisition with relaxation enhancement</i>
R <sub>N</sub>	normalisiertes Fluoreszenzsignal
SD	Standardabweichung
TBAS	Tetrabutylammoniumbisulfat
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WT	Wildtyp
λ <sub>Em</sub>	Emissionswellenlänge
λ <sub>Ex</sub>	Exzitationswellenlänge

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Tumormikroumgebung .....	1
1.2	Extrazelluläre Freisetzung von ATP .....	2
1.3	Extrazellulärer Stoffwechsel von Adenosin .....	5
1.4	Funktionen der CD73.....	6
1.5	Funktionen von Adenosin .....	7
1.5.1	Signaltransduktion über Adenosinrezeptoren .....	7
1.5.2	Wirkungen von Adenosin auf Tumorzellen.....	8
1.5.3	Wirkungen von Adenosin auf Immunzellen .....	9
1.5.4	Wirkungen auf Adenosin auf Endothelzellen .....	13
1.5.5	Auswirkungen von Adenosin auf die Tumorentwicklung.....	14
1.6	Ziele der Arbeit .....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1	Material .....	17
2.1.1	Medien und Chemikalien.....	17
2.1.2	Gebrauchslösungen .....	18
2.1.3	Enzyme und Kits.....	19
2.1.4	Antikörper .....	19
2.1.5	Geräte und Gebrauchswaren .....	20
2.1.6	Zellen und Tiere .....	21
2.1.7	Software .....	22
2.2	Methoden .....	22
2.2.1	Zellkultur .....	22
2.2.2	HPLC .....	22
2.2.3	Tierversuche.....	23

2.2.4	Knochenmarktransplantation .....	24
2.2.5	Tumormodelle .....	24
2.2.6	Tumorgrößenbestimmung mittels MRT .....	25
2.2.7	Tumorgrößenbestimmung mittels Kaliper .....	26
2.2.8	FACS .....	26
2.2.9	IFN- $\gamma$ ELISpot .....	27
2.2.10	Lymphknotenmetastasierung .....	27
2.2.11	Lungenmetastasierung .....	28
2.2.12	Statistik .....	28
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
3.1	AMPase-Aktivität von B16-F10 und LLC Zellen .....	29
3.2	Subkutanes Tumormodell an Mäusen .....	30
3.2.1	Versuche mit B16-F10 Zellen .....	30
3.2.1.1	Untersuchungen an CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	30
3.2.1.2	Untersuchungen an endothelzellspezifischen CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	35
3.2.1.3	Untersuchungen an knochenmarktransplantierten Mäusen .....	36
3.2.1.4	Versuche mit reduzierter Zahl an B16-F10 Zellen .....	39
3.2.2	Versuche mit LLC Zellen .....	42
3.3	Intravenöses Tumormodell mit B16-F10 Zellen .....	44
3.4	Intradermales Tumormodell mit B16-F10 Zellen .....	45
3.4.1	Untersuchungen an CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	45
3.4.2	Untersuchungen an knochenmarktransplantierten Mäusen .....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>50</b>
4.1	Einfluss von CD73 auf das Wachstum von B16-F10 Tumoren nach subkutaner Applikation .....	50
4.2	Einfluss von CD73 auf das Wachstum von B16-F10 Tumoren nach intradermaler Applikation .....	56
4.3	Rolle der CD73 bei der Immunzellantwort in B16-F10 Tumoren .....	57

4.4	Rolle der CD73 bei der Metastasierung von B16-F10 Zellen .....	60
4.5	Schlussfolgerungen.....	61
<b>5</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>79</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumormikroumgebung

Für das Wachstum von Tumoren sind zwei Faktoren entscheidend. Zum einen sind es die Eigenschaften der Tumorzellen selbst und die Transformation von einzelnen Zellen über Dysplasien bis hin zu malignen Zellen, die durch unkontrolliertes Zellwachstum, Invasion in ihre Umgebung und Metastasierung in entfernte Organe gekennzeichnet sind. Zum anderen kristallisiert sich in den letzten Jahren immer mehr die Bedeutung der Interaktion von Tumorzellen mit den umgebenden gesunden Zellen und der extrazellulären Matrix in der Tumorumgebung heraus <sup>1</sup>. Die daraus resultierende Bildung einer sogenannten Tumormikroumgebung trägt entscheidend dazu bei, das Überleben, Wachstum sowie Metastasierung von Tumorzellen zu modifizieren.

Für eine erfolgreiche Tumorprogression sind vor allem drei Faktoren in diesem Mikromilieu wesentlich: Sicherstellung einer ausreichenden Gefäßversorgung, Schutz vor einer tumorgerichteten Immunantwort sowie die Degradation der extrazellulären Matrix. Kleine Tumore erhalten im Anfangsstadium die benötigten Nährstoffe über Diffusion. Ab einer kritischen Größe im Millimeterbereich ist die Diffusion aufgrund der großen Entfernung zu dem Gefäßsystem unzureichend, sodass neu gebildete Gefäße in den Tumor einwachsen <sup>2</sup>. Gleichzeitig können Tumorzellen durch das körpereigene Immunsystem als fremd erkannt und vernichtet werden <sup>3</sup>. Für das Überleben des Tumors ist es daher notwendig, dass die Mikroumgebung das Eindringen von Immunzellen hemmt und diese in ihrer Aktivität supprimiert <sup>4</sup>. Schließlich kommt es zur Lockerung der extrazellulären Matrix im Tumor, was die Migration von Tumorzellen zu den Blut- und Lymphgefäßen erleichtert und dadurch die Absiedlung in weitere Organe begünstigt <sup>5</sup>.

Nichtmaligne Zellen wie Endothelzellen, Immunzellen und Fibroblasten werden durch die Tumormikroumgebung in ihrem Verhalten dahingehend verändert, dass sie das Tumorwachstum begünstigen. Beispielsweise schütten diese Zellen Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) aus, welche die Angiogenese stimulieren und dadurch die Nährstoffversorgung des wachsenden Tumors sicherstellen <sup>6</sup>. Weitere Zytokine (z.B. IL-4, IL-10) supprimieren die tumorgerichtete Immunzellantwort im Sinne einer Immunevasion <sup>4</sup>.

Freigesetzte Enzyme wie Matrix-Metalloproteasen (MMPs) bauen die extrazelluläre Matrix ab und fördern dadurch die Tumorausbreitung<sup>5</sup>.

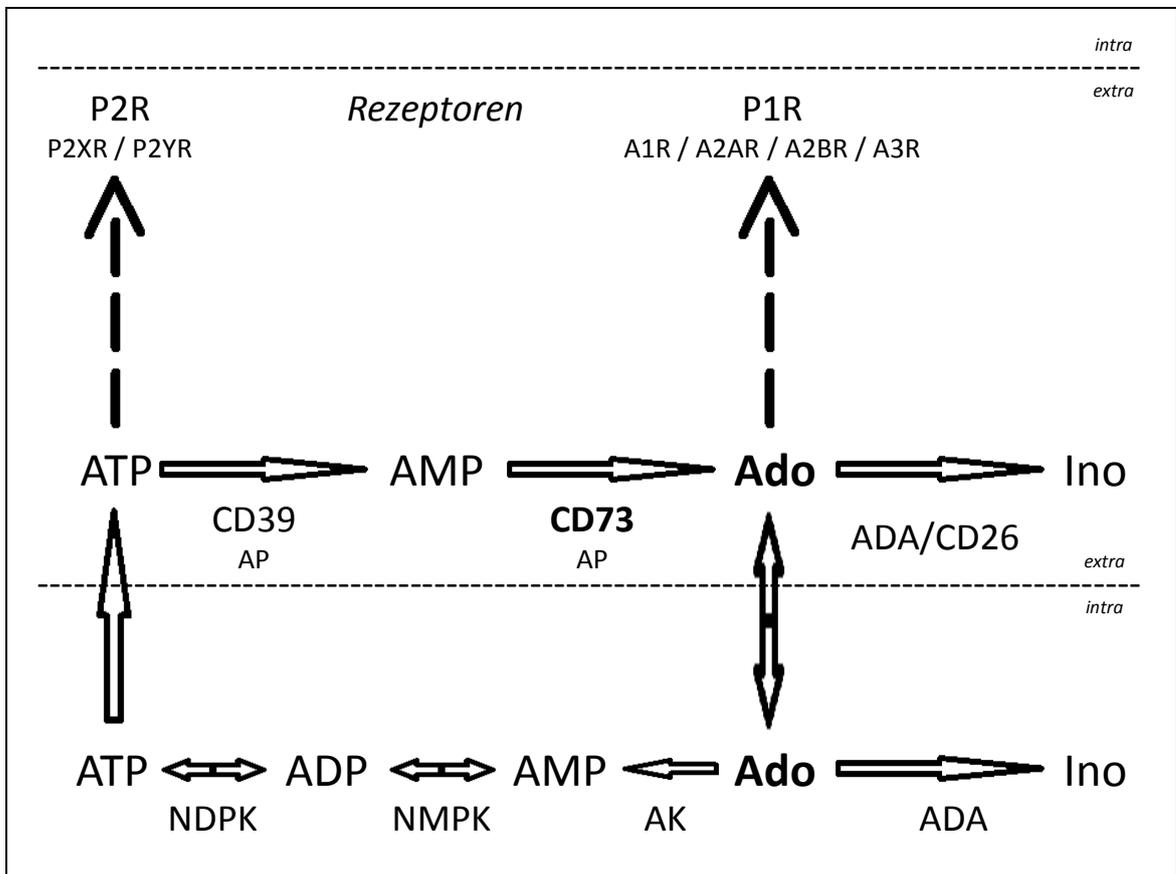
Die pharmakologische Beeinflussung des Tumormilieus ist ein vielversprechender neuer Therapieansatz, das die klassischen drei Säulen der Tumorthherapie ergänzt: die Operation, die Strahlen- und Chemotherapie. Bekanntlich ist das Genom von entarteten Zellen sehr mutationsfreudig und es entstehen durch die schnelle Proliferation Subpopulationen, die dann resistent gegen das jeweilige Therapieregime sind. Durch Manipulation der Tumormikroumgebung können die klassischen Therapiestrategien dahingehend sinnvoll erweitert werden, dass nun auch die Umgebungsfaktoren, die das Wachstumsverhalten des Tumors modifizieren, beeinflusst werden können<sup>7</sup>. Ein bekanntes Beispiel ist der in der Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms eingesetzte monoklonale Antikörper Bevacizumab, der sich gegen den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) richtet und dadurch die Angiogenese im Tumor hemmt<sup>8</sup>.

Ein weiteres *target* für eine Tumorthherapie könnten extrazelluläre Purinverbindungen sein. Eines dieser Mediatoren ist das ubiquitär vorkommende Nukleosid Adenosin, ein Abbauprodukt des Nukleotids Adenosintriphosphat (ATP). Für Adenosin sind eine Vielzahl von Wirkungen auf das Immunsystem bekannt, die in der Summe in der Literatur als vorwiegend immunsupprimierend beschrieben werden<sup>9</sup>. Zusätzlich stimuliert Adenosin die Angiogenese durch seine Wirkung auf Endothelzellen<sup>10</sup>. ATP hingegen wirkt hauptsächlich immunstimulatorisch<sup>11</sup>. Dies hat in der Literatur zum Konzept geführt, dass in der Tumormikroumgebung hohe extrazelluläre ATP Konzentrationen tumorschädigend sind, während der Gegenspieler Adenosin tumorfördernd wirkt<sup>11</sup>. Tumore können dabei das Gleichgewicht zwischen ATP Abbau und Adenosinbildung zugunsten von Adenosin verändern (Abb. 1), um das eigene Wachstum und Überleben sicherzustellen<sup>12</sup>. Der Stoffwechsel sowie die Wirkungen von Adenosin auf die Tumorentwicklung werden im Folgenden näher dargestellt.

## 1.2 Extrazelluläre Freisetzung von ATP

Extrazellulär wird Adenosin vor allem durch die Aktivitäten von membrangebundenen Ecto-Nukleotidasen aus ATP generiert (Abb. 1), wobei Tumore besonders hohe extrazelluläre ATP Konzentrationen (> 700 µM) aufweisen<sup>13</sup>. ATP kann sowohl von

Tumor-<sup>14</sup> als auch von Immunzellen<sup>15</sup> freigesetzt werden. Die Freisetzung erfolgt spezifisch über Membrantransporter oder unspezifisch aufgrund von Zelltod durch Apoptose oder Nekrose<sup>16</sup>.



**Abb. 1: Stoffwechsel von Adenosin.** Extrazelluläres ATP wird vorwiegend durch membrangebundene Ecto-Nukleotidasen (CD39 / CD73) und teilweise durch die niederaffine Alkalische Phosphatase (AP) zu Adenosin dephosphoryliert. Adenosin (Ado) wird extrazellulär durch die Adenosindesaminase (ADA), die mit dem Membranprotein CD26 assoziiert ist, zu Inosin (Ino) abgebaut. Alternativ kann Adenosin nach intrazellulärer Aufnahme durch die zytosolische ADA zu Inosin desaminiert oder durch die Adenosinkinase (AK) zu AMP rephosphoryliert werden. AMP steht in Gleichgewicht mit ATP durch die reversiblen Reaktionen der zytosolischen Nucleosidmonophosphat (NMP) und Nucleosiddiphosphat (NDP) Kinasen. Die Wirkung von ATP wird über P2 Rezeptoren (P2XR, P2YR), die von Adenosin über P1 Rezeptoren (A1R, A2AR, A2BR, A3R) vermittelt. Ado: Adenosin. Ino: Inosin. ADA: Adenosindesaminase. AK: Adenosinkinase. NMPK: Nucleosidmonophosphat Kinase. NDPK: Nucleosiddiphosphat Kinase. Intra: intrazellulär. Extra: extrazellulär.

Die Signaltransduktion von ATP erfolgt über P2 Rezeptoren (P2R): den metabotropen P2Y (P2YR) und ionotropen P2X Rezeptoren (P2XR)<sup>17</sup>. Innerhalb der P2YR unterscheidet

man acht Subtypen<sup>17</sup>: P2Y<sub>1,2,4,6,11</sub>R koppeln an G<sub>q/11</sub>, welche die Phospholipase C (PLC) aktivieren und zur Erhöhung der intrazellulären Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) Konzentration führen<sup>17</sup>. IP<sub>3</sub> induziert eine Ca<sup>2+</sup> Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum über den IP<sub>3</sub> Rezeptor. P2Y<sub>12,13,14</sub>R aktivieren G<sub>i/o</sub>, welches die Adenylatzyklase hemmt<sup>17</sup>. Dadurch wird die intrazelluläre cAMP Konzentration gesenkt und die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) gehemmt<sup>17</sup>. Bei allen sieben Subtypen der P2XR (P2X<sub>1-7</sub>R) handelt es sich um unspezifische Kationenkanäle, die nach Aktivierung für Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> permeabel sind<sup>17</sup>.

Auf das Tumorwachstum sind sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte von ATP über P2R beschrieben worden. Auf humane Melanomzellen (A375) führt die Gabe von P2Y<sub>1</sub>R Agonisten zur einer dosisabhängigen Hemmung der Tumorzellproliferation, während P2Y<sub>2</sub>R Agonisten dosisabhängig das Tumorwachstum stimulieren<sup>18</sup>. Eine Aktivierung des P2X<sub>7</sub>R führt an humanen Melanomzellen (A375) zu einer Wachstums-  
hemmung<sup>19</sup>, wohingegen der gleichgerichtete Effekt auf murine Melanomzellen (B16) durch eine Blockade dieses Rezeptors ausgelöst wird<sup>20</sup>. Somit hängt die Wirkung von ATP auf die Proliferation von Tumorzellen sowohl vom Tumortyp als auch dessen Rezeptorausstattung ab. Die konkrete Verteilung von einzelnen Subtypen der P2R auf den jeweiligen Tumorzellen dürfte die ATP Wirkung *in vivo* zusätzlich modulieren.

Neben der direkten Wirkung auf die Proliferation von Tumorzellen können P2R durch Ausschüttung von Mediatoren auch indirekt deren Wachstum beeinflussen. Gliome (C6) schütten nach Stimulation durch ATP verstärkt die Chemokine *monocyte chemoattractant protein-1* und IL-8 aus<sup>21</sup>. Für Schilddrüsenkarzinomzelllinien (FB1, FB2) ist nach Stimulation von P2X<sub>7</sub>R eine IL-6 Sekretion beschrieben worden<sup>22</sup>. Diese Zytokine könnten über Modulation der Immunzellantwort im Tumor dessen Schicksal entscheidend beeinflussen. Ebenfalls durch ATP werden Glioblastomzellen (ACN) zur Ausschüttung von Substanz P angeregt, welches deren Proliferation autokrin stimuliert<sup>23</sup>.

Für Immunzellen wie phagozytierende Zellen stellt extrazelluläres ATP einen chemotaktischen Reiz dar. Monozyten und Makrophagen detektieren einen ATP Gradienten, wie er auch in Tumoren vorkommen kann, mittels ihres P2Y<sub>2</sub>R, und können damit apoptotische Zellen aufspüren<sup>24</sup>. Des Weiteren führt die P2X<sub>7</sub>R Aktivierung zur erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Makrophagen<sup>25</sup>.

An neutrophile Granulozyten stellt ATP kein chemotaktisches Signal dar. Auf einen chemotaktischen Reiz hin setzen diese Zellen aber ATP frei, das über P2Y<sub>2</sub>R und nach Abbau zu Adenosin über A<sub>3</sub> Rezeptoren die Zellmigration stimuliert und dadurch autokrin das chemotaktische Signal verstärkt <sup>26</sup>.

Wie Makrophagen nutzen auch dendritische Zellen im unreifen Zustand Nukleotide als chemotaktischen Reiz, während dieser Signalweg nach Ausreifung durch Herabregulierung des P2Y<sub>R</sub> nur von geringer Bedeutung ist <sup>27</sup>. Der P2Y<sub>11</sub>R induziert außerdem die Expression zweier negativer Regulatoren der T-Zell Proliferation: Indolamin-2,3-Dioxygenase und Thrombospondin-1 <sup>28</sup>.

Allgemein wird ATP in der Literatur als ein proinflammatorischer Mediator angesehen <sup>11</sup>, auch wenn für ATP teilweise entzündungshemmende Wirkungen bekannt sind <sup>17</sup>. Dagegen fungiert das ATP Abbauprodukt Adenosin als antiinflammatorischer Gegenspieler über Aktivierung von Adenosinrezeptoren (P1R) <sup>12</sup>. Im Tumorkontext bedeutet es, dass ATP negativ und Adenosin positiv sich auf das Tumorstadium auswirkt. Das Verhältnis von ATP zu Adenosin in der Tumormikroumgebung wird entscheidend durch die Aktivität von zwei Ecto-Nukleotidasen, der Ecto-Apyrase CD39 und Ecto-5'-Nukleotidase CD73, reguliert. Diese Enzyme bestimmen letztlich, ob der „tumorefeindliche“ P2R Signalweg oder der „tumorfremde“ P1R Signalweg bevorzugt wird. Dazu passt auch, dass bestimmte Tumoren CD39 / CD73 im Sinne einer Immunevasion überexprimieren, um der gegen sie gerichteten Immunzellantwort zu entkommen <sup>12</sup>.

### **1.3 Extrazellulärer Stoffwechsel von Adenosin**

Das Nucleosid Adenosin entsteht extrazellulär vor allem über die sequenzielle Dephosphorylierung von ATP durch membrangebundene Ecto-Nukleotidasen <sup>11</sup> (Abb. 1). Daneben kann Adenosin auch über erleichterte Diffusion aus intrazellulären Quellen freigesetzt werden <sup>29</sup>.

ATP wird von intrazellulär nach extrazellulär über Membrantransporter oder durch Zellschaden freigesetzt <sup>16</sup>. Extrazellulär kann es P2R (P2XR, P2YR) aktivieren <sup>17</sup> oder weiter kaskadenartig zu Adenosin abgebaut werden. Zunächst wird ATP durch die Ecto-Apyrase (CD39), einem Enzym mit ATPase und ADPase Aktivität, zu AMP abgebaut <sup>17</sup>.

Die anschließende Dephosphorylierung von AMP zu Adenosin erfolgt durch die Ecto-5'-Nukleotidase (CD73)<sup>17</sup>. Alternativ kann die niederaffine Alkalische Phosphatase (AP) alle Dephosphorylierungsschritte von ATP zu Adenosin katalysieren<sup>30</sup>. Adenosin vermittelt seine Wirkungen über vier verschiedene Klassen von P1R: A1R, A2AR, A2BR, A3R<sup>17</sup>.

Der weitere Abbau von Adenosin erfolgt sowohl extra- als auch intrazellulär. Extrazellulär wird es durch die Adenosindesaminase (ADA), die mit dem Membranprotein CD26 assoziiert ist, zu Inosin verstoffwechselt<sup>11</sup>. Nach intrazellulärer Aufnahme über Nukleosidtransporter erfolgt die Desaminierung von Adenosin zu Inosin durch die zytosolische ADA oder / und die Rephosphorylierung über die Adenosinkinase (AK) zu AMP<sup>29</sup>. AMP kann über die Nukleosidmonophosphat (NMP) und Nukleosiddiphosphat (NDP) Kinasen auch wieder zu ATP regeneriert werden<sup>31</sup>. Die von den NMP und NDP Kinasen katalysierten Reaktionen sind reversibel, wobei die Richtung der Reaktion von den Konzentrationen ihrer jeweiligen Substrate abhängig ist.

## 1.4 Funktionen der CD73

Bei der CD73 handelt es sich um ein Glykoprotein, das über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an der Zellmembran gebunden ist und in seiner aktiven Form als Homodimer vorliegt<sup>32</sup>. Es katalysiert die extrazelluläre Dephosphorylierung von AMP zu Adenosin und kontrolliert damit den entscheidenden Schritt in der Bereitstellung von Adenosin (Abb. 1). Diese Reaktion ist erst nach intrazellulärer Aufnahme von Adenosin durch die zytosolische AK reversibel. In der Tumormikroumgebung führt eine verstärkte Aktivität von CD39 / CD73 zu einer Bevorzugung von Adenosin / P1R Wirkungen im Sinne einer Immunevasion.

Die CD73 wird von zahlreichen Zelltypen exprimiert. Auf Immunzellen wird CD73 insbesondere auf Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen exprimiert<sup>11</sup>. Innerhalb der T-Zell Fraktion ist die Expression auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) beschrieben<sup>11</sup>. Des Weiteren wird die CD73 von Endothelzellen sowie einigen Epithelpopulationen exprimiert<sup>10</sup>.

Zahlreiche Tumorarten zeigen eine hohe CD73 Expression, darunter Hauttumoren (Malignes Melanom), epitheliale Tumoren (Mammakarzinom, Kolonkarzinom und

Blasenkarzinom), Hirntumore (Gliom und Glioblastom) <sup>10</sup> sowie hämatologischen Neoplasien (chronisch lymphatische Leukämie) <sup>12</sup>. Die Bedeutung der CD73 Expression auf Tumorzellen als Prognosefaktor wird noch kontrovers diskutiert. So haben beispielsweise Studien zum Mammakarzinom eine positive Korrelation zwischen hoher CD73 Expression auf Tumorzellen und schlechtem klinischen Verlauf festgestellt <sup>33</sup>. Andere Untersuchungen zum Mammakarzinom dagegen zeigen einen positiven Zusammenhang zwischen CD73 Expression auf Tumorzellen und der Überlebensdauer der Patienten <sup>34</sup>.

Unabhängig von seiner Enzymaktivität besitzt CD73 auch nichtenzymatische Funktionen. T-Zellen zeigen nach Inkubation mit anti-CD73 Antikörpern eine verstärkte anti-CD3 Antikörper induzierte Proliferation und IL-2 Produktion <sup>35</sup>. Außerdem wird die Adhäsion von Lymphozyten an Endothelzellen durch anti-CD73 Antikörper verstärkt <sup>36</sup>. An Tenascin C, einem Protein der extrazellulären Matrix, wird die Adhäsion und Migration von Melanomzellen CD73-abhängig stimuliert <sup>37</sup>, wobei der Effekt allerdings nicht durch Inhibitoren der enzymatischen CD73 Aktivität antagonisiert werden kann.

Die Expression von CD73 wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Gewebshypoxie, wie sie auch in Tumoren vorkommen kann, führt zur Aufregulierung nicht nur der CD73 Expression <sup>38</sup>, sondern auch von CD39 <sup>38</sup> und A2BR <sup>39</sup>. Dadurch werden mehrere Stationen des Adenosin Signalweges synergistisch induziert. Außerdem steuern eine Reihe von Zytokinen, wie sie auch in Tumormilieu vorkommt, die CD73 Expression: IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  <sup>40</sup> sowie IL-6 und TGF- $\beta$  <sup>41</sup> bewirken eine Hochregulierung von CD73, wohingegen IL-4 und IFN- $\gamma$  <sup>42</sup> die CD73 Expression supprimiert. Diese Mechanismen können weiter zur Schaffung einer von Adenosin / P1R dominierten Tumormikroumgebung beitragen.

## **1.5 Funktionen von Adenosin**

### **1.5.1 Signaltransduktion über Adenosinrezeptoren**

Adenosin entfaltet seine Wirkung über vier verschiedene G-Protein-gekoppelte P1R (A1R, A2AR, A2BR, A3R) <sup>43</sup>. Die Bindung von Adenosin an A2AR oder A2BR führt über das G<sub>s</sub> Protein zur Aktivierung der Adenylatzyklase mit vermehrter Bildung von cAMP <sup>43</sup>. Der

intrazelluläre Anstieg von cAMP aktiviert die PKA, welche weitere Zielproteine phosphoryliert <sup>43</sup>. Außerdem können beide Rezeptoren die *Mitogen-Activated* Proteinkinase (MAPK) sowie die Proteinkinase C (PKC) aktivieren <sup>43</sup>. Für den A2BR ist außerdem die Aktivierung von PLC $\beta$  beschrieben, das zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt <sup>44</sup>. A1R und A3R dagegen koppeln am G<sub>i/o</sub> Protein, das zur Hemmung der Adenylatzyklase führt und damit letztlich die Aktivität der PKA inhibiert <sup>43</sup>. Auch diese beiden Subtypen können die MAPK und PKC aktivieren sowie zusätzlich die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) <sup>43</sup>.

Während die hochaffinen A1R, A2AR und A3R durch physiologische extrazelluläre Adenosinkonzentrationen aktiviert werden können, handelt es sich bei dem A2BR um einen niederaffinen Rezeptor, der erst bei Anstieg von Adenosin unter pathologischen Bedingungen wie beispielsweise in Tumoren aktiviert wird <sup>9</sup>.

Die A2AR Expression wird durch die Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  induziert und durch IFN- $\gamma$  gehemmt <sup>45</sup>. A2BR werden wie CD39 / CD73, die gleichzeitig den passenden Liganden generieren, durch Hypoxie hochreguliert <sup>39</sup>. Zusätzlich können auch IFN- $\gamma$  <sup>46</sup> und TNF- $\alpha$  <sup>47</sup> die A2BR Expression induzieren. Diese Mediatoren, wie sie auch in Tumoren vorkommen, können somit alle benötigten Bestandteile des Adenosin / P1R Signalweges induzieren.

## 1.5.2 Wirkungen von Adenosin auf Tumorzellen

Das Nukleosid Adenosin wirkt auf Tumorzellen je nach Tumorzelltyp und Adenosinrezeptorausstattung unterschiedlich. Verschiedene humane Mammakarzinomzelllinien zeigen eine erhöhte A1R Expression, über die sowohl Zellproliferation stimuliert als auch Apoptose gehemmt wird <sup>48</sup>. Beim hormonabhängigen Mammakarzinom besteht eine gegenseitige Beeinflussung zwischen dem Östrogenrezeptor- $\alpha$  und dem A1R. Beide Rezeptoren induzieren die Expression des jeweils anderen Partners, zusätzlich zeigen A1R *Knockout* Zelllinien eine reduzierte Östrogenrezeptor- $\alpha$  abhängige Zellproliferation <sup>49</sup>. Aber auch gegenteilige Effekte auf das Tumorwachstum sind bekannt. Beispielsweise führt eine Aktivierung des A1R auf Kolonkarzinom Zellen (CW2) zu einer Induktion der Apoptose <sup>50</sup>.

Vom A2AR ist bekannt, dass durch seine Aktivierung Progesteronrezeptoren auf Mammakarzinomzellen (MCF-7) induziert und durch seine Blockade die ethanolinduzierte Östrogenrezeptor- $\alpha$  abhängige Zellproliferation gehemmt wird <sup>51</sup>. A2AR und A2BR auf Tumorzellen des hepatozellulären Karzinoms (Hep3B) stimulieren die Produktion von Erythropoetin, was sich *in vivo* vorteilhaft auf die Sauerstoffversorgung des Tumors auswirken könnte <sup>52</sup>. Expression mehrerer Subtypen von Adenosinrezeptoren auf der gleichen Tumorzelle können sogar entgegengesetzte Effekt vermitteln. Auf Melanomzellen (A375) induzieren A2AR Agonisten den Zelltod, während gleichzeitige Applikation von A3R Agonisten dies verhindert <sup>53</sup>. Des Weiteren können Tumorzellen durch Nutzung des Adenosin Signalweges die Wirksamkeit einer Chemotherapie abschwächen. So zeigen Tumorzellen bei der chronisch lymphatischen Leukämie nach Vorbehandlung mit A2AR Agonisten eine erhöhte Resistenz gegenüber durch Chemotherapeutika (Etoposid, Fludarabin) ausgelöste Apoptose <sup>54</sup>.

Für den A3R ist eine Wachstumshemmung in mehreren Tumorzelllinien beschrieben. Auf Melanomzellen (B16-F10) <sup>55</sup> und Kolonkarzinomzellen (HCT-116) <sup>56</sup> wirken A3R Agonisten proliferationshemmend. Dagegen wird in Glioblastom Zellen (A172, U87MG) unter hypoxischen Bedingungen über Aktivierung von A3R der Hypoxie-induzierte Faktor-1 (HIF-1) und VEGF induziert, was das Tumorwachstum indirekt durch Stimulation der Angiogenese verbessern kann <sup>57</sup>.

Insgesamt ist die Adenosinwirkung auf Tumorzellen über deren P1 Rezeptorausstattung sehr heterogen und beeinflusst Wachstum und Überleben unterschiedlich. Der Einfluss von Adenosin auf Immun- und Endothelzellen, die *in vivo* das komplexe Zusammenspiel in der Tumormikroumgebung prägt, wird als Nächstes erörtert.

### **1.5.3 Wirkungen von Adenosin auf Immunzellen**

Die Wirkungen von Adenosin auf Immunzellen sind intensiv untersucht worden <sup>9</sup>. Immunzellen können alle Subtypen von P1R exprimieren, was eine Vielzahl unterschiedlicher Effekte je nach Immunzellpopulation und Rezeptorsubtyp auslöst <sup>43</sup>. Die Rekrutierung sowie Aktivität von Immunzellen im Tumor beeinflusst entscheidend die Tumorausbreitung <sup>17</sup>.

Neutrophile Granulozyten gehören zu den nicht-antigenpräsentierenden Phagozyten. Adenosin hemmt über den A2R die Produktion von Superoxidanionen ( $O_2^-$ )<sup>58</sup> sowie die Degranulation über den A2R und A3R<sup>59</sup>, beides für Tumorzellen potentiell schädliche Aktivitäten. Dagegen wird A1R-vermittelt die Adhäsion an Endothelzellen und Chemotaxis von Neutrophilen stimuliert<sup>60</sup>, was das Auffinden von Tumorzellen erleichtern könnte. Die Sekretion von Matrix-Metalloprotease-9 (MMP-9) durch Neutrophile wird über den A2AR und A3R inhibiert<sup>61</sup>, wodurch Adenosin Einfluss auf den Zustand der extrazellulären Matrix nimmt und damit indirekt das Metastasierungsverhalten von Tumoren modulieren kann.

Makrophagen als wichtige antigenpräsentierende Zellen werden durch die Aktivierung des A2R in ihrer Phagozytoseaktivität<sup>62</sup> und der Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) inhibiert<sup>63</sup>. Aktivierung des A2AR führt zur verstärkten Freisetzung von IL-10 und VEGF durch Makrophagen, während IL-12 und TNF- $\alpha$  runterreguliert werden<sup>64</sup>. Dadurch kann eine für Tumore günstige Situation entstehen, die durch reduzierte Inflammation und gesteigerte Vaskularisierung gekennzeichnet ist. Im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten wird die Sekretion von MMP-9 durch Makrophagen durch den A2AR und A2BR gehemmt<sup>65</sup>, während der A3R darauf stimulierend wirkt<sup>66</sup>.

Natürliche Killer (NK) Zellen spielen aufgrund ihrer zytotoxischen Fähigkeiten eine bedeutende Rolle in der tumorgerichteten Immunzellantwort. Durch den A2AR werden wichtige Aktivitäten runterreguliert, was Tumoren einen Überlebensvorteil verschaffen kann. So wird die Tumorlyse durch NK Zellen A2AR-vermittelt inhibiert<sup>67</sup> und gleichzeitig die Freisetzung von IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  auf- und von IFN- $\gamma$  herabreguliert<sup>68</sup>, was zur Schaffung einer immunsuppressiven Tumormikroumgebung beitragen kann. Dagegen scheint der A3R die NK Aktivität zu stimulieren. So führt der adoptive Transfer von mit A3R Agonisten vorbehandelten NK Zellen zum reduzierten Tumorwachstum und Lungenmetastasierung in der Maus<sup>69</sup>.

Dendritische Zellen gehören neben Makrophagen und B-Zellen zu den wichtigen antigenpräsentierenden Zellen. Wie ATP<sup>27</sup> stellt auch das Nukleosid Adenosin<sup>70</sup> ein chemotaktisches Signal dar, das die Migration von unreifen dendritischen Zellen durch die Aktivierung des A1R und A3R stimuliert. Hingegen kommt es bei ausgereiften dendritischen Zellen zu einer Herabregulation von A1R / A3R<sup>70</sup> und Hochregulation des A2AR<sup>71</sup>, womit eine reduzierte Chemotaxis sowie verminderte Produktion von IL-6, IL-12 und IFN- $\alpha$  einhergeht<sup>71</sup>. Zusätzlich löst die Aktivierung von A2BR auf dendritische

Zellen die Produktion einer ganzen Reihe von Zytokinen und Enzymen aus: IL-6, IL-8, IL-10, *transforming growth factor* (TGF- $\beta$ ), VEGF, Indolamin-2,3-Dioxygenase und Cyclooxygenase-2 <sup>72</sup> weisen sowohl potentiell tumorfördernde Wirkungen wie Immunsuppression und gesteigerte Angiogenese als auch immunstimulierende und damit mögliche negative Effekte auf das Tumorwachstum auf. Jedoch führt die Injektion von dendritische Zellen, die *ex vivo* mit Adenosin stimuliert worden sind, im experimentellen Mausmodell mit implantierten Tumoren zur Stimulation des Tumorwachstums <sup>72</sup>, sodass *in vivo* die Adenosinwirkung auf dendritische Zellen in der Summe wahrscheinlich als tumorfördernd anzusehen ist.

B-Zellen, eine Subpopulation der Lymphozyten, gehören ebenfalls zu den antigenpräsentierenden Zellen und produzieren außerdem noch antigenspezifische Immunglobuline. Aktivierung von A2R führt zur Hemmung der B-Zell-Rezeptor induzierten Aktivierung von *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) <sup>73</sup>. Gedächtnis-B-Zellen exprimieren in Vergleich zu naiven B-Zellen verstärkt CD73 <sup>74</sup> und A2AR <sup>75</sup>, sodass Adenosin eine inhibierende Wirkung auf die Restimulation von Gedächtnis-B-Zellen durch Antigene spielen könnte. Damit übereinstimmend ist eine A2AR-vermittelte Reduktion der IgM Produktion von aktivierten B-Zellen beschrieben <sup>76</sup>, was im Tumorkontext sich negativ auf die Bildung tumorspezifischer Antikörper auswirken könnte.

Bei den lymphozytären T-Zellen gibt es eine Reihe von Subfraktionen, dessen bekanntesten Vertreter die CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen und die CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) sind. Generell wirkt Adenosin auf T-Zellen hauptsächlich über deren A2AR. So wird die IFN- $\gamma$  Produktion drastisch und im schwächeren Ausmaße auch die Proliferation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen nach T-Zell-Rezeptoraktivierung durch Applikation von A2AR Agonisten gehemmt, wobei der Effekt auch nicht durch IL-2 Stimulation reversibel ist <sup>77</sup>. Selbst nach Ende der Gabe von A2AR Agonisten persistiert die reduzierte zytotoxische Aktivität der T-Zellen gegenüber Tumorzellen sowie deren verminderte IFN- $\gamma$  Ausschüttung <sup>77</sup>. Die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> Zellen nach T-Zell-Rezeptoraktivierung zu Th1 oder Th2 T-Helferzellen wird durch Aktivierung von A2AR gehemmt, ebenso die Zytokinproduktion von IFN- $\gamma$  durch Th1 Zellen und IL-4 durch Th2 Zellen nach Behandlung mit A2AR Agonisten <sup>78</sup>. Interessanterweise wird die A2AR Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Sinne einer negativen Rückkopplung nach T-Zell-Rezeptoraktivierung hochreguliert und über den A2AR die

Differenzierung zu Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> stimuliert <sup>79</sup>. Ebenfalls wird die T<sub>reg</sub> Differenzierung durch den A1R / A2BR synergistisch induziert <sup>80</sup>, was die Suppression der Tumorimmunantwort zusätzlich verstärken kann. Ähnlich wie beim A2AR führt die Aktivierung von A3R auf T-Zellen zu einer Proliferationshemmung sowie reduzierten Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen <sup>81</sup>. Während die Wirkungen von Adenosin auf T-Zellen hauptsächlich immunsuppressiver Natur und damit vorteilhaft für Tumore sind, könnte die Metastasierung durch die verminderte Freisetzung von MMP-1 und MMP-3 nach A2AR / A3R Aktivierung behindert werden <sup>82</sup>.

Ein indirekter Weg zur Suppression einer möglichen Immunzellantwort in Tumoren stellt die Rekrutierung der wichtigen T-Zell-Subpopulation der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> dar. Diese werden durch das Nukleotid ATP, das in Tumoren extrazellulär häufig in hohen Konzentrationen vorliegt <sup>13</sup>, aktiviert <sup>83</sup>. Aktive T<sub>reg</sub> sind durch eine erhöhte Expression von CD39 / CD73 gekennzeichnet, was zu einem gesteigerten Abbau von ATP zu Adenosin führt, während gleichzeitig das Adenosin abbauende Enzym ADA / CD26 runterreguliert wird <sup>84</sup>. Dagegen bauen T-Effektorzellen verstärkt Adenosin ab: diese Zellen exprimieren vermindert CD39 / CD73 und verstärkt ADA / CD26 <sup>84</sup>. Interessanterweise benötigen T<sub>reg</sub> für die Vermittlung ihrer immunsuppressiven Wirkung auf T-Zellen die Aktivität von CD39 / CD73, wie Experimente an entsprechenden *Knockout* Mäusen <sup>85</sup> oder mit Ecto-Nukleotidase-Inhibitoren <sup>84</sup> zeigen. Ein wichtiger Zielrezeptor für das von T<sub>reg</sub> generierte Adenosin ist hierbei wahrscheinlich der A2AR auf T<sub>reg</sub> und T-Effektorzellen <sup>84</sup>. Die mögliche klinische Relevanz dieses propagierten Mechanismus zeigt sich daran, dass beispielsweise die CD39 / CD73 Expression auf T<sub>reg</sub> von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinome gegenüber denen von gesunden Patienten deutlich erhöht ist <sup>86</sup>.

Trotz der hier beschriebenen teils sehr heterogenen Wirkungen von Adenosin auf Immunzellen wird Adenosin in der Literatur im Wesentlichen eine immunsupprimierende Wirkung zugeschrieben <sup>9</sup>. Damit einhergehend soll Adenosin entscheidend dazu beitragen, Tumorzellen vor der gegen sie gerichteten Immunantwort zu schützen <sup>10</sup>.

## 1.5.4 Wirkungen auf Adenosin auf Endothelzellen

Endothelzellen als innere Auskleidung der Blutgefäße spielen eine wichtige Rolle in der Tumervaskularisation und können über die Steuerung der Auswanderung von Immunzellen auch die intratumorale Immunantwort beeinflussen.

Adenosin stimuliert über den A2AR in Endothelzellen die Produktion des proangiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF <sup>87</sup> bei gleichzeitiger Suppression des antiangiogenetischen Faktors Thrombospondin-1 <sup>88</sup>. Auch die Aktivierung des A2BR auf Endothelzellen kann die Tumorgefäßversorgung durch vermehrte Sekretion weiterer proangiogenetisch wirkender Faktoren wie VEGF, *basic fibroblast growth factor* und IL-8 verbessern <sup>89</sup>. Interessanterweise führt Hypoxie, wie sie auch in Tumoren vorkommen kann, zur verstärkten Expression von A2AR <sup>90</sup> und A2BR <sup>39</sup> sowie der Ecto-Nukleotidasen CD39 und CD73 <sup>38</sup> auf Endothelien, wodurch die Adenosinwirkung auf die Angiogenese im Tumor potenziert werden kann. Zytokine, wie sie während einer tumorgerichteten Immunantwort freigesetzt werden, modulieren zusätzlich die Adenosinrezeptor Expression auf Endothelzellen. Dabei induziert IL-1 und TNF- $\alpha$  die A2AR und A2BR Expression auf Endothelien, während IFN- $\gamma$  den A2BR heraufreguliert und den A2AR runterreguliert <sup>91</sup>.

Des Weiteren reguliert Adenosin die endotheliale Barriere durch Steuerung der Expression von Adhäsionsproteinen auf Endothelzellen und kann damit die Einwanderung von Immunzellen ins Tumormilieu beeinflussen. A2AR Aktivierung führt auf Endothelzellen zur vermehrten Expression von VE-Cadherin <sup>92</sup>, einem Adhäsionsprotein, wodurch die Leukozytenadhäsion erleichtert werden kann. Über endotheliales CD73 generiertes Adenosin hemmt über A2BR die endotheliale Expression von L-Selectin, einem weiteren Adhäsionsprotein, und darüber die Lymphozyteneinwanderung in Lymphknoten <sup>93</sup>. Dieser Mechanismus könnte sich positiv auf die Lymphknotenmetastasierung von Tumoren auswirken.

Insgesamt wird in der Literatur aber davon ausgegangen, dass Adenosin auf Endothelzellen hauptsächlich stimulierend auf die Angiogenese wirkt und damit stimulierend auf das Tumorwachstum <sup>10</sup>.

## 1.5.5 Auswirkungen von Adenosin auf die Tumorentwicklung

Die bisher beschriebenen Effekte von Adenosin auf die einzelnen Zellpopulationen zeigen ein sehr breites Spektrum an Möglichkeiten, wie es die Entwicklung eines Tumors beeinflussen kann. Aufgrund der vielen teils auch gegensätzlichen Wirkungen lässt sich schlecht vorhersagen, wie sich eine erhöhte extrazelluläre Adenosinkonzentration im Tumor *in vivo* dessen Progression beeinflusst. Eine Möglichkeit dies zu erfassen sind experimentelle Tumormodelle an Mäusen, bei dem diese Tumorzellen injiziert werden, um dann das Ansiedeln, das Wachstum und die Metastasierung zu verfolgen. Modelle zur Untersuchung der hämatogenen Metastasierung arbeiten meistens mit der Erfassung der Lungenmetastasierung nach intravenöser Tumorzellinjektion. Die Bedeutung der einzelnen Subtypen der Adenosinrezeptoren für die Tumorprogression kann entweder anhand von *Knockout* Tieren für den jeweiligen Rezeptor oder pharmakologisch durch Applikation von spezifischen Adenosin Rezeptorinhibitoren untersucht werden.

In Übereinstimmung mit den immunsuppressiven und Angiogenese fördernden Wirkungen von Adenosin <sup>10</sup> zeigen Experimente an der Maus eine Stimulation des Tumorwachstums durch den A2AR und A2BR. Bei subkutaner Implantation von immunogenen Melanomzellen (CL8-1) zeigen A2AR<sup>-/-</sup> Mäuse ein verzögertes Tumorwachstum gegenüber Wildtyp (WT) Mäusen, wobei es bei einem Teil der *Knockout* Mäuse sogar zu einer vollständigen Tumorabstoßung kommt <sup>94</sup>. Dagegen besteht beim Einsatz einer wenig immunogenen Melanomzelllinie (B16-BL6) kein Überlebensvorteil der A2AR<sup>-/-</sup> Tiere <sup>94</sup>. Für den inhibierenden Effekt auf das Tumorwachstum soll die A2AR Expression auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen entscheidend sein, da der adoptive Transfer von tumorspezifischen CD8<sup>+</sup> Zellen bei gleichzeitiger Applikation von A2AR Antagonisten zu einer Reduktion von Lungenmetastasen nach intravenöser Injektion von Sarkomzellen (CMS4) führt <sup>94</sup>.

Auch für den A2BR ist eine stimulierende Wirkung auf das Tumorwachstum beschrieben worden. Nach subkutaner Implantation von Lungenkarzinomzellen (LLC) zeichnen sich A2BR<sup>-/-</sup> Mäuse durch ein verlangsamtes Tumorwachstum und verbessertes Überleben gegenüber WT Mäuse aus, wobei die Tumore der *Knockout* Tiere eine schlechtere Vaskularisierung aufweisen <sup>95</sup>. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte eine verminderte Sekretion von VEGF durch intratumorale CD45<sup>+</sup> Immunzellen sein <sup>95</sup>.

Dagegen vermittelt Adenosin über A1R und A3R eine wachstumshemmende Wirkung auf Tumore. A1R<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen nach der Injektion von Glioblastomzellen (G1261) ins Gehirn größere Tumolvolumina als WT Mäuse sowie verstärkte Akkumulation von Mikrogliazellen, den Makrophagen im zentralen Nervensystem <sup>96</sup>. Für die Vermittlung dieser Wirkung scheint dabei der A1R auf Mikrogliazellen entscheidend zu sein, weil deren Depletion *in vitro* die hemmende Wirkung von A1R Agonisten auf das Wachstum von Glioblastomzellen (G1261) antagonisiert <sup>96</sup>.

Eine Aktivierung des A3R wirkt sich im Mausmodell hemmend auf das Tumorwachstum aus. Bei WT Mäusen kommt es bei Gabe von A3R Agonisten dosisabhängig zur Inhibition des Wachstums von subkutan injizierten Melanomzellen (B16-F10) <sup>97</sup>. Als Mediatoren der Wirkung fungieren unter anderem NK und CD8<sup>+</sup> Zellen, da eine Depletion dieser Zellpopulationen die inhibierende Wirkung von A3R Agonisten auf das Tumorwachstum in der Maus rückgängig macht <sup>97</sup>.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Bisherige Daten der Literatur zur Wirkung von Adenosin auf die Tumorentwicklung zeigen ein widersprüchliches Bild. Auch die Bedeutung der körpereigenen CD73 als wichtigste Quelle für extrazelluläres Adenosin auf die Tumorprogression war zu Beginn der Experimente noch nicht im Detail untersucht.

Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Wirkung der körpereigenen CD73 durch Verwendung einer CD73 Verlustmutante auf das Tumorwachstum im Detail zu untersuchen. Hierzu wurde ein in der Literatur gut etabliertes experimentelles Tumormodell an der Maus unter Verwendung von murinen Melanomzellen (B16-F10) sowie murinen Lungenzellkarzinomzellen (LLC) eingesetzt.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Unterscheidet sich das Tumorwachstum in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber WT Mäusen? Welche Rolle spielt dabei die zelltypspezifische CD73 auf Endothelzellen oder Immunzellen?
2. Ist die Wirkung abhängig von der applizierten Tumorzellzahl?

3. Ist der Effekt abhängig von der gewählten Applikationsart für die Tumorzellen: subkutane versus intradermale Injektion?

Außerdem sollten die verschiedenen Immunzellpopulationen im Tumor charakterisiert sowie der Grad der regionären lymphogenen Metastasierung erfasst werden. Zusätzlich wurde das Ausmaß der hämatogenen Metastasierung in die Lunge nach intravenöser Applikation der Tumorzellen untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Medien und Chemikalien

1,N <sup>6</sup> -Ethenoadenosin (etheno-Adenosin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
1,N <sup>6</sup> -Ethenoadenosin 5'-Monophosphat (etheno-AMP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Adenosin 5'-( $\alpha,\beta$ -methylen) diphosphat (AOPCP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
Baytril (Enrofloxacin)	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Isofluran	AlleMan Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Levamisol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
L-Glutamin	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

Perchlorsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
Tetrabutylammoniumbisulfat (TBAS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
Trypanblau Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
Vancomycin Hexal	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland
Tri-Kaliumphosphat (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.2 Gebrauchslösungen

Erylyse-Puffer	8.29 g NH <sub>4</sub> Cl 1 g KHCO <sub>3</sub> 0.0375 g Na <sub>2</sub> -EDTA ad 1 l <i>Aqua destillata</i> (pH 7.4)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	0.2 g KCl 0.2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 g NaCl 1.17 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 1 l <i>Aqua destillata</i> (pH 7.4)
Saline-Ethylendiamintetraacetat (S-EDTA)	0.2 g EDTA 8 g NaCl 0.2 g KCl 1.15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l <i>Aqua destillata</i> (pH 7.4)

### 2.1.3 Enzyme und Kits

Hyaluronidase von bovinen Hoden	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
Kollagenase von Clostridium histolyticum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen bei München, Deutschland
Mouse IFN-gamma ELISpot Kit	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Repeat-Free Poseidon RAB9B (XqF1) & WC Y Mouse Probe	Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy Micro Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
SoftTubes 0.2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
TaqMan Gene Expression Assays: melan-A Primer actin, beta Primer	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
TaqMan Universal PCR Master Mix	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.4 Antikörper

APC Ratte anti-Maus CD45	BD, Heidelberg, Deutschland
APC Ratte IgG2b, $\kappa$ Isotyp Kontrolle	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC Hamster anti-Maus CD11c	BD, Heidelberg, Deutschland

FITC Hamster IgG1, $\lambda$ 1 Isotyp Kontrolle	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC Ratte anti-Maus CD11b	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC Ratte anti-Maus CD4	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC Ratte anti-Maus CD8a	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC Ratte IgG2a, $\kappa$ Isotyp Kontrolle	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC Ratte IgG2b, $\kappa$ Isotyp Kontrolle	BD, Heidelberg, Deutschland
PE Hamster anti-Maus CD69	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
PE Hamster IgG Isotyp Kontrolle	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
PE Ratte anti-Maus CD25	Miltenyi Biotec GmbH, Gladbach, Deutschland
PE Ratte anti-Maus CD86	BD, Heidelberg, Deutschland
PE Ratte IgG2a, $\kappa$ Isotyp Kontrolle	BD, Heidelberg, Deutschland

### 2.1.5 Geräte und Gebrauchswaren

1525 Binary HPLC Pumpe	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
2475 Multiwellenlängen- Fluoreszenzdetektor	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
30-mm saw Resonator	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland
40-mm Gradientenset	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland
BD FACSCanto II	BD, Heidelberg, Deutschland
Bruker DRX 9.4 T wide-bore NMR Spektrometer	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland
FastPrep-24 Instrument	MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland

Kaliper PK-1025	Mitutoyo Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland
Lysing Matrix D	MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 ml	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
QIAcube	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Round bottom test tubes	BD, Heidelberg, Deutschland
Safe-Lock Gefäß	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
StepOnePlus Real-Time PCR Systems	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tuberkulinspritze mit eingeschweißter Kanüle (27 ½ G)	BD, Heidelberg, Deutschland
Wella Contura Rasierer	Wella AG, Darmstadt, Deutschland
XTerra MSC18 Säule (5 µm, 4.5 × 100 mm)	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
Zellkulturflasche	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatte	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb	BD, Heidelberg, Deutschland

### **2.1.6 Zellen und Tiere**

B16-F10 Zellen	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von unseren Kooperationspartnern (Herr Dr. Hippe, Frau Dr. Schorr, Herr Prof. Homey), Hautklinik des Universitätsklinikum Düsseldorf
LLC Zellen	

C57BL/6 Maus

Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf

### **2.1.7 Software**

Adobe Photoshop

Adobe Systems GmbH, München, Deutschland

Breeze

Waters GmbH, Eschborn, Deutschland

FACS Diva

BD, Heidelberg, Deutschland

Microsoft Office

Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim,  
Deutschland

Paravision

Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Deutschland

StepOne

Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

B16-F10 und LLC Zellen wurden in einem Medium (DMEM + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin) bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre kultiviert.

### **2.2.2 HPLC**

Die AMPase Aktivität von B16-F10 und LLC Zellen wurde durch Messung der Hydrolyse von fluoreszierenden etheno-AMP zu etheno-Adenosin mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) analysiert.

Dazu wurden die Zellen ( $5 \times 10^4$ ) in einem Medium (RPMI-1640 + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin) für 24 h inkubiert. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen für 20 min mit 50  $\mu$ M Levamisol, mit 50  $\mu$ M AOPCP, mit 50  $\mu$ M Levamisol + 50  $\mu$ M AOPCP oder ohne Zusätze (Kontrolle) inkubiert, wobei jede Gruppe aus drei voneinander unabhängigen Proben bestand. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ M etheno-AMP gestartet. Nach 10 min, 20 min, 30 min, 40 min und 50 min wurde jeweils 15  $\mu$ l Überstand entnommen, mit gleicher Menge 1 M Perchlorsäure denaturiert sowie gleicher Menge 1 M  $K_3PO_4$  neutralisiert.

Für die HPLC wurden je 40  $\mu$ l der Proben auf eine XTerra MSC18 Säule (5  $\mu$ m,  $4.5 \times 100$  mm) geladen, das an eine 1525 Binary HPLC Pumpe angeschlossen war. Zur Separation von etheno-AMP und etheno-Adenosin wurden zwei Puffer verwendet: 6 % Acetonitril, 5.7 mM TBAS, 30.5 mM  $KH_2PO_4$  eingestellt auf pH 5.8 (Puffer A) und 66 % Acetonitril, 5.7 mM TBAS, 30.5 mM  $KH_2PO_4$  eingestellt auf pH 5.8 (Puffer B). Nukleotide und Nukleoside wurden bei einer Flussrate von 0.75 ml/min mit einem linearen Gradient von 100 – 66 % Puffer A und 0 – 34 % Puffer B für 5.6 min sowie 66 % Puffer A und 34 % Puffer B für 1.4 min eluiert. Zur Fluoreszenzdetektion von etheno-AMP und etheno-Adenosin wurde der 2475 Multiwellenlängen-Fluoreszenzdetektor ( $\lambda_{Em} = 410$  nm,  $\lambda_{Ex} = 280$  nm) verwendet.

Für die Auswertung der HPLC Daten wurde die Breeze Software verwendet. Dabei wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) von etheno-AMP zu etheno-Adenosin der B16-F10 und LLC Zellen pro  $1 \times 10^6$  Zellen angegeben.

### 2.2.3 Tierversuche

Für die *in vivo* Experimente wurden sechs bis zehn Wochen alte WT,  $CD73^{-/-}$ , loxP und  $eCD73^{-/-}$  Mäuse mit einem C57BL/6 Hintergrund verwendet. Die Erzeugung der  $CD73^{-/-}$  Mäuse erfolgte wie in der Literatur beschrieben<sup>98</sup>. LoxP und  $eCD73^{-/-}$  Mäuse wurden freundlicherweise vom Institut für Molekulare Kardiologie (Frau Viethen, Herr Prof. Schrader) zur Verfügung gestellt. Die Tierversuche wurden vom LANUV NRW (Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) genehmigt (8.87-50.10.37.09.297, 17.11.2009 – 30.11.2012). Alle beteiligten Personen hatten im Vorfeld erfolgreich an einem tierversuchskundlichen Kurs teilgenommen.

## 2.2.4 Knochenmarktransplantation

Zur Knochenmarktransplantation erhielten männliche WT Mäuse zehn Tage vor bis fünf Wochen nach Transplantation Antibiotika (80 mg/l Vancomycin, 40 mg/l Enrofloxacin) mit dem Trinkwasser zur Infektionsprophylaxe. Ein Tag vor Transplantation wurden die Tiere einer Ganzkörperbestrahlung (8 Gy) in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie des Universitätsklinikum Düsseldorf (Herr Dr. Simiantonakis, Herr Bannach, Herr Prof. Budach) unterzogen.

Zur Gewinnung von Knochenmarkzellen wurden Tibia und Fibula der Spendertiere mittels eines Medium (PBS + 2 % BSA) gespült und die aufgefangene Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb filtriert. Knochenmarkzellen ( $1 \times 10^7$ ) von weiblichen WT oder CD73<sup>-/-</sup> Spendermäusen wurden jeder männlichen WT Empfängermaus in 250 µl Medium (PBS + 2 % BSA) intravenös in eine Schwanzvene injiziert. Zum Zeitpunkt der Tumorzellinjektion waren die knochenmarktransplantierten Mäuse etwa 14 Wochen alt.

Der Erfolg der Knochenmarktransplantation wurde mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) am Ende der *in vivo* Versuche überprüft. Nach Blutentnahme durch Herzpunktion wurden die X- und Y-Chromosomen in den Blutzellen unter Verwendung von Fluoreszenzsonden (Repeat-Free Poseidon RAB9B (XqF1) & WC Y Mouse Probe) sichtbar gemacht. Eine erfolgreiche Knochenmarkrekonstitution nach Transplantation wurde hierbei durch den Nachweis von > 97 % weiblichen Blutzellen in den männlichen Mäusen belegt.

## 2.2.5 Tumormodelle

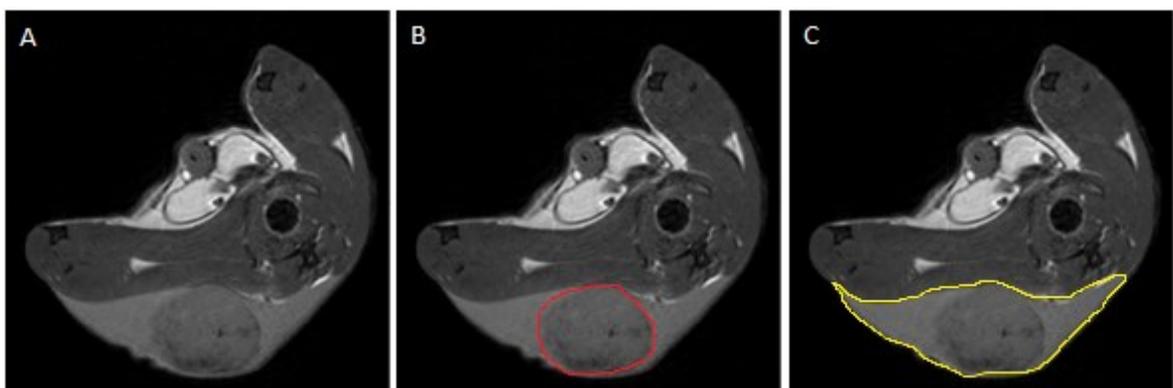
Zur Untersuchung des Tumorwachstums wurden wahlweise B16-F10 Zellen ( $25 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  oder  $1 \times 10^4$  Zellen) oder LLC Zellen ( $50 \times 10^4$  oder  $10 \times 10^4$  Zellen) in 100 µl PBS subkutan in den rechten Hinterlauf der Mäuse<sup>55</sup> oder B16-F10 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen) in 100 µl PBS intradermal in die rechte Flanke der Mäuse<sup>99</sup> injiziert wie bereits in der Literatur beschrieben. Zur Untersuchung der hämatogenen Metastasierung wurden B16-F10 Zellen ( $25 \times 10^4$  Zellen) in 250 µl PBS intravenös in eine Schwanzvene der Maus injiziert. Die Mäuse wurden während der Injektion mit einem Gasmisch (97.5 %

O<sub>2</sub> + 2.5 % Isofluran, 60 ml/min) über eine Maske narkotisiert. Zur Injektion wurden nur Zellen verwendet, deren Anteil an avitalen Zellen (Anfärbbarkeit mit Trypanblau) weniger als 10 % betrug.

## 2.2.6 Tumorgrößenbestimmung mittels MRT

Zur Bestimmung von Tumor- und Tumorödempvolumen des in der Haut der Mäuse wachsenden Tumors wurden tomographische Magnetresonanzbilder bei 9.4 T aufgenommen und planimetrisch analysiert.

Die Mäuse wurden während der Messung mit einem Gasgemisch (N<sub>2</sub> + 30 % O<sub>2</sub> + 1.5 % Isofluran, 75 ml/min) über eine Maske narkotisiert und bei 37 °C gehalten. Die Messungen erfolgten in einem vertikalen Bruker DRX 9.4 T wide-bore NMR Spektrometer, der mit einem 40-mm Gradientensystem und einem linearen 30-mm saw-Resonator ausgestattet war. Für die *2D-multislice-RARE* Sequenz (identisch mit der Turbo-Spin-Echo Sequenz) wurden folgende Parameter verwendet: Repetitionszeit (TR) = 3.5 s, Echozeit (TE) = 15.8 ms, *field of view* (FOV) = 3 × 3 cm<sup>2</sup>, Matrixgröße = 256 × 192 (*zerofilling* zu 256 × 256 resultierte in einer Pixelgröße von 117 × 117 μm<sup>2</sup>), Akquisitionszeit = 2.8 min. Der Tumor wurde dabei durch 30 konsekutive axiale 1-mm-Schichten erfasst.



**Abb. 2: MRT Bilder vom B16-F10 Tumor einer repräsentativen Maus nach subkutaner Injektion.**  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen wurden den Mäusen subkutan in den rechten Hinterlauf injiziert (Tag 0) und das Tumorwachstum über 18 Tage mittels MRT verfolgt. (A) Axiale MRT Bilder einer Maus am Tag 18 nach Injektion. Zur Bestimmung des Tumolvolumens bzw. des Gesamtvolumens wurde auf jeder Schicht die Tumorfläche (B, rot umrandet) bzw. die Fläche des Tumorödems (C, gelb umrandet) markiert.

Für die Auswertung wurden in jeder Schicht der Tumor sowie das umgebene Tumorödem umfahren (Abb. 2) und die so bestimmte Fläche mit der Schichtdicke multipliziert. Die so berechneten Teilvolumina wurden zur Bestimmung von Tumolvolumen und Gesamtvolumen (bestehend aus Tumolvolumen und Tumorödempvolumen) aufaddiert. Das Tumorödempvolumen wurde nach Subtraktion des Tumolvolumens vom Gesamtvolumen berechnet.

### **2.2.7 Tumorgrößenbestimmung mittels Kaliper**

Von dem in der Haut der Maus wachsenden Tumors wurde mittels eines Messschiebers (Kaliper) die maximale Längsausdehnung sowie im 90°-Winkel dazu die maximale Breitenausdehnung wie in der Literatur üblich bestimmt <sup>55</sup>. Das Tumolvolumen wurde nach der Formel  $\text{Volumen (mm}^3\text{)} = \text{Länge (mm)} \times \text{Breite (mm)} \times \text{Breite (mm)} \times 0.5$  berechnet. Die Tumorfläche wurde mittels der Formel  $\text{Fläche (mm}^2\text{)} = \text{Länge (mm)} \times \text{Breite (mm)}$  berechnet.

Für die abschließende Flächenbestimmung wurde die vom Tumor durchsetzte Haut *in toto* exzidiert und die Haut auf einem Styropor Block mittels Pinnadeln befestigt. Die so aufgespannte Haut wurde zur Bestimmung der vom Tumor infiltrierten Fläche zusammen mit einem Maßstab fotografiert und die Tumorfläche mittels Adobe Photoshop ausgewertet.

### **2.2.8 FACS**

Es wurden nur Tumore analysiert, die zum Zeitpunkt der Entnahme nicht durch die Haut der Mäuse ulzeriert waren. Dazu wurden die Tumore nach Exzision aus der Maus enzymatisch (7.5 mg Kollagenase + 2.5 mg Hyaluronidase) in 10 ml PBS (37 °C, 1 h) verdaut und durch ein 100 µm Zellsieb filtriert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit 25 ml Erylyse Puffer (4 °C, 8 min) inkubiert und danach mit PBS gewaschen. Ein Teil der Zellen ( $2 \times 10^5$ ) wurden hiervon für den IFN-γ ELISpot entnommen.

Für die *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) Analysen wurden die Zellen mit den folgenden Antikörpern gefärbt: FITC Ratte anti-Maus CD4, FITC Ratte anti-Maus CD8a, FITC Ratte anti-Maus CD11b, FITC Hamster anti-Maus CD11c, PE Ratte anti-Maus CD25, APC Ratte anti-Maus CD45, PE Hamster anti-Maus CD69, PE Ratte anti-Maus CD86 sowie die entsprechenden Isotyp Kontrollantikörper. Vor der FACS Auswertung wurden die Proben in 4 % Paraformaldehyd fixiert.

Die Analyse der Proben wurde am BD FACSCanto II mithilfe der FACS Diva Software durchgeführt. Die Auswertung erfolgte als prozentualer Anteil der CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup> Zellen von den CD45<sup>+</sup> Zellen.

### **2.2.9 IFN- $\gamma$ ELISpot**

Die quantitative Bestimmung von IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen aus dem Tumor wurde an der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf (Herr Dr. Hippe, Frau Dr. Schorr, Herr Prof. Homey) durchgeführt. Die Zellen ( $2 \times 10^5$ ) von nicht-ulzerierten Tumoren wurden wie bei der FACS Aufbereitung enzymatisch vereinzelt und mit einem IFN- $\gamma$  Enzyme Linked Immuno Spot (ELISpot) Kit analysiert. Dazu wurden die Zellen auf Platten mit beschichteten anti-Maus IFN- $\gamma$  Antikörper inkubiert. Das durch die Antikörper immobilisierte IFN- $\gamma$  wurde nach Bindung eines Zweitantikörpers mit Alkalischer Phosphatase Aktivität mittels einer Farbreaktion als *spots* auf der Platte sichtbar gemacht. Dabei stand jeder *spot* für eine IFN- $\gamma$  sezernierende Zelle.

### **2.2.10 Lymphknotenmetastasierung**

Zur Untersuchung der regionären lymphogenen Metastasierung von B16-F10 Zellen wurden beide inguinale Lymphknoten der Mäuse isoliert und auf Expression von Melan-A messenger RNA (mRNA), einem spezifischen Marker von B16-F10 Zellen <sup>100</sup>, mittels *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) analysiert. Nur Lymphknoten von Mäusen, deren Tumore am Tag der Entnahme nicht durch die Haut ulzeriert waren, wurden verwendet.

Die Lymphknoten wurden im flüssigen Stickstoff (N<sub>2</sub>) schockgefroren und in Lysing Matrix D Tuben unter Verwendung des FastPrep-24 Instruments mechanisch homogenisiert. Die RNA Isolierung mit simultanem DNA-Verdau aus diesen Proben erfolgte mithilfe des RNeasy Micro Kits im QIAcube. Für die Reverse Transkription von RNA auf *complementary* DNA (cDNA) wurden 10 µl RNA in 20 µl Reaktionsansatz des SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit eingesetzt.

Die qPCR erfolgte mit dem TaqMan Universal PCR Master Mix unter Verwendung von Melan-A Primer und β-Aktin Primer als endogene Kontrolle. 2 µl cDNA in 20 µl Reaktionsansatz wurden 40 Zyklen aus folgenden Schritten unterzogen: Denaturierung (95 °C, 15 s), Hybridisierung und Elongation (60 °C, 1 min). Reaktionen erfolgten für jede Probe als Triplikate.

Die (relative) Quantifizierung des Melan-A Levels der Lymphknoten wurde nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode zum endogenen β-Aktin Level normalisiert<sup>101</sup> und mittels der StepOne Software ausgewertet.

### **2.2.11 Lungenmetastasierung**

Zur Untersuchung der hämatogenen Metastasierung wurden B16-F10 Zellen ( $25 \times 10^4$  Zellen) in 250 µl PBS intravenös in eine Schwanzvene der Maus injiziert. Nach 10 Tagen wurde die Gesamtanzahl der auf beiden Lungenoberflächen der Mäuse sichtbaren metastatischen Knoten gezählt.

### **2.2.12 Statistik**

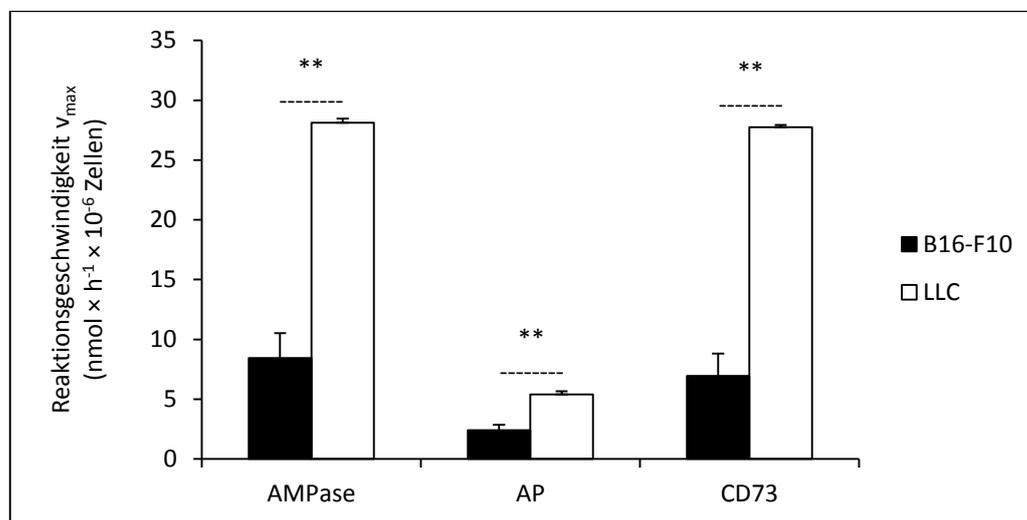
Die Daten der einzelnen Gruppen wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde der zweiseitige Student'sche t-Test verwendet, wobei p-Werte  $< 0.05$  als statistisch signifikant gewertet wurden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 AMPase-Aktivität von B16-F10 und LLC Zellen

Zur Untersuchung der Rolle der körpereigenen Ecto-5'-Nukleotidase CD73 wurde zunächst die endogene enzymatische AMPase Aktivität der verwendeten murinen Melanomzellen (B16-F10) und murinen Lungenkarzinomzellen (LLC) untersucht.

Dazu wurde die Hydrolyse von fluoreszierenden etheno-AMP zu etheno-Adenosin unter  $v_{\max}$  Bedingungen mittels HPLC gemessen. Der Anteil der CD73 an der AMPase Aktivität wurde durch gleichzeitige Gabe von Levamisol, einem Inhibitor der Alkalischen Phosphatase (AP), bestimmt. Der Beitrag der AP an der AMPase Aktivität wurde durch gleichzeitige Gabe von Adenosin 5'-( $\alpha,\beta$ -methylen)diphosphat (AOPCP), einem Inhibitor der CD73, gemessen. Bei simultanem Einsatz beider Inhibitoren war keine messbare AMPase Aktivität nachweisbar, sodass die Beteiligung weiterer AMPasen ausgeschlossen werden konnte.



**Abb. 3: AMPase, AP und CD73 Aktivität von B16-F10 und LLC Zellen.** Die AMPase Aktivität von B16-F10 und LLC Zellen wurde durch Messung der Hydrolyse von etheno-AMP zu etheno-Adenosin mittels HPLC unter  $v_{\max}$  Bedingungen gemessen. Die AP Aktivität wurde durch Vorinkubation der Zellen mit AOPCP (50  $\mu$ M), einem CD73-Inhibitor, gemessen. Die CD73 Aktivität wurde durch Vorinkubation der Zellen mit Levamisol (50  $\mu$ M), einem Inhibitor der Alkalischen Phosphatase (AP), bestimmt. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 3). \*\* p < 0.01.

Sowohl bei B16-F10 als auch LLC Zellen entfiel der Hauptanteil der AMPase Aktivität auf die CD73 (Abb. 3). Dabei zeigten B16-F10 Zellen eine etwa 4-fach niedrigere CD73 Aktivität als LLC Zellen.

In den nachfolgenden Versuchen sollte die Rolle der CD73 auf das Tumorwachstum bei möglichst geringer Beeinflussung durch die CD73 der Tumorzellen selbst untersucht werden. Daher wurden zunächst B16-F10 Zellen bei den nachfolgenden Experimenten verwendet.

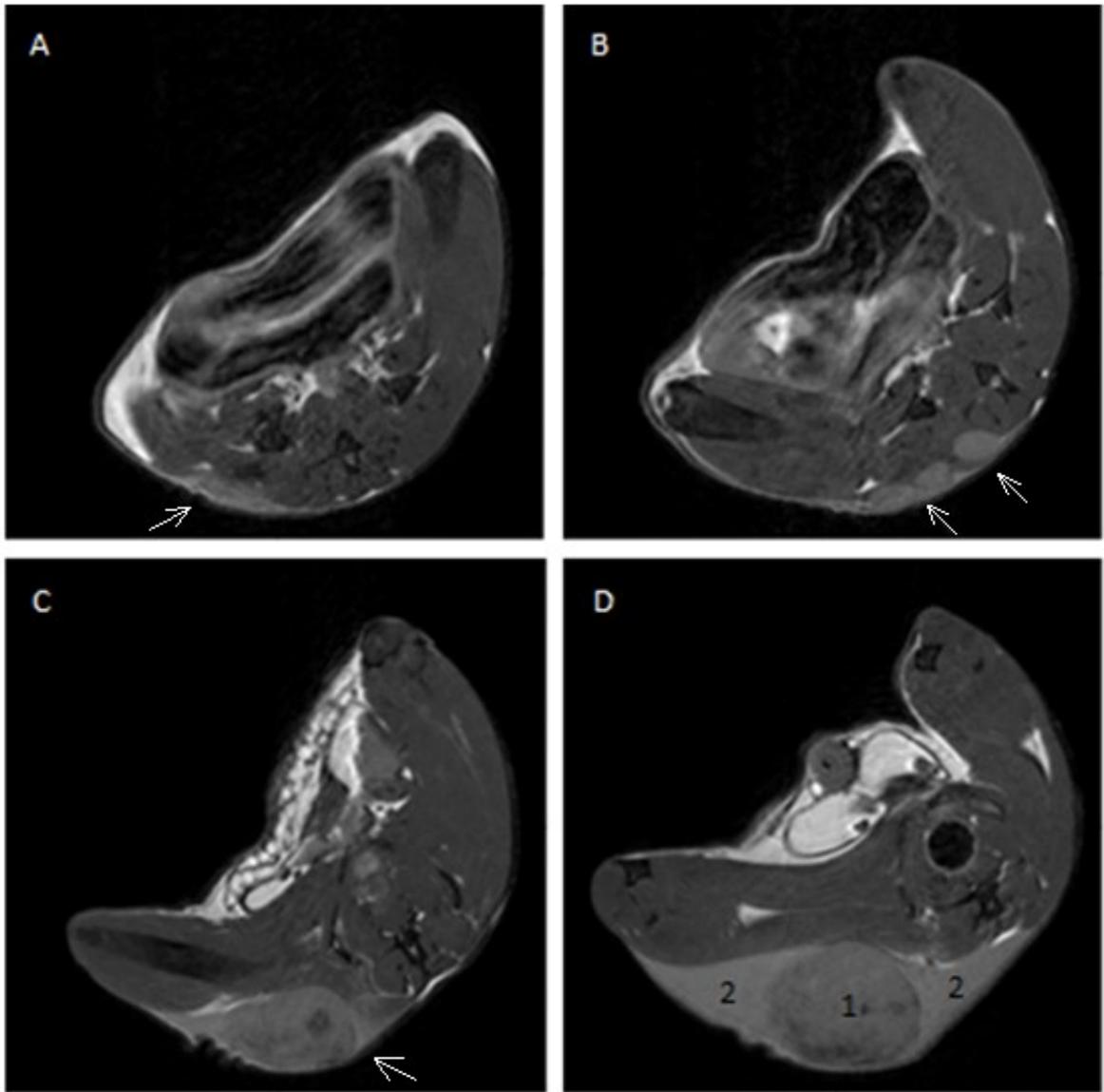
## **3.2 Subkutanes Tumormodell an Mäusen**

### **3.2.1 Versuche mit B16-F10 Zellen**

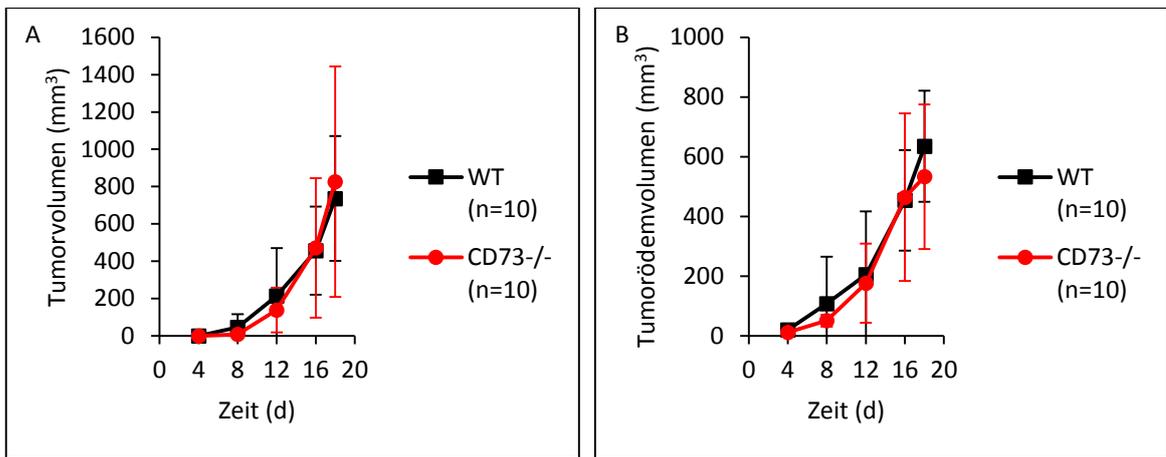
#### **3.2.1.1 Untersuchungen an CD73<sup>-/-</sup> Mäusen**

Zur Untersuchung des Einflusses der körpereigenen CD73 auf das Tumorwachstum wurde in Übereinstimmung mit der Literatur<sup>55</sup> ein *in vivo* Mausmodell verwendet, bei der  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen subkutan in den rechten Hinterlauf von C57BL/6 Mäuse injiziert wurde. Der in der Haut von WT und CD73<sup>-/-</sup> Tiere wachsende Tumor wurde dabei über 18 Tage mittels axialer MRT Aufnahmen planimetrisch vermessen (Abb. 4) wie im Methodenteil ausführlich beschrieben (Kap. 2.2.6). Hierbei zeigte sich im Verlauf die Ausbildung einer entzündlichen Ödemzone um den eigentlichen soliden Tumor (Abb. 4D).

Im Verlaufszeitraum zeigte sich weder im Tumolvolumen noch im Tumorödenvolumen ein Unterschied zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Tiere (Abb. 5). Eine WT Maus (zwischen Tag 12 und 16) sowie eine CD73<sup>-/-</sup> Maus (zwischen Tag 16 und 18) verstarb vorzeitig. Bei einer WT und zwei CD73<sup>-/-</sup> Mäusen war der Tumor am Tag 18 durch die Haut ulzeriert. Auch unter Ausschluss dieser Tiere waren keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen feststellbar.



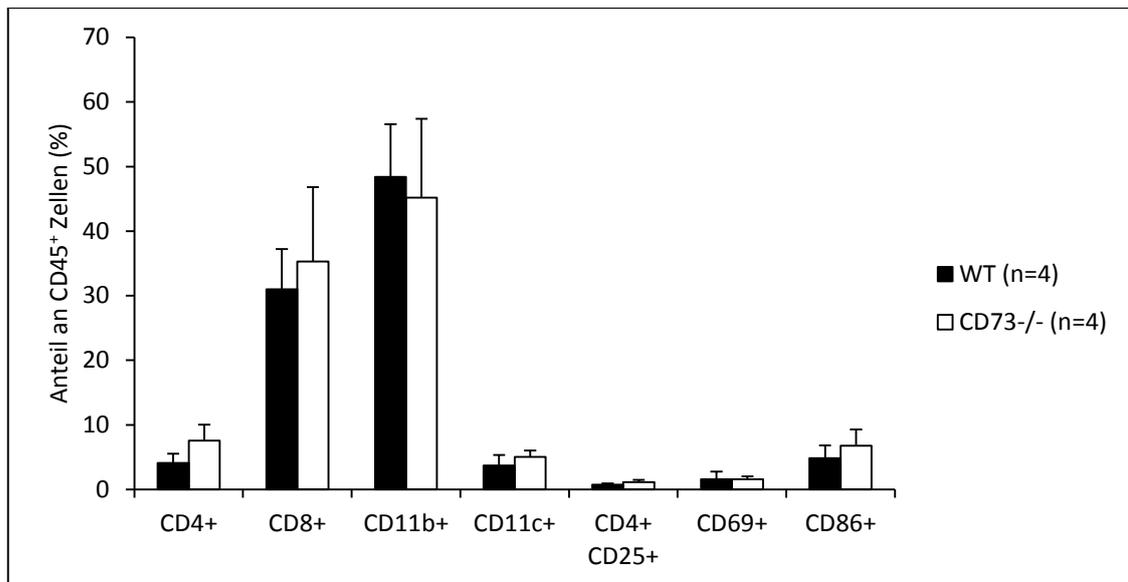
**Abb. 4: MRT Bilder vom B16-F10 Tumor einer repräsentativen Maus nach subkutaner Injektion im Verlauf.**  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen wurden den Mäusen subkutan in den rechten Hinterlauf injiziert (Tag 0) und das Tumorstadium über 18 Tage mittels MRT verfolgt. Die Abbildung zeigt axiale MRT-Bilder einer repräsentativen Maus über 18 Tage. Der subkutan wachsende Tumor (Pfeile) stellte sich deutlich hyperintens gegenüber der Umgebung dar. An Tag 16 grenzte sich der solide Tumor gegenüber dem entzündlichen Tumorödembereich leicht hypointens ab. (A) Tag 8. (B) Tag 12. (C) Tag 16. (D) Tag 18: Tumor (1). Tumorödem (2).



**Abb. 5: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion.**  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen wurden den Mäusen subkutan in den rechten Hinterlauf injiziert (Tag 0) und das Tumorstadium über 18 Tage mittels MRT verfolgt. (A) Tumorvolumen. (B) Tumorödenvolumen. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 10).

Um zusätzlich die Tumor-induzierte Immunzellantwort zu vergleichen, wurden die Tumore am Tag 18 exzidiert und die den Tumor infiltrierenden Immunzellen mittels FACS analysiert. Dazu wurden die Zellen des Tumors enzymatisch vereinzelt, filtriert und einer Erylyse unterzogen. Zur Identifikation der Immunzellen wurden die so gewonnenen Zellen gegen CD45 gefärbt<sup>102</sup>. Die einzelnen Immunzellpopulationen (Färbung der Zellen gegen CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD25, CD69 und CD86) wurden dabei als jeweiligen Anteil an CD45<sup>+</sup> Zellen bestimmt.

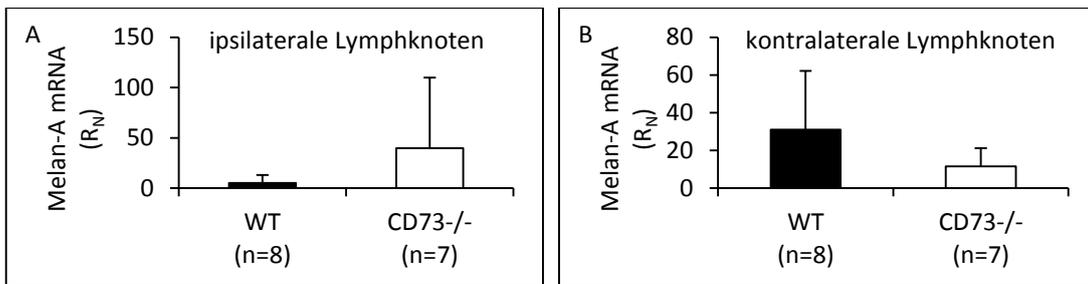
Dabei fand sich eine deutliche Entzündungsreaktion mit Zunahme von CD11b<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen (Abb. 6). Allerdings konnten in den einzelnen nachgewiesenen Immunzellpopulationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tumoren von WT und CD73<sup>-/-</sup> Tieren festgestellt werden. Nicht berücksichtigt wurden diejenigen Tumore, die zum Zeitpunkt der Tumorentnahme bereits durch die Haut der Mäuse ulzeriert waren, da die Immunreaktion in diesen Tumoren nicht vergleichbar wären gegenüber nicht-ulzerierten Tumoren. Auch unter Berücksichtigung der ulzerierten Tumoren (n = 4 – 5) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.



**Abb. 6: Immunzellpopulationen im B16-F10 Tumor von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion.** Tumore wurden am Tag 18 nach subkutaner B16-F10 Injektion ( $25 \times 10^4$ ) aus den Mäusen entfernt und die Zellen enzymatisch vereinzelt. Die gewonnene Zellsuspension wurde gegen CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD25, CD45, CD69 und CD86 für die FACS Analyse gefärbt. Die einzelnen Immunzellpopulationen wurden als prozentualer Anteil an CD45<sup>+</sup> Zellen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 4).

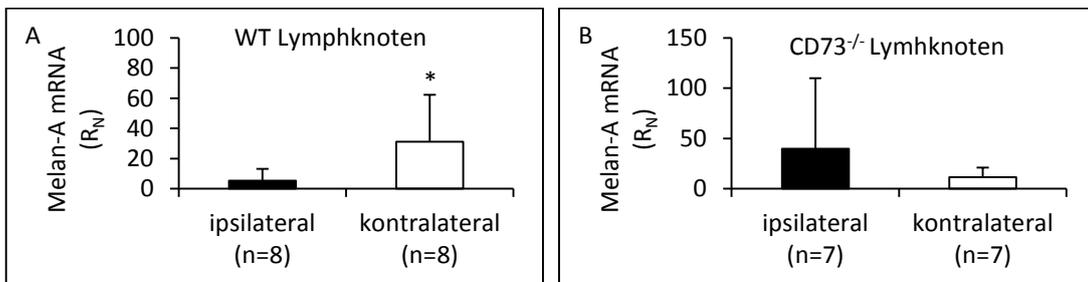
Um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der lymphogenen Metastasierung zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen gab, wurden die inguinalen Lymphknoten auf beiden Seiten am Tag 18 entfernt und die Melan-A mRNA Expression als spezifischer Marker von B16-F10 Zellen quantitativ untersucht<sup>100</sup>. Nach RNA-Isolierung aus den Lymphknoten und Reverse Transkription in cDNA wurden die relative Quantifizierung von Melan-A cDNA mittels qPCR nach der  $\Delta\Delta$ CT-Methode durchgeführt und zum endogenen  $\beta$ -Aktin Level normalisiert<sup>101</sup>. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden wie bei der FACS Analyse die Lymphknoten von Tieren mit ulzerierten Tumoren nicht berücksichtigt, wobei sich die Ergebnisse auch bei Berücksichtigung nicht signifikant unterscheiden.

In den ipsilateralen tumornahen Lymphknoten war die Melan-A Expression bei den WT Mäusen in der Tendenz niedriger als bei den CD73<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 7A), während dies bei den Lymphknoten auf der kontralateralen tumorfernen Seite genau umgekehrt war (Abb. 7B). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war jedoch jeweils nicht statistisch signifikant.



**Abb. 7: Melan-A mRNA Expression in inguinalen Lymphknoten von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen mit B16-F10 Tumor nach subkutaner Injektion.** RNA wurde aus Lymphknoten am Tag 18 nach subkutaner B16-F10 Injektion ( $25 \times 10^4$ ) isoliert und in cDNA mittels Reverse Transkription umgeschrieben. Relative Quantifizierung von Melan-A cDNA wurde mittels qPCR nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode durchgeführt und zum endogenen  $\beta$ -Aktin Level normalisiert. (A) Ipsilaterale inguinale Lymphknoten ( $p = 0.19$ ). (B) Kontralaterale inguinale Lymphknoten ( $p = 0.14$ ). Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 7 - 8$ ).

Vergleicht man die Melan-A Expression zwischen den ipsilateralen und kontralateralen Lymphknoten bei den WT Tieren, konnte eine statistisch signifikant höhere Metastasierung als auf der kontralateralen Seite festgestellt werden (Abb. 8A). Bei den CD73<sup>-/-</sup> Mäusen dagegen war in den ipsilateralen Lymphknoten im Mittel eine höhere Metastasierung nachweisbar, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen (Abb. 8B).

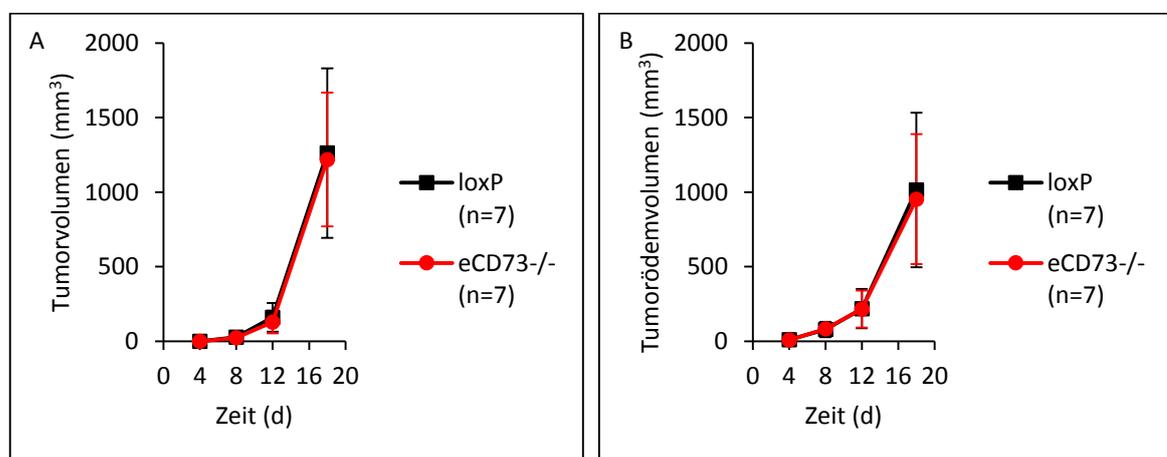


**Abb. 8: Melan-A mRNA Expression in inguinalen Lymphknoten von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen mit B16-F10 Tumor nach subkutaner Injektion.** RNA wurde aus Lymphknoten am Tag 18 nach subkutaner B16-F10 Injektion ( $25 \times 10^4$ ) isoliert und in cDNA mittels Reverse Transkription umgeschrieben. Relative Quantifizierung von Melan-A cDNA wurde mittels qPCR nach der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode durchgeführt und zum endogenen  $\beta$ -Aktin Level normalisiert. (A) Inguinale Lymphknoten von WT Mäusen ( $n = 8$ ,  $p = 0.04$ ). (B) Inguinale Lymphknoten von CD73<sup>-/-</sup> Mäusen ( $n = 7$ ,  $p = 0.31$ ). Mittelwert  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$ .

### 3.2.1.2 Untersuchungen an endothelzellspezifischen CD73<sup>-/-</sup> Mäusen

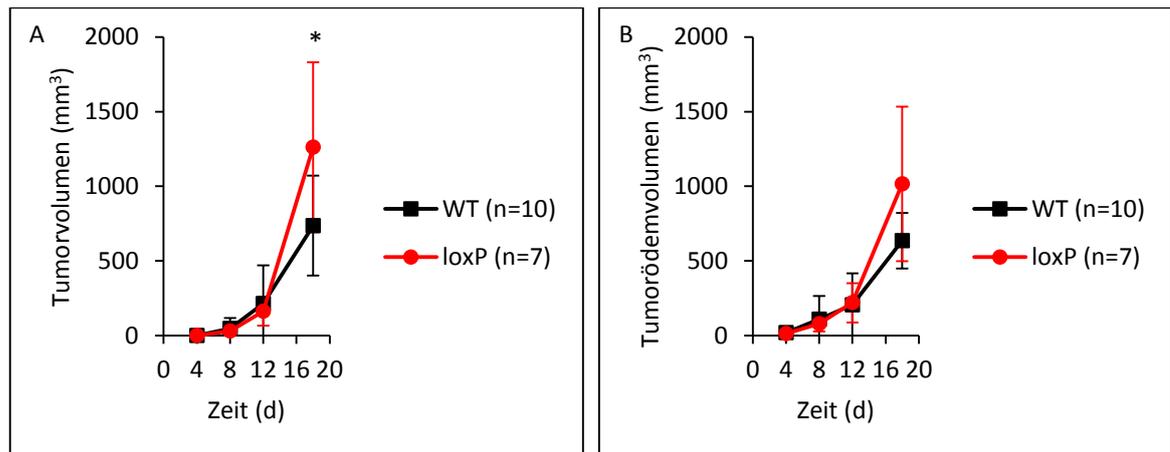
Da Immun-, Endothel- und Tumorzellen die CD73 exprimieren, wäre es denkbar, dass die CD73 auf den jeweiligen Zellen sich gegensätzlich auf das Tumorstadium auswirkt (Kap. 1.5), wodurch sich in der Summe die Effekte neutralisieren. Daher wurde im Folgenden die Auswirkung einer selektiven Ausschaltung der CD73 nur auf Endothelzellen oder Immunzellen untersucht.

Zunächst wurde das B16-F10 Tumormodell auf eCD73<sup>-/-</sup> Mäuse (fehlende CD73 Expression nur auf Endothelzellen) angewandt mit loxP Mäuse als Kontrolle. Wie bereits beschrieben wurden  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen subkutan in den rechten Hinterlauf von loxP und eCD73<sup>-/-</sup> Mäusen injiziert und das weitere Wachstum der Tumore mittels MRT Aufnahmen planimetrisch verfolgt. Wie bei den Versuchen mit WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich auch hier weder ein Unterschied beim Tumorstadium noch beim Tumorstadium zwischen loxP und eCD73<sup>-/-</sup> Tieren (Abb. 9). Bei fünf loxP und vier eCD73<sup>-/-</sup> Mäusen war der Tumor am Tag 18 durch die Haut ulzeriert, wobei die betroffenen Tumore nicht mit der Tumorstadium korrelierte.



**Abb. 9: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von loxP und eCD73<sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion.**  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen wurden den Mäusen subkutan in den rechten Hinterlauf injiziert (Tag 0) und das Tumorstadium über 18 Tage mittels MRT verfolgt. (A) Tumorstadium. (B) Tumorstadium. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 7).

Erstaunlicherweise waren die B16-F10 Tumore der loxP Kontrolltiere (für die eCD73<sup>-/-</sup> Tiere) am Tag 18 im Mittel um etwa 70 % größer als die der WT Kontrolltiere (für die CD73<sup>-/-</sup> Tiere), wobei der Unterschied statistisch signifikant war (Abb. 10A). Das Tumorödem der loxP Mäuse dagegen erfasste im Mittel ein etwas 60 % größeres Areal als das der WT Mäuse am Tag 18 (Abb. 10B), das Signifikanzniveau wurde hier jedoch nicht erreicht (p = 0.07).

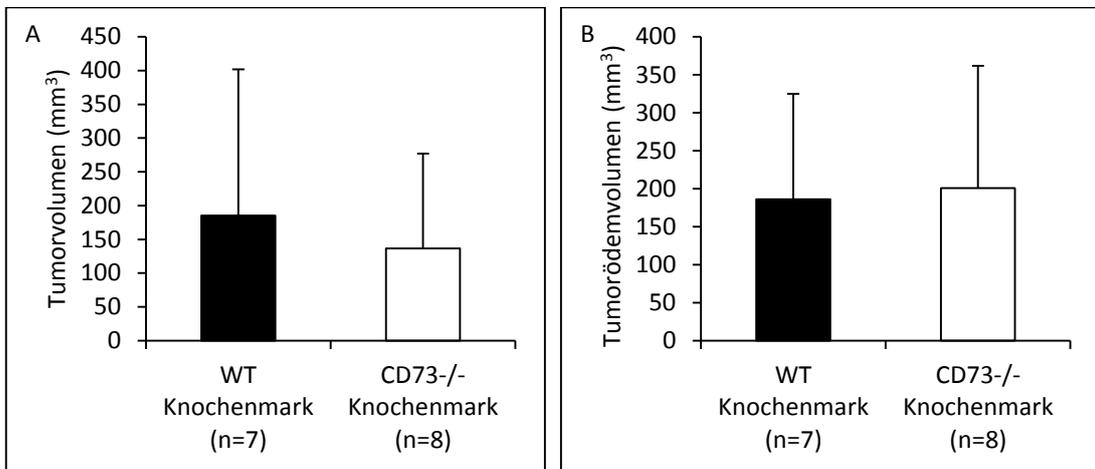


**Abb. 10: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von WT und loxP Mäusen nach subkutaner Injektion.**  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen wurden den Mäusen subkutan in den rechten Hinterlauf injiziert (Tag 0) und das Tumorwachstum über 18 Tage mittels MRT verfolgt. (A) Tumorvolumen (p = 0.04). (B) Tumorödembvolumen (p = 0.07). Mittelwert  $\pm$  SD (n = 7 – 10). \* p < 0.05.

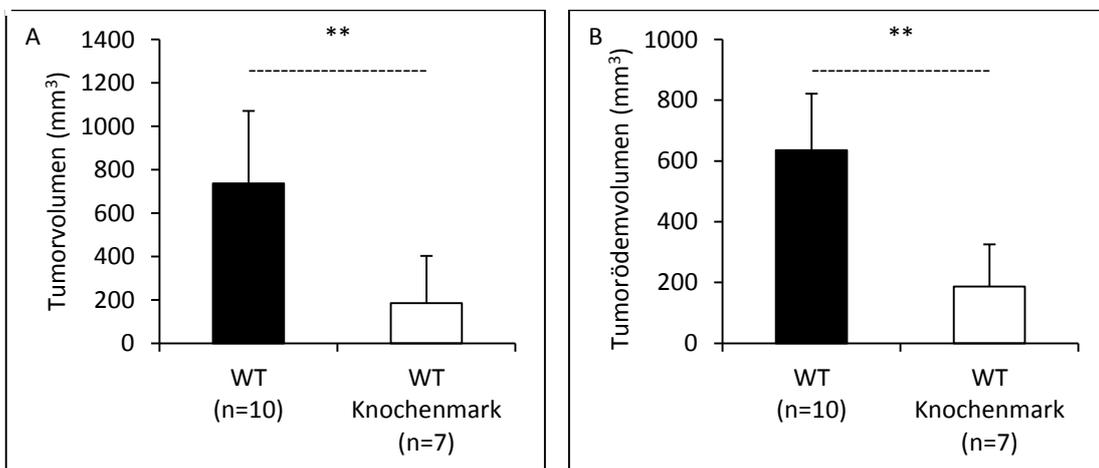
### 3.2.1.3 Untersuchungen an knochenmarktransplantierten Mäusen

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss der CD73 Expression von Immunzellen auf das Wachstum der B16-F10 Tumore untersucht. Dazu wurden WT Mäuse nach Ganzkörperbestrahlung wahlweise mit WT oder CD73<sup>-/-</sup> Knochenmarkszellen transplantiert, wodurch selektiv die CD73 Expression auf hämatopoetischen Zellen in der CD73<sup>-/-</sup> Gruppe ausgeschaltet wurde. Nach Knochenmarksrestitution wurden diese Tiere mit demselben Tumorprotokoll behandelt.  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen wurden in den rechten Hinterlauf der knochenmarktransplantierten Mäusen injiziert und das Tumor- sowie Tumorödembvolumen nach 17 Tagen im MRT planimetrisch bestimmt. Hierbei konnte weder in der Tumorgöße noch in der Ausdehnung des Tumorödems wesentliche

Differenzen zwischen WT oder CD73<sup>-/-</sup> Knochenmarktransplantierten WT Tieren gefunden (Abb. 11).



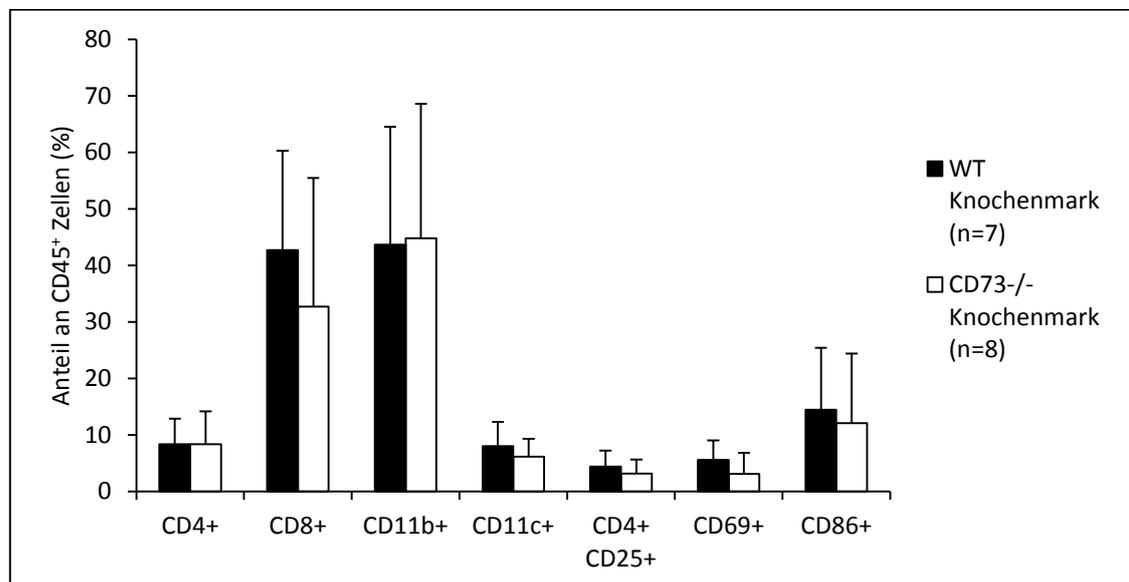
**Abb. 11: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von WT oder CD73<sup>-/-</sup> Knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach subkutaner Injektion.** WT Mäuse wurden nach Ganzkörperbestrahlung mit WT oder CD73<sup>-/-</sup> Knochenmark transplantiert.  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen wurden den Knochenmarktransplantierten Mäusen subkutan in den rechten Hinterlauf injiziert (Tag 0) und die Tumorgöße am Tag 17 mittels MRT bestimmt. (A) Tumorvolumen. (B) Tumorödenvolumen. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 7 – 8).



**Abb. 12: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von WT und WT Knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach subkutaner Injektion.**  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen wurden den Mäusen subkutan in den rechten Hinterlauf injiziert (Tag 0) und die Tumorgöße am Tag 18 (WT Mäuse) oder Tag 17 (WT Knochenmarktransplantierte WT Mäuse) mittels MRT bestimmt. (A) Tumorvolumen. (B) Tumorödenvolumen. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 7 – 10). \*\* p < 0.01.

Vergleicht man die an den knochenmarktransplantierten Kontrolltieren (WT Tiere mit WT Knochenmark) erhobenen Daten mit denen der WT Kontrollen (aus den Versuchen mit CD73<sup>-/-</sup> Mäusen), so fällt auf, dass die Tumore der Mäuse nach Knochenmarktransplantation im Mittel am Tag 17 lediglich etwa ein Viertel der Größe der entsprechenden Mäuse ohne Transplantation am Tag 18 erreichte (Abb. 12A). Das Tumorödempvolumen betrug im Mittel etwa ein Drittel von dem der WT Tiere (Abb. 12B). Beide Unterschiede waren statistisch signifikant.

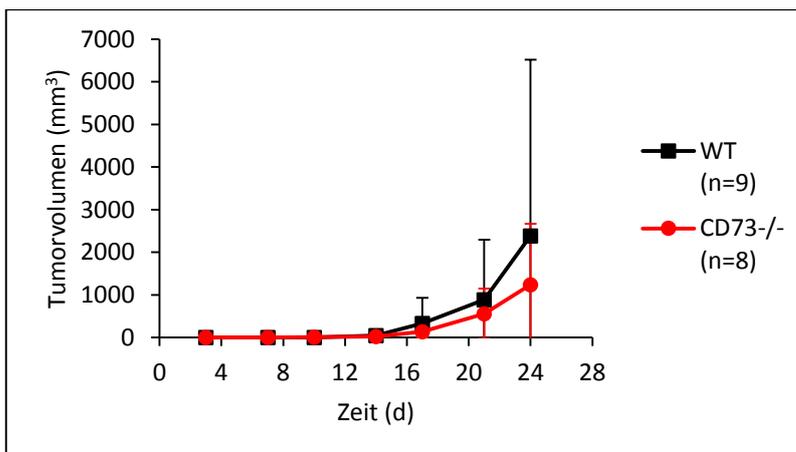
FACS Analysen zur Charakterisierung der infiltrierenden Immunzellen im B16-F10 Tumor zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der einzelnen Immunzellpopulationen zwischen WT oder CD73<sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Mäusen (Abb. 13). Im Vergleich mit den WT und CD73<sup>-/-</sup> Tieren ohne Knochenmarktransplantation (Abb. 6) dominierten auch hier vor allem CD11b<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen. Auch die Verteilung der übrigen erfassten Immunzellpopulationen war ähnlich, obwohl sich Tumolvolumen und Tumorödempvolumen in den MRT Messungen deutlich voneinander unterschieden (Abb. 12).



**Abb. 13: Immunzellpopulationen im B16-F10 Tumor von WT oder CD73<sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach subkutaner Injektion.** Tumore wurden am Tag 17 nach subkutaner B16-F10 Injektion ( $25 \times 10^4$ ) aus den Mäusen entfernt und die Zellen enzymatisch vereinzelt. Die gewonnene Zellsuspension wurde gegen CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD25, CD45, CD69 und CD86 für die FACS Analyse gefärbt. Die einzelnen Immunzellpopulationen wurden als prozentualer Anteil an CD45<sup>+</sup> Zellen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 7 – 8).

### 3.2.1.4 Versuche mit reduzierter Zahl an B16-F10 Zellen

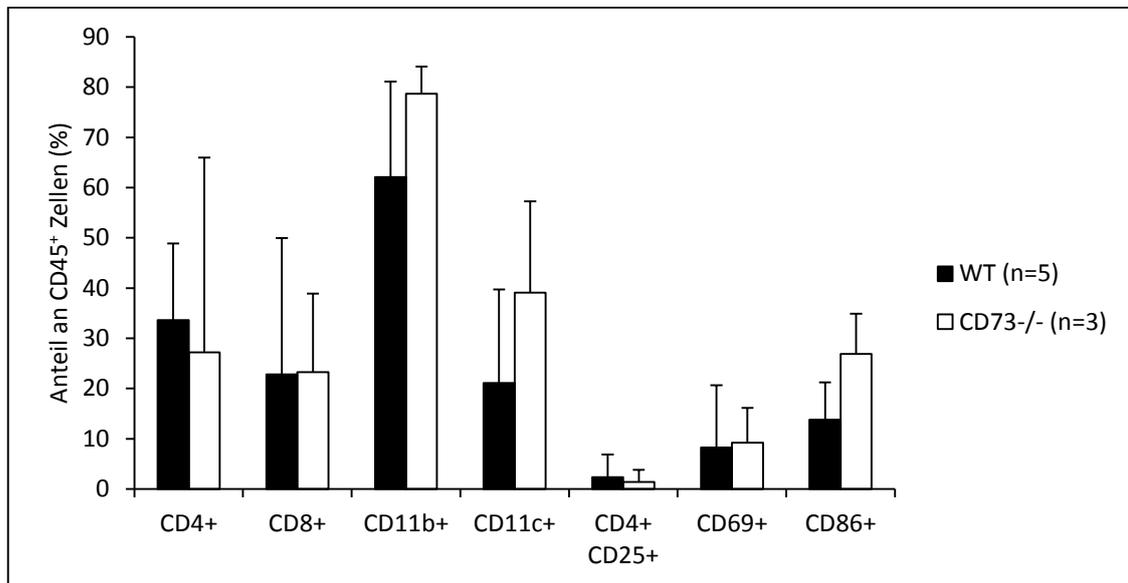
Um die Abhängigkeit des bisher verwendeten Tumormodells von der initialen Tumorlast zu untersuchen, wurde die Anzahl der injizierten B16-F10 Zellen auf ein Fünftel der bisher verwendeten Zellzahl verringert. Nach subkutaner Injektion von  $5 \times 10^4$  B16-F10 Zellen in den rechten Hinterlauf von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen wurde der wachsende Tumor mittels Kaliper über 24 Tage gemessen und das Tumolvolumen mittels der Näherungsformel  $\text{Volumen (mm}^3) = \text{Länge (mm)} \times \text{Breite (mm)} \times \text{Breite (mm)} \times 0.5$  wie in der Literatur üblich berechnet<sup>55</sup>. Ab Tag 17 verlangsamte sich das Tumorwachstum bei den CD73<sup>-/-</sup> Tieren, wobei der Unterschied zu den WT Tieren auch am Tag 24 nicht signifikant war (Abb. 14). Bei drei WT und zwei CD73<sup>-/-</sup> Mäusen war der Tumor am Tag 24 durch die Haut ulzeriert. Auch bei Ausschluss dieser Tiere bestätigte sich der Trend bei der CD73<sup>-/-</sup> Gruppe.



**Abb. 14: Kalipermessungen am B16-F10 Tumor von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion von  $5 \times 10^4$  B16-F10 Zellen.** Zellen wurden den Mäusen subkutan in den rechten Hinterlauf injiziert (Tag 0) und das Tumorwachstum über 24 Tage mittels Kaliper verfolgt. Tumolvolumen wurde nach der Formel  $\text{Volumen (mm}^3) = \text{Länge (mm)} \times \text{Breite (mm)} \times \text{Breite (mm)} \times 0.5$  berechnet.  $p = 0.47$  (Tag 24). Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 8 - 9$ ).

Bei FACS Analysen unter Ausschluss der ulzerierten Tumoren zeigte sich ein höherer Anteil an CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup> Zellen in der CD73<sup>-/-</sup> Gruppe, wenn auch der Unterschied zur WT Gruppe nicht signifikant war (Abb. 15). Dies spricht tendenziell für eine höhere entzündliche Aktivität in den Tumoren der CD73<sup>-/-</sup> Mäuse. Im Vergleich zu

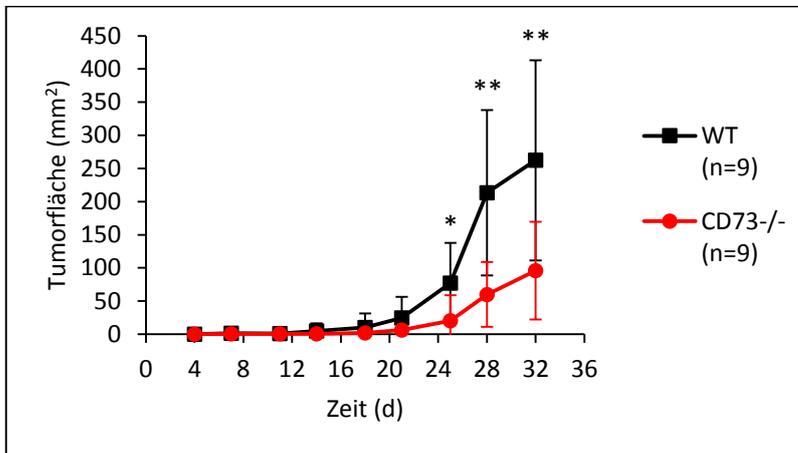
den Versuchen mit 5-fach höherer Zellzahl (Abb. 6) wurde hier bis auf CD8 über alle erfassten CD Marker hinweg höhere Anteile der einzelnen Immunzellpopulationen gemessen, was für eine erhöhte entzündliche Aktivität im Tumor bei reduzierter Zellzahl spricht. Auch unter Einschluss der ulzerierten Tumoren war diese Tendenz feststellbar.



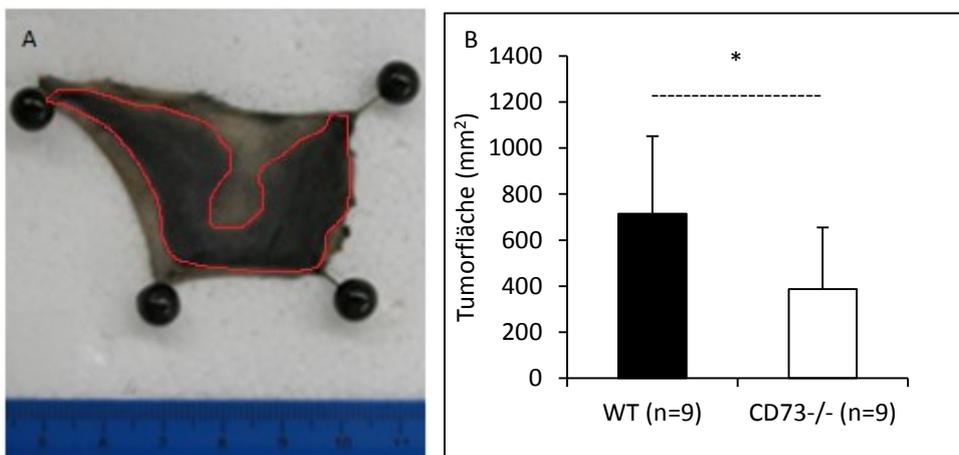
**Abb. 15: Immunzellpopulationen im B16-F10 Tumor von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion von  $5 \times 10^4$  B16-F10 Zellen.** Tumore wurden am Tag 24 nach subkutaner B16-F10 Injektion aus den Mäusen entfernt und die Zellen enzymatisch vereinzelt. Die gewonnene Zellsuspension wurde gegen CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD25, CD45, CD69 und CD86 für FACS Analyse gefärbt. Die einzelnen Immunzellpopulationen wurden als prozentualer Anteil an CD45<sup>+</sup> Zellen dargestellt. CD11b<sup>+</sup> ( $p = 0.20$ ). CD11c<sup>+</sup> ( $p = 0.23$ ). CD86<sup>+</sup> ( $p = 0.06$ ). Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 3 - 5$ ).

Nachdem sich Unterschiede zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäuse durch Reduktion der Zellzahl andeuteten, wurde die Tumormasse nochmal auf ein Fünftel der zuvor verwendeten Anzahl an B16-F10 Zellen reduziert.  $1 \times 10^4$  B16-F10 Zellen wurden diesmal subkutan in den rechten Hinterlauf von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen injiziert und das Tumorstadium mittels Kalipermessung über 32 Tage verfolgt. In Gegensatz zu den bisherigen Versuchen bildete sich bei den meisten Tieren kein erheblicher Tumor mehr aus, der die Haut nach außen vorwölbte. Stattdessen wurde die Haut diffus flächenhaft von den Tumorzellen infiltriert (Abb. 17A). Die Auswertung erfolgte daher durch Berechnung der Tumorphäche nach der Nährungsformel Fläche (mm<sup>2</sup>) = Länge (mm)  $\times$  Breite (mm). Tumore der CD73<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten ab Tag 21 ein deutlich verlangsamtes Wachstum, wobei der

Unterschied zu den WT Mäusen ab Tag 25 statistisch signifikant war (Abb. 16). Am Tag 32 machte das Tumorareal der CD73<sup>-/-</sup> Mäuse im Mittel lediglich ein Drittel von dem der WT Mäuse aus.



**Abb. 16: Kalipermessungen am B16-F10 Tumor von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion von  $1 \times 10^4$  Zellen.** Zellen wurden den Mäusen subkutan in den rechten Hinterlauf injiziert (Tag 0) und das Tumorwachstum über 32 Tage mittels Kaliper verfolgt. Tumorfläche wurde nach der Formel Fläche (mm<sup>2</sup>) = Länge (mm) × Breite (mm) berechnet. Mittelwert ± SD (n = 9). \* p < 0.05. \*\* p < 0.01.

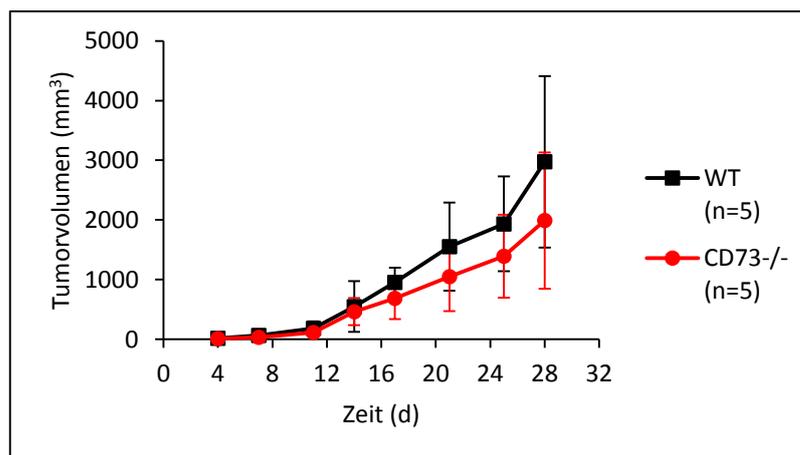


**Abb. 17: Tumorflächenmessungen am B16-F10 Tumor von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion von  $1 \times 10^4$  B16-F10 Zellen.** Zellen wurden den Mäusen subkutan in den rechten Hinterlauf injiziert (Tag 0) und Haut zur Flächenmessung mittels Adobe Photoshop am Tag 34 ausgeschnitten. (A) Das vom B16-F10 Zellen infiltrierte Hautareal (rot umrandet) imponierte in Gegensatz zur normalen Haut schwärzlich. (B) Tumorfläche von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen (p = 0.04). Mittelwert ± SD (n = 9). \* p < 0.05.

Da die Tumordinfiltration der Haut der Tiere teils recht inhomogen verlief (Abb. 17A), war es denkbar, dass die auf Basis von Kalipermessungen nährungsweise berechneten Tumorflächen das tatsächliche Areal ungenau widerspiegelten. Für die exakte Flächenbestimmung wurde die Haut der Mäuse daher am Tag 34 exzidiert, für planimetrische Messungen aufgespannt und mit Maßstab fotografiert (Abb. 17A). Hier bestätigte sich, dass die Tumorflächenausdehnung der CD73<sup>-/-</sup> Tiere statistisch signifikant geringer war als bei den WT Tieren (Abb. 17B). Jedoch betrug die Tumorfläche der CD73<sup>-/-</sup> Mäuse im Mittel nur noch die Hälfte von dem der WT Mäuse.

### 3.2.2 Versuche mit LLC Zellen

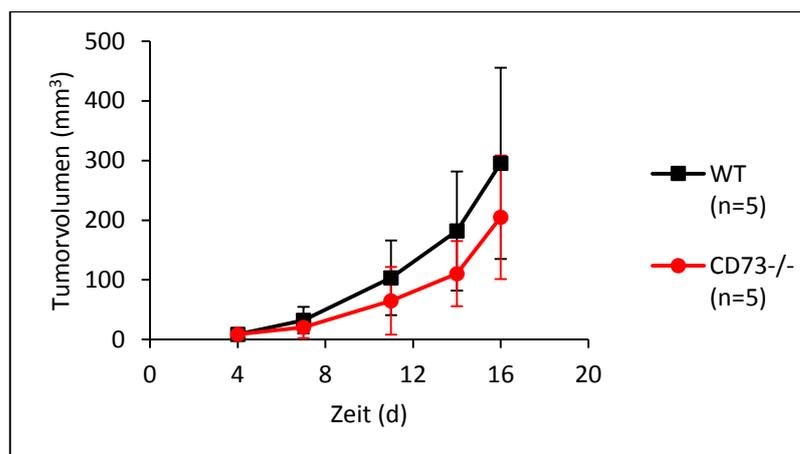
Nach den Versuchen mit B16-F10 Zellen im subkutanen Tumormodell wurde untersucht, inwieweit eine höhere tumoreigene CD73 Aktivität Auswirkungen beim bisher verwendeten Mausmodell hatte. Dazu wurden LLC Zellen, deren CD73 *in vitro* eine viermal höhere enzymatische AMPase-Aktivität zeigte, verwendet. WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen wurden subkutan  $50 \times 10^4$  LLC Zellen in den rechten Hinterlauf injiziert und die Tumore mittels Kaliper über 28 Tage gemessen. Das Tumolvolumen wurde nach der bereits verwendeten Formel berechnet.



**Abb. 18: Kalipermessungen am LLC Tumor von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion von  $50 \times 10^4$  LLC Zellen.** Zellen wurden den Mäusen subkutan in den rechten Hinterlauf injiziert (Tag 0) und das Tumorwachstum über 28 Tage mittels Kaliper verfolgt. Tumolvolumen wurde nach der Formel  $\text{Volumen (mm}^3\text{)} = \text{Länge (mm)} \times \text{Breite (mm)} \times \text{Breite (mm)} \times 0.5$  berechnet.  $p = 0.26$  (Tag 28). Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).

Ab Tag 17 zeigten die CD73<sup>-/-</sup> Tiere im Mittel gegenüber den WT Tiere ein verlangsamtes Tumorwachstum, das aber zu keinen Messzeitpunkt statistisch signifikant war (Abb. 18). Da alle Tumore ab Tag 14 durch die Haut ulzerierten und dies die Entzündungsaktivität der infiltrierenden Immunzellen deutlich moduliert, wurden keine FACS Analysen von den Immunzellpopulationen im Tumor durchgeführt.

Da die bisherigen Versuchen mit B16-F10 Zellen eine Abhängigkeit des Tumorwachstums von der initialen Tumorlast zeigte, wurde LLC Zellzahl ebenfalls auf ein Fünftel der vorherigen Versuchsserie reduziert. Nach subkutaner Injektion von  $10 \times 10^4$  LLC Zellen wurden in WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäuse die Tumore mittels Kaliper über 16 Tage verfolgt. Bei der CD73<sup>-/-</sup> Gruppe verlangsamte sich das Tumorwachstum ab Tag 11, wobei auch hier der Unterschied zu keinem Messzeitpunkt statistisch signifikant war (Abb. 19). Bis Tag 16 waren die Tumore von drei WT und vier CD73<sup>-/-</sup> Mäusen durch die Haut ulzeriert, sodass keine FACS Analysen vom Tumor durchgeführt wurden.



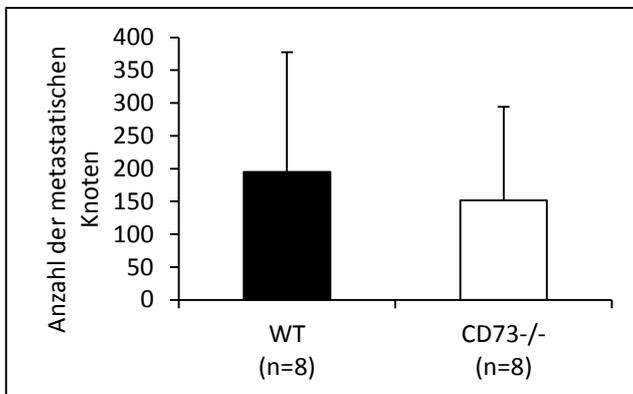
**Abb. 19: Kalipermessungen am LLC Tumor von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion von  $10 \times 10^4$  LLC Zellen.** Zellen wurden den Mäusen subkutan in den rechten Hinterlauf injiziert (Tag 0) und das Tumorwachstum über 16 Tage mittels Kaliper verfolgt. Tumolvolumen wurde nach der Formel  $\text{Volumen (mm}^3\text{)} = \text{Länge (mm)} \times \text{Breite (mm)} \times \text{Breite (mm)} \times 0.5$  berechnet.  $p = 0.32$  (Tag 16). Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 5$ ).

Somit konnte im subkutanen Tumormodell mit LLC Zellen im Gegensatz zu den Versuchen mit B16-F10 Zellen keine Abhängigkeit des Tumorwachstums von der initialen Zellzahl, mit der die Mäuse belastet wurden, festgestellt werden. Da auch der Zeitpunkt der Ulzeration nicht durch Reduktion der Zellzahl wesentlich beeinflusst werden konnte

und dadurch nachfolgende Untersuchungen zur Immunzellantwort im Tumor nicht durchführbar waren, wurden keine weiteren Versuche mit LLC Zellen durchgeführt.

### 3.3 Intravenöses Tumormodell mit B16-F10 Zellen

Für die Untersuchung der Rolle der körpereigenen CD73 bei der hämatogenen Metastasierung von Tumoren wurde ein Modell an der Maus benutzt, bei dem der Grad der Lungenmetastasierung nach direkter intravenöser Tumorzellapplikation untersucht wurde.



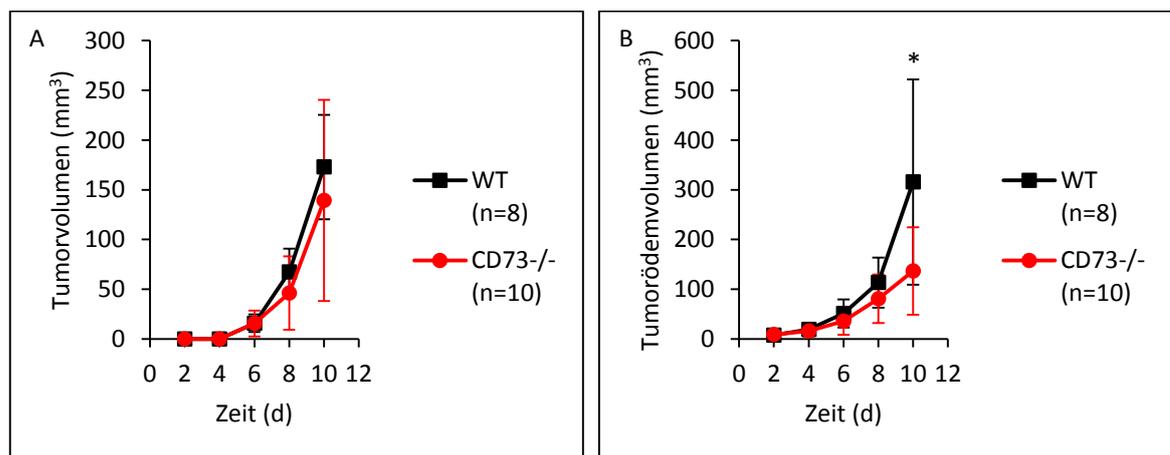
**Abb. 20: Lungenmetastasierung von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen nach intravenöser B16-F10 Injektion.**  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen wurden den Mäusen intravenös in die Schwanzvene injiziert (Tag 0). Beide Lungen wurden am Tag 10 zur Auszählung der auf beiden Lungenoberflächen sichtbaren metastatischen Knoten entfernt. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 8).

Insgesamt  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen wurden intravenös in die Schwanzvene von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen injiziert und die Gesamtanzahl der auf beiden Lungenoberflächen sichtbaren metastatischen Knoten nach 10 Tagen gezählt. Dabei wurden kein Unterschied bei der hämatogenen Metastasierung zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Tieren festgestellt (Abb. 20).

### 3.4 Intradermales Tumormodell mit B16-F10 Zellen

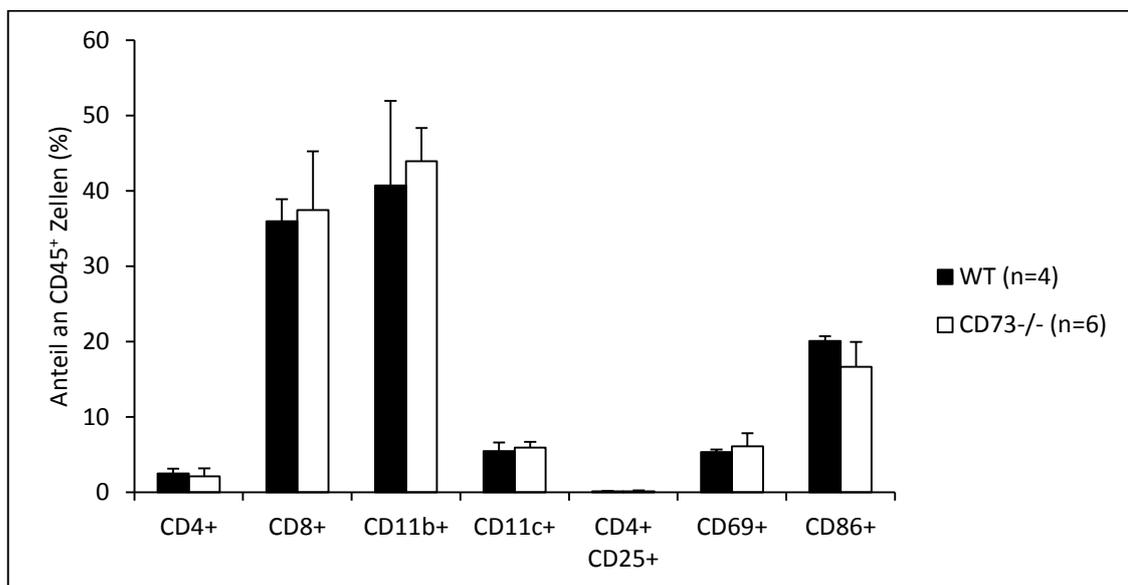
#### 3.4.1 Untersuchungen an CD73<sup>-/-</sup> Mäusen

Da die bisherigen Untersuchungen zur Immunzellantwort im B16-F10 Tumor keinen Unterschied zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten, wurde ein Tumormodell mit einer potentiell höheren Immunreaktion gegen Tumorzellen gesucht. Beim spontan wachsenden Malignen Melanom kommt es normalerweise in der Epidermis und Dermis zum Erstkontakt zwischen Immunsystem und Tumorzellen<sup>103</sup>, weshalb eine Tumorzellapplikation in der Dermis die resultierende Immunreaktion realistischer abbilden würde. Wie in der Literatur beschrieben<sup>99</sup> wurden  $1 \times 10^6$  B16-F10 Zellen intradermal in die rechte Flanke von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen injiziert und das Tumorstadium mittels MRT Aufnahmen über 10 Tage wie bereits erläutert verfolgt. In der Tumorstadium zeigte sich kein Unterschied zwischen der WT und CD73<sup>-/-</sup> Gruppe (Abb. 21A). Ab Tag 8 verkleinerte sich jedoch das Ausmaß der entzündlichen Ödemzone um den Tumor von CD73<sup>-/-</sup> Tiere, wobei der Unterschied am Tag 10 gegenüber der WT Gruppe statistisch signifikant war (Abb. 21B).



**Abb. 21: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen nach intradermaler Injektion.**  $1 \times 10^6$  B16-F10 Zellen wurden den Mäusen intradermal in die rechte Flanke injiziert (Tag 0) und das Tumorstadium über 10 Tage mittels MRT verfolgt. (A) Tumorstadium. (B) Tumorödenvolumen. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 8 – 10). \* p < 0.05.

Zur Charakterisierung der Immunzellantwort im Tumor wurden diese nach dem bekannten Protokoll einer FACS Analyse unterzogen. Hierbei wurden keine Unterschiede in den einzelnen Immunzellpopulationen des Tumors von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt (Abb. 22). Wie schon im subkutanen Tumormodell mit  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen (Abb. 6) wurde die Entzündungsreaktion auch hier vor allem von CD11b<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen dominiert. Im Vergleich zeigte sich im intradermalen Ansatz im Mittel ein höherer Anteil an CD69<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup> Zellen sowie ein geringerer Anteil an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Zellen, während die anderen Immunzellpopulationen ähnlich stark vertreten waren.



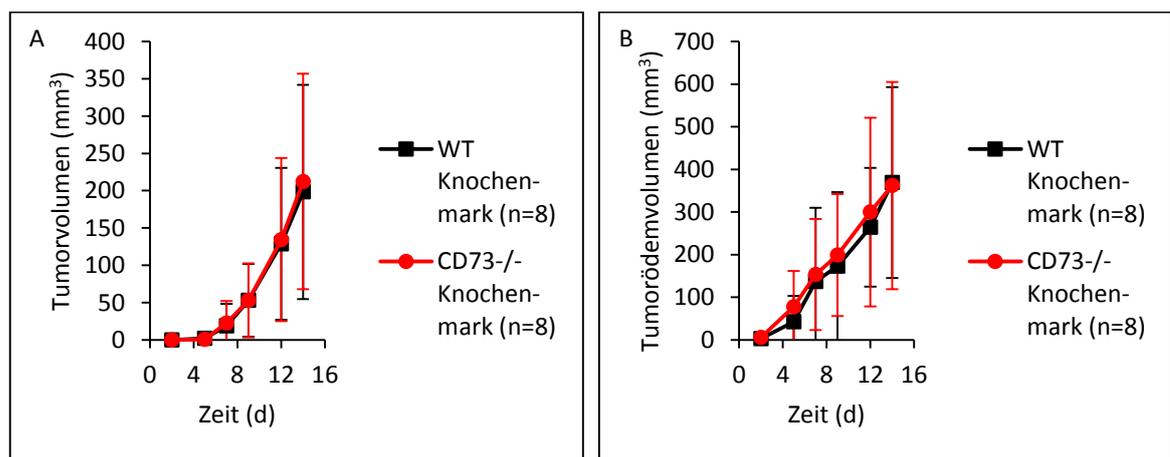
**Abb. 22: Immunzellpopulationen im B16-F10 Tumor von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen nach intradermaler Injektion.** Tumore wurden am Tag 10 nach intradermaler B16-F10 Injektion ( $1 \times 10^6$ ) aus den Mäusen entfernt und die Zellen enzymatisch vereinzelt. Die gewonnene Zellsuspension wurde gegen CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD25, CD45, CD69 und CD86 für die FACS Analyse gefärbt. Die einzelnen Immunzellpopulationen wurden als prozentualer Anteil an CD45<sup>+</sup> Zellen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 4 – 6).

### 3.4.2 Untersuchungen an knochenmarktransplantierten Mäusen

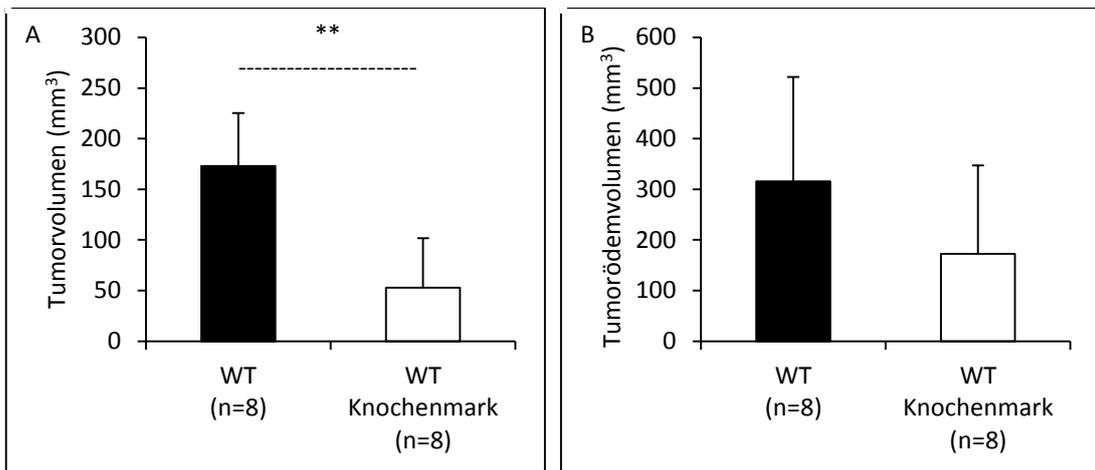
Weil bei den CD73<sup>-/-</sup> Mäusen das den Tumor umgebene entzündliche Ödemareal signifikant kleiner war als bei WT Tieren, wurde als nächstes untersucht, ob dieser Effekt spezifisch von der CD73 auf den hämatopoetischen Zellen vermittelt wurde. Analog zur letzten Versuchsreihe wurden  $1 \times 10^6$  B16-F10 Zellen intradermal in die rechte Flanke von

WT oder CD73<sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Mäusen injiziert und das Tumorstadium über 14 Tage mittels MRT verfolgt. Im Gegensatz zu den Versuchen mit WT und CD73<sup>-/-</sup> Tieren (Abb. 21) zeigten sich hierbei weder im Tumorstadium noch im Tumorstadium ein Unterschied zwischen WT oder CD73<sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Tieren (Abb. 23). Somit konnte der Unterschied im Tumorstadium nicht auf eine selektive fehlende CD73 Expression auf hämatopoetischen Zellen zurückgeführt werden.

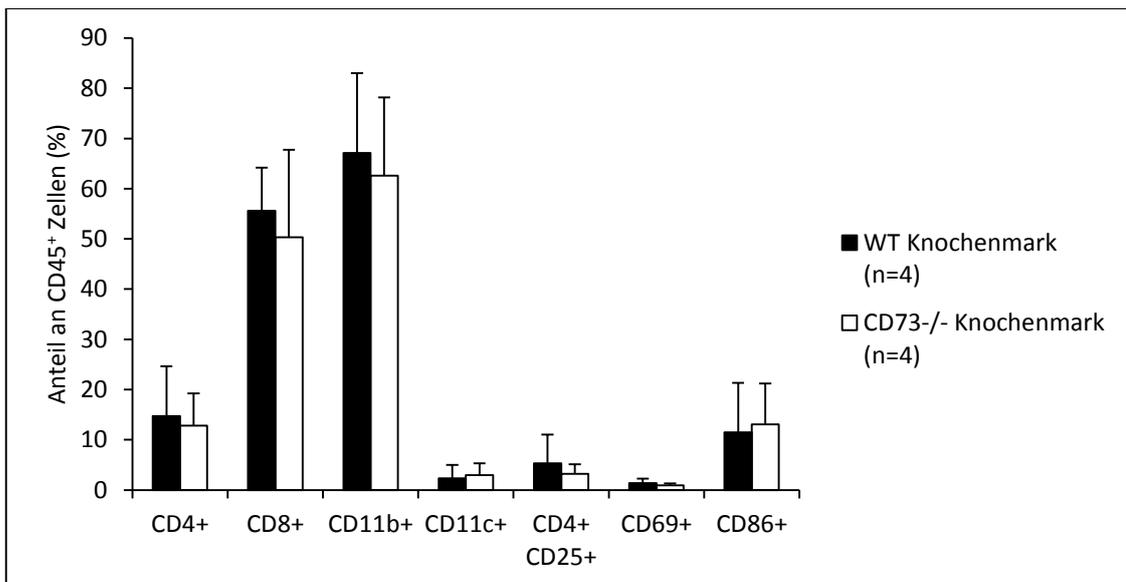
Das Tumorstadium der knochenmarktransplantierten Tiere zeigte im zeitlichen Verlauf ein fast lineares Wachstumsmuster, während dasselbe Areal bei den WT und CD73<sup>-/-</sup> Tiere eher exponentiell wuchs (Abb. 21). Im direkten Vergleich fiel auf, dass das Tumorstadium der WT knochenmarktransplantierten WT Mäuse im Mittel nur etwa die Hälfte der Ausdehnung des Tumorstadiums der entsprechenden WT Mäuse ohne Transplantation erreichte (Abb. 24B), allerdings wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht. Auch bei der Tumorstadium erreichten die knochenmarktransplantierten Tiere im Mittel lediglich etwa ein Drittel der Größe der nicht-transplantierten Tiere (Abb. 24A), wobei hier der Unterschied statistisch signifikant war. Dieser Zusammenhang war bereits in qualitativ gleicher Ausprägung von den Versuchen im subkutanen Tumorstadium bekannt (Abb. 12).



**Abb. 23: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von WT oder CD73<sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach intradermaler Injektion.** WT Mäuse wurden nach Ganzkörperbestrahlung mit WT oder CD73<sup>-/-</sup> Knochenmark transplantiert.  $1 \times 10^6$  B16-F10 Zellen wurden den knochenmarktransplantierten Mäusen intradermal in die rechte Flanke injiziert (Tag 0) und das Tumorstadium über 14 Tage mittels MRT verfolgt. (A) Tumorstadium. (B) Tumorstadiumvolumen. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 8).

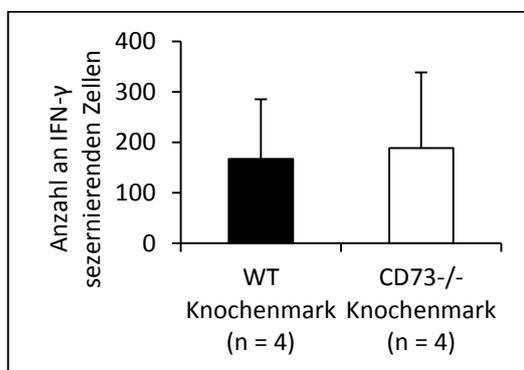


**Abb. 24: MRT-Messungen am B16-F10 Tumor von WT und WT knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach intradermaler Injektion.**  $1 \times 10^6$  B16-F10 Zellen wurden den Mäusen intradermal in die rechte Flanke injiziert (Tag 0) und die Tumorgöße am Tag 10 (WT Mäuse) oder Tag 9 (WT knochenmarktransplantierte WT Mäuse) mittels MRT bestimmt. (A) Tumorvolumen ( $p = 0.0003$ ). (B) Tumorödenvolumen ( $p = 0.16$ ). Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 8$ ). \*\*  $p < 0.01$ .



**Abb. 25: Immunzellpopulationen im B16-F10 Tumor von WT oder CD73<sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach intradermaler Injektion.** Tumore wurden am Tag 14 nach intradermaler B16-F10 Injektion ( $1 \times 10^6$ ) aus den Mäusen entfernt und die Zellen enzymatisch vereinzelt. Die gewonnene Zellsuspension wurde gegen CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD25, CD45, CD69 und CD86 für die FACS Analyse gefärbt. Die einzelnen Immunzellpopulationen wurden als prozentualer Anteil an CD45<sup>+</sup> Zellen dargestellt. Mittelwert  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

FACS Analysen der Tumore zeigten keinen Unterschied in der Zusammensetzung der einzelnen Immunzellpopulationen zwischen beiden Gruppen (Abb. 25). Im Vergleich zu den Ergebnissen aus der Versuchsserie mit WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen fällt auf (Abb. 22), dass mit Ausnahme der CD11c<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup> Zellen der Immunzellanteil über alle restlichen gemessenen Populationen im Mittel erhöht war, was für eine höhere entzündliche Reaktion in den B16-F10 Tumoren der knochenmarktransplantierten Mäusen spricht. Die Verteilung dagegen war ähnlich mit den CD11b<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen als dominierenden Anteil an allen Immunzellen. Auch diese Zusammenhänge waren vergleichbar bereits bei den subkutanen Versuchen festgestellt worden (Kap. 3.2.1.3).



**Abb. 26:** Anzahl an IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen im B16-F10 Tumor von WT oder CD73<sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach intradermaler Injektion. Tumore wurden am Tag 14 nach intradermaler B16-F10 Injektion ( $1 \times 10^6$ ) aus den Mäusen entfernt und die Zellen enzymatisch vereinzelt. Aus der gewonnenen Zellsuspension wurden  $2 \times 10^5$  Zellen für den IFN- $\gamma$  ELISpot eingesetzt. Die Anzahl an IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen pro  $2 \times 10^5$  Zellen des Tumors wurden gezeigt. Mittelwert  $\pm$  SD (n = 4).

Zur Messung des Aktivierungsgrades der Immunzellen im B16-F10 Tumor wurden ein Teil der für die FACS Analysen vereinzelt Zellen des Tumors für den IFN- $\gamma$  ELISpot verwendet. Dabei wurde kein Unterschied in der Anzahl an IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen im Tumor von WT oder CD73<sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Tieren festgestellt (Abb. 26).

## 4 Diskussion

### 4.1 Einfluss von CD73 auf das Wachstum von B16-F10

#### Tumoren nach subkutaner Applikation

Die Ecto-5'-Nukleotidase (CD73), welche AMP zu Adenosin dephosphoryliert, stellt einen wichtigen Beitrag zur extrazellulären Adenosinproduktion in der Tumormikroumgebung dar<sup>10,12,104</sup>. In der Literatur wird häufig ein Modell postuliert, nach dem das durch Tumor- und Immunzellen freigesetzte ATP durch Ecto-Nukleotidasen wie die CD39 und CD73 zu Adenosin abgebaut wird, das dann über seine immunsuppressiven sowie proangiogenetischen Wirkungen das Tumorwachstum weiter stimuliert<sup>10,12,104</sup>. Dieser stimulatorische Effekt auf das Tumorwachstum konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Zur Untersuchung des Einflusses der körpereigenen CD73 auf das Tumorwachstum wurde ein in der Literatur gut etabliertes *in vivo* Modell verwendet, bei dem murine B16-F10 Melanomzellen subkutan in den Hinterlauf der Mäuse injiziert wurden<sup>105</sup> um das Tumorwachstum zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäuse zu vergleichen. Bei der Verwendung einer mit der Literatur vergleichbaren Tumorlast von  $25 \times 10^4$  B16-F10 Zellen<sup>105-107</sup> zeigten MRT Messungen des Tumolvolumens im Verlauf keine Unterschiede im Tumorwachstum zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Tiere (Abb. 5). Entsprechend führte auch ein endothelspezifischer CD73 *Knockout* (Abb. 9) bzw. ein selektiver Verlust der CD73 auf hämatopoetischen Zellen durch Knochenmarktransplantation (Abb. 11) zu keinem veränderten Wachstumsverhalten der Tumoren. Erst bei deutlich verringerter Zellzahl ( $5 \times 10^4$ ) verlangsamte sich das Tumorwachstum in der CD73<sup>-/-</sup> Gruppe (Abb. 14), wobei der Unterschied erst bei nochmaliger Reduktion der Tumorlast ( $1 \times 10^4$ ) statistisch signifikant zur WT Gruppe war (Abb. 16, Abb. 17B). Interessanterweise wölbte der Tumor bei der niedrigsten Zellzahl ( $1 \times 10^4$ ) nicht wie zuvor beobachtet die Haut der Mäuse nach außen vor. Stattdessen wurde die Haut bei den meisten Tieren lediglich flächenhaft durch die Tumorzellen infiltriert, ohne dabei eine sichtbare Vorwölbung der Haut hervorzurufen (Abb. 17A). Diese Resultate stehen im Gegensatz zu denen von anderen Arbeitsgruppen, die im gleichen Tumormodell eine ähnliche oder sogar höhere Anzahl an B16-F10 Zellen

injiziert haben <sup>105-109</sup> und über signifikante Unterschiede berichteten. Mögliche Gründe für diese Unterschiede sollen im Folgenden diskutiert werden.

Yegutkin *et al.* fand nach subkutaner Injektion von Luciferase-transfizierten B16-F10 Zellen ( $4 \times 10^5$ ) in die Hinterläufe ein signifikant reduziertes Tumorwachstum in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen gemessen am Tumolvolumen und Luciferase Signal des implantierten Tumors <sup>107</sup>. Eine mögliche Erklärung in Anbetracht der hier erhobenen Ergebnisse könnte sein, dass die Zellen durch die Transfektion mit Luciferase gegenüber der Ausgangszelllinie B16-F10 verändert sind. So wurde z.B. über ein gehemmtes Tumorwachstum von Luciferase-transfizierten B16-F1 Melanomzellen ( $1 \times 10^5$ ) verglichen mit den Ausgangszellen im Mausmodell nach Injektion der Tumorzellen in die Ohrmuschel berichtet <sup>110</sup>. Auch ist bemerkenswert, dass bei einem Wechsel des Injektionsortes an die Ohrmuschel Yegutkin *et al.* weder im Tumolvolumen noch im Luciferase Signal signifikante Unterschiede zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen messen konnten <sup>107</sup>.

Stagg *et al.* <sup>105</sup> bzw. Wang *et al.* <sup>108</sup> wiesen im Mausmodell mit B16-F10 Zellen ein moderat abgeschwächtes Tumorwachstum bei subkutaner Injektion von  $2 \times 10^5$  bzw.  $1 \times 10^6$  B16-F10 Zellen in CD73<sup>-/-</sup> Tieren nach, wobei teilweise das Signifikanzniveau erreicht wurde. Koszalka *et al.* konnten bei noch höherer Anzahl an B16-F10 Zellen ( $2.5 \times 10^6$ ) ebenfalls ein signifikant gehemmtes Tumorwachstum in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen nachweisen <sup>109</sup>. Kritisch ist hier anzumerken, dass diese Arbeitsgruppen lediglich fünf oder sechs Mäuse pro Gruppe verwendeten <sup>105,108,109</sup>, während in dieser Arbeit doppelt so viele Tiere in den beiden Gruppen ( $n = 10$ ) eingesetzt wurden. Bei der bekannten starken Variabilität des verwendeten Tumormodells <sup>106,107</sup>, die sich auch in der vorliegenden Arbeit an der hohen Standardabweichung der einzelnen Gruppen zeigte (Abb. 5), könnte möglicherweise die zufällige Streuung der Ergebnisse eine Rolle spielen. Auch wurden von diesen Arbeitsgruppen die Tumorgrößen mittels Kaliper und Nahrungsformel abgeschätzt <sup>105,108,109</sup>, was gegenüber den in dieser Arbeit verwendeten MRT Verfahren sich durch eine geringere Messgenauigkeit auszeichnet.

Einen pharmakologischen Ansatz zur Untersuchung der Rolle von CD73 im Tumorkontext verfolgten Forte *et al.*, die im subkutanen Mausmodell nach B16-F10 Applikation ( $3 \times 10^5$ ) die enzymatische Aktivität der CD73 durch peritumorale Injektion von AOPCP, einem Inhibitor der CD73, oder anti-CD73 Antikörper blockierten <sup>106</sup>. Hierbei zeigten die Tumore in der mit AOPCP bzw. anti-CD73 Antikörper behandelten Gruppe ein signifikant gehemmtes Wachstum <sup>106</sup>. Im Gegensatz zu den CD73<sup>-/-</sup> Mäusen, wo die CD73 auf allen

Körperzellen, nicht aber auf den B16-F10 Zellen fehlt, hemmt die Applikation von AOPCP bzw. anti-CD73 Antikörper neben der körpereigenen auch die CD73 auf den Tumorzellen in ihrer enzymatischen Aktivität. Unklar ist außerdem, inwieweit die Hemmung der CD73 durch AOPCP bzw. anti-CD73 Antikörper vollständig war und wie lange der Hemmeffekt anhielt. Schließlich könnten Nebenwirkungen von *in vivo* appliziertem AOPCP bzw. anti-CD73 Antikörper nicht ausgeschlossen werden.

Weitere potentielle Einflussfaktoren auf die Ergebnisse könnten in der Versuchsdurchführung selbst liegen. Um mögliche Störfaktoren auf ein Minimum zu beschränken, wurde dabei der experimentelle Ablauf in hohem Maße standardisiert und berücksichtigte folgende potentielle Variablen:

1. Für die Injektionen wurden zwecks Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsreihen nur frisch aufgetaute B16-F10 Zellen der gleichen Passage verwendet. Die Vitalität der Zellen wurde dabei immer mittels Trypanblau vor der Injektion sichergestellt.
2. Die gesamte Aufbereitung und Lagerung der Tumorzellen fand bei 4°C statt und alle Injektionen wurden innerhalb von zwei Stunden nach Zellentnahme abgeschlossen, um einen zeitlichen Einfluss auf die Qualität der B16-F10 Zellen zu minimieren.
3. Mittels regelmäßiger Kontrolluntersuchungen auf Mykoplasmen konnte eine Veränderung der Zelleigenschaften durch Kontamination ausgeschlossen werden.
4. Für jede Tumorzellinjektion in eine Maus wurde eine separate Einmalspritze mit eingeschweißter Kanüle verwendet, die sich durch einen geringeren Totraumvolumen gegenüber Spritzen mit aufgesetzter Kanüle auszeichneten. Dadurch sollte eine eventuelle Schwankung im injizierten Volumen und damit Zellzahl minimiert werden.
5. Die Haut der Mäuse wurde an der Injektionsstelle vorher rasiert, um eine bestmögliche standardisierte Injektionsposition und -tiefe in der Haut zu ermöglichen.
6. Eine kurzfristige Inhalationsnarkose der Maus über eine Maske diente der Bewegungsreduktion der Tiere und damit einer eventuellen Fehlpositionierung der Kanüle während der Injektion.
7. Den Mäusen der jeweiligen Versuchs- und Kontrollgruppe wurden die Tumorzellen jeweils alternierend appliziert, damit sich Reihenfolgeeffekte auf beide Gruppen gleich verteilten.

Des Weiteren wäre denkbar, dass sich der genetische Hintergrund der verwendeten CD73<sup>-/-</sup> Mäuse von denen der anderen Arbeitsgruppen unterscheidet. Das CD73 Gen der in dieser Arbeit sowie von Koszalka *et al.* verwendeten *Knockout* Mäuse wurde durch homologe Rekombination und Aktivierung des Cre-loxP Systems inaktiviert<sup>98</sup> und ermöglicht somit die Herstellung von endothelspezifischen CD73<sup>-/-</sup> Mäusen. Dagegen wurden die CD73<sup>-/-</sup> Mäuse der anderen Arbeitsgruppen<sup>105,107,108</sup> nach den von Thompson *et al.* beschriebenen Verfahren durch konventionellen *Knockout* erzeugt<sup>111</sup>. Die unterschiedliche Positionierung der Rekombinationssequenz zur Inaktivierung des CD73 Gens beim jeweiligen *Knockout* System könnte hierbei eine Rolle gespielt haben. Dass Positionseffekte eine Rolle spielen könnten, zeigt die Beobachtung, dass in den Versuchen an endothelialen CD73<sup>-/-</sup> Mäusen die loxP Kontrolltiere gegenüber den WT Kontrolltieren (der CD73<sup>-/-</sup> Mäuse) deutlich erhöhte Tumorumfänge und Tumoredemvolumina nach B16-F10 Injektion zeigten (Abb. 10). Obwohl die CD73 bei den loxP und WT Mäusen intakt war und die Tiere damit genetisch vergleichbar, zeigten sich deutliche Unterschiede im Phänotyp beim Tumorwachstum.

Auch bei den Versuchen mit knochenmarktransplantierten Tieren zeigten sich Unterschiede im Tumorwachstum: sowohl Tumorumfang als auch Tumoredemvolumen der WT Tiere, die mit WT Knochenmark transplantiert wurden, waren signifikant erniedrigt gegenüber dem der WT Tiere ohne Knochenmarktransplantation (Abb. 12). Ein ähnliches Phänomen wurde auch im Tumormodell an MC38-ova Kolonkarzinomen<sup>105</sup> und B16-SIY Melanomen<sup>108</sup> beobachtet, wo das Tumorwachstum in WT Mäusen mit WT Knochenmark gegenüber WT Mäusen ohne Knochenmarktransplantation trotz intakter CD73 in beiden Fällen ebenfalls deutlich verlangsamt war. Eine weitere Variable kommt noch dazu: knochenmarktransplantierte Mäuse waren zum Zeitpunkt der Tumorzellinjektion ungefähr 14 Wochen alt, während WT Mäuse sechs bis zehn Wochen alt waren.

Ein weiterer Einflussfaktor könnte der Gesundheitszustand der Mäuse selbst sein. Neuere Erkenntnisse zeigten nämlich, dass die Darmflora einen erheblichen Einfluss auf das endokrine System und das Immunsystem haben kann<sup>112,113</sup>. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Darmflorazusammensetzung zwischen den Mäusen allein schon durch eine gemeinsame Haltung übertragbar ist und dadurch metabolische Erkrankungen in vormals gesunden Tieren induziert werden kann<sup>112</sup>. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäuse zeigten mikrobiologische Routineuntersuchungen entsprechend den Empfehlungen der FELESA (*Federation of European Laboratory Animal Science*

*Associations*)<sup>114</sup> keine Evidenz für häufige murine Pathogene außer für *Pasteurellaceae* und *Protozoa*. Über den Gesundheitszustand der Mäuse der anderen Arbeitsgruppen liegen entweder keine Informationen vor<sup>105-108</sup> oder die Haltung fand unter SPF (*specific pathogen free*) Bedingungen statt<sup>109</sup>. Daher wäre es denkbar, dass mögliche Unterschiede im Gesundheitszustand der verwendeten Mäuse auch zu Veränderungen in der Tumorummunzellantwort führte und dadurch die abweichenden Ergebnisse bedingte.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigten, dass ein signifikant verlangsamtes Tumorwachstum im subkutanen Modell an CD73<sup>-/-</sup> Mäusen erst bei deutlicher Reduktion der Anzahl an injizierten B16-F10 Zellen auftritt (Abb. 16). Die extrazelluläre Adenosinkonzentration in der Tumormikroumgebung wird dabei hauptsächlich durch die Aktivität der CD73 auf Immun-, Endothel- und Tumorzellen bestimmt<sup>10</sup>. Bei den Versuchen mit hoher Zellzahl war der Beitrag durch die CD73 auf Immun- und Endothelzellen wahrscheinlich durch die limitierte Tumolvaskularisation bei fortschreitendem Wachstum begrenzt, auch erkennbar an Nekrosen im Tumorkern im MRT und nach Tumorextraktion. Dadurch würde in Verhältnis die Bedeutung der CD73 auf den B16-F10 Zellen für die intratumorale Adenosinproduktion wahrscheinlich deutlich zunehmen. Dagegen wuchs der Tumor bei niedriger Zellzahl eher flächig ohne sichtbare Volumenzunahme, was eher für eine adäquate Tumorgefäßversorgung spricht und möglicherweise ein eher ausgeglichenes Verhältnis zwischen der CD73 auf den Tumorzellen und auf den Körperzellen im Tumor bedingt. Unter Annahme dieser Hypothesen würde ein CD73 *Knockout* bei hoher applizierter Zellzahl auf die Adenosinkonzentration im Tumormikromilieu womöglich nur einen geringen Einfluss haben, weil der Beitrag der CD73 auf den Tumorzellen das der körpereigenen Zellen in diesem Fall deutlich übertrifft. Dann wäre lediglich ein kaum messbarer Unterschied im Tumorwachstum in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber WT Mäusen zu erwarten wie auch gemessen wurde (Abb. 5). Erst bei reduzierter Zellzahl würde ein CD73 *Knockout* auf den Körperzellen einen erheblichen Beitrag zur Adenosinproduktion im Tumormilieu entfernen, sodass ein signifikanter Unterschied im Tumorwachstum in den CD73<sup>-/-</sup> Mäusen messbar wird (Abb. 16). Zwar wurde auf B16-F10 Zellen *in vitro* nur eine sehr geringe AMPase Aktivität gemessen (Abb. 3), was auch mit entsprechenden FACS Daten anderer Autoren übereinstimmt<sup>105,107</sup>. Allerdings muss bedacht werden, dass durch die exponentielle Vermehrung der Tumorzellen *in vivo* deren Beitrag zur Adenosinproduktion mit fortlaufender Versuchsdauer stark zunehmen kann. Auch ist unklar, ob B16-F10

Zellen, die intrazellulär scheinbar über eine große Reserve an CD73 verfügen<sup>109</sup>, *in vivo* ihre CD73 Expression hochregulieren.

Während die Literatur vorwiegend die immunsuppressiven sowie proangiogenetischen Wirkungen von Adenosin hervorhebt und damit tumorwachstumsstimulierende Effekte postuliert<sup>10,12,104</sup>, sind für B16-F10 Zellen auch wachstumshemmende Effekte durch Adenosin beschrieben worden. Madi *et al.* zeigten, dass die Gabe von A3R Agonisten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* das Wachstum von B16-F10 Zellen hemmen<sup>55</sup>. Versuche von Morello *et al.* identifizierten NK Zellen und CD8<sup>+</sup> Zellen als zusätzliche Vermittler des beobachteten Effektes *in vivo*, da eine Depletion dieser Zellpopulationen die wachstumshemmende Wirkung von A3R Agonisten auf B16-F10 Tumore in Mäusen rückgängig machte<sup>97</sup>. Für Adenosin sind somit sowohl stimulierende als auch hemmende Wirkungen aufs Tumorwachstum beschrieben worden. Die Verteilung von Tumor-, Immun- und Endothelzellen sowie deren jeweilige Adenosinrezeptorexpression in der Tumorumgebung bestimmen letztlich, ob bei einer bestimmten Adenosinkonzentration in der Summe das Tumorwachstum stimuliert oder gehemmt wird. Bei Annahme der oben genannten Hypothese, dass bei hoher Zellzahl der CD73 Anteil der Körperzellen gegenüber den der B16-F10 Zellen vernachlässigbar wäre, wäre eine Adenosinkonzentration im Tumormilieu denkbar, wo die Adenosinwirkungen aufs Tumorwachstum sich insgesamt aufheben (Abb. 5). Dagegen wäre bei reduzierter Zellzahl eine Adenosinkonzentration denkbar, wo in der Summe die wachstumsstimulierenden Effekte von Adenosin überwiegen würden, sodass dann eine signifikante Wachstumshemmung in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen messbar wurde (Abb. 16).

Als weitere Tumorzelllinie wurden im subkutanen Tumormodell murine LLC Lungenkarzinomzellen eingesetzt, die sich gegenüber B16-F10 Zellen durch eine deutlich höhere enzymatische CD73 Aktivität *in vitro* auszeichneten (Abb. 3). Nach subkutaner Injektion von LLC Zellen ( $50 \times 10^4$  bzw.  $10 \times 10^4$ ) war im Mittel das Tumorwachstum in den CD73<sup>-/-</sup> Mäusen verlangsamt, wobei der Unterschied zu keinem Zeitpunkt signifikant zur WT Gruppe war (Abb. 18, Abb. 19). Auch der Ulzerationszeitpunkt der meisten Tumore nach etwa zwei Wochen war nicht zellzahlabhängig, sodass keine weiteren Versuche mit LLC Zellen durchgeführt wurden.

Vermutlich spielen auch hier wie schon bei den B16-F10 Zellen gegensätzliche Wirkungen von Adenosin auf das Wachstum der LLC Zellen eine Rolle. So wurde *in vitro* eine Hemmung des Wachstums von LLC Zellen<sup>115</sup> durch A3R Agonisten wie auch schon bei

B16-F10 Zellen<sup>55</sup> beobachtet. Dagegen wurde in *ex vivo* Experimenten eine Inhibition der zytotoxischen Aktivität von NK Zellen gegenüber LLC Zellen unter Adenosinabgabe beobachtet, wobei die Adenosinwirkung auf NK Zellen aus A2AR<sup>-/-</sup> Mäusen abgeschwächt war<sup>67</sup>, woraus *in vivo* eine reduzierte tumorgerichtete Immunantwort durch Adenosin resultieren könnte. Auch zeigten LLC Tumore ein verlangsamtes Wachstum nach subkutaner Injektion in A2BR<sup>-/-</sup> Mäuse, wofür eine verminderte Sekretion von VEGF durch intratumorale CD45<sup>+</sup> Immunzellen verantwortlich gemacht wurde<sup>95</sup>. Diese gegensätzlichen Wirkungen von Adenosin auf das Wachstum der LLC Zellen könnten die schwache Wachstumshemmung in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen erklären (Abb. 18, Abb. 19).

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass in der vorliegenden Arbeit keine robusten Effekte für eine wachstumsstimulierende Wirkung von körpereigenen CD73 auf murine B16-F10 Melanomzellen bei subkutaner Applikation gefunden wurden. Entsprechend sollte auch eine pharmakologische Hemmung der CD73 keine Hemmung des Tumorwachstums auslösen.

## **4.2 Einfluss von CD73 auf das Wachstum von B16-F10 Tumoren nach intradermaler Applikation**

Als alternatives Modell wurde in der vorliegenden Arbeit eine intradermale Applikation der B16-F10 Zellen gewählt, da beim spontanen Malignen Melanom normalerweise in der Epidermis und Dermis es zum Erstkontakt zwischen Tumorzellen und Immunsystem kommt<sup>100</sup>. Dadurch könnte die Immunreaktion während der Entwicklung des spontanen Malignen Melanoms besser abgebildet werden. Nach Injektion von  $1 \times 10^6$  B16-F10 Zellen in die Flanke fanden sich im Verlauf keine Unterschiede im Tumorwachstum zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäuse (Abb. 21A). Interessanterweise war aber die Ausbildung des entzündlichen Tumorödems in der CD73<sup>-/-</sup> Gruppe signifikant abgeschwächt (Abb. 21B). Bei den knochenmarktransplantierten Tieren verlief das Tumorwachstum erwartungsgemäß ähnlich zwischen den Tieren mit WT oder CD73<sup>-/-</sup> hämatopoetischen Zellen, jedoch verschwand hier aber der Unterschied im Tumorödem (Abb. 23). Dies bedeutet höchstwahrscheinlich, dass für die verringerte Ausbildung des Tumorödems in den CD73<sup>-/-</sup> Mäusen die CD73 auf nicht-hämatopoetischen Zellen wie z.B. Endothelzellen entscheidend sein könnten. Wie bereits aus den Versuchen im subkutanen Modell bekannt

(Abb. 12) wurde auch bei intradermaler Applikation bei den WT Knochenmarktransplantierten WT Mäusen ein reduziertes Tumolvolumen sowie Tumorödenvolumen gegenüber den WT Mäusen ohne Knochenmarktransplantation festgestellt (Abb. 24), obwohl beide eine intakte CD73 Expression auf den Körperzellen aufwiesen.

Für das verringerte Tumorödem der CD73<sup>-/-</sup> Mäuse könnte die CD73 auf Endothelzellen verantwortlich sein, die über das von der CD73 generierte Adenosin die Extravasation von Immunzellen aus den Blutgefäßen stimuliert<sup>92</sup>. So stimuliert Adenosin die Expression von VE-Cadherin<sup>92</sup>, einem Adhäsionsprotein auf Endothelzellen. Darüber könnte die Leukozytenadhäsion am Endothel als erster Schritt der Extravasation verstärkt werden, was ein verringertes entzündliches Tumorödem in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen zur Folge haben könnte. Des Weiteren könnte die CD73 auf Endothelzellen direkt über Interaktion mit der CD18, einem Integrin auf Immunzellen, die Leukozytenadhäsion vermitteln, wie Experimente mit anti-CD73 und anti-CD18 Antikörper zeigten<sup>36</sup>. Ein anderer denkbarer Mechanismus wäre wenn Adenosin direkt die Tumorneovaskularisation stimuliert<sup>10,12</sup>. Das im MRT gemessene reduzierte Tumorödem in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen wäre dann lediglich Ausdruck einer reduzierten peritumoralen Angiogeneese. Die Datenlage hierzu ist widersprüchlich: Yegutkin *et al.* konnten im subkutanen Tumormodell mit Luciferase-transfizierten B16-F10 Zellen keine Unterschiede in der intratumoralen Gefäßdichte von WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen in der Immunhistochemie feststellen<sup>107</sup>. Hingegen stellten Koszalka *et al.* mit subkutan applizierten B16-F10 Zellen in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen, die zusätzlich intraperitoneal mit dem CD73 Inhibitor AOPCP behandelt wurden, eine signifikant verringerte Tumorgefäßdichte in der Histologie fest<sup>109</sup>. Daher könnte das in dieser Arbeit im MRT gemessene reduzierte peritumorale Ödem in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen auch durch eine verringerte peritumorale Vaskularisation bedingt sein.

### **4.3 Rolle der CD73 bei der Immunzellantwort in B16-F10 Tumoren**

Aus der Literatur ist bekannt, dass Tumor-<sup>14</sup> und Immunzellen<sup>15</sup> *in vivo* verstärkt ATP freisetzen können. Das ATP wird dann durch die Ecto-Nukleotidasen CD39 und CD73 zu

Adenosin abgebaut, das wiederum über seine immunsuppressiven und proangiogenetischen Eigenschaften das Tumorwachstum weiter stimuliert <sup>10,12,104</sup>.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden in der vorliegenden Arbeit die B16-F10 Tumoren entnommen und die intratumorale Immunzellantwort mittels FACS analysiert. Dabei wurden die Immunzellen durch den CD45 Marker identifiziert <sup>102</sup> und die Verteilung der einzelnen Subpopulationen bestimmt: CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen, CD11b<sup>+</sup> Zellen (Phagozyten und NK Zellen u.a.) <sup>116</sup>, CD11c<sup>+</sup> Zellen (dendritische Zellen u.a.) <sup>117</sup>, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>, CD69<sup>+</sup> Zellen (Aktivierungsmarker von Phagozyten, Lymphozyten u.a.) <sup>118</sup> und CD86<sup>+</sup> Zellen (Aktivierungsmarker von antigen-präsentierende Zellen u.a.) <sup>119</sup>. Insgesamt wurden keine Unterschiede in den einzelnen Immunzellpopulationen zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen im subkutanen Modell mit B16-F10 Zellen ( $25 \times 10^4$ ) festgestellt (Abb. 6). Auch in den Versuchen mit spezifischem *Knockout* der CD73 auf hämatopoetischen Zellen nach Knochenmarktransplantation fanden sich keine Unterschiede in der intratumoralen Immunzellzusammensetzung (Abb. 13), wobei auch hier CD8<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen die Immunantwort dominierten.

Nach Reduktion der Zellzahl ( $5 \times 10^4$ ) fand sich eine verstärkte Akkumulation von CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup> Zellen in Tumoren von CD73<sup>-/-</sup> Mäusen, ohne dass der Unterschied zu den WT Mäusen signifikant war (Abb. 15). Möglicherweise spiegelte dieser Befund eine aktivere intratumorale Immunzellreaktion wider, was wegen der tendenziell niedrigeren Tumorumfänge der CD73<sup>-/-</sup> Gruppe zu erwarten war (Abb. 14). Auch waren alle CD Marker bis auf CD8 gegenüber entsprechenden Werten aus Versuchen mit höherer Zellzahl ( $25 \times 10^4$ ) gesteigert, was für eine insgesamt stärkere Entzündungsreaktion spricht. Wie oben bereits besprochen war das Tumorwachstum der CD73<sup>-/-</sup> Mäuse bei nochmalig verringerter Zellzahl ( $1 \times 10^4$ ) signifikant gegenüber der WT Gruppe verringert (Abb. 16). Durch die flächige Tumorfunktion der Haut ohne Tumorumfängenahme (Abb. 17A) war es aufgrund der geringen Menge an Tumorgewebe technisch nicht möglich, die Immunzellen aus der Haut wie vorher aus dem Tumor enzymatisch herauszulösen, um FACS Analysen durchzuführen.

Auch andere Gruppen bestätigten die FACS Ergebnisse aus den subkutanen Versuchen (Abb. 6, Abb. 15), obwohl sie ein signifikant reduziertes Tumorwachstum in den Mäusen mit *Knockout* <sup>107</sup> bzw. Hemmung der CD73 <sup>106</sup> feststellten: Yegutkin *et al.* wiesen nach subkutaner Injektion von Luciferase-transfizierten B16-F10 Zellen ( $4 \times 10^5$ ) in WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen auch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl an intra-

tumoralen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen im FACS nach <sup>107</sup>. Allerdings zeigten die Tumore von CD73<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikant verringerte Akkumulation von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> <sup>107</sup>, während in den hier vorliegenden Versuchen kein Unterschied zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen feststellbar war, was den Anteils an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> anging. Die Literatur ist jedoch in diesem Punkt nicht einheitlich. Abweichend hiervon stellten Forte *et al.* in subkutanen Tumormodell mit B16-F10 Zellen ( $3 \times 10^5$ ) eine signifikant erhöhte intratumorale Infiltration von CD8<sup>+</sup> Zellen in mit dem CD73 Inhibitor AOPCP behandelten Mäusen mittels FACS fest <sup>106</sup>. Dieser Befund steht im Widerspruch zu den hier erhobenen Ergebnissen und denen von Yegutkin *et al.* <sup>107</sup>. Wie bereits oben diskutiert könnte dies an den Unterschieden im Versuchsansatz zwischen pharmakologischer und genetischer Inaktivierung der CD73 liegen (Kap. 4.1).

Bei intradermaler Tumorapplikation wurden trotz der unterschiedlichen Tumorödenvolumina zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäusen keine Unterschiede in der intratumoralen Immunzellzusammensetzung im FACS festgestellt (Abb. 22). Wie schon im subkutanen Tumormodell (Abb. 6) stellten die CD11b<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen die größten Fraktionen dar, während der Anteil an CD69<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup> Zellen höher und der Anteil an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> niedriger bei intradermaler Applikation waren. Dies spricht insgesamt für eine stärkere Entzündungsreaktion beim intradermalen Wachstum der B16-F10 Zellen verglichen mit der subkutanen Lokalisation, erkennbar am höheren Anteil an aktivierten Immunzellen (CD69, CD86).

In den Experimenten an den knochenmarktransplantierten Tieren war bei intradermaler Injektion der Anteil der einzelnen Immunzellpopulationen bis auf CD11c<sup>+</sup> und CD86<sup>+</sup> Zellen gegenüber den Tumoren der WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäuse erhöht (Abb. 25). Auch hier gab es keine signifikante Unterschiede in der intratumoralen Immunzellzusammensetzung zwischen WT Mäuse mit WT oder CD73<sup>-/-</sup> hämatopoetischen Zellen. Auch die Messung des Anteils an IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen an den intratumoralen Zellen mittels IFN- $\gamma$  ELISpot zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Abb. 26).

Zusammenfassend fanden sich weder bei subkutaner noch bei intradermaler Applikation der B16-F10 Zellen signifikante Unterschiede in der intratumoralen Immunzellzusammensetzung im FACS. Das eingangs in der Literatur beschriebene Modell zur immunsuppressiven Wirkung von Adenosin in der Tumormikroumgebung <sup>10,12,104</sup> konnte somit für B16-F10 Melanomzellen nicht bestätigt werden.

## 4.4 Rolle der CD73 bei der Metastasierung von B16-F10 Zellen

Zur Untersuchung der Rolle von CD73 auf die regionäre Lymphknotenmetastasierung wurden bei den Versuchen mit  $25 \times 10^4$  subkutan injizierten B16-F10 Zellen zusätzlich die inguinalen Lymphknoten auf beiden Seiten entnommen und die Expression von Melan-A mRNA, einem spezifischen Marker von B16-F10 Zellen<sup>100</sup>, mittels qPCR untersucht. In den ipsilateralen tumornahen Lymphknoten der CD73<sup>-/-</sup> Mäuse zeigte sich eine verstärkte lymphogene Metastasierung, wobei aber der Unterschied zu den WT Mäusen nicht signifikant war (Abb. 7A). Dagegen war auf der tumorfernen kontralateralen Seite die lymphogene Metastasierung in der CD73<sup>-/-</sup> Gruppe tendenziell abgeschwächt, ohne auch hier das Signifikanzniveau zu erreichen (Abb. 7B).

Diese Ergebnisse widersprechen denen von Yegutkin *et al.*, die über eine abgeschwächte Metastasierung in den drainierenden Lymphknoten des B16-F10 Tumors von CD73<sup>-/-</sup> Mäusen berichteten<sup>107</sup>. Allerdings erfolgte dort die Messung anhand von Gewicht und Volumen der Lymphknoten sowie des Signals der Luciferase-transfizierten B16-F10 Zellen, wobei nur beim Volumen der Unterschied signifikant war<sup>107</sup>. Volumen und Gewicht von Lymphknoten müssen jedoch nicht notwendigerweise mit dem Grad des metastatischen Befalls korrelieren, da Lymphknoten z.B. auch reaktiv entzündlich vergrößert sein können. Ein weiterer wichtiger Unterschied liegt im Injektionsort an der Ohrmuschel in den Versuchen von Yegutkin *et al.*<sup>107</sup> in Gegensatz zur Injektion am Hinterlauf beim hier vorliegenden Versuchsaufbau und damit verbunden die unterschiedliche Lokalisation der drainierenden Lymphknoten.

Beim Vergleich der Lymphknoten der WT Mäuse wurde überraschenderweise eine signifikant höhere Metastasierung auf der kontralateralen tumorfernen Seite gegenüber der ipsilateralen tumornahen Seite festgestellt (Abb. 8A). Dagegen zeigten CD73<sup>-/-</sup> Mäuse erwartungsgemäß eine tendenziell stärker Metastasierung in den ipsilateralen Lymphknoten, ohne dass hierbei das Signifikanzniveau erreicht wurde (Abb. 8B). Dieses paradoxe Ergebnis lässt sich derzeit nur schwer erklären.

Die hämatogene Metastasierung wurde durch intravenöse Injektion von  $25 \times 10^4$  B16-F10 Melanomzellen und nachfolgender Auszählung der metastatischen Knoten auf der Lungenoberfläche nach zehn Tagen untersucht. Dabei zeigten sich keine Unterschiede im Grad der Lungenmetastasierung zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäuse (Abb. 20). In Gegensatz

dazu stellten Stagg *et al.* bei ähnlichem Versuchsaufbau fest, dass bei intravenöser Applikation von B16-F10 Zellen ( $2 \times 10^5$ ) nach 14 Tagen die Lungenmetastasierung in der CD73<sup>-/-</sup> Gruppe signifikant verringert war, wobei für diesen Effekt die CD73 auf nicht-hämatopoetischen Zellen entscheidend war<sup>105</sup>. Mögliche Gründe für die abweichenden Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit wurden bereits beim subkutanen Tumormodell diskutiert (Kap. 4.1).

## 4.5 Schlussfolgerungen

Im Wesentlichen wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass das Tumorwachstum von subkutan injizierten murinen B16-F10 Melanomzellen in CD73<sup>-/-</sup> Mäusen bei einer mit der Literatur<sup>105-107</sup> vergleichbaren Zellzahl gegenüber WT Mäuse keine Unterschiede zeigte. Erst bei deutlich reduzierter Zellzahl wuchsen die Tumore in CD73<sup>-/-</sup> Tieren signifikant langsamer als in WT Tieren, wobei bei den meisten Tieren die Tumore die Haut nur flächig infiltrierten, ohne dabei eine wesentliche Volumenzunahme zu zeigen. Beim Versuchsablauf wurde auf eine größtmögliche Standardisierung geachtet, um Störfaktoren zu minimieren, sodass als plausible Erklärungen für die in dieser Arbeit gefundenen von der Literatur<sup>105-109</sup> abweichenden Ergebnisse nur mögliche Unterschiede in der Qualität der verwendeten Tumorzellen sowie der genetische Hintergrund und der Gesundheitszustand der Mäuse in Frage kommen (Kap. 4.1). Bei intradermaler Applikation der B16-F10 Zellen zeigten sich zwar keine Wachstumsunterschiede in den CD73<sup>-/-</sup> Tieren, jedoch war hier das entzündliche peritumorale Ödem signifikant reduziert, wobei dieser Effekt auf die CD73 von nicht-hämatopoetischen Zellen (z.B. Endothelzellen) zurückgeführt wurde. Weder bei subkutaner noch intradermaler Tumorzellinjektion fanden sich signifikante Unterschiede in der intratumoralen Immunzellverteilung zwischen WT und CD73<sup>-/-</sup> Mäuse, die diese Beobachtungen eindeutig erklären könnten. Auch bei der Entwicklung von Lymphknotenmetastasen nach subkutaner Tumorzellinjektion und der hämatogenen Lungenmetastasierung nach intravenöser Applikation wurden keine signifikanten Unterschiede in den CD73<sup>-/-</sup> Tieren festgestellt. Somit zeigen die vorliegenden Daten für B16-F10 Zellen keine robusten tumorwachstumsfördernden Effekte durch die körpereigene CD73. Die in der Literatur aufgestellte Hypothese, nach der das durch Tumor- und Immunzellen freigesetzte ATP im Tumormikromilieu durch die Ecto-Nukleotidasen CD39 und CD73 zu Adenosin abgebaut wird, das schließlich über

seine immunsuppressiven und proangiogenetischen Wirkungen das Tumorwachstum stimuliert<sup>9-12,17,104</sup>, muss für B16-F10 Zellen in Frage gestellt werden.

Eine weitere wichtige Rolle könnte auch die Immunogenität der Tumorzellen selbst spielen. So wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen eine stark abgeschwächte bis hin zu völlig ausbleibender Tumorwachstumsförderung von Adenosin beim Einsatz von schwächer immunogenen Tumorzelllinien, zu der auch die B16-F10 Zellen gehören, im Mausmodell beschrieben<sup>94,105,108</sup>. Auch wurden auf verschiedene Tumorzellen (u.a. B16-F10 Zellen) wachstumshemmende Effekte von Adenosin beschrieben<sup>50,55,56</sup>, die unabhängig von der Immunantwort und Vaskularisation im Tumor dessen Wachstum *in vivo* direkt hemmen könnten. Beide Aspekte könnten dazu beitragen, warum für B16-F10 Zellen keine robusten wachstumsfördernden Effekte durch die CD73 in dieser Arbeit gefunden wurden.

Des Weiteren könnte die nicht-enzymatische Funktion der CD73 auf den Tumorzellen selbst das Wachstum und die Metastasierung unabhängig von der Adenosinproduktion beeinflussen. Murine B16-F10 Melanomzellen, die durch Transfektion verstärkt CD73 exprimierten, zeigten gegenüber den Ausgangszellen eine verstärkte Lungenmetastasierung nach intravenöser Applikation, während das lokale Tumorwachstum nach subkutaner Applikation sich nicht unterschied<sup>120</sup>. Die Migration von humanen A375 Melanomzellen in Tenascin C, einem extrazellulären Matrixprotein, war im A375 Zellen mit CD73 *Knockout* gehemmt, während dieser Effekt nicht durch Inhibition der CD73 mittels AOPCP Gabe auf CD73 exprimierenden A375 Zellen beobachtet wurde<sup>37</sup>. Möglicherweise könnte die CD73 auf humanen Melanomzellen über diesen Mechanismus die Invasion und damit die Metastasierung Adenosin-unabhängig stimulieren. Dazu passt auch die positive Korrelation zwischen der CD73 Expression und weiteren metastasierungsfördernden Proteinen auf verschiedenen humanen Melanomzelllinien<sup>121</sup>. Die CD73 Expression selbst kann auf diversen humanen Melanomzelllinien durch Methylierung im CD73 Gen runterreguliert werden<sup>122</sup>. Klinische Untersuchungen an Patientenproben von Malignen Melanomen zeigten dabei eine Korrelation zwischen der Methylierung im CD73 Gen und dem bevorzugten Metastasierungsweg<sup>122</sup>. Hierbei war eine fehlende Methylierung und damit Hochregulation von CD73 mit viszeralen Metastasen und Hirnmetastasen assoziiert, während eine vorhandene Methylierung mit einer Präferenz für die lymphogene Metastasierung einherging<sup>122</sup>. Inwiefern eine Messung der CD73 Expression auf Melanomzellen als Prognosefaktor sinnvoll ist, müssen aufgrund der

begrenzten klinischen Datenlage weitere Untersuchungen zeigen. Der Einsatz der CD73 zur Prognosebestimmung bei anderen Tumorarten indes wird aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse kontrovers diskutiert <sup>10,12</sup>.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ist ein pharmakologischer Ansatz zur Reduktion der Adenosinproduktion durch Inhibition der Ecto-Nukleotidasen (CD39, CD73) oder Adenosinwirkung durch Rezeptorblockade zur Wachstumshemmung und Metastasenreduktion von B16-F10 Melanomzellen nicht aussichtsreich. Für andere Tumorarten, insbesondere immunogene Tumorzelllinien, wurde über eine Tumorstillstandshemmung durch Inhibition der Ecto-Nukleotidasen bzw. Antagonisierung der Adenosinrezeptoren berichtet <sup>10,12,104</sup>. Ein sinnvoller pharmakologischer Eingriff in den Adenosinstoffwechsel zur Tumorthherapie scheint somit auch abhängig vom Tumortyp zu sein.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Box C, Rogers SJ, Mendiola M, Eccles SA. Tumour-microenvironmental interactions: paths to progression and targets for treatment. *Semin. Cancer Biol.* 2010;20:128–138.
2. Almog N. Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer Lett.* 2010;294:139–146.
3. Chow MT, Möller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2012;22:23–32.
4. Becker JC, Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P. Immune-suppressive properties of the tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* 2013;62:1137–1148.
5. Wong GS, Rustgi AK. Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis. *Br. J. Cancer.* 2013;108:755–761.
6. Fokas E, McKenna WG, Muschel RJ. The impact of tumor microenvironment on cancer treatment and its modulation by direct and indirect antivascular strategies. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31:823–842.
7. Sounni NE, Noel A. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clin. Chem.* 2013;59:85–93.
8. Saif MW. Is there a benefit from addiction to anti-VEGF therapy in patients with colorectal cancer? *Anticancer Res.* 2013;33:2377–2380.
9. Longhi MS, Robson SC, Bernstein SH, Serra S, Deaglio S. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *J. Mol. Med.* 2013;91:165–172.
10. Allard B, Turcotte M, Stagg J. CD73-generated adenosine: orchestrating the tumor-stroma interplay to promote cancer growth. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012;2012:485156.
11. Regateiro FS, Cobbold SP, Waldmann H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin. Exp. Immunol.* 2013;171:1–7.
12. Ghiringhelli F, Bruchard M, Chalmin F, Rébé C. Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012;2012:473712.
13. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS ONE.* 2008;3:e2599.
14. Berglund E, Berglund D, Akcakaya P, Ghaderi M, Daré E, Berggren P, Köhler M, Aspinwall CA, Lui W, Zedenius J, Larsson C, Bränström R. Evidence for Ca(2+)-

- regulated ATP release in gastrointestinal stromal tumors. *Exp. Cell Res.* 2013;319:1229–1238.
15. Ayna G, Krysko DV, Kaczmarek A, Petrovski G, Vandenabeele P, Fésüs L. ATP release from dying autophagic cells and their phagocytosis are crucial for inflammasome activation in macrophages. *PLoS ONE.* 2012;7:e40069.
  16. Di Virgilio F. Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res.* 2012;72:5441–5447.
  17. Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene.* 2010;29:5346–5358.
  18. White N, Ryten M, Clayton E, Butler P, Burnstock G. P2Y purinergic receptors regulate the growth of human melanomas. *Cancer Lett.* 2005;224:81–91.
  19. White N, Butler, Peter E M, Burnstock G. Human melanomas express functional P2 X(7) receptors. *Cell Tissue Res.* 2005;321:411–418.
  20. Hattori F, Ohshima Y, Seki S, Tsukimoto M, Sato M, Takenouchi T, Suzuki A, Takai E, Kitani H, Harada H, Kojima S. Feasibility study of B16 melanoma therapy using oxidized ATP to target purinergic receptor P2X7. *Eur. J. Pharmacol.* 2012;695:20–26.
  21. Jantaratnotai N, Choi HB, McLarnon JG. ATP stimulates chemokine production via a store-operated calcium entry pathway in C6 glioma cells. *BMC Cancer.* 2009;9:442.
  22. Solini A, Cuccato S, Ferrari D, Santini E, Gulinelli S, Callegari MG, Dardano A, Faviana P, Madec S, Di Virgilio F, Monzani F. Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease? *Endocrinology.* 2008;149:389–396.
  23. Raffaghello L, Chiozzi P, Falzoni S, Di Virgilio F, Pistoia V. The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2006;66:907–914.
  24. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* 2009;461:282–286.
  25. Pfeiffer ZA, Guerra AN, Hill LM, Gavala ML, Prabhu U, Aga M, Hall DJ, Bertics PJ. Nucleotide receptor signaling in murine macrophages is linked to reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med.* 2007;42:1506–1516.

26. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA, Junger WG. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science*. 2006;314:1792–1795.
27. Idzko M, Panther E, Sorichter S, Herouy Y, Berod L, Geissler M, Mockenhaupt M, Elsner P, Girolomoni G, Norgauer J. Characterization of the biological activities of uridine diphosphate in human dendritic cells: Influence on chemotaxis and CXCL8 release. *J. Cell. Physiol*. 2004;201:286–293.
28. Marteau F, Gonzalez NS, Communi D, Goldman M, Boeynaems J, Communi D. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells. *Blood*. 2005;106:3860–3866.
29. Eltzschig HK. Extracellular adenosine signaling in molecular medicine. *J. Mol. Med*. 2013;91:141–146.
30. Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 2000;362:299–309.
31. Van Rompay, A R, Johansson M, Karlsson A. Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacol. Ther*. 2000;87:189–198.
32. Knapp K, Zebisch M, Pippel J, El-Tayeb A, Müller CE, Sträter N. Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure*. 2012;20:2161–2173.
33. Leth-Larsen R, Lund R, Hansen HV, Laenkholtm A, Tarin D, Jensen ON, Ditzel HJ. Metastasis-related plasma membrane proteins of human breast cancer cells identified by comparative quantitative mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics*. 2009;8:1436–1449.
34. Supernat A, Markiewicz A, Welnicka-Jaskiewicz M, Seroczynska B, Skokowski J, Sejda A, Szade J, Czapiewski P, Biernat W, Zaczek A. CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol*. 2012;20:103–107.
35. Massaia M, Perrin L, Bianchi A, Ruedi J, Attisano C, Altieri D, Rijkers GT, Thompson LF. Human T cell activation. Synergy between CD73 (ecto-5'-nucleotidase) and signals delivered through CD3 and CD2 molecules. *J. Immunol*. 1990;145:1664–1674.
36. Airas L, Niemelä J, Jalkanen S. CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism. *J. Immunol*. 2000;165:5411–5417.

37. Sadej R, Skladanowski AC. Dual, enzymatic and non-enzymatic, function of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in migration and invasion of A375 melanoma cells. *Acta Biochim. Pol.* 2012;59:647–652.
38. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* 2002;110:993–1002.
39. Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enjyoji K, Robson SC, Colgan SP. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J. Exp. Med.* 2003;198:783–796.
40. Savic V, Stefanovic V, Ardaillou N, Ardaillou R. Induction of ecto-5'-nucleotidase of rat cultured mesangial cells by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology.* 1990;70:321–326.
41. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Végran F, Hichami A, Ladoire S, Derangère V, Vincent J, Masson D, Robson SC, Eberl G, Pallandre JR, Borg C, Ryffel B, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity.* 2012;36:362–373.
42. Christensen LD, Andersen V, Nygaard P, Bendtzen K. Effects of immunomodulators on ecto-5'-nucleotidase activity on blood mononuclear cells in vitro. *Scand. J. Immunol.* 1992;35:407–413.
43. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2001;53:527–552.
44. Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Matafonov A, Biaggioni I, Feoktistov I. Differential role of the carboxy-terminus of the A(2B) adenosine receptor in stimulation of adenylyl cyclase, phospholipase Cbeta, and interleukin-8. *Purinergic Signal.* 2009;5:289–298.
45. Khoa ND, Montesinos MC, Reiss AB, Delano D, Awadallah N, Cronstein BN. Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A(2A) receptors in human monocytic THP-1 cells. *J. Immunol.* 2001;167:4026–4032.

46. Xaus J, Mirabet M, Lloberas J, Soler C, Lluís C, Franco R, Celada A. IFN-gamma up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J. Immunol.* 1999;162:3607–3614.
47. Kolachala V, Asamoah V, Wang L, Obertone TS, Ziegler TR, Merlin D, Sitaraman SV. TNF-alpha upregulates adenosine 2b (A2b) receptor expression and signaling in intestinal epithelial cells: a basis for A2bR overexpression in colitis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005;62:2647–2657.
48. Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter JA, Lachowicz JE, Wang Y, Liu S. RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* 2005;4:1355–1360.
49. Lin Z, Yin P, Reierstad S, O'Halloran M, Coon, V J S, Pearson EK, Mutlu GM, Bulun SE. Adenosine A1 receptor, a target and regulator of estrogen receptoralpha action, mediates the proliferative effects of estradiol in breast cancer. *Oncogene.* 2010;29:1114–1122.
50. Saito M, Yaguchi T, Yasuda Y, Nakano T, Nishizaki T. Adenosine suppresses CW2 human colonic cancer growth by inducing apoptosis via A(1) adenosine receptors. *Cancer Lett.* 2010;290:211–215.
51. Etique N, Grillier-Vuissoz I, Lecomte J, Flament S. Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ERalpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 2009;21:977–981.
52. Fisher JW, Brookins J. Adenosine A(2A) and A(2B) receptor activation of erythropoietin production. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001;281:F826-32.
53. Merighi S, Mirandola P, Milani D, Varani K, Gessi S, Klotz K, Leung E, Baraldi PG, Borea PA. Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 2002;119:923–933.
54. Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, D'Arena G, Coscia M, Tripodo C, Inghirami G, Robson SC, Gaidano G, Malavasi F, Deaglio S. CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood.* 2011;118:6141–6152.
55. Madi L, Bar-Yehuda S, Barer F, Ardon E, Ochaion A, Fishman P. A3 adenosine receptor activation in melanoma cells: association between receptor fate and tumor growth inhibition. *J. Biol. Chem.* 2003;278:42121–42130.

56. Fishman P, Bar-Yehuda S, Ohana G, Barer F, Ochaion A, Erlanger A, Madi L. An agonist to the A3 adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 beta and NF-kappa B. *Oncogene*. 2004;23:2465–2471.
57. Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Leung E, MacLennan S, Borea PA. Adenosine modulates vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1 in human glioblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 2006;72:19–31.
58. Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively. *J. Clin. Invest.* 1990;85:1150–1157.
59. Bouma MG, Jeunhomme TM, Boyle DL, Dentener MA, Voitenok NN, van den Wildenberg, F A, Buurman WA. Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J. Immunol.* 1997;158:5400–5408.
60. Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J. Immunol.* 1992;148:2201–2206.
61. Ernens I, Rouy D, Velot E, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca<sup>2+</sup> pathway. *Circ. Res.* 2006;99:590–597.
62. Eppell BA, Newell AM, Brown EJ. Adenosine receptors are expressed during differentiation of monocytes to macrophages in vitro. Implications for regulation of phagocytosis. *J. Immunol.* 1989;143:4141–4145.
63. Haskó G, Szabó C, Németh ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J. Immunol.* 1996;157:4634–4640.
64. Grinberg S, Hasko G, Wu D, Leibovich SJ. Suppression of PLCbeta2 by endotoxin plays a role in the adenosine A(2A) receptor-mediated switch of macrophages from an inflammatory to an angiogenic phenotype. *Am. J. Pathol.* 2009;175:2439–2453.
65. Souza, Luiz Fernando de, Jardim FR, Sauter IP, Souza, Marcela Moreira de, Barreto F, Margis R, Bernard EA. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*

- increases matrix metalloproteinase 9 expression in RAW 264.7 macrophages: modulation by A2A and A2B adenosine receptors. *Mol. Immunol.* 2009;46:937–942.
66. Velot E, Haas B, Léonard F, Ernens I, Rolland-Turner M, Schwartz C, Longrois D, Devaux Y, Wagner DR. Activation of the adenosine-A3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages. *Cardiovasc. Res.* 2008;80:246–254.
67. Raskovalova T, Huang X, Sitkovsky M, Zacharia LC, Jackson EK, Gorelik E. Gs protein-coupled adenosine receptor signaling and lytic function of activated NK cells. *J. Immunol.* 2005;175:4383–4391.
68. Nowak M, Lynch L, Yue S, Ohta A, Sitkovsky M, Balk SP, Exley MA. The A2aR adenosine receptor controls cytokine production in iNKT cells. *Eur. J. Immunol.* 2010;40:682–687.
69. Harish A, Hohana G, Fishman P, Arnon O, Bar-Yehuda S. A3 adenosine receptor agonist potentiates natural killer cell activity. *Int. J. Oncol.* 2003;23:1245–1249.
70. Panther E, Idzko M, Herouy Y, Rheinen H, Gebicke-Haerter PJ, Mrowietz U, Dichmann S, Norgauer J. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J.* 2001;15:1963–1970.
71. Schnurr M, Toy T, Shin A, Hartmann G, Rothenfusser S, Soellner J, Davis ID, Cebon J, Maraskovsky E. Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2004;103:1391–1397.
72. Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Huang Y, Tikhomirov OY, Blackburn MR, Biaggioni I, Carbone DP, Feoktistov I, Dikov MM. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood.* 2008;112:1822–1831.
73. Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, Schamel, Wolfgang W A, Reth M, Brummer T. Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur. J. Immunol.* 2005;35:31–41.
74. Anderson SM, Tomayko MM, Ahuja A, Haberman AM, Shlomchik MJ. New markers for murine memory B cells that define mutated and unmutated subsets. *J. Exp. Med.* 2007;204:2103–2114.
75. Tomayko MM, Anderson SM, Brayton CE, Sadanand S, Steinel NC, Behrens TW, Shlomchik MJ. Systematic comparison of gene expression between murine memory and naive B cells demonstrates that memory B cells have unique signaling capabilities. *J. Immunol.* 2008;181:27–38.

76. Sakowicz-Burkiewicz M, Kocbuch K, Grden M, Maciejewska I, Szutowicz A, Pawelczyk T. Impact of adenosine receptors on immunoglobulin production by human peripheral blood B lymphocytes. *J. Physiol. Pharmacol.* 2012;63:661–668.
77. Ohta A, Ohta A, Madasu M, Kini R, Subramanian M, Goel N, Sitkovsky M. A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. *J. Immunol.* 2009;183:5487–5493.
78. Csóka B, Himer L, Selmeczy Z, Vizi ES, Pacher P, Ledent C, Deitch EA, Spolarics Z, Németh ZH, Haskó G. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J.* 2008;22:3491–3499.
79. Zarek PE, Huang C, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG, Powell JD. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood.* 2008;111:251–259.
80. Nakatsukasa H, Tsukimoto M, Harada H, Kojima S. Adenosine A2B receptor antagonist suppresses differentiation to regulatory T cells without suppressing activation of T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011;409:114–119.
81. Hoskin DW, Butler JJ, Drapeau D, Haeryfar, S M Mansour, Blay J. Adenosine acts through an A3 receptor to prevent the induction of murine anti-CD3-activated killer T cells. *Int. J. Cancer.* 2002;99:386–395.
82. Varani K, Padovan M, Vincenzi F, Targa M, Trotta F, Govoni M, Borea PA. A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. *Arthritis Res. Ther.* 2011;13:R197.
83. Ring S, Enk AH, Mahnke K. ATP activates regulatory T Cells in vivo during contact hypersensitivity reactions. *J. Immunol.* 2010;184:3408–3416.
84. Mandapathil M, Hilldorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnik M, Ren J, Lang S, Jackson EK, Gorelik E, Whiteside TL. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J. Biol. Chem.* 2010;285:7176–7186.
85. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 2007;204:1257–1265.
86. Mandapathil M, Szczepanski MJ, Szajnik M, Ren J, Lenzner DE, Jackson EK, Gorelik E, Lang S, Johnson JT, Whiteside TL. Increased ectonucleotidase expression

- and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* 2009;15:6348–6357.
87. Takagi H, King GL, Robinson GS, Ferrara N, Aiello LP. Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996;37:2165–2176.
88. Desai A, Victor-Vega C, Gadangi S, Montesinos MC, Chu CC, Cronstein BN. Adenosine A2A receptor stimulation increases angiogenesis by down-regulating production of the antiangiogenic matrix protein thrombospondin 1. *Mol. Pharmacol.* 2005;67:1406–1413.
89. Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voino-Yasenetskaya T, Biaggioni I. Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ. Res.* 2002;90:531–538.
90. Ahmad A, Ahmad S, Glover L, Miller SM, Shannon JM, Guo X, Franklin WA, Bridges JP, Schaack JB, Colgan SP, White CW. Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2alpha in pulmonary endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009;106:10684–10689.
91. Nguyen DK, Montesinos MC, Williams AJ, Kelly M, Cronstein BN. Th1 cytokines regulate adenosine receptors and their downstream signaling elements in human microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 2003;171:3991–3998.
92. Umapathy NS, Fan Z, Zemskov EA, Alieva IB, Black SM, Verin AD. Molecular mechanisms involved in adenosine-induced endothelial cell barrier enhancement. *Vascul. Pharmacol.* 2010;52:199–206.
93. Takedachi M, Qu D, Ebisuno Y, Oohara H, Joachims ML, McGee ST, Maeda E, McEver RP, Tanaka T, Miyasaka M, Murakami S, Krahn T, Blackburn MR, Thompson LF. CD73-generated adenosine restricts lymphocyte migration into draining lymph nodes. *J. Immunol.* 2008;180:6288–6296.
94. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong, Michael K K, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen J, Jackson EK, Apasov S, Abrams S, Sitkovsky M. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103:13132–13137.
95. Ryzhov S, Novitskiy SV, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Carbone DP, Biaggioni I, Dikov MM, Feoktistov I. Host A(2B) adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia.* 2008;10:987–995.

96. Synowitz M, Glass R, Färber K, Markovic D, Kronenberg G, Herrmann K, Schnermann J, Nolte C, van Rooijen N, Kiwit J, Kettenmann H. A1 adenosine receptors in microglia control glioblastoma-host interaction. *Cancer Res.* 2006;66:8550–8557.
97. Morello S, Sorrentino R, Montinaro A, Luciano A, Maiolino P, Ngkelo A, Arra C, Adcock IM, Pinto A. NK1.1 cells and CD8 T cells mediate the antitumor activity of Cl-IB-MECA in a mouse melanoma model. *Neoplasia.* 2011;13:365–373.
98. Koszalka P, Ozüyan B, Huo Y, Zerneck A, Flögel U, Braun N, Buchheiser A, Decking, Ulrich K M, Smith ML, Sévigny J, Gear A, Weber A, Molojavyi A, Ding Z, Weber C, Ley K, Zimmermann H, Gödecke A, Schrader J. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ. Res.* 2004;95:814–821.
99. Zigrino P, Kuhn I, Bäuerle T, Zamek J, Fox JW, Neumann S, Licht A, Schorpp-Kistner M, Angel P, Mauch C. Stromal expression of MMP-13 is required for melanoma invasion and metastasis. *J. Invest. Dermatol.* 2009;129:2686–2693.
100. Mockey M, Bourseau E, Chandrashekhar V, Chaudhuri A, Lafosse S, Le Cam E, Quesniaux, V F J, Ryffel B, Pichon C, Midoux P. mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes. *Cancer Gene Ther.* 2007;14:802–814.
101. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402–408.
102. Huntington ND, Tarlinton DM. CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol. Lett.* 2004;94:167–174.
103. Oosterhoff D, Sluijter, B J R, Hangalapura BN, de Gruijl, T D. The dermis as a portal for dendritic cell-targeted immunotherapy of cutaneous melanoma. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2012;351:181–220.
104. Sitkovsky M, Ohta A. Targeting the hypoxia-adenosinergic signaling pathway to improve the adoptive immunotherapy of cancer. *J. Mol. Med.* 2013;91:147–155.
105. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng, Michele W L, Darcy PK, Smyth MJ. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res.* 2011;71:2892–2900.
106. Forte G, Sorrentino R, Montinaro A, Luciano A, Adcock IM, Maiolino P, Arra C, Cicala C, Pinto A, Morello S. Inhibition of CD73 improves B cell-mediated anti-tumor immunity in a mouse model of melanoma. *J. Immunol.* 2012;189:2226–2233.

107. Yegutkin GG, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemelä J, Laurila JP, Elima K, Jalkanen S, Salmi M. Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur. J. Immunol.* 2011;41:1231–1241.
108. Wang L, Fan J, Thompson LF, Zhang Y, Shin T, Curiel TJ, Zhang B. CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *J. Clin. Invest.* 2011;121:2371–2382.
109. Koszałka P, Pryszałak A, Gołuńska M, Kolasa J, Stasiłojć G, Składanowski AC, Bigda JJ. Inhibition of CD73 stimulates the migration and invasion of B16F10 melanoma cells in vitro, but results in impaired angiogenesis and reduced melanoma growth in vivo. *Oncol. Rep.* 2013.
110. Murakami T, Cardones AR, Finkelstein SE, Restifo NP, Klaunberg BA, Nestle FO, Castillo SS, Dennis PA, Hwang ST. Immune evasion by murine melanoma mediated through CC chemokine receptor-10. *J. Exp. Med.* 2003;198:1337–1347.
111. Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele, C Justin, Resta R, Morote-Garcia JC, Colgan SP. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J. Exp. Med.* 2004;200:1395–1405.
112. Chassaing B, Aitken JD, Gewirtz AT, Vijay-Kumar M. Gut microbiota drives metabolic disease in immunologically altered mice. *Adv. Immunol.* 2012;116:93–112.
113. Evans JM, Morris LS, Marchesi JR. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J. Endocrinol.* 2013;218:R37-47.
114. Nicklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 2002;36:20–42.
115. Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M. Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation. *Anticancer Res.* 2006;26:43–47.
116. Ross GD, Větvicka V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin. Exp. Immunol.* 1993;92:181–184.
117. Pulendran B, Lingappa J, Kennedy MK, Smith J, Teepe M, Rudensky A, Maliszewski CR, Maraskovsky E. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J. Immunol.* 1997;159:2222–2231.

118. Natarajan K, Sawicki MW, Margulies DH, Mariuzza RA. Crystal structure of human CD69: a C-type lectin-like activation marker of hematopoietic cells. *Biochemistry*. 2000;39:14779–14786.
119. Bugeon L, Dallman MJ. Costimulation of T cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2000;162:S164-8.
120. Beavis PA, Divisekera U, Paget C, Chow MT, John LB, Devaud C, Dwyer K, Stagg J, Smyth MJ, Darcy PK. Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of CD73+ tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013;110:14711–14716.
121. Sadej R, Spychala J, Skladanowski AC. Ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) is coexpressed with metastasis promoting antigens in human melanoma cells. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2006;25:1119–1123.
122. Wang H, Lee S, Lo Nigro C, Lattanzio L, Merlano M, Monteverde M, Matin R, Purdie K, Mladkova N, Bergamaschi D, Harwood C, Syed N, Szlosarek P, Briasoulis E, McHugh A, Thompson A, Evans A, Leigh I, Fleming C, Inman GJ, Hatzimichael E, Proby C, Crook T. NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity. *Br. J. Cancer*. 2012;106:1446–1452.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Stoffwechsel von Adenosin. ....	3
Abb. 2: MRT Bilder vom B16-F10 Tumor einer repräsentativen Maus nach subkutaner Injektion. ....	25
Abb. 3: AMPase, AP und CD73 Aktivität von B16-F10 und LLC Zellen. ....	29
Abb. 4: MRT Bilder vom B16-F10 Tumor einer repräsentativen Maus nach subkutaner Injektion im Verlauf. ....	31
Abb. 5: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion. ....	32
Abb. 6: Immunzellpopulationen im B16-F10 Tumor von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion. ....	33
Abb. 7: Melan-A mRNA Expression in inguinalen Lymphknoten von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen mit B16-F10 Tumor nach subkutaner Injektion. ....	34
Abb. 8: Melan-A mRNA Expression in inguinalen Lymphknoten von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen mit B16-F10 Tumor nach subkutaner Injektion. ....	34
Abb. 9: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von loxP und eCD73 <sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion. ....	35
Abb. 10: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von WT und loxP Mäusen nach subkutaner Injektion. ....	36
Abb. 11: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von WT oder CD73 <sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach subkutaner Injektion. ....	37
Abb. 12: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von WT und WT knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach subkutaner Injektion. ....	37
Abb. 13: Immunzellpopulationen im B16-F10 Tumor von WT oder CD73 <sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach subkutaner Injektion. ....	38

Abb. 14: Kalipermessungen am B16-F10 Tumor von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion von $5 \times 10^4$ B16-F10 Zellen. ....	39
Abb. 15: Immunzellpopulationen im B16-F10 Tumor von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion von $5 \times 10^4$ B16-F10 Zellen. ....	40
Abb. 16: Kalipermessungen am B16-F10 Tumor von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion von $1 \times 10^4$ Zellen.....	41
Abb. 17: Tumorflächenmessungen am B16-F10 Tumor von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion von $1 \times 10^4$ B16-F10 Zellen. ....	41
Abb. 18: Kalipermessungen am LLC Tumor von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion von $50 \times 10^4$ LLC Zellen.....	42
Abb. 19: Kalipermessungen am LLC Tumor von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen nach subkutaner Injektion von $10 \times 10^4$ LLC Zellen. ....	43
Abb. 20: Lungenmetastasierung von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen nach intravenöser B16-F10 Injektion. ....	44
Abb. 21: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen nach intradermaler Injektion. ....	45
Abb. 22: Immunzellpopulationen im B16-F10 Tumor von WT und CD73 <sup>-/-</sup> Mäusen nach intradermaler Injektion. ....	46
Abb. 23: MRT Messungen am B16-F10 Tumor von WT oder CD73 <sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach intradermaler Injektion. ....	47
Abb. 24: MRT-Messungen am B16-F10 Tumor von WT und WT knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach intradermaler Injektion. ....	48
Abb. 25: Immunzellpopulationen im B16-F10 Tumor von WT oder CD73 <sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach intradermaler Injektion. ....	48
Abb. 26: Anzahl an IFN- $\gamma$ sezernierenden Zellen im B16-F10 Tumor von WT oder CD73 <sup>-/-</sup> knochenmarktransplantierten WT Mäusen nach intradermaler Injektion. ....	49

## 7 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Schrader für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit zur Arbeit am Institut für Molekulare Kardiologie sowie der Übernahme des Referats. Auch in schwierigen Zeiten des Projektes hat er mich stets motiviert und vorangebracht. Herrn Prof. Dr. Schulz danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit als Koreferent.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Sandra Burghoff für ihre unermüdliche Betreuung der Versuche und der Vermittlung des wissenschaftlichen Arbeitens. Ohne ihre Unterstützung hätte ich dieses Projekt nie verwirklichen können.

Herrn Dr. Zhaoping Ding danke ich für seine Hilfe und Anleitung bei den tierexperimentellen Untersuchungen.

Herrn Dr. Christoph Jacoby und Herrn PD Dr. Ulrich Flögel danke ich für ihre Hilfestellung bei der Durchführung und Auswertung der MRT Aufnahmen.

Frau Sabine Bongardt und Frau Jutta Ziemann danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Laborexperimente.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Kardiologie und des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie sei gedankt für ihre Hilfe bei zahllosen Problemen. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr für mich hattet.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Homey, Herrn Dr. Andreas Hippe und Frau Dr. Anne Schorr von der Hautklinik am Universitätsklinikum Düsseldorf danke ich für ihre Zusammenarbeit bei der Durchführung der Tumorexperimente.

Den Mitarbeitern von Herrn Prof. Wilfried Budach von der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie am Universitätsklinikum Düsseldorf gebührt mein Dank für die Durchführung der Bestrahlungsversuche.

Der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Cornelia Mauch der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie an der Uniklinik Köln sei gedankt für ihre Hilfe bei der Vermittlung der intradermalen Tumorzellinjektionstechnik.

## **8 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

23. Januar 2014, Xuan Gong

Unterschrift