

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-,
Gefäß- und Kinderchirurgie

Chirurgische Klinik I

Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

Untersuchungen zum Differenzierungspotential
humaner Monozyten / Makrophagen *in vitro*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Michael Franz Toni Hausmann

aus Würzburg

Würzburg, August 2012

Referent: Prof. Dr. rer. nat. C. Otto

Korreferent: Prof. Dr. med. M. Eyrich

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2013

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Makrophagensystem	1
1.2	Differenzierung von M1-/M2-Makrophagen	1
1.3	Die Wachstumsfaktoren M-CSF und GM-CSF	3
1.4	Biologische Effekte von Laktat	5
1.5	Zielsetzung	6
2	Fragen	9
3	Methoden und Materialien	10
3.1	Kulturmedien und Pufferlösungen.....	10
3.2	Zelllinien.....	10
3.3	Gewinnung humaner Blutmonozyten.....	11
3.4	Durchflusszytometrie.....	12
3.5	Kultivierung nicht-aktivierter und aktivierter Makrophagen	13
3.6	Zellernte	14
3.7	Phänotypisierung von Makrophagen-Subtypen	15
3.8	Immunhistochemie	16
3.9	Bestimmung von Stickstoffmonoxid (NO).....	19
3.10	Echtzeit-Zellanalysen	20
3.11	Reverse Transkriptase Quantitative Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR).....	21
3.12	Bestimmung von Interleukin 12 (IL-12).....	24
3.13	Auswertung.....	25
4	Ergebnisse	26
4.1	Kulturbedingungen für nicht-aktivierte und aktivierte Makrophagen	26
4.2	Morphologie nicht-aktivierter und aktivierter Makrophagen	31
4.3	Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression des M1-Markers HLA-DR	37
4.4	Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression typischer M2-Marker	41
4.5	Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression des Phagozytose-Rezeptors FcγIII	47
4.6	Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression von Chemokinen und IDO	52
4.7	Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Sezernierung von NO und IL-12	58
4.8	Einfluss von Laktat auf die Differenzierung von Makrophagen	65
5	Beantwortung der Fragen	69
6	Diskussion	72
6.1	Differenzierungspotential der Wachstumsfaktoren M-CSF und GM-CSF	72
6.2	Laktat abhängige Effekte auf Monozyten-/ Makrophagenkulturen	75
6.3	Dynamik der Immunantwort von Monozyten-/ Makrophagen	76
7	Ausblick	78
8	Zusammenfassung	79
9	Literaturverzeichnis	81
10	Appendix	91
11	Abbildungsverzeichnis	108
12	Tabellenverzeichnis	111
	Danksagung, Lebenslauf	

1 Einleitung

1.1 Das Makrophagensystem

Makrophagen sind essentieller Teil der angeborenen Immunabwehr und überall im Körper zu finden. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus multipotenten Vorläuferzellen, zirkulieren als CD14-positive Monozyten im Blutkreislauf und reifen, wenn sie in Gewebe einwandern, zu Makrophagen. Phänotyp und Funktion werden dabei stark vom lokalen Mikromilieu beeinflusst^{*)}. Die unterschiedlichen Makrophagenpopulationen weisen gemeinsame Funktionen auf; hierzu gehören Phagozytose, Antigenpräsentation und Zytotoxizität. Zudem modulieren Makrophagen die Extrazellulärmatrix (ECM) und sezernieren zahlreiche Zytokine, Arachidonsäurederivate, Wachstums- und Komplementfaktoren sowie Enzyme (Takahashi K, 2000; Murdoch C et al., 2004; Lewis CE und Pollard J, 2006).

1.2 Differenzierung von M1- / M2-Makrophagen

Monozyten / Makrophagen reagieren überaus empfindlich auf verschiedenste Mediatoren, die sie in unterschiedliche Subtypen differenzieren lassen. Trotz dieser Diversität sind sämtliche Makrophagen an dem typischen Marker CD68 zu identifizieren, der Bestandteil intrazellulärer lysosomaler Membranproteine ist (Becker S et al., 1987; Holness C, Simmons D, 1993; Lipman M et al., 1995; Fonseca JE et al., 2002; Brown BN et al., 2009). Hingegen verlieren reife Makrophagen auf ihrem Differenzierungsweg das für Monozyten charakteristische CD14-Antigen (Haziot A et al., 1988; Landmann R et al., 1991; Haugen TS et al., 1998; Gordon S und Taylor PR, 2005).

Das bekannteste Differenzierungsschema für Makrophagen ist das der «klassisch» aktivierten M1-Makrophagen und der «alternativ» aktivierten M2-

^{*)} Die Darstellung behandelt ausschließlich die aus Blutmonozyten rekrutierten Makrophagen und nicht die lang-
lebig ansässigen Gewebemakrophagen wie z.B. die Kupferzellen der Leber, die eine M-CSF unabhängige Prolifera-
tion und Differenzierung aufweisen (Rutherford MS et al., 1993; Takahashi K, 2000).

Makrophagen (Abb. 1.1). Dabei stellen diese beiden Typen aktivierter Makrophagen wohl nur die entferntesten Positionen des Differenzierungspotentials von Makrophagen dar. Eine Makrophagenpopulation, die nahezu ausschließlich aus M1- oder M2-Makrophagen besteht, ist entweder durch den gezielten Einsatz bestimmter Zytokine in Zellkulturen entstanden oder im Organismus im Rahmen chronischer Entzündungen, wozu auch Tumorerkrankungen gehören. Während die wesentliche Aufgabe von M1-Makrophagen die Abwehr von Mikroorganismen ist, wirken M2-Makrophagen immunsuppressiv und sind überwiegend an der Beseitigung von Zelltrümmern beteiligt; auch fördern sie Wundheilung und Angiogenese (Mantovani A et al., 2002; Solinas G et al., 2009).

M1-Makrophagen entwickeln sich aus nicht-aktivierten Makrophagen, die mit bestimmten Faktoren wie IFN γ und LPS, eine aus der Zellwand von Bakterien stammende Verbindung aus Zucker- und Lipideinheiten, in Kontakt kommen. M1-Makrophagen sind Effektorzellen und weisen Rezeptoren zur Opsonisierung (CD16, Fc γ III) und / oder Antigenpräsentation (HLA-DR) bzw. Kostimulation (CD80, CD86) auf (Verreck FA et al., 2006; Ohri CM et al., 2009; Solinas G et al., 2009). Sie sezernieren IL-1, IL-12, IL-23 und TNF α und produzieren Stickstoff- und Sauerstoffradikale (Mosser DM, 2003; Verreck FA et al., 2006; Ohri CM et al., 2009; Solinas G et al., 2009). Zelltoxische M1-Makrophagen können auch Tumoren zerstören (Allavena P et al., 2008).

Im Gegensatz zu M1-Makrophagen sind M2-Makrophagen sehr viel heterogener. In Abhängigkeit der einwirkenden Differenzierungssignale entstehen unterschiedliche M2-Typen: M2a-Makrophagen durch die Interleukine (IL) IL-4 und IL-13; M2b-Makrophagen durch Bindung von Immunkomplexen (Komplexe aus Antigen und Antikörper) an Toll-like Rezeptoren (TLR) und M2c-Makrophagen durch IL-10, Prostaglandine (PGE $_2$) und Glukokortikoide (Goerdts S et al., 1999; Mosser DM, 2003; Mantovani A et al., 2004; Ohri CM et al., 2009). Für M2-Makrophagen sind hohe Spiegel an IL-10 und niedrige Spiegel an IL-12

charakteristisch (Sica, A et al., 2006; Solinas G et al., 2009). Sie weisen zudem eine gesteigerte Synthese der Chemokine CCL2 und CCL18 auf (Sica A et al., 2006; Solinas G et al., 2009), und sie exprimieren Scavenger (CD163)- und Mannose (CD206)-Rezeptoren (Goerdt S, Orfanos CE, 1999; Mosser DM, 2003; Mantovani A et al., 2004; Verreck FA et al., 2006; Ohri CM et al., 2009; Solinas G et al., 2009). M2-Makrophagen zeigen zwar eine ausgeprägte Phagozytose, sie präsentieren aber kaum Antigene (Stein M et al., 1992; Hsieh CS et al., 1992; Goerdt S, Orfanos CE, 1999; Mantovani A et al., 2002; Solinas G et al., 2009).

Die starke Präsenz von IL-10 und IL-4 sowie M-CSF im Tumormilieu lässt einwandernde Monozyten zu sogenannten tumorassoziierten Makrophagen oder TAM differenzieren, die den M2-Makrophagen zuzuordnen sind. (Lewis CE, Pollard JW, 2006; Solinas G et al., 2009). Die Einwanderung von Monozyten aus dem Blutkreislauf wird durch Mediatoren wie CCL2 und M-CSF chemotaktisch vermittelt (Lewis CE, Pollard JW, 2006; Solinas G et al., 2009). Tumorassoziierte Makrophagen, denen eine starke Expression von CD163 und CD206 gemeinsam ist, sind unfähig, Tumorzellen zu zerstören. Sie sind zudem unfähig, dem Immunsystem Tumorantigene zu präsentieren, was die Ausbildung einer effektiven zelltoxischen Immunantwort verhindert.

1.3 Die Wachstumsfaktoren M-CSF und GM-CSF

Das als Wachstums- / Proliferations- und Differenzierungssignal bekannte M-CSF (*monocyte-colony stimulating factor*) stellt den Hauptregulator für Proliferation und Differenzierung monozytärer Zellen dar. M-CSF, das permanent im Körper nachzuweisen ist (Lee MT et al., 1990; Rutherford MS, et al., 1993), da es z.B. autoregulatorisch von Monozyten sezerniert wird, induziert zwar keine aktivierten Makrophagen, doch zeigen die induzierten, nicht-aktivierten M-CSF-Makrophagen bereits Eigenschaften von M2-Makrophagen (Rutherford MS et al., 1993; Murdoch C et al., 2004; Pollard JW, 2004; Kawamura K et al., 2009; Solinas G et al., 2009). Sie werden in der Literatur auch als M2 \emptyset Makrophagen

bezeichnet und exprimieren die typischen Oberflächenproteine eines aktivierten M2-Makrophagen wie Scavenger (CD163)- und Mannose (CD206)-Rezeptoren (Verreck FA et al., 2006). Unter dem Einfluss von M-CSF entstehen somit anti-inflammatorische Makrophagen.

Wirken auf M-CSF-Makrophagen inflammatorische Signale (IFN γ , LPS) so entwickeln sich aktivierte M1-Makrophagen (Abb. 1.1). Martinez beschreibt, dass die Entwicklung von M1-Makrophagen aus M-CSF-Makrophagen mit einem dramatischen Wandel im Transkriptom, also der Gesamtheit der Transkripte oder mRNA-Moleküle, einhergeht (Martinez, FO et al., 2006). So weisen beim Übergang von nicht-aktivierten M-CSF-Makrophagen zu klassisch-aktivierten M1-Makrophagen ca. 90 % der Gene einen eindeutigen Unterschied in ihrer Aktivität auf. Werden M-CSF-Makrophagen zu M2-Makrophagen aktiviert, so ist nur bei ca. 8 % der Gene ein Aktivitätsunterschied zu messen. Die Untersuchung von Martinez macht somit deutlich, dass nicht-aktivierte M-CSF-Makrophagen bereits mehr Eigenschaften von M2- als von M1-Makrophagen aufweisen.

Auch GM-CSF induziert einen nicht-aktivierten Makrophagentyp, der als GM-CSF-Makrophage bezeichnet wird (Abb. 1.1). In Gegenwart proinflammatorischer Signale werden GM-CSF-Makrophagen zu GM1-Makrophagen aktiviert (Sweet MJ, Hume DA, 1996), die im Vergleich zu M1-Makrophagen eine verminderte Fähigkeit zur Phagozytose aufweisen (Verreck FA et al., 2006; Leidi M et al., 2009). GM1-Makrophagen gehören aber nicht zu den M2-Makrophagen, da ihnen die für M2-Makrophagen charakteristischen Oberflächenproteine wie Scavenger (CD163)- und Mannose (CD206)-Rezeptoren fehlen (Abb. 1.1).

Die beiden Wachstumsfaktoren GM-CSF und M-CSF zeigen somit deutliche biologische Unterschiede und sind für die Differenzierung von Makrophagen mit unterschiedlichen Eigenschaften von grundlegender Bedeutung.

1.4 Biologische Effekte von Laktat

Lange Zeit wurde Laktat, das Salz der Milchsäure, als Stoffwechselendprodukt angesehen. Mit einer Säurekonstante (pK_s) von 3,9 liegt Laktat bei einem physiologischem pH-Wert von 7,2 bis 7,4 dissoziiert im extrazellulären Raum vor. Erhöhte Konzentrationen an Laktat sind häufig bei Entzündungen und in Tumoren zu finden. Charakteristisch für das extrazelluläre Tumormilieu sind hohe Protonen- und Laktatkonzentrationen sowie schwankende Sauerstoffkonzentrationen (Kimura H et al., 1996; Braun RD et al., 1999; Gilead A, Neeman M, 1999; Gatenby RA, Gillies RJ, 2004). Bei limitierter Sauerstoffversorgung wird Glukose zum wichtigsten Energielieferanten (Vaupel, P et al., 1989). Der Stoffwechsel von Tumoren, die in sauerstoffarmen bzw. hypoxischen Bereichen liegen, ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte Aktivität der sauerstoffunabhängigen Stoffwechselwege Glykolyse und Pentosephosphatweg (Warburg O, 1924; Semenza G et al., 2001; DeBerardinis RJ et al., 2008; Kroemer G, Pouyssegur J, 2008; Matés JM et al., 2009; Van der Heiden MG et al., 2009). In Tumoren lassen sich Laktatwerte messen, die zwischen 6 bis 15 $\mu\text{mol/L}$ pro Gramm Tumorgewebe liegen, teilweise sogar bis zu 40 $\mu\text{mol/L}$. Bei Krebspatienten korrelieren hohe intratumorale Laktatspiegel in aller Regel mit einer schlechten Prognose (Walenta S et al., 2000 u. 2004). Bei Malignomen mit hohen Laktatspiegel treten häufiger Metastasen auf und die Tumorprogression läuft rascher ab (Walenta S et al., 2000; Walenta S und Mueller-Klieser WF, 2004).

Makrophagen, die sich in Bereichen von Wunden, Entzündungen, aber auch Tumoren aufhalten, benötigen große Mengen an rasch verfügbarer Energie, um ihre zahlreichen physiologischen Aufgaben erfüllen zu können. Experimentell wurde gezeigt, dass Makrophagen das in diesen Bereichen in großen Mengen vorkommende Laktat als Energiequelle verwerten können (Loike, JD et al., 1993). Die Aufnahme erfolgt dabei präferentiell im sauren Milieu. Wissenschaftler in Japan erkannten, dass das von Tumorzellen sezernierte

Laktat eine Überexpression von IL-23 in Makrophagen stimuliert (Shime H et al., 2008; Kambayashi T et al., 1995). IL-23 ist ein Interleukin, dass im Tumormilieu oft erhöht vorzufinden ist (Langowski JL et al., 2006).

Dass die hier beschriebenen Effekte von Laktat nicht allein auf die hohe Protonenkonzentration zurückzuführen ist, belegen Versuche mit entsprechenden Konzentrationen an Salzsäure; hier wurde lediglich ein Teil der mit Laktat erzielten Effekte beobachtet. So beeinflusst Laktat die Genexpression bereits auf mRNA-Ebene, während ein niedriger pH-Wert auf posttranskriptionaler Ebene wirkt (Fischer K et al., 2007). Es wird vermutet, dass Laktat die ADP-Ribosylierung bestimmter Promotorregionen verhindert, was zur Induktion der Zytokinsynthese führt (Gladden LB, 2004). ADP-Ribosylierung ist eine Form der posttranslationalen Modifizierung, bei der Proteine durch Anheften monomerer bzw. polymerer ADP-Ribosylgruppen verändert werden.

1.5 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war, das allgemein anerkannte Schema der auf zwei Stimuli beruhenden Makrophagenaktivierung zu überprüfen. Die beiden englischen Begriffe «*priming*» und «*triggering*» beschreiben die wesentlichen Schritte dieser Zwei-Schritt-Aktivierung («*two-hit-hypothesis*»). Mit «*priming*» wird dabei die «Vor-Differenzierung» / Reifung eines ruhenden Monozyten aufgrund lokaler Signale in einen nicht-aktivierten Vorläufer-Makrophagen bezeichnet (Abb. 1.1). Unter «*triggering*» versteht man die endgültige funktionelle Aktivierung von Vorläufer-Makrophagen, die zur Ausdifferenzierung zu einem bestimmten Makrophagen-Subtyp führt, entweder zu proinflammatorischen M1-Makrophagen oder zu immunregulatorischen M2-Makrophagen (Stein M et al., 1992).

Neuere Erkenntnisse zur Makrophagendifferenzierung lassen vermuten, dass M-CSF-Makrophagen bereits über Eigenschaften von M2-Makrophagen und

GM-CSF-Makrophagen über Eigenschaften von M1-Makrophagen verfügen. Somit scheinen die beiden Wachstumsfaktoren M-CSF und GM-CSF neben «*priming*»-Eigenschaften auch «*triggering*»-Eigenschaften aufzuweisen (Verreck FA et al., 2006). Auch lassen weiterführende Arbeiten den Schluss zu, dass die Ausdifferenzierung der Makrophagen keineswegs so stabil und endgültig ist, wie bisher angenommen (Porcheray F et al., 2005).

Zum besseren Verständnis der Makrophagendifferenzierung wurde in der vorliegenden Arbeit der Phänotyp von M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen intensiv analysiert. Auch die Aktivierung von GM-CSF-Makrophagen zu M1-Makrophagen (sie werden in dieser Arbeit als GM1-Makrophagen bezeichnet) bzw. die Aktivierung von M-CSF-Makrophagen zu M1-Makrophagen bzw. M2-Makrophagen wurde untersucht (Abb. 1.1). Zudem wurden die verschiedenen Makrophagen-Subtypen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, zelltoxisches NO und IL-12 zu sezernieren.

Auch das Potential von Laktat als Differenzierungsfaktor für Monozyten wurde untersucht. Dazu wurden sowohl unreife Monozyten als auch verschiedene Makrophagen-Subtypen mit Laktat versetzt, um einen möglichen Wechsel im Phänotyp zu erkennen. Mit diesen Versuchen sollte die Frage beantwortet werden, ob das im Tumormilieu häufig erhöht vorzufindende Laktat selbst ein Differenzierungssignal darstellt und bevorzugt den protumoralen M2-Phänotyp induziert.

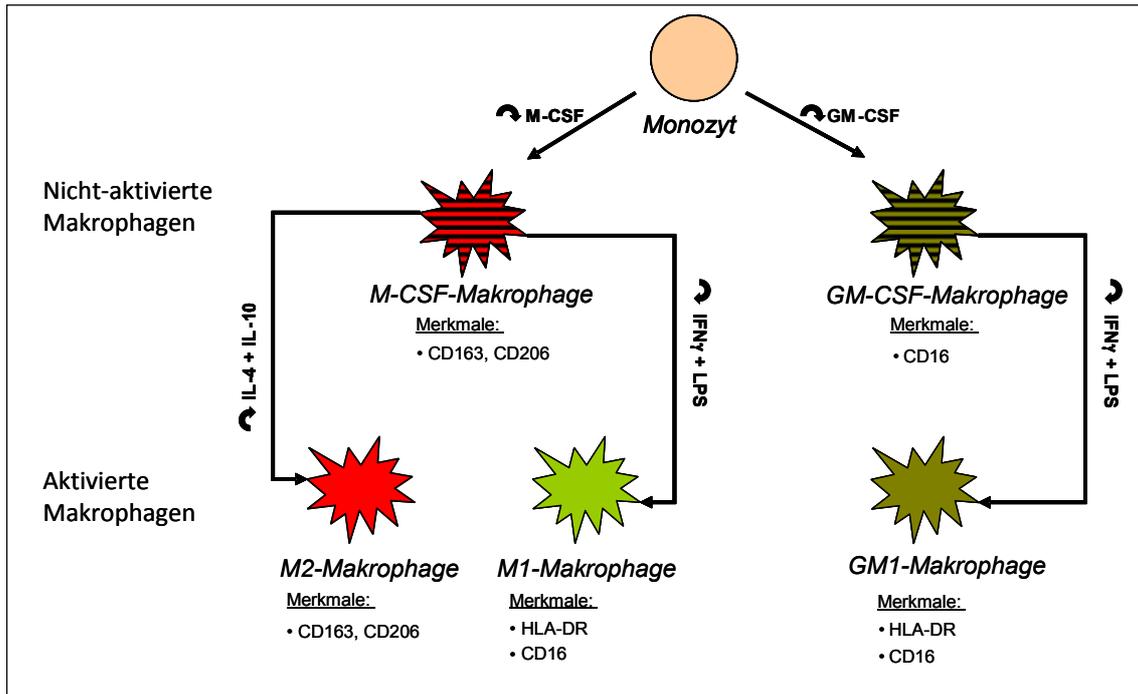


Abb. 1.1: Die in dieser Arbeit untersuchten Wege der Makrophagenaktivierung. Weitere Informationen sind im Haupttext zu finden. Unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren M-CSF und GM-CSF entstehen M-CSF- bzw. GM-CSF-Makrophagen. Hierbei handelt es sich um nicht-aktivierte Makrophagen, die erst aktiviert werden müssen, um ihre Effektorfunktionen zu erhalten. Die Aktivierung mit IFN γ und LPS führt zu inflammatorischen M1-Makrophagen mit zelltoxischen Eigenschaften. Die Aktivierung mit IL-4 und IL-10 führt zu M2-Makrophagen, die Zelltrümmer beseitigen und an Wundheilung und Angiogenese beteiligt sind. Im Gegensatz zu M1-Makrophagen sind GM1-Makrophagen bisher noch wenig untersucht. Zusätzlich angegeben sind einige Marker, die für die jeweilige Makrophagenpopulation charakteristisch sind (s. auch Kapitel 3.7 «Material und Methoden»).

2 Fragen

Das Ziel dieser Arbeit war, die Entwicklung von Makrophagen unter Berücksichtigung neuer Erkenntnisse zur Funktion der Wachstumsfaktoren M-CSF und GM-CSF *in vitro* zu charakterisieren. Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit beantwortet werden (siehe hierzu auch Abb. 1.1):

- 2.1 Welchen Phänotyp weisen die durch M-CSF und GM-CSF induzierten nicht-aktivierten Makrophagen (M-CSF- bzw. GM-CSF-Makrophagen) auf?
- 2.2 Ähneln Phänotyp und Eigenschaften von M-CSF-Makrophagen bereits mehr M2- als M1-Makrophagen?
- 2.3 Ähneln Phänotyp und Eigenschaften von GM-CSF-Makrophagen bereits mehr M1-Makrophagen als M2-Makrophagen? Welchen Phänotyp und welche Funktion weisen GM1-Makrophagen auf?
- 2.4 Laktat ist in Tumoren häufig erhöht, und Tumor-assoziierte Makrophagen weisen Eigenschaften von M2-Makrophagen auf.
Weist Laktat Eigenschaften eines Differenzierungsfaktors auf?
Induziert Laktat M2-Makrophagen?

3 Material und Methoden

3.1 Kulturmedien und Pufferlösungen

Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 in „Dutch Modification“ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit folgenden Zusätzen verwendet (in Klammern jeweils die Endkonzentration): Penicillin G (100 U/mL), Streptomycin (100 µg/mL), L-Glutamin (2 mmol/L), 2-Mercaptoethanol (50 µmol/L), Natriumpyruvat (1 mmol/L), MEM nicht-essentielle Aminosäuren (1 %) (alle Invitrogen GmbH) sowie hitze-inaktiviertes, gepooltes humanes AB-Serum (PAA Laboratoires GmbH, Cölbe) in den Konzentrationen 1 % und 5 %.

PBS («Phosphate buffered saline»): Die phosphatgepufferte Salzlösung (Invitrogen GmbH) enthält Natriumchlorid (140 mmol/L), Kaliumchlorid (2,7 mmol/L), Natriumdihydrogenphosphat (7,2 mmol/L) sowie Kaliumhydrogenphosphat (1,5 mmol/L).

Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan): Dieser Puffer enthält 138,6 mmol/L Natriumchlorid (Merck, Darmstadt), 3,8 mmol/L Tris-HCl (Merck, Darmstadt) und 2 g/L bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Die Substanzen wurden in destilliertem Wasser gelöst und ein pH-Wert von 7,4 eingestellt.

3.2 Zelllinien

Folgende Apheresen wurden für die vorliegende Arbeit verwendet: Aph-33 und Aph-34. Die meisten Versuche wurden mit Aph-33 durchgeführt. Aph-34 wurde für Phänotypisierungs- und NO-Versuche genommen, nachdem gezeigt wurde, dass die Monozyten beider Apheresen bei gleichen Kulturbedingungen eine vergleichbare Differenzierung aufweisen. Der Anteil an angereicherten Monozyten in den Apheresen wurde durchflusszytometrisch mit 45-50 % ermittelt. Sie waren für den Standard-Monozytenmarker CD14 positiv (Goyer SM et al., 1988;

Haziot A et al., 1988). Dies entsprach einer Reinheit der Präparate an CD14 positiven Zellen von 5-6 %.

3.3 Gewinnung humaner Blutmonozyten

Im Institut für Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg fallen als Nebenprodukt bei der Thrombozytenspende durch Leukozytendepletion mit LRSC («leukoreduction system chambers») sog. leukozytenreiche «Blutzapfen» an (Abb. 3.1).



Abb. 3.1: Leukozytenreicher «Blutzapfen» oder LRSC.

Die Blutzapfen entstehen innerhalb des Zellseparators, in dem durch Zentrifugation die einzelnen Blutbestandteile aufgeteilt werden. Das Blut wurde dabei aus einer peripheren Vene entnommen. Die Spende erfolgte anonym. Das Blut aus den Apheresen wurde mit gleichem Volumen PBS verdünnt, anschließend vorsichtig auf die gleiche Menge FicoLite-H (Linaris, Wertheim) geschichtet und für 20 Minuten bei 1000 xg ohne Bremse zentrifugiert. Die leukozytenreiche Interphase wurde entnommen, zweimal mit PBS für jeweils 10 Minuten bei 600 xg gewaschen[†] und anschließend ihre Zellzahl in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Jeweils 2×10^8 Zellen wurden auf große Petrischalen mit einer 15 cm^2 großen Wachstumsfläche verteilt und über Nacht in Kulturmedium kultiviert.

[†] Der Begriff Waschen beschreibt folgende Arbeitsschritte: Auffüllen der Zellsuspension mit Kulturmedium bzw. Pufferlösung, Pelletieren durch Zentrifugieren, Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren der Zellen mit Kulturmedium bzw. Pufferlösung.

3.4 Durchflusszytometrie

Prinzip: Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine laserunterstützte Technik zur Messung physikalischer und biochemischer Eigenschaften biologischer Partikel (z.B. Zellen). Signale entstehen durch Lichtstreuung und durch Fluoreszenz, wobei jede Zelle einzeln vermessen wird. Die Auswertung kann qualitativ und quantitativ erfolgen. Gemessen wird die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (Ablenkwinkel 1° bis 10° ; *forward angle light scatter*, FCS) als Maß der Zellgröße und die Lichtstreuung zur Seite (Ablenkwinkel 90° ; *side angle light scatter*, SSC) als Maß für die Zellgranularität. Die zur Phänotypisierung verwendeten fluorochrommarkierten Antikörper können u.a. mit R-Phycoerythrin (PE; Emissionsmaximum bei 575 nm) bzw. mit Fluoreszein-5-isothiocyanat (FITC; Emissionsmaximum bei 520 nm) konjugiert sein. Da sich die Emissionsspektren beider Fluoreszenzfarbstoffe überschneiden, wird zum Ausschluß falschpositiver bzw. falschnegativer Messwerte eine rechnerische Korrektur der Rohdaten durchgeführt; dieser Vorgang wird als Kompensation bezeichnet.

Tab. 3.1: Liste der verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse. FITC: Fluoreszein-5-isothiocyanat; **PE:** R-Phycoerythrin.

Antikörper	Firma	Konjugat
Mouse Anti Human CD14	Biomeda, USA	Nicht konjugiert
Mouse Anti Human CD68	AbDSerotec, Düsseldorf, D	FITC
Mouse Anti Human CD83	AbDSerotec, Düsseldorf	FITC
Mouse Anti Human CD16	AbDSerotec, Düsseldorf	FITCt
Donkey Anti Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch Europe, UK	FITC°/°PE-
Isotyp-Kontrollantikörper		
Maus IgG1,κ Antikörper	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg	PE
Maus IgG1,κ Antikörper	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg	FITC

Praktisches Vorgehen: Jeweils 1×10^6 Zellen der zu untersuchenden Blutleukozyten wurden in 50 μ L PBS mit dem jeweiligen Antikörper (Tab. 3.1) für

20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 μ L PBS zu jedem Röhrchen wurden die Proben bei 300 xg für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zur Messung am Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg) in 300 μ L PBS resuspendiert. Mit jeder Messung wurden 10.000 Ereignisse mit dem Programm BD CellQuest Pro (Version 5.1.1) aufgenommen und gespeichert. Wurden unkonjugierte Antikörper verwendet (Tab. 3.1), so folgte nach dem ersten Inkubationsschritt die Inkubation mit einem konjugierten Sekundär-Antikörper (Donkey-Anti-Mouse), der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist.

Vor der Zugabe des anti-CD68-Antikörpers wurden die Zellen mit dem Leucoperm-Kit der Firma AbDSerotec permeabilisiert (www.abdserotec.com). Zur Überprüfung unspezifischer Antikörperbindungen wurde als Negativkontrolle pro Messreihe jeweils ein gesondertes Probenröhrchen mit 1 μ L eines nicht-bindenden Antikörpers, der den gleichen Isotyp wie die Analyse-Antikörper aufwies, verwendet (Tab. 3.1). Mit einem weiteren Probenröhrchen («Leerprobe») ohne Zusätze (aber mit Zellen) wurde die Hintergrundfluoreszenz der jeweiligen Messreihe ermittelt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels WinMDI in der Version 2.8 (*Windows multiple document interface, Flow cytometry application*, Joseph Trotter, Scripps Research Institute).

3.5 Kultivierung nicht-aktivierter und aktivierter Makrophagen

Blutmonozyten wurden nach einem modifiziertem Protokoll von Verreck FA, 2006 und von Martinez FO, 2006 kultiviert. Hierzu wurden bis zu 2×10^8 periphere Blutleukozyten mit 10 ml Kulturmedium auf große Petrischalen mit einer Wachstumsfläche von 15 cm² (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) verteilt oder bis zu 2×10^7 Leukozyten mit 500 μ L Kulturmedium pro Vertiefung

(1,9 cm² Wachstumsfläche) einer Zellkulturschale mit 24 Vertiefungen (Greiner bio-one) gegeben und für 1 Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert (NurAire NU-5500). Die nicht-adhärennten Zellen wurden verworfen und die adhärennten Zellen (= Monozyten) einmal gewaschen.

Zur Induktion der verschiedenen Makrophagen-Subtypen wurden die adhärennten Zellen mit 50 ng/mL M-CSF (R&D Systems, Minneapolis) oder mit 50 ng/mL GM-CSF (R&D Systems) für 7 Tage inkubiert.

Zur Aktivierung der Zellen (M-CSF- bzw. GM-CSF-Makrophagen) wurden sie mit folgenden Zytokinen bzw. inflammatorischen Faktoren für weitere 3 Tage inkubiert (Abb. 1.1): 100 ng/mL LPS (Lipopolysaccharide von *E. coli* 055:B5; Sigma-Aldrich); 15 ng/mL IFN- γ (Strathmann Biotec AG, Hamburg); 15 ng/mL IL-4 und IL-10 (beide R&D Systems). Die verwendeten Konzentrationen an Zytokinen und Faktoren entsprechen dabei den üblichen Konzentrationen für *in vitro*-Kulturen.

Um einen biologischen Effekt von Laktat nachzuweisen, erhielten die Zellen nach 72 Stunden im Differenzierungsmedium (s. oben) für weitere 24 Stunden 15 mmol/L Laktat (Sigma-Aldrich, Deisenhof). Diese Konzentration wurde gewählt, da hier die pH-Abhängigkeit eines eventuellen Effektes deutlich geringer ausfällt (Gottfried E et al., 2006; Shime H et al., 2008).

3.6 Zellernte

Das Kulturmedium wurde entfernt und die Petrischalen bzw. Zellkulturflaschen mit 10 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden 10 mL kalziumfreies PBS zur Auflösung der Adhärenz hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation im Brutschrank wurden die abgelösten Zellen entnommen und die weiterhin adhärennten Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber (Nunc, Wiesbaden) vom Boden der

Petrischale bzw. Zellkulturflasche abgelöst und für 6 Minuten bei 220 xg und 20°C zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer nach der «L-Regel», bei der nur die auf den inneren Begrenzungslinien liegenden Zellen mitgezählt werden, bestimmt.

3.7 Phänotypisierung von Makrophagen-Subtypen

Zur Identifizierung von Makrophagen-Subtypen wurden folgende Oberflächenmarker verwendet:

CD68: Intrazellulärer Lysosomenmarker, pan-Makrophagen-Marker.

CD16: Der Opsonierungsrezeptor FcγIII korreliert mit der Fähigkeit von Makrophagen zu phagozytieren.

HLA-DR: Der MHC-Klasse II-Rezeptor ist für die Antigenpräsentation von großer Bedeutung und wird überwiegend von M1-Makrophagen exprimiert.

CD163: Ein Scavengerrezeptor, der für die Endozytose wichtig ist; typischer Marker für M2-Makrophagen.

CD206: Ein Manoserezeptor vom Typ I (ein «*pattern recognition receptor*»), der von M2-Makrophagen und tumorassoziierten Makrophagen exprimiert wird.

Die Marker sind u.a. in folgenden Publikationen beschrieben: Szein MB et al., 1984; Clarkson SB, Ory PB, 1988; Stein M et al., 1992; de Waal Malefyt R et al., 1993; Van den Heuvel MM et al., 1999; Sulahian TH et al., 2000; Fonseca JE et al., 2002; Mosser DM, 2003; Moestrup SK et al., 2004; Nguyen T et al., 2005; Porcheray F et al., 2005; Aron-Wisnewsky J et al. 2009; Jensen TO et al., 2009; Leidi M et al., 2009; Ohri CM et al., 2009; Philippidis P et al., 2010).

3.8 Immunhistochemie

Prinzip: Bei der «Sandwich»-Technik werden Zellen oder Gewebe zunächst mit einem Primärantikörper, der gegen das gewünschte Antigen gerichtet ist, inkubiert (Abb. 3.2). Nicht-gebundene Antikörper werden gewaschen und ein mit Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper zugegeben, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Nach einem weiteren Waschschritt wird überschüssiger Sekundärantikörper entfernt und das Peroxidasesubstrat Diaminobenzidin (DAB) zugesetzt.

Das Peroxidasesubstrat DAB wird durch die Peroxidase oxidiert, wobei sich ein unlösliches, braun gefärbtes Präzipitat bildet – und zwar an den Stellen, an denen der Primärantikörper an sein Antigen bindet. Eine Braunfärbung zeigt also das Vorhandensein des jeweiligen Markers an.

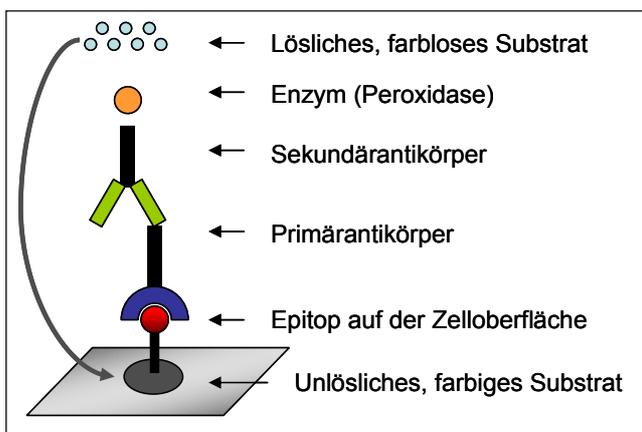


Abb. 3.2: Prinzip der immunhistochemischen Färbung (Sandwich-Technik). Mit der Immunhistochemie werden Antigene in Geweben anhand sichtbarer Reaktionsprodukte nachgewiesen, die bei der Spaltung eines farblosen Substrats durch die an Antikörper gekoppelte Enzyme entstehen.

Praktisches Vorgehen: Cytospin-Präparate wurden für 5 Minuten in Aceton bei Raumtemperatur fixiert und anschließend für 10 Minuten getrocknet. Nach dreimaligem Waschen – hierzu wurden die Präparate für jeweils fünf Minuten in Tris-HCl geschwenkt – wurden die Cytospins mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Diese wurden dann über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlschrank inkubiert. Am zweiten Tag wurden nach erneutem dreimaligem Waschen mit Tris-HCl die Präparate mit dem Sekundärantikörper Rabbit-anti-

Mouse oder Rabbit-anti-FITC, die mit Peroxidase konjugiert sind, für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach einem weiteren Waschschrift wurden 1 bis 2 Tropfen (je nach Größe des Präparates) von frisch angesetztem Liquid-DAB (3,3-Diaminobenzidin, BioGenex, San Ramon) zugesetzt. Die Färbung wurde beobachtet und spätestens nach 4,5 Minuten gestoppt. Nach der Kernfärbung in Mayer's Hämalaun (Merck, Darmstadt) für 60 Sekunden und dem anschließenden «Bläuen» unter Leitungswasser zur Gegenfärbung wurden die Objektträger in aufsteigender Alkoholreihe und abschließend in Xylol entwässert. Danach erfolgte die Eindeckung der Präparate mit Entellan (Merck, Darmstadt). Folgende Antikörper wurden verwendet (Tab. 3.2):

Tab. 3.2: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.

<i>Primärantikörper (Maus-anti-Human)</i>	<i>Firma</i>	<i>Verdünnung</i>
<i>CD14</i>	Biomeda, Hayward	1:100 mit Antibody Diluent
<i>CD68</i>	Dako Denmark	1:100 mit Antibody Diluent
<i>CD163</i>	AbDSerotec, Düsseldorf, D	1:100 mit Antibody Diluent
<i>CD206</i>	AbDSerotec, Düsseldorf	1:100 mit Antibody Diluent
<i>HLA-DR</i>	AbDSerotec, Düsseldorf	1:100 mit Antibody Diluent
<i>CD16 (FITC konjugiert)</i>	AbDSerotec, Düsseldorf	1:50 mit Antibody Diluent
<i>Sekundärantikörper</i>		
<i>Rabbit Anti Mouse</i>	Dako, Glostrup	1:100 mit Tris-HCL
<i>Rabbit Anti FITC</i>	AbDSerotec, Düsseldorf	1:100 mit Tris-HCL

Die Cytospins wurden bei 400-facher Vergrößerung digital fotografiert (Olympus Camedia C-5050). Die in dieser Arbeit präsentierten Bilder stellen repräsentative Ausschnitte des Gesamtpräparates dar. Die Helligkeit und der Kontrast wurden mit dem Microsoft Office Picture Manager 2003® nachbearbeitet.

Färbescore: Pro Cytospin wurden fünf repräsentative Felder gewählt, dreimal ausgezählt und anschließend die Mittelwerte gebildet. Je nach prozentualem Anteil der gefärbten Zellen wurde dem Cytospin dann ein Wert zugeteilt: **Score 0:** <10 %; **Score 1:** 10-39 %; **Score 2:** 40-75 %; **Score 3:** >75 %.

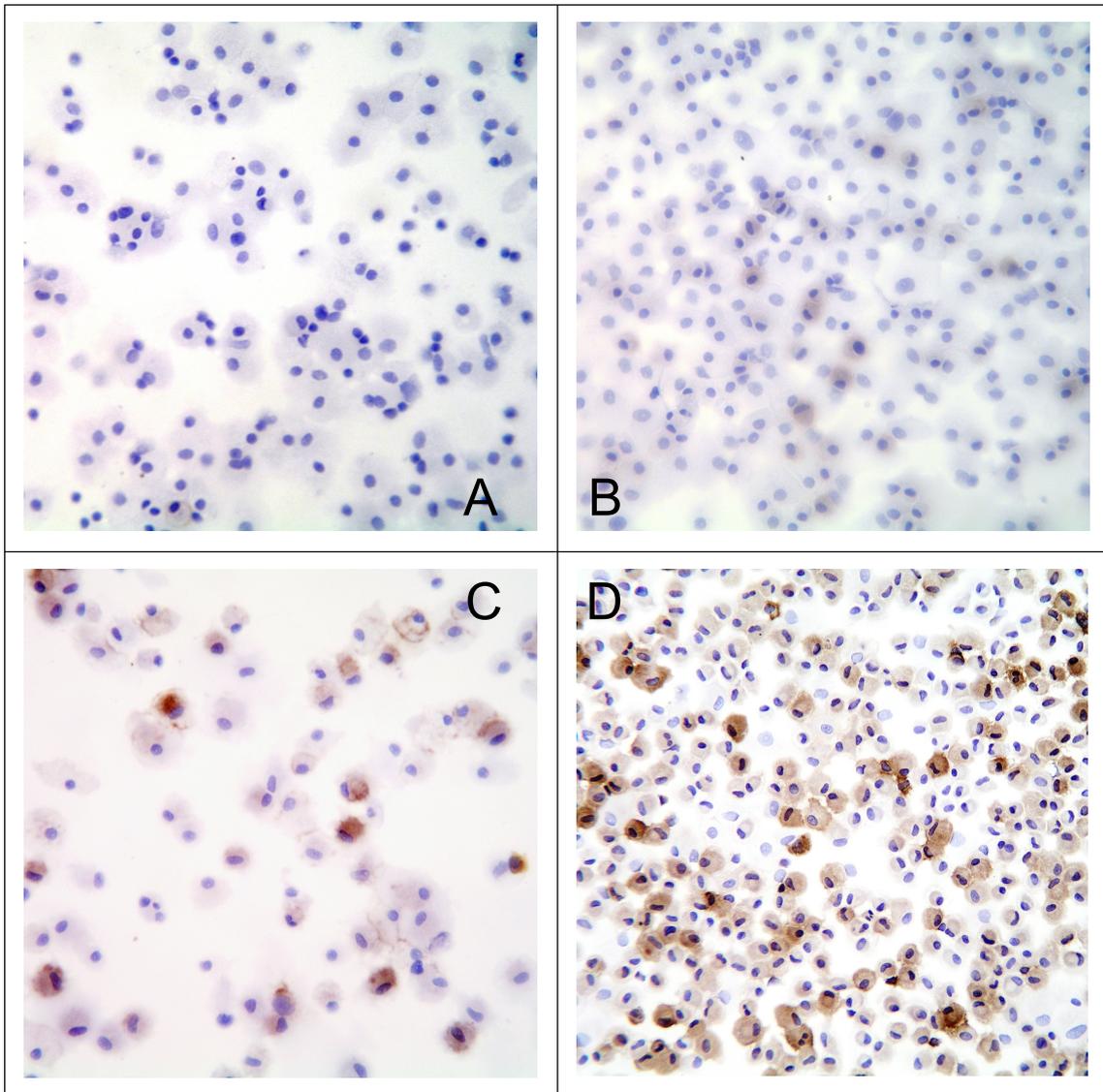


Abb. 3.3: Beispiele zum Färbescore. Teilabbildung **A** ist ein Beispiel für den Score 0 (<10 % gefärbte Zellen); Teilabbildung **B** für Score 1 (10-39 % gefärbte Zellen); Teilabbildung **C** für Score 2 (40-75 % gefärbte Zellen) und Teilabbildung **D** für Score 3 (>75 % gefärbte Zellen).

Kontrollen bestanden aus der alleinigen Zugabe des Sekundärantikörpers zu jeweils einem Teil der Präparate. Diese sogenannten Negativkontrollen sind notwendig, um spezifische von unspezifischen Färbungen zu unterscheiden.

3.9 Bestimmung von Stickstoffmonoxid (NO)

Prinzip: NO wird indirekt über dessen stabiles Endprodukt Nitrit (NO_2^-) in einer Farbreaktion mit dem Griess-Reagenz (Sigma-Aldrich) bestimmt. In einer Diazotierungsreaktion entsteht ein rotes Chromophor, das bei 570 nm gemessen wird.

Praktisches Vorgehen: Die Überstände für die NO-Messung wurden aus Zellkulturschalen mit 24 Vertiefungen gewonnen. Jeweils 500 μL der Zellkulturüberstände wurden in Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und bei 16.000 xg und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, um eventuelle Zellreste zu entfernen. Die Überstände wurden anschließend in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

Der Standard zur Erstellung einer Eichkurve wurde wie folgt angesetzt:

- 1) 0,04 g NaNO_2 (Sigma-Aldrich) wurden mit 20 mL Aqua dest. versetzt
- 2) 100 μL dieser 2 mg/mL Lösung wurden mit 9,9 mL Aqua dest. verdünnt
- 3) 1,73 mL der 1:100 Verdünnung wurden mit 8,27 mL Aqua dest. vermischt

Dies ergab den gewünschten 500 $\mu\text{mol/L}$ -Standard.

Der Standard wurde wie die Proben in doppelten Ansätzen gemessen. Für den Standard wurde eine Verdünnungsreihe von 500 $\mu\text{mol/L}$ bis 7,8 $\mu\text{mol/L}$ in Verdünnungsschritten von 1:2 erstellt; das Volumen betrug jeweils 50 μL . Zur Bestimmung der Hintergrundfärbung wurden so genannte „Leerwerte“ mit dem jeweiligen Kulturmedium (Endvolumen: 50 μL) angesetzt. Anschließend wurden 50 μL des Griess-Reagenz (Sigma - Aldrich, Deisenhofen) zu jeder Vertiefung der

ELISA-Platte hinzugegeben. (Abb. 3.4). Die Platte wurde für 10 Minuten lichtgeschützt inkubiert und anschließend mit einem ELISA-Reader bei 570 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel 2003®. Aus den Standardverdünnungen wurde eine Eichgerade erstellt, um aus den Extinktionswerten der Proben die entsprechenden Konzentrationen zu berechnen.

3.10 Echtzeit-Zellanalysen

Prinzip: Bei dem RTCA-System (*real-time cell analyzer-system*) xCELLigence der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, handelt es sich um ein Echtzeit-Zell-Analyse-System, das das Wachstum einer Zellkultur kontinuierlich aufzeichnet. Das xCELLigence-System besteht aus einer RTCA-Station, die in einem regulären Zellkultur-Inkubator untergebracht wird und in die spezielle Zellkulturplatten, die sogenannten E-Platte (ACEA Biosciences, CA), eingesetzt werden. In jede der Vertiefungen einer E-Platte ist ein Sensor mit 2 Mikroelektroden integriert. Sobald sich adhärente Zellen am Boden einer solchen Vertiefung absetzen, nimmt die Impedanz, also der elektrische Widerstand, zu. Dieser ist dabei nicht allein von der Adhärenz, sondern auch von der Qualität der Interaktion und der Morphologie der Zellen abhängig. Die gemessenen Impedanzdaten werden an die RTCA-Kontrolleinheit übertragen, wo sie mit Hilfe einer speziell entwickelten Software ausgewertet und in Form des dimensionslosen «*Cell Index (CI)*» dargestellt werden. Dieser Index lässt Aussagen bezüglich Zellvitalität, Zellzahl, Zellmorphologie und Zelladhäsion zu.

Praktisches Vorgehen: In jede Vertiefung einer E-Platte (s. oben) wurden 5×10^6 Blutleukozyten in 100 μL Kulturmedium gegeben und eine Stunde bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden verworfen und die Vertiefungen mit 100 μL PBS gewaschen. Zu den verbliebenen Zellen wurden 150 μL Kulturmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an M-CSF bzw. GM-CSF gegeben. Die Datenerfassung erfolgte in dreifacher Bestimmung über

72 Stunden. Als Kontrolle wurden drei Vertiefungen mit Kulturmedium zellfrei gehalten («*blank*»).

3.11 Reverse Transkriptase (RT) quantitative Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR)

Prinzip: Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur selektiven Amplifizierung definierter Nukleinsäuresequenzen. Durch Zugabe von zwei Oligonukleotiden (*forward* und *reverse primer*), die zum 5'- bzw. 3'- Ende der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, und thermostabilen DNA-Polymerasen ist eine automatisierte Durchführung der PCR in programmierbaren Thermoblocken möglich. Ein so genannter Zyklus besteht aus Primeranlagerung, Kettenverlängerung und Denaturierung der DNA-Doppelstränge zur exponentiellen Vermehrung der gewünschten Sequenzen.

Praktisches Vorgehen: Gesamt-RNA wurde mit Trizol aus jeweils einer Millionen Zellen isoliert (Chomczynski P, Sacchi N, 1987) und mit Chloroform aus der phenolischen Phase extrahiert. Nach dem Zentrifugieren bei 16.000 xg wurde die wässrige Oberphase abgenommen und die RNA in Isopropanol bei -20°C für mindestens eine halbe Stunde bzw. über Nacht (ca. 18 Stunden) gefällt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13.684 xg und 4°C wurde das RNA-Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 45 µL *Storage solution* (Ambion) gelöst.

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde mit der lab-on-chip-Technologie über Kapillarelektrophorese (Experion; Bio-Rad) bestimmt. Hierbei wird den RNA-Proben hinsichtlich ihrer Integrität ein Zahlenwert (*relative quality indicator*, RQI) zwischen 1 (stark degradierte RNA) und 10 (intakte RNA) zugewiesen. Für die Untersuchungen wurde ausschließlich qualitativ hochwertige RNA mit einem RQI-Wert von über 8 verwendet.

Die RNA-Konzentration wurde bei 260 nm mit einem NanoDrop 2000c Spektralphotometer (Thermo Scientific, NanoDrop Technologies) bestimmt. Ein Mikrogramm Gesamt-RNA wurde für die Erststrang-Komplementär DNA (cDNA)-Synthese mit dem iScript synthesis kit (BioRad) durchgeführt. Der Kit enthält die RNase H⁺ iScript Reverse Transkriptase, einen RNase Inhibitor und einen optimierten Mix aus oligo(dT) und random Primern. Die cDNA Synthese wurde in einem Endvolumen von 20 µL durchgeführt. Das Synthese-Protokoll hierzu sah wie folgt aus: 5 Minuten bei 25°C; 30 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 85°C.

Aus der cDNA wurden verschiedene Verdünnungsstufen (1:2,5 bis 1:320) in nukleasefreiem Wasser hergestellt, um folgende Qualitätskriterien der quantitativen PCR entsprechend den MIQE Empfehlungen (Bustin SA et al., 2009) für jedes Primerpaar zu überprüfen: Effizienz (E), Steigung der Standardkurve, Korrelationskoeffizient (R^2) und den Zyklus der Quantifizierung (*cycle of quantification* oder Cq) für die niedrigste und höchste Verdünnung (Tab. 3.3 u. 3.4).

Die quantitative PCR wurde mit dem MESA Green qPCR MasterMix (Eurogentec) für SYBR Green in 0.2 mL weißen 8-„tube“-Streifen (Biozym) durchgeführt. Das Kit enthält die MeteorTaq hotstart DNA Polymerase. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes betrug 25 µL mit 2 µL 1:10 vorverdünnter cDNA, 200 nmol/L (Endkonzentration) des jeweiligen Primerpaars. Das Synthese-Protokoll sah wie folgt aus: 5 Minuten bei 95°C (1 Zyklus) gefolgt von 40 Zyklen mit folgendem Temperaturverlauf: 15 Sekunden bei 95°C und 60 Sekunden bei 60°C. Ein abschließender Extensionsschritt wurde für 5 Minuten bei 72°C durchgeführt.

Die Expression der Gene CCL2, CCL18, CCR7 und IDO (Tab. 3.3) wurde normalisiert auf die beiden Referenzgene β -Aktin und Peptidyl-Prolyl-Isomerase A (PPIA) und die jeweilige Expression mit der $\Delta\Delta Cq$ -Methode bestimmt (Pfaffl MW). Die beiden Referenzgene zeigen eine stabile Expression in den unter-

schiedlichen Makrophagenpopulation und wurden aus einer Reihe von Referenzgenen aufgrund ihres M-Werts (Vandesompele J et al., 2002) ausgewählt. Die Schmelzkurven der Amplifikate wurden hinsichtlich möglicher Primerdimer-Artefakte und auf Kontaminationen überprüft. Zusätzlich wurden die aufgereinigten PCR-Produkte sequenziert, um ihre Identität mit der Zielsequenz zu bestätigen (SeqLab Göttingen GmbH, Göttingen).

Tab. 3.3: Informationen zu den in dieser Arbeit verwendeten Primer-Paaren.

Symbol	Zugangs-ID	Größe (bp)	Sequenz (5' → 3')	
CCL2 ¹⁾	NM_002982.3	139	For:	CTG CCG CCC TTC TGT GCC TG
			Rev:	CTC GCG AGC CTC TGC ACT GA
CCL18 ¹⁾	NM_002988.2	127	For:	GCA CCA TGG CCC TCT GCT CC
			Rev:	GGG CAC TGG GGG CTG GTT TC
CCR7 ²⁾	NM_001838.2	104	For:	AAG GGG TAG TGC GAG GCC G
			Rev:	GAG CCA CCA CCA GCA CGC TT
IDO1 ³⁾	NM_002164	130	For:	AGT GCA GGC CAA AGC AGC GT
			Rev:	AGT TCC TGT GAG CTG GTG GCA
β-Aktin	NM_001101.3	96	For:	CCT TGC CAT CCT AAA AGC C
			Rev:	CAC GAA AGC AAT GCT ATC AC
PPIA ⁴⁾	NM_021130.3	140	For:	TGT CCA TGG CAA ATG CTG GAC CC
			Rev:	GCG CTC CAT GGC CTC CAC AA

For: Forward Primer; Rev: Reverse Primer; ¹⁾ (c-c motif) ligand; ²⁾ (c-c motif) receptor; ³⁾ Indoleamine 2,3-dioxygenase 1; ⁴⁾ Peptidyl-Prolyl-Isomerase A

Tab 3.3: Qualitätsdaten zur Charakterisierung der quantitative RT-PCR. Die Daten sind als 95 % Konfidenzintervall ("confidence interval", CI) bzw. als Mittelwert (MW) und Standardabweichung (Stabw) angegeben.

Symbol	Effizienz (95 % CI)	Steigung (95 % CI)	R ²	Cq (1:2,5) (MW ± Stabw)	Cq (1:320) (MW ± Stabw)
CCL2	98,7 (97,05 - 100,4)	-3,353 (-3,310 / -3,390)	0,997	22,95 ± 0,11	28,11 ± 0,15
CCL18	113,5 (112,1 - 114,9)	-3,036 (-3,011 / -3,061)	0,994	25,52 ± 0,15	29,16 ± 0,26
CCR7	97,7 (95,0 - 100,5)	-3,394 (-3,310 / -3,439)	0,998	25,67 ± 0,14	30,75 ± 0,02
IDO1	102,0 (99,8 - 103,1)	-3,274 (-3,224 / -3,291)	0,995	21,41 ± 0,39	26,36 ± 0,13
β-Aktin	101,8 (100,5 - 102,5)	-3,273 (-3,267 / -3,279)	0,999	17,03 ± 0,24	22,90 ± 0,14
PPIA ⁴⁾	100,1 (99,9 - 100,7)	-3,303 (-3,301 / -3,304)	0,998	17,31 ± 0,11	23,29 ± 0,19

3.12 Bestimmung von Interleukin 12 (IL-12)

Prinzip: Der Cytokin-Assay der Firma R&D Systems (Katalognummer: D1200) wurde für die quantitative Bestimmung von humanem IL-12 in Zellkulturüberständen verwendet.

Vorgehen: Nachdem der Waschpuffer, das Calibrator Diluent RD5C, die Substrat Solution (Färbereagenz) und die IL-12 Standardreihe (von 500 bis 0 pg/mL) nach Anleitung angesetzt worden waren, wurde als erstes zu jeder Vertiefung 50 µL eines Assay Diluents (RD1F) hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 200 µL pro Vertiefung der Standardproben, der Versuchsproben und des *Blanks* (Medium zur Bestimmung der Hintergrundfärbung) in doppelter Ausführung. Nach zweistündiger Inkubation wurden die ELISA-Platten mit einem *ELISA washer* „gewaschen“, wobei die Schritte Absaugen, Spülen und Absaugen dreimal hintereinander durchgeführt wurden. Nach Zugabe des zweiten Antikörpers (IL-12 Conjugate) wurde ein zweitesmal für 2 Stunden inkubiert.

Nach einem weiteren Waschschrift wurden jeweils 200 μL des Färbereagenz (Substrate Solution) in die Vertiefungen gegeben und für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt und die Farbreaktion im Mikrotiterplattenlesegerät (Dynatech Laboratories, USA) bei 450 nm gemessen.

3.13 Auswertung

Die Auswertung der Daten (Genexpression, ELISA) erfolgte mit dem Programm Excel 2007 der Firma Microsoft. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 4.0 (Statcon, Witzenhausen, Germany) genutzt. Die Daten wurden mit dem "Mann-Whitney U test" ausgewertet und Unterschiede von $P < 0.05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Kulturbedingungen für nicht-aktivierte und aktivierte Makrophagen

In Vorversuchen wurden die optimalen Kulturbedingungen für humane Monozyten[‡] untersucht. Als erstes wurde der Einfluss von 1 % und 5 % AB-Serum (hitzeinaktiviert) auf das Ausmass der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen mit Hilfe der beiden Marker CD14 («Monozytenmarker») und CD68 («Makrophagenmarker») immunhistochemisch untersucht.

Eine starke CD68- und eine geringe CD14-Expression sind typisch für Makrophagen, während eine starke CD14-Expression charakteristisch für Monozyten ist.

Die Makrophagendifferenzierung in Gegenwart der beiden Serumkonzentrationen verlief nahezu identisch. Die Kulturen, die mit 1 % AB-Serum inkubiert wurden, enthielten nach 7 Tagen 52 % CD68-positive Makrophagen (Score 2; Abb. 4.1 B) und 15 % CD14-positive Monozyten (Score 1; Abb. 4.1 A). Kulturen mit 5 % AB-Serum zeigten einen doppelt so hohen Anteil an CD68-positiven Zellen (100 %; Score 3; Abb. 4.1 D). Auch der Anteil an CD14-positiven Zellen war erhöht und betrug 48 % (Score 2; Abb. 4.1 C).

Das Verhältnis von Makrophagen zu Monozyten betrug in Medium mit 1 % AB-Serum 3,5 und in Medium mit 5 % AB-Serum 2,1.

[‡] Für die Versuche wurden ausschliesslich Leukozyten aus Apherese-Präparaten verwendet, da sich frisch gewonnene Blutleukozyten aus Transfusionszapfen zur *in-vitro* Generierung von Makrophagen als ungeeignet erwiesen. Solche Transfusionszapfen stellen aber eine hervorragende Quelle zur Generierung reifer dendritischer Zellen dar.

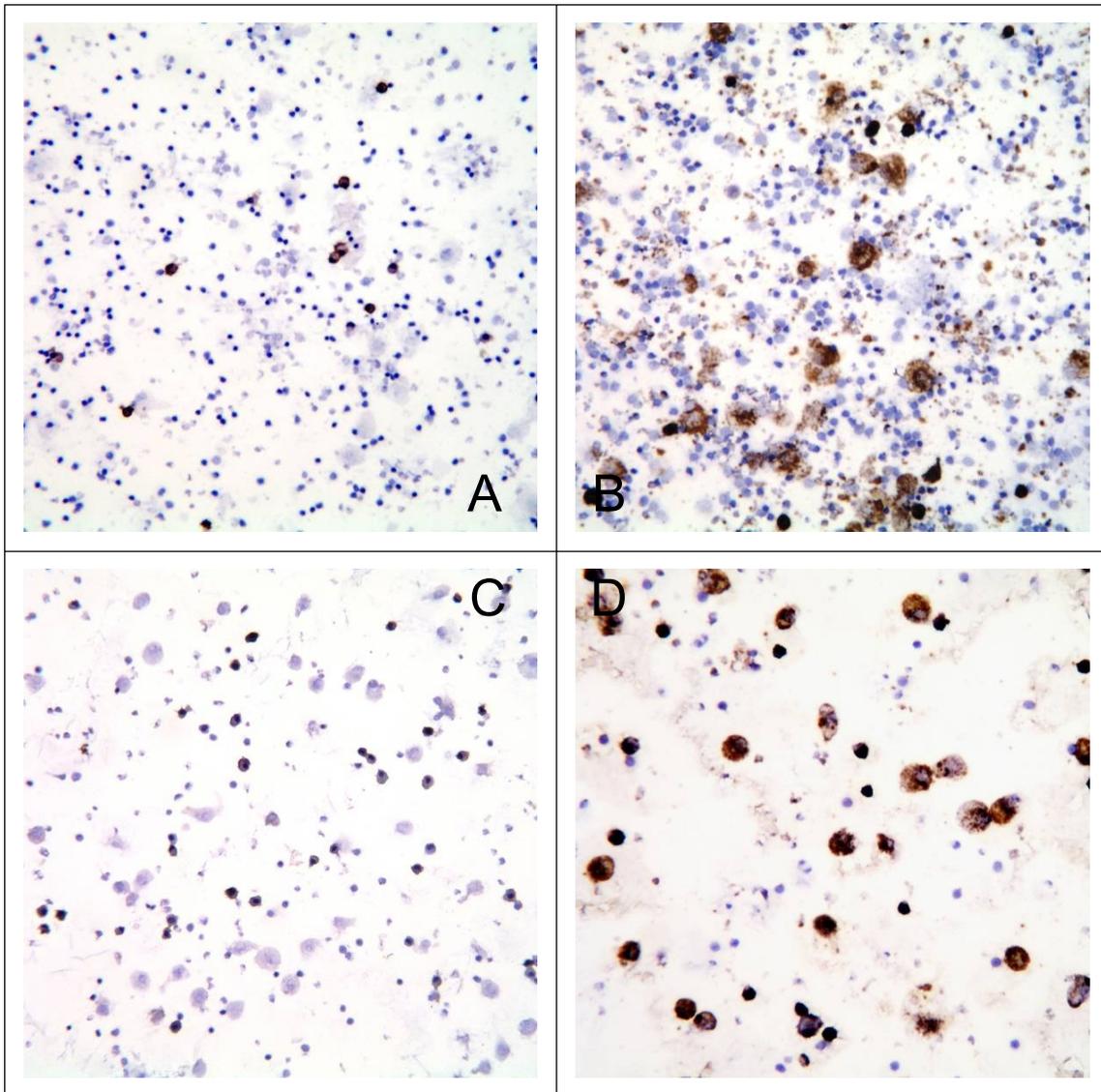


Abb. 4.1: Immunhistochemischer Nachweis CD68-positiver Makrophagen nach 7 Tagen in Kultur. Getestet wurden verschiedene Serumkonzentrationen. (A) Anteil CD14-positiver Zellen in Medium mit 1 % AB-Serum (15 % positive Zellen; Score 1); (B) Anteil CD68-positiver Zellen in Medium mit 1 % AB-Serum (52 % positive Zellen; Score 2); (C) Anteil CD14-positiver Zellen in Medium mit 5 % AB-Serum (48 % positive Zellen; Score 2); (D) Anteil CD68-positiver Zellen in Medium mit 5 % AB-Serum (100 % positive Zellen; Score 3). Vergrößerung: 200x. Zum Score siehe S. 18.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren M-CSF und GM-CSF auf die Differenzierung von Monozyten untersucht. Von den Zellen, die in Medium mit 1 % AB-Serum und 50 ng/mL M-CSF kultiviert wurden, war nach sieben Tagen in Kultur nur noch ein geringer Anteil CD14-positiver Zellen nachweisbar (29 % positive Zellen, Score 1; Abb. 4.2 A), aber ein großer

Anteil CD68-positiver Zellen (99 % positive Zellen, Score 3; Abb. 4.2 B). Auch in Gegenwart von 5 % AB-Serum wurde eine ähnlich starke Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen nach Zugabe von M-CSF beobachtet: 57 % CD14-positive Zellen (Score 2; Abb. 4.2 C) und 100 % CD68-positive Zellen (Score 3; Abb. 4.2 D) im Vergleich zu Kulturen ohne M-CSF.

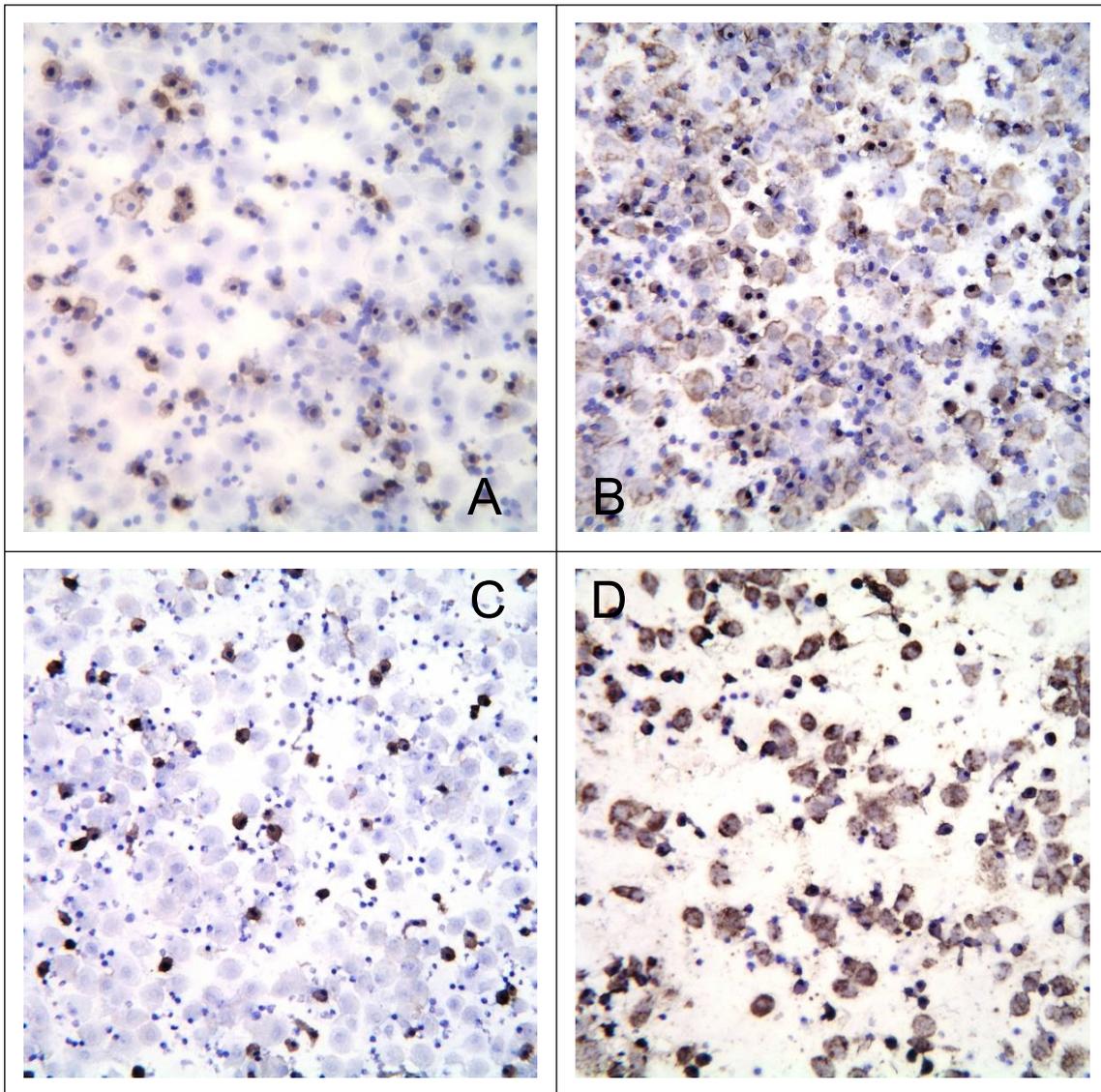


Abb. 4.2: Immunhistochemischer Nachweis CD68-positiver Makrophagen nach 7 Tagen in Kultur. Getestet wurden 50 ng/mL M-CSF bei verschiedenen Serumkonzentrationen. (A) Anteil CD14-positiver Zellen bei 1 % AB-Serum (29 % positive Zellen; Score 1); (B) Anteil CD68-positiver Zellen bei 1 % AB-Serum (99 % positive Zellen; Score 3); (C) Anteil CD14-positiver Zellen bei 5 % AB-Serum (57 % positive Zellen; Score 2); (D) Anteil CD68-positiver Zellen bei 5 % AB-Serum (100 % positive Zellen; Score 3). Vergrößerung: 200x. Zum Färbescore siehe S. 18.

Basierend auf den Ergebnissen in Abb. 4.2 wurden sämtliche Versuche mit 1 % AB-Serum durchgeführt, da diese Serumkonzentration kombiniert mit M-CSF für die Differenzierung von Makrophagen aus Monozyten optimal erscheint. Nach sieben Tagen in Kultur betrug der Anteil CD68-positiver Zellen 99 % (Abb. 4.2 B). Dies steht in Einklang mit publizierten Daten (Kreutz, M et al., 1998). Auch morphologisch wurden keine auffälligen Unterschiede beobachtet. Bei beiden Serumkonzentrationen war eine Zunahme der Zellgröße und eine Änderung der Morphologie – von rundlichen zu spindelförmigen, adhärennten Zellen – zu beobachten (Abb. 4.3 A-D).

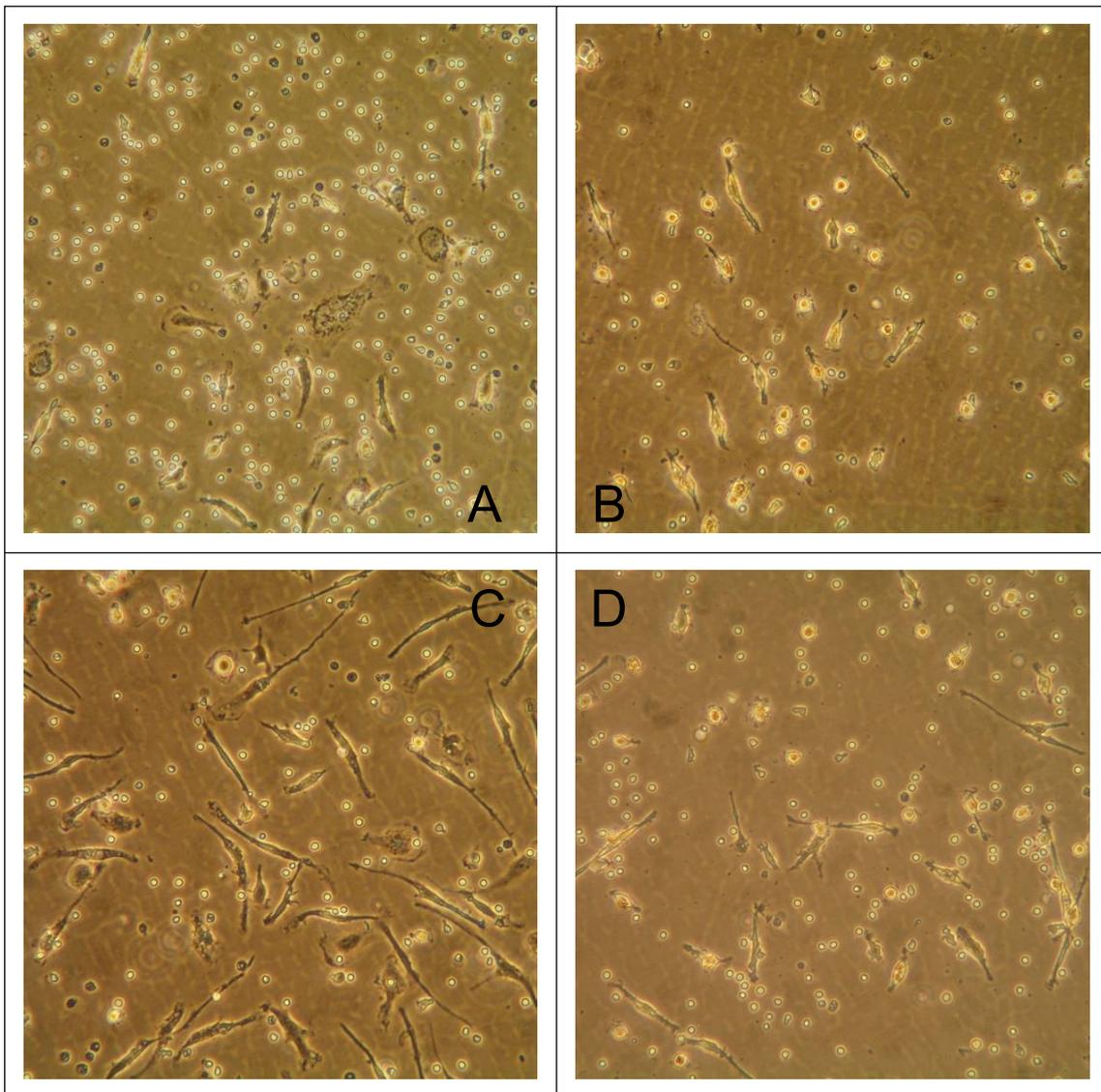
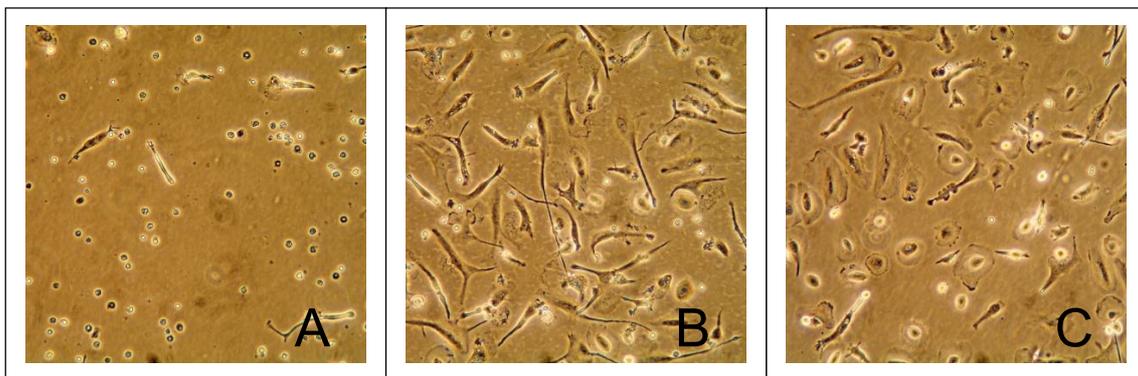


Abb. 4.3 (S. 29): Morphologie humaner Makrophagen nach 7 Tagen in Kultur. Die Wirkung von M-CSF wurde bei verschiedenen Serumkonzentrationen ausgetestet. **A & C:** 1 % AB-Serum; **B & D:** 5 % AB-Serum. Teilabbildungen **A** (ohne M-CSF) und **C** (mit M-CSF) zeigen spindelförmige Makrophagen. Teilabbildungen **B** (ohne M-CSF) und **D** (mit M-CSF) zeigen ebenfalls spindelförmige Zellen. Auch morphologisch ist kein Unterschied zwischen 1 % und 5 % Humanserum zu erkennen (die kleinen sphäroiden Zellen sind Leukozyten). Vergrößerung: 200x. Zum Färbescore siehe S. 18.

Für die Experimente mit *in-vitro* Kulturen ist neben der Zelldifferenzierung ebenso die Zellproliferation von Bedeutung. M-CSF ist unentbehrlich für das Überleben und die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (siehe Einleitung und Becker, S et al., 1987; Brugger, W et al., 1991). Ein positiver Effekt von M-CSF auf die Proliferation von Monozyten / Makrophagen wurde auch in dieser Arbeit beobachtet. Um die proliferationssteigernden Eigenschaften von M-CSF zu untersuchen, wurde das Verhältnis der Zellzahl nach Zellernte zur eingesetzten Zellzahl berechnet, das von 1,2 bis zu 4,8 reichte.⁵⁾

Abbildung 4.4 verdeutlicht, wie sich die Inkubation mit M-CSF bzw. GM-CSF auf die Proliferation von Makrophagen und damit auf die Zelldichte auswirkt. Es wurden jeweils 2×10^8 Zellen ausgesät und die Zellen nach 7 Tagen in Kultur mit M-CSF (Abb. 4.4 B) bzw. GM-CSF (Abb. 4.4 C) ausgezählt.



⁵⁾ Für GM-CSF wurde ebenfalls ein positiver Einfluss auf die Proliferation von Monozyten / Makrophagen beobachtet. Das Zellverhältnis betrug 3,2.

Abb. 4.4: Repräsentative Beispiele zum Wachstum von Makrophagen nach 7 Tagen in Kultur mit M-CSF bzw. GM-CSF. (A) ohne M-CSF bzw. GM-CSF; (B) mit 50 ng/mL M-CSF; (C) mit 50 ng/mL GM-CSF. Die Serumkonzentration betrug 1 %. Der Anteil an Makrophagen ist in Kulturen mit Wachstumsfaktoren deutlich höher. Vergrößerung: 200x.

Unterstützt werden diese Ergebnisse zur Steigerung der Zellproliferation durch M-CSF bzw. GM-CSF mit dem Echtzeit-Zell-Analyse-System xCelligence (Abb. 4.5).

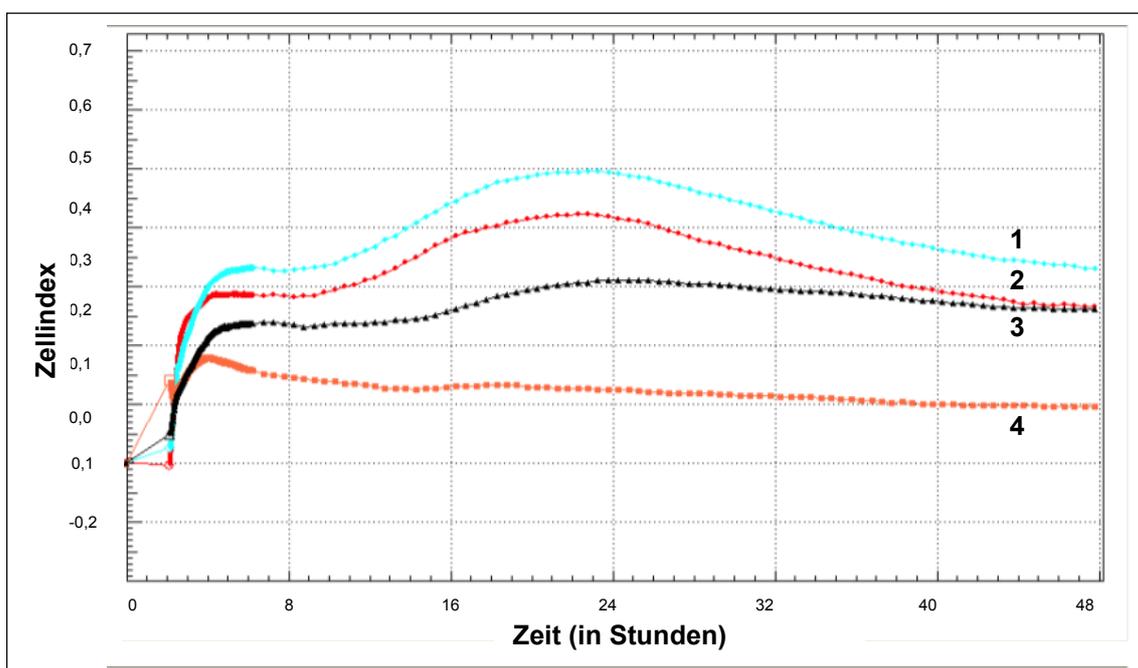


Abb. 4.5: Wachstumskurven von Makrophagenkulturen bei verschiedenen Konzentrationen an M-CSF. 50 ng/mL M-CSF (2); 25 ng/mL M-CSF (1); 12,5 ng/mL M-CSF (4) und 0 ng/mL M-CSF (3). Am höchsten war die Proliferationsrate mit 25 ng/mL (1) und 50 ng/mL (2) M-CSF. Nach ca. 23 Stunden erreichte das Zellwachstum sein Maximum. Die Serumkonzentration für diese Versuche betrug 1 %.

4.2 Morphologie nicht-aktivierter und aktivierter Makrophagen

Der Einfluss von M-CSF, GM-CSF und Laktat auf Form und Funktion von Makrophagen wurde untersucht. Von besonderem Interesse war, ob Laktat die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen beeinflusst (siehe Einleitung). Monozyten, deren Kulturen während der gesamten Kulturdauer mit M-CSF und

GM-CSF versetzt waren, zeigten charakteristische Merkmale der Zellreifung wie Zunahme von Zellgröße und Granularität (Abb 4.6 C, D).

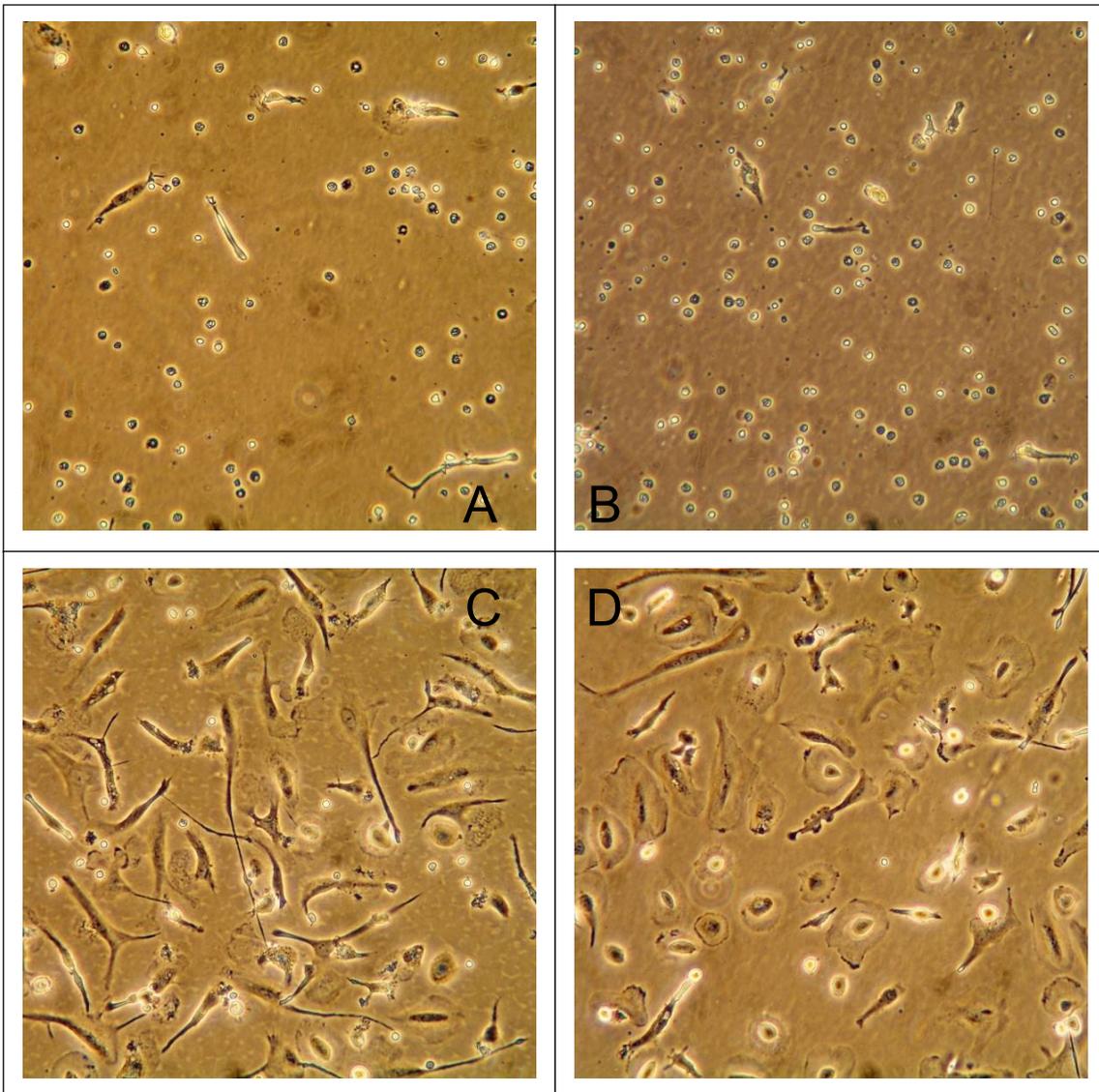


Abb. 4.6: Morphologie von Makrophagen nach 7 Tagen in Kultur. (A) bei 1 % Serum; (B) zusätzlich mit 15 mmol/L Laktat; (C) zusätzlich mit 50 ng/mL M-CSF; (D) zusätzlich mit 50 ng/mL GM-CSF. In den Teilabbildungen C und D ist die deutliche Zunahme an Zellen nicht zu übersehen. Vergrößerung: 200x. Zum Färbescore siehe S. 18.

Monozyten, die mit Laktat versetzt waren, entwickelten sich kaum und zeigten – ähnlich wie Monozyten ohne Wachstumsfaktoren (Abb. 4.6 A) – kaum typische Merkmale der Reifung (Abb. 4.6 B); siehe hierzu auch Kapitel 4.8.

Monozyten, die mit M-CSF inkubiert waren, entwickelten sich zu spindelförmigen Zellen mit Fibrozyten-ähnlicher Form und einem langgestreckten Zellkörper (Abb. 4.6 C).

Monozyten, die mit GM-CSF inkubiert waren, entwickelten sich währenddessen zu Makrophagen mit einer großen runden Form, die an «Spiegeleier» erinnert (Abb. 4.6 D); siehe auch Young, DA et al., 1990; Verreck, FA et al., 2006. Die Spiegelei-Form kam interessanterweise besonders deutlich zum Vorschein, nachdem die Zellen für weitere drei Tage ohne GM-CSF inkubiert wurden (Abb. 4.7).

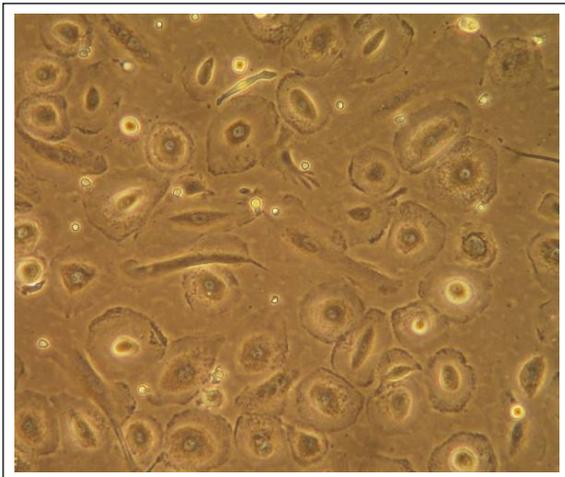


Abb. 4.7: Morphologie von Makrophagen nach 10 Tagen in Kultur. Die Zellen wurden für sieben Tage mit 50 ng/mL GM-CSF inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere drei Tage ohne GM-CSF kultiviert. Vergrößerung: 200x.

GM-CSF-Makrophagen wurden mit den beiden proinflammatorischen Stimuli $\text{IFN}\gamma$ und LPS aktiviert. Auffällig war, dass die GM-CSF-Makrophagen ihre «Spiegelei»-Form (Abb. 4.8 A) während der nächsten 72 Stunden verloren (Abb. 4.8 D). Zu diesem Zeitpunkt dominierte die spindelförmige Fibrozyten-Form (Abb. 4.8 C, D). Somit ist anzunehmen, dass aktivierte GM-CSF-Makrophagen, so genannte GM1-Makrophagen, Fibrozyten-Form aufweisen, während GM-CSF-Makrophagen eine «Spiegelei»-Form aufweisen.

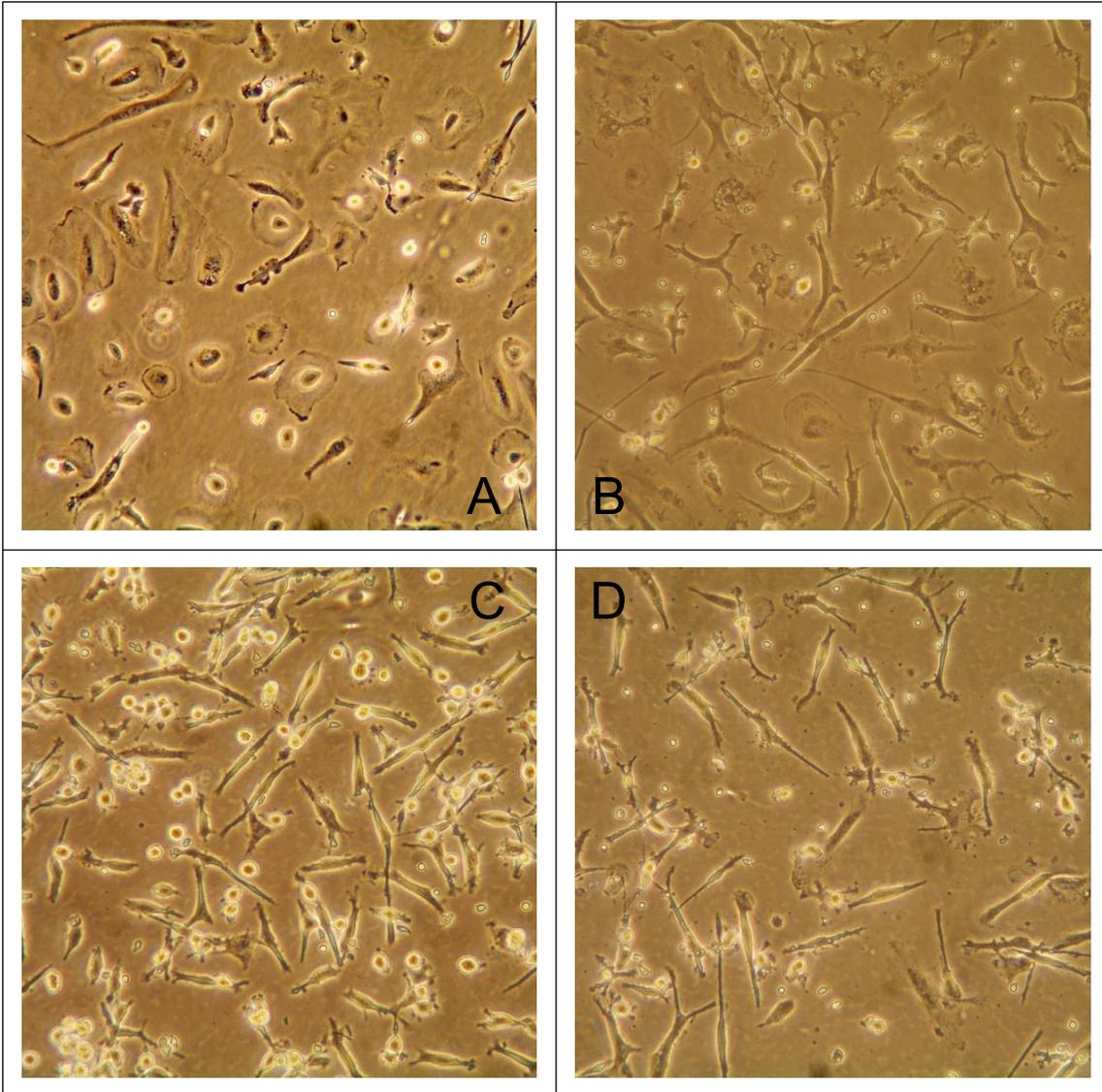


Abb. 4.8: Morphologie von Makrophagen in Kultur. (A) Sieben Tage in Kultur mit GM-CSF (50 ng/mL); (B) nach weiteren 24 Stunden mit IFN γ (15 ng/mL) und LPS (100 ng/mL); (C) nach weiteren 48 Stunden mit IFN γ und LPS (die Zellkörper erscheinen dichter); (D) nach weiteren 72 Stunden mit IFN γ und LPS (die spindelförmige Fibrozyten-Form dominiert). Vergrößerung: 200x.

Die Fibrozyten-Form ist aber auch die vorherrschende Form bei Makrophagenkulturen, die unter dem Einfluss von M-CSF stehen (Abb. 4.9 A). Die Aktivierung mit den beiden klassischen proinflammatorischen Stimuli IFN γ und LPS führte zu einem Verlust der «Spiegelei»-Form (Abb. 4.9 C).

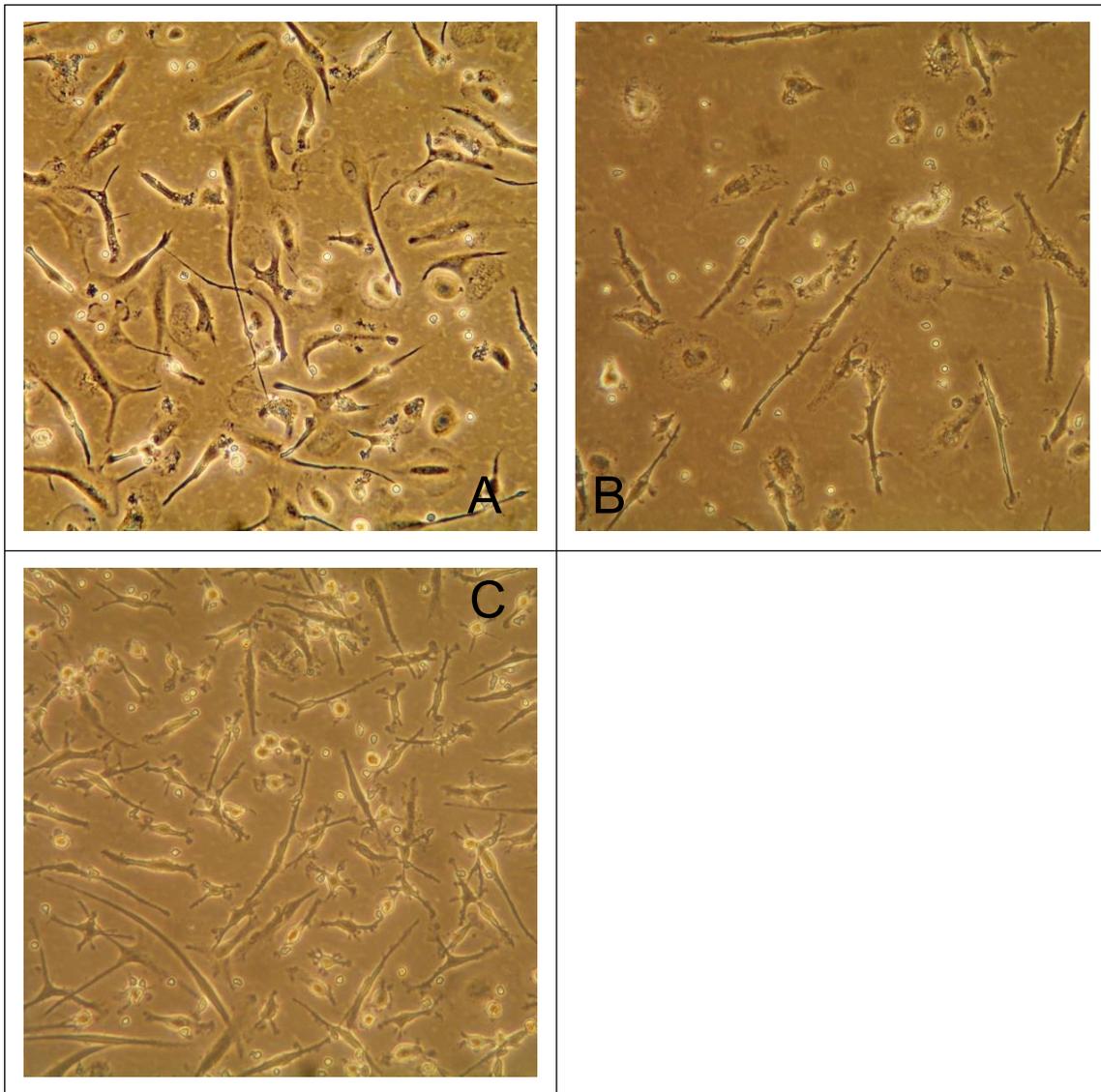


Abb. 4.9: Morphologie von Makrophagen in Kultur. (A) Sieben Tage in Kultur mit M-CSF (50 ng/mL); (B) nach weiteren 24 Stunden mit IFN γ (15 ng/mL) und LPS (100 ng/mL); (C) nach weiteren 72 Stunden mit IFN γ und LPS. Mit der Kulturdauer nimmt der Anteil der Zellen mit Fibrozyten-Form deutlich zu. Vergrößerung: 200x.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 4.2 «Morphologie nicht-aktivierter und aktivierter Makrophagen»:

Tab. 4.1: Die Ergebnisse zur Zellmorphologie unterschiedlicher Makrophagenpopulationen im Überblick.

Monozyten (Abb. 4.6 und 4.7)			
Inkubiert mit:	Laktat (15 mmol/L)	M-CSF (50 ng/mL)	GM-CSF (50 mg/mL)
Beobachtung:	keine Zellteilung und keine Differenzierung	Zellteilung und Differenzierung	Zellteilung und Differenzierung
Zellmorphologie:	-----	Spindelform	Spindelform und Spiegeleiform (die Spiegeleiform dominiert)

	M-CSF-Makrophagen	GM-CSF-Makrophagen
Stimuliert mit:	IFN γ (15 ng/mL) und LPS (100 ng/mL)	IFN γ (15 ng/mL) und LPS (100 ng/mL)
Zellmorphologie:	Spindelform (Abb. 4.9)	Spindelform (Abb. 4.8)

Laktat ist kein Differenzierungs- bzw. Wachstumsfaktor für Monozyten – im Gegensatz zu M-CSF und GM-CSF. Weitere Informationen zur biologischen Funktion von Laktat werden in Kapitel 4.8 «Einfluss von Laktat auf die Differenzierung von Makrophagen» aufgeführt.

Mit IFN γ und LPS stimulierte M-CSF-Makrophagen und GM-CSF-Makrophagen weisen eine spindelförmige Morphologie auf.

4.3 Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression des M1-Markers HLA-DR

Unter dem Einfluss der Wachstumsfaktoren M-CSF und GM-CSF wurde die Expression des M1-Markers HLA-DR auf M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen induziert. Nach sieben Tagen in Kultur betrug der Anteil HLA-DR-positiver Zellen 60 % (Score 2; Abb. 4.10) bei M-CSF-Makrophagen und 87 % (Score 3; Abb. 4.11) bei GM-CSF-Makrophagen.

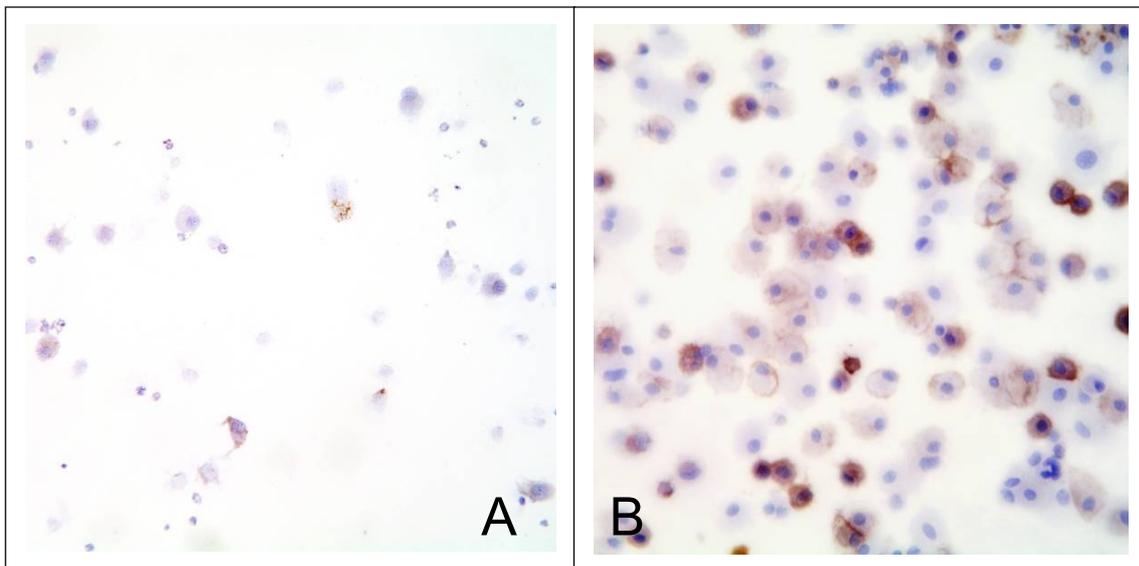


Abb. 4.10: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von HLA-DR auf der Zelloberfläche von Makrophagen nach 7 Tagen in Kultur. (A) Monozyten / Makrophagen ohne Wachstumsfaktoren (34 % positive Zellen; Score 1); (B) M-CSF-Makrophagen mit 50 ng/mL M-CSF (60 % positive Zellen; Score 2). Vergrößerung: 400x. Zum Färbescore siehe S. 18.

Eine anschließende Aktivierung von GM-CSF-Makrophagen mit 15 ng/mL IFN γ und 100 ng/mL LPS zu GM1-Makrophagen erhöhte den Anteil HLA-DR-positiver Zellen nicht mehr wesentlich: 60 % positive Zellen (Score 2) nach 24 Stunden Stimulation (Abb. 4.11 B); 82 % positive Zellen (Score 3) nach 48 Stunden Stimulation (Abb. 4.11 C) und 30 % positive Zellen nach 72 Stunden Stimulation (Abb. 4.11 D).

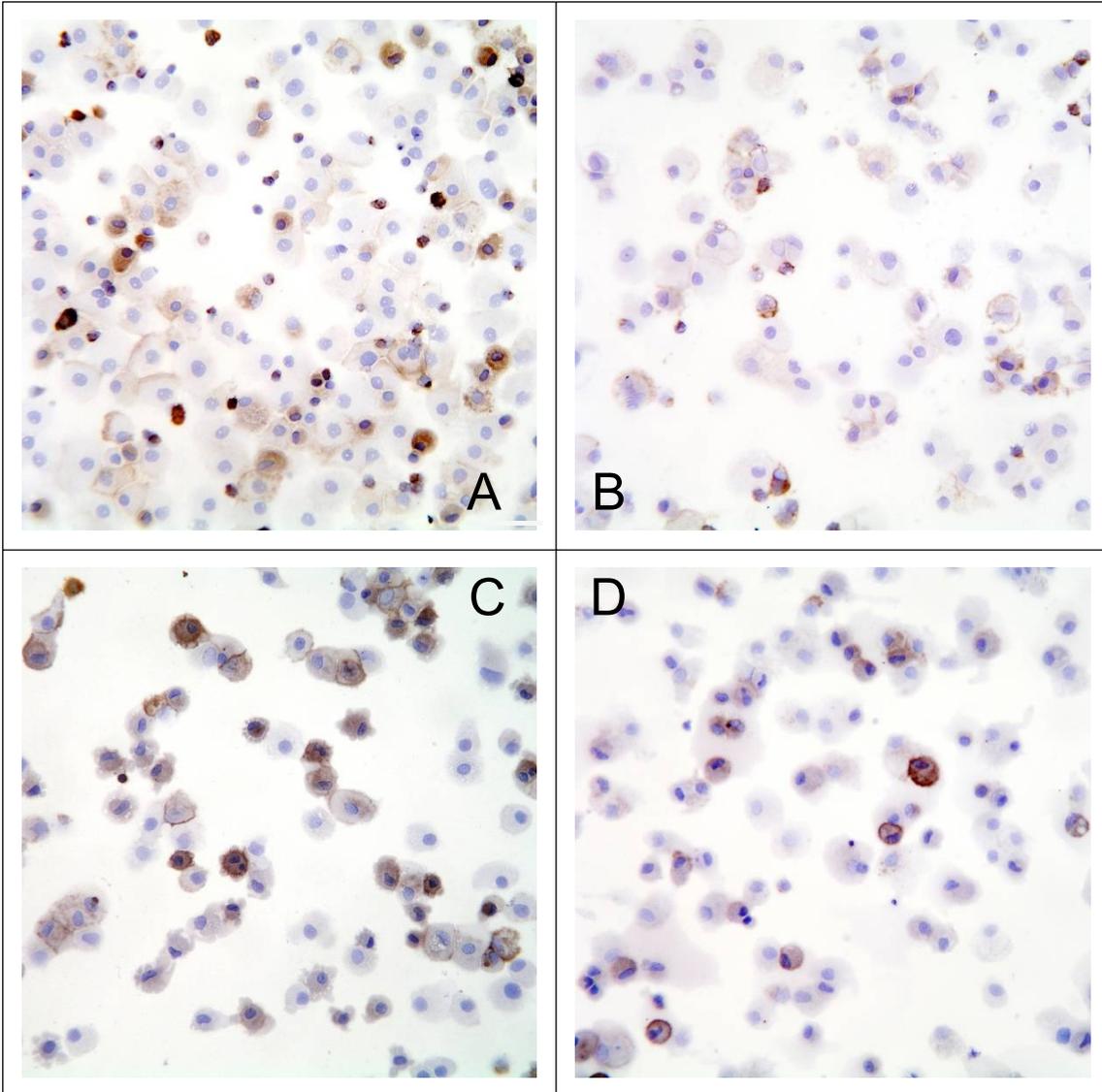


Abb. 4.11: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von HLA-DR auf Makrophagen. (A) GM-CSF-Makrophagen mit 50 ng/mL GM-CSF nach 7 Tagen in Kultur (87 % positive Zellen; Score 3); (B) GM1-Makrophagen nach Aktivierung mit 15 ng/mL IFN γ und 100 ng/mL LPS für 24 Stunden (60 % positive Zellen; Score 2); (C) nach Aktivierung für 48 Stunden (82 % positive Zellen; Score 3); (D) nach Aktivierung für 72 Stunden (30 % positive Zellen; Score 1). Vergrößerung: 400x. Zum Färbescore siehe S. 18.

M-CSF-Makrophagen, die mit 15 ng/mL IFN γ und 100 ng/mL LPS stimuliert wurden, entwickelten sich zu M1-Makrophagen. Dabei nahm der Anteil HLA-DR-positiver Zellen kontinuierlich mit der Inkubationsdauer zu. Nach 48 Stunden stieg der Anteil HLA-DR-positiver Zellen auf 75 % (Score 2; Abb. 4.12 B) und nach 72 Stunden auf 87 % (Score 3; Abb 4.12 C).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen GM-CSF und M-CSF scheint somit zu sein, dass GM-CSF einen M1-Phänotyp (GM-CSF-Makrophagen) induziert, der bereits eine starke Expression von HLA-DR aufweist (87 % positive Zellen; Abb. 4.11), während bei M-CSF-Makrophagen der Anteil HLA-DR-positiver Zellen durch die Aktivierung mit IFN γ und LPS noch zu steigern war (Abb. 4.12).

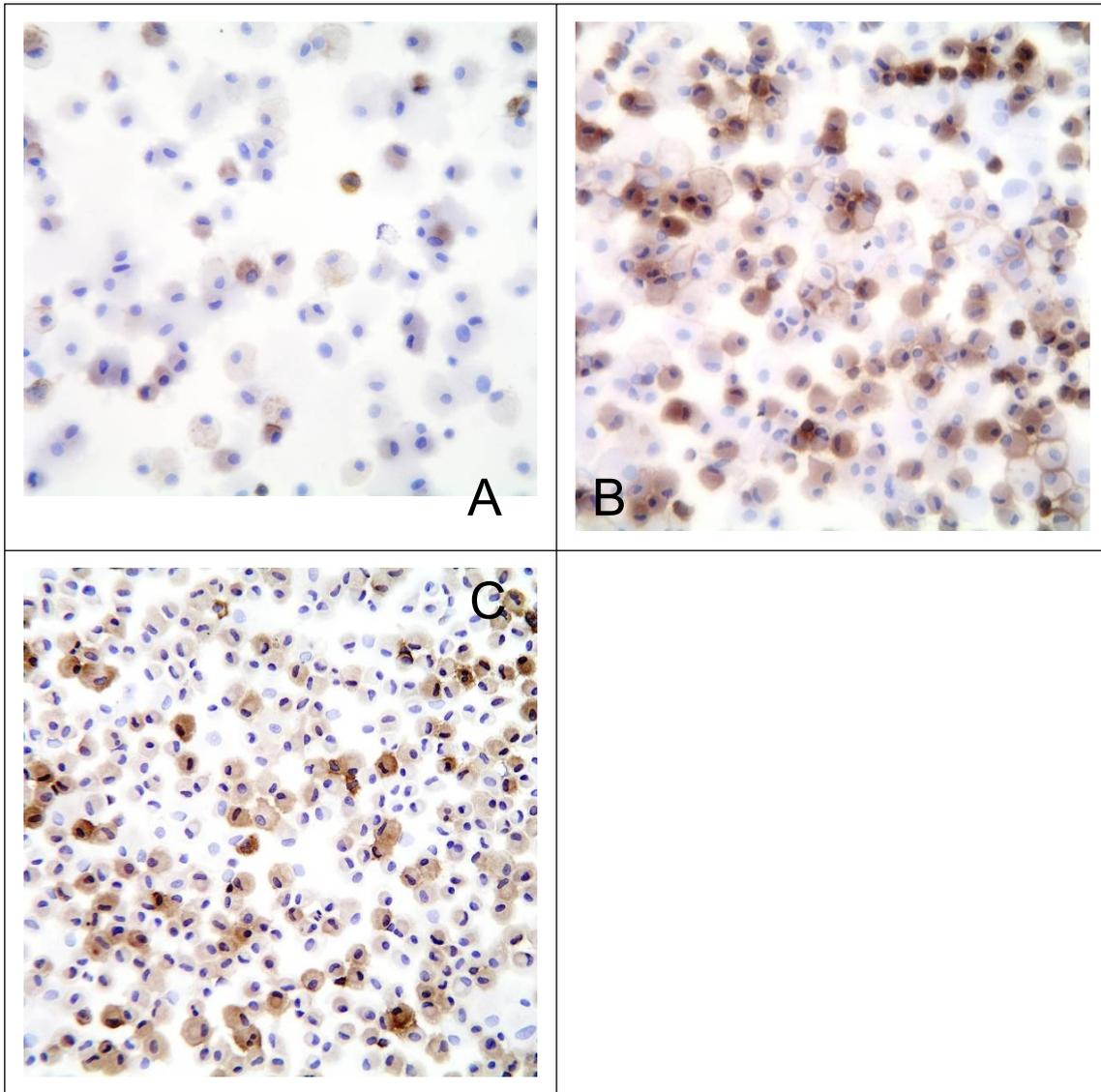


Abb. 4.12 Immunhistochemischer Nachweis der Expression von HLA-DR auf M1-Makrophagen. (A) Aktivierung mit IFN γ und LPS für 24 Stunden (60 % positive Zellen; Score 2); (B) nach Aktivierung für 48 Stunden (75 % positive Zellen; Score 2); (C) nach Aktivierung für 72 Stunden (87 % positive Zellen; Score 3). Vor ihrer Aktivierung «reiften» die Makrophagen für sieben Tage mit 50 ng/mL M-CSF. Vergrößerung: 400x. Zum Färbescore siehe S. 18.

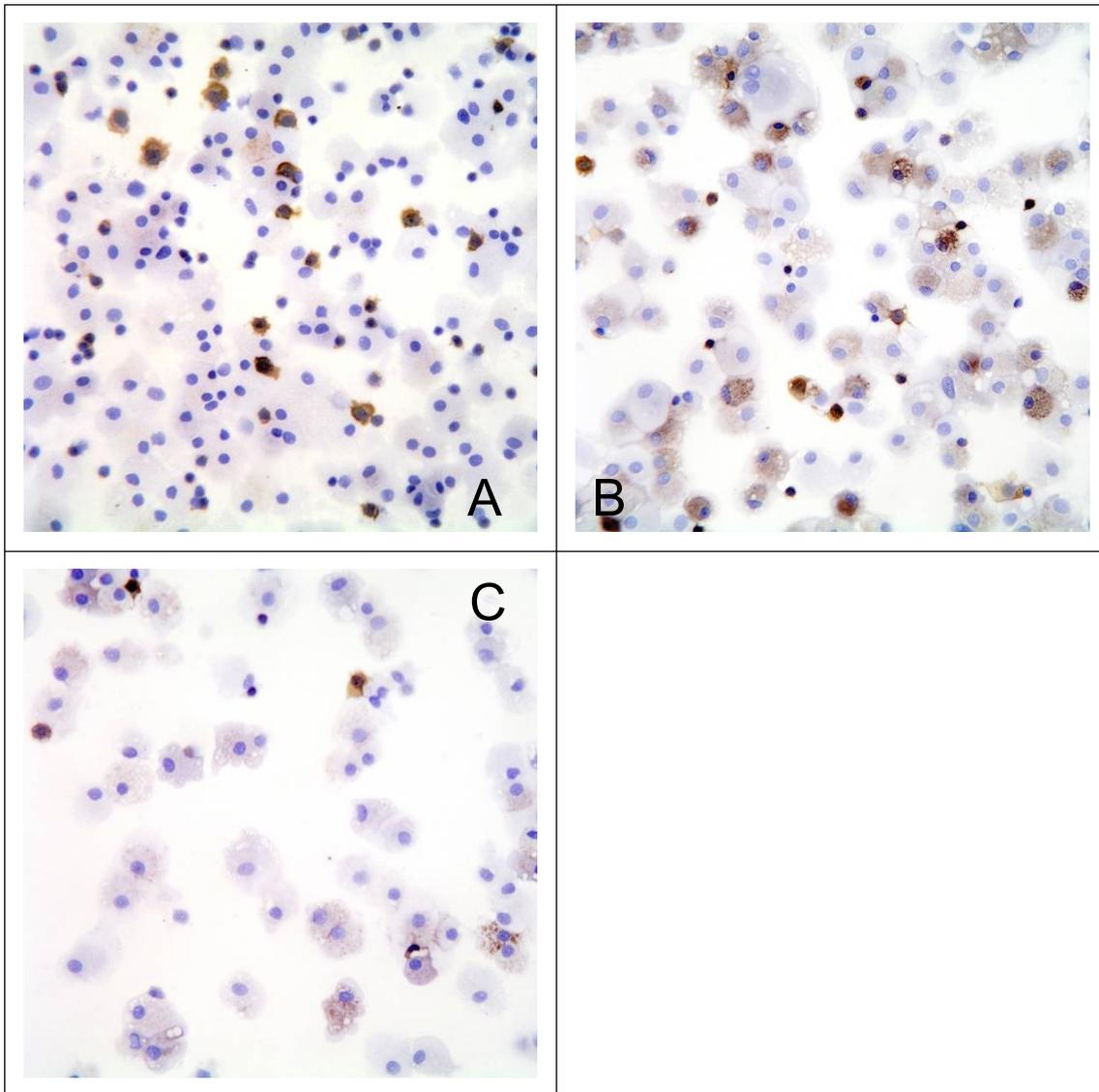


Abb. 4.13: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von HLA-DR auf M2-Makrophagen. (A) nach Aktivierung mit 15 ng/mL IL-4 und 15 ng/mL IL-10 für 24 Stunden (34 % positive Zellen; Score 1); (B) nach Aktivierung für 48 Stunden (61 % positive Zellen; Score 2); (C) nach Aktivierung für 72 Stunden (43 % positive Zellen; Score 2). Vor ihrer Aktivierung «reiften» die Makrophagen für sieben Tage mit 50 ng/mL M-CSF. Vergrößerung: 400x. Zum Färbescore siehe S. 18.

Für M2-Makrophagen, die mit IL-4 und IL-10 aktiviert wurden, war die HLA-DR-Expression mit 34 % positive Zellen (Score 1; Abb. 4.13 A) schwach. Nach 48 Stunden stieg der Anteil HLA-DR-positiver Zellen auf 61 % (Score 2; Abb. 4.13 B) und fiel nach 72 Stunden auf 43 % ab (Score 2; Abb. 4.13 C). Insgesamt war somit nur ein geringer Anteil an M2-Makrophagen HLA-DR-positiv.

4.4 Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression typischer M2-Marker

Der Mannose-Rezeptor CD206 und der Hämoglobin-Scavenger-Rezeptor CD163 sind Oberflächenmoleküle mit funktioneller Beteiligung bei Auflösung bzw. Begrenzung von Entzündungen (siehe Einleitung und East L und Isacke CM, 2002; Philippidis P et al., 2010). Beide Marker sind auch häufig auf tumorassoziierten Makrophagen (TAM) zu finden und tragen vermutlich dazu bei, dass diese Makrophagen kein zytotoxisches Potential gegenüber Tumoren entwickeln.

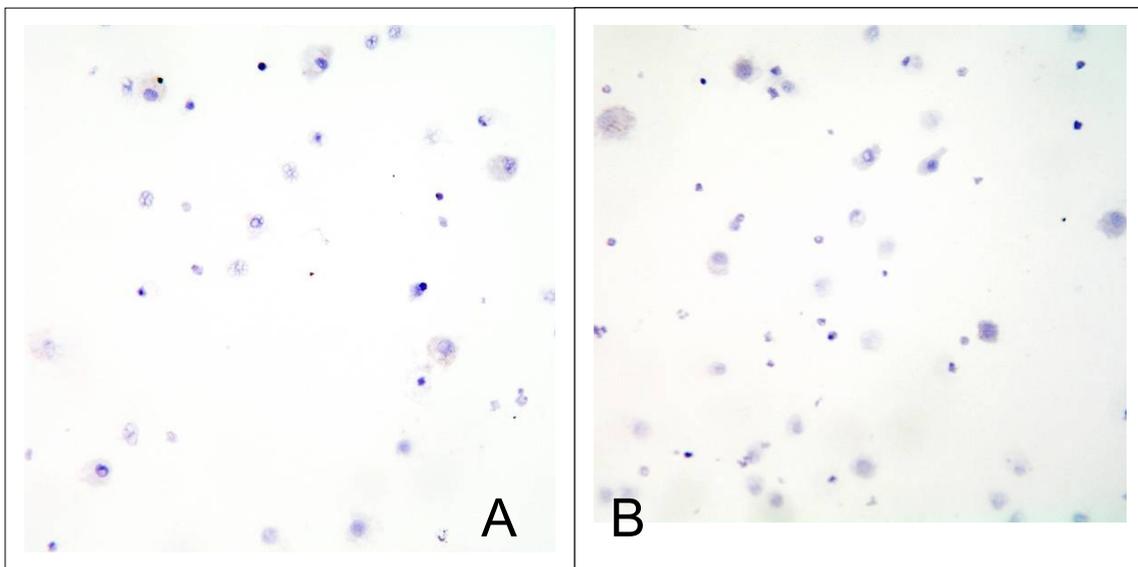


Abb. 4.14: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD163 und CD206 auf Makrophagen. Die Zellen wurden für 7 Tage ohne Wachstumsfaktoren inkubiert. (A) CD163 (10 % positive Zellen; Score 1); (B) CD206 (< 10 % positive Zellen; Score 0). Vergrößerung: 400x. Zum Färbescore siehe S. 18.

Ohne Wachstumsfaktoren herangereifte Makrophagen sind nahezu negativ für die beiden M2-Marker CD163 und CD206 (Abb. 4.14 A und B). Im Gegensatz dazu war ein überaus großer Anteil der M-CSF-Makrophagen positiv für CD163 (93 % positive Zellen, Score 3; Abb. 4.15 A). Zudem war ungefähr jede zweite Zelle positiv für CD206 (47 % positive Zellen, Score 2; Abb. 4.15 B). Dagegen waren GM-CSF-Makrophagen nur positiv für CD206 (100 % positive Zellen, Score 3; Abb. 4.15 D). Somit entsprechen M-CSF-Makrophagen hinsichtlich der

Expression der M2-Marker CD163 und CD206 bereits aktivierten M2-Makrophagen (Abb. 4.32 «Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse»).

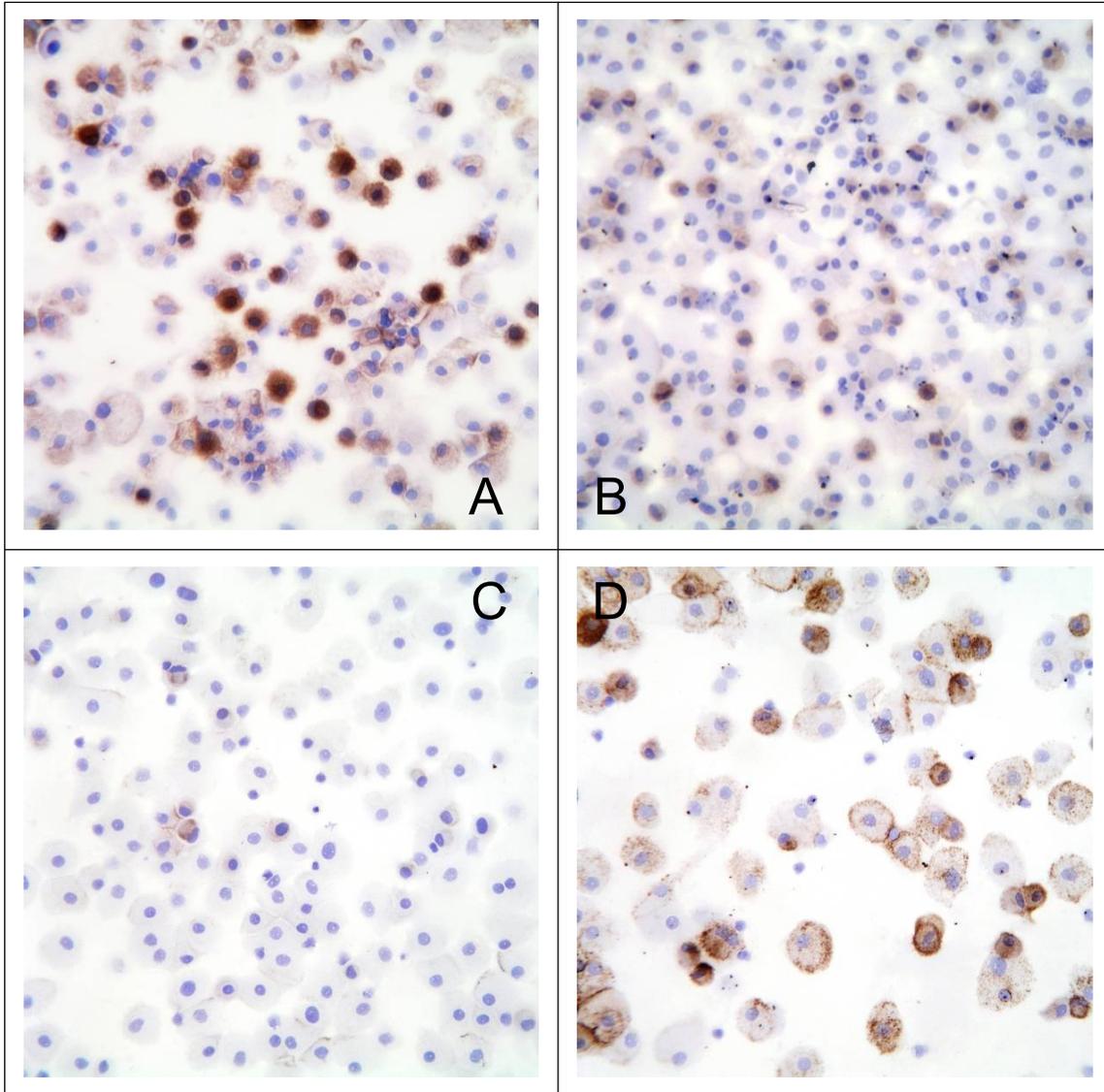


Abb. 4.15: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD163 und CD206 auf M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen. Die Zellen wurden für 7 Tage mit 50 ng/mL M-CSF (A & B) bzw. mit 50 ng/mL GM-CSF (C & D) inkubiert. (A) CD163 (93 % positive Zellen; Score 3); (B) CD206 (47 % positive Zellen; Score 2); (C) CD163 (10 % positive Zellen; Score 1); (D) CD206 (100 % positive Zellen; Score 3). Vergrößerung: 400x. Zum Färbescore siehe S. 18.

Die Aktivierung von GM-CSF-Makrophagen mit 15 ng/mL $\text{INF}\gamma$ und 100 ng/mL LPS zu GM1-Makrophagen führte zu keiner starken Expression der beiden M2-Marker CD163 und CD206 (zw. 39 bis 65 %, Score 2; Abb. 4.16 A-F).

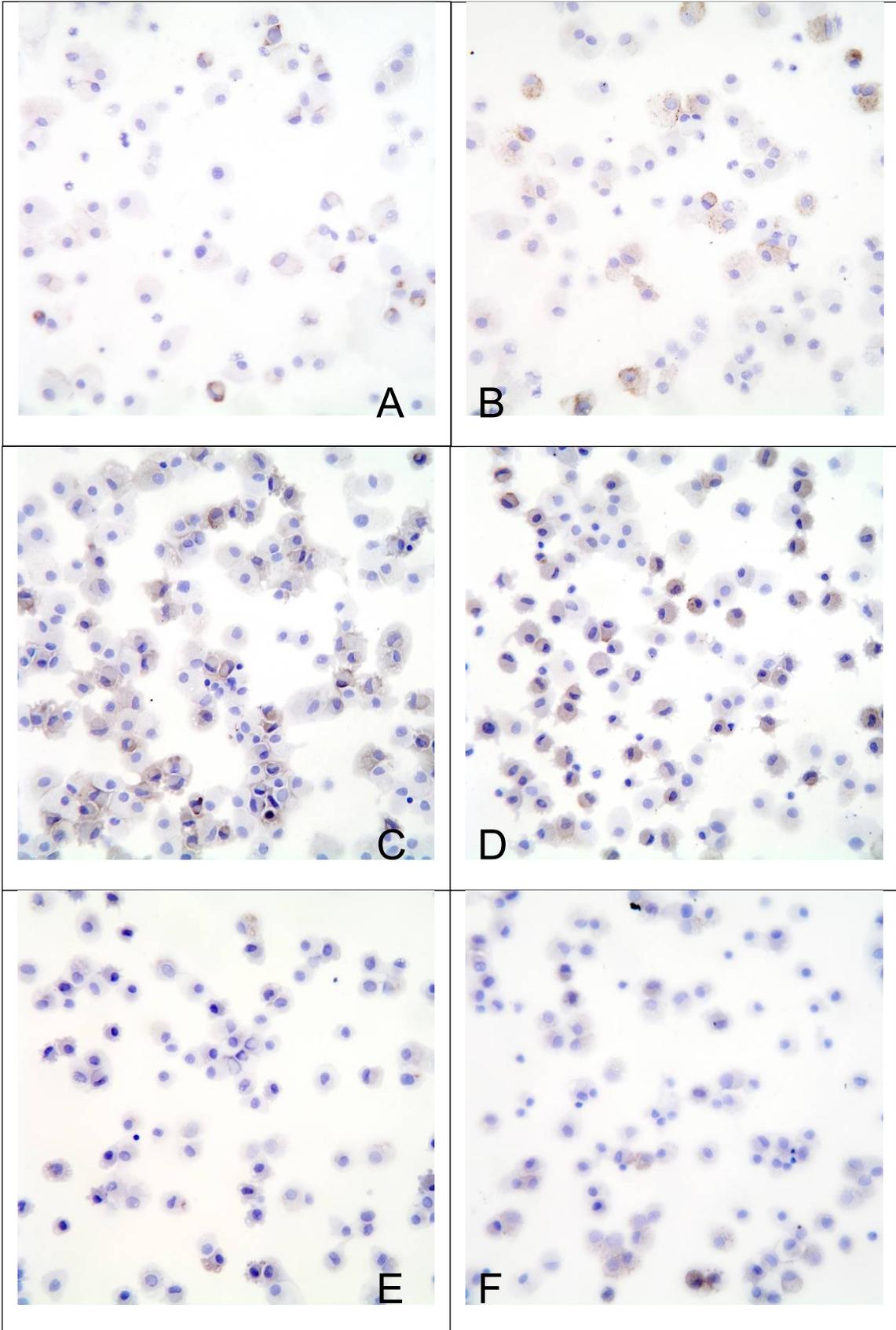


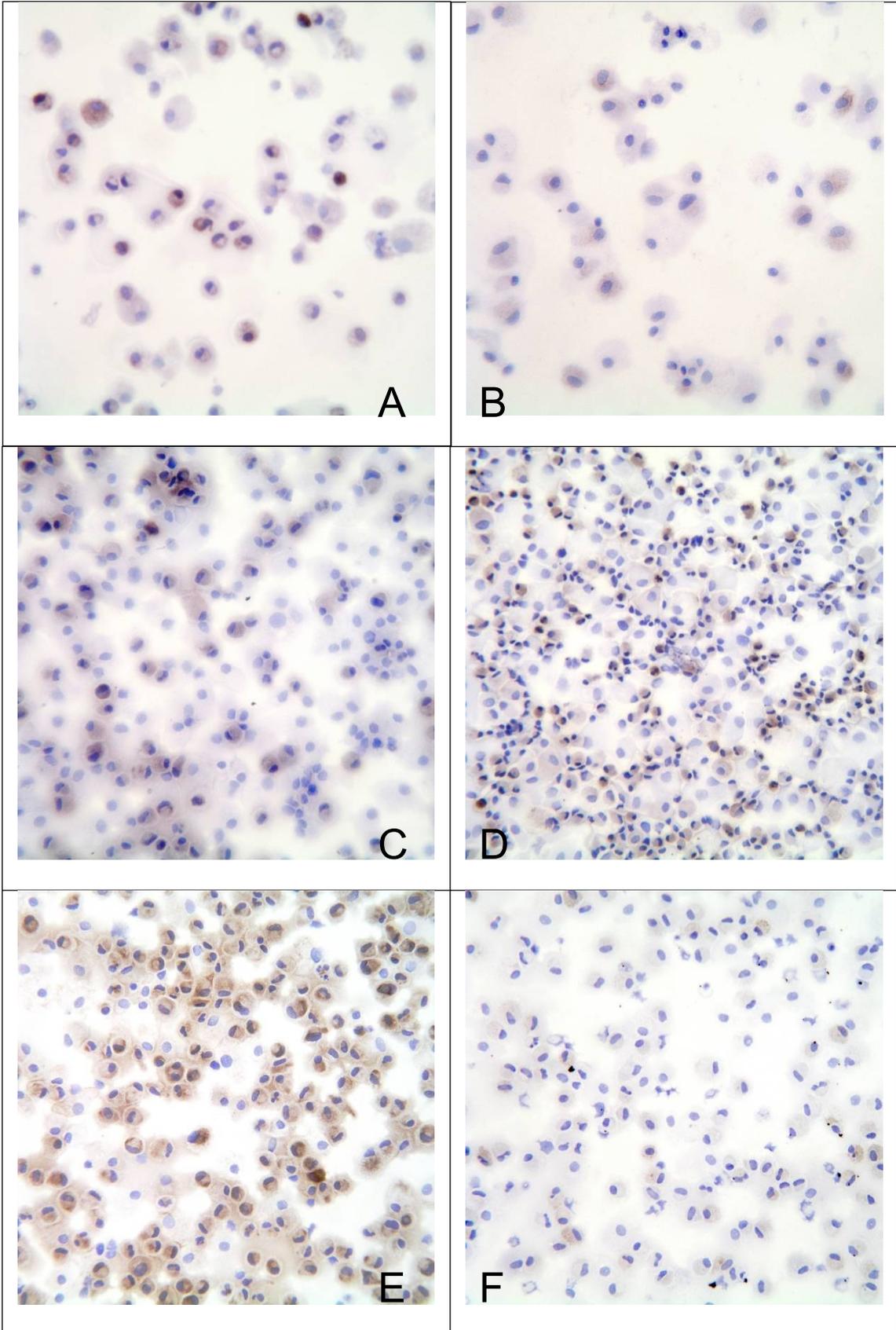
Abb. 4.16 (S. 43): Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD163 und CD206 auf GM1-Makrophagen. (A) CD163 (55 % positive Zellen; Score 2) und (B) CD206 (57 % positive Zellen; Score 2) nach Aktivierung mit 15 ng/mL INF γ und 100 ng/mL LPS für 24 Stunden; (C) CD163 (49 % positive Zellen; Score 2) und (D) CD206 (65 % positive Zellen; Score 2) nach Aktivierung für 48 Stunden; E CD163 (39 % positive Zellen; Score 2) und (F) CD206 (40 % positive Zellen; Score 2) nach Aktivierung für 72 Stunden. Vor ihrer Aktivierung «reiften» die Makrophagen für sieben Tage mit 50 ng/mL GM-CSF. Vergrößerung: 400x. Zum Färbescore siehe S. 18.

Interessanterweise stieg bei den M1-Makrophagen durch Aktivierung mit den beiden proinflammatorischen M1-Stimuli INF γ und LPS der Anteil positiv gefärbter Zellen für den M2-Marker CD163 an. Es zeigte sich, dass nach Aktivierung über 72 Stunden sämtliche Zellen CD163 exprimierten (100 % positive Zellen, Score 3; Abb. 4.17 E).

Der Anteil positiv gefärbter M1-Makrophagen für den Mannoserezeptor CD206 blieb hingegen während der Kulturdauer auf einem relativ konstanten Niveau zwischen 32 und 46 % (Abb. 4.17 B, D, F).

Insgesamt scheinen die «klassischen» proinflammatorischen Aktivatoren INF γ und LPS die M-CSF-induzierte Expression von CD206 bei M1-Makrophagen nicht zu beeinflussen. Demgegenüber nahm der Anteil CD206-positiver GM1-Makrophagen im Vergleich zu GM-CSF-Makrophagen deutlich ab, während der Anteil CD163-positiver Zellen durch die Aktivierung deutlich zunahm.

Abb. 4.17 (S. 45): Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD163 und CD206 auf M1-Makrophagen. (A) CD163 (75 % positive Zellen; Score 2) und (B) CD206 (44 % positive Zellen; Score 2) nach Aktivierung mit 15 ng/mL INF γ und 100 ng/mL LPS für 24 Stunden; (C) CD163 (62 % positive Zellen; Score 2) und (D) CD206 (46 % positive Zellen; Score 2) nach Aktivierung für 48 Stunden; (E) CD163 (100 % positive Zellen; Score 3) und (F) CD206 (32 % positive Zellen; Score 1) nach Aktivierung für 72 Stunden. Vor ihrer Aktivierung «reiften» die Makrophagen für sieben Tage mit 50 ng/ml M-CSF. Vergrößerung: 600x. Zum Färbescore siehe S. 18.



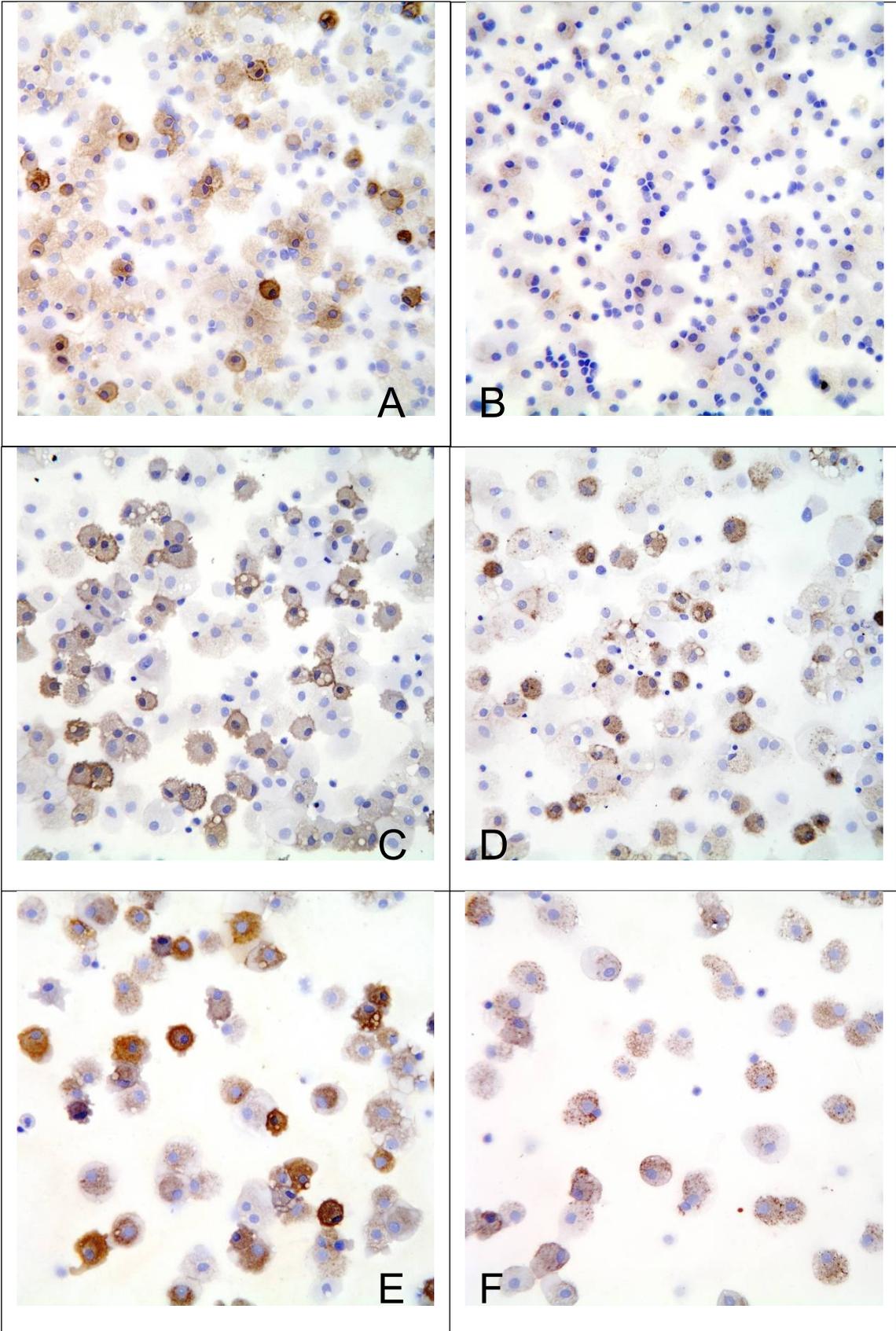


Abb. 4.18 (S. 46): Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD163 und CD206 auf M2-Makrophagen. (A) CD163 (100 % positive Zellen; Score 3) und (B) CD206 (55 % positive Zellen; Score 2) nach Aktivierung mit 15 ng/mL IL-4 und 15 ng/mL IL-10 für 24 Stunden; (C) CD163 (100 % positive Zellen; Score 3) und (D) CD206 (90 % positive Zellen; Score 3) nach Aktivierung für 48 Stunden; (E) CD163 (100 % positive Zellen; Score 3) und (F) CD206 (94 % positive Zellen; Score 3) nach Aktivierung für 72 Stunden. Vor ihrer Aktivierung «reiften» die Makrophagen für sieben Tage mit 50 ng/mL M-CSF. Vergrößerung: 600x. Zum Färbescore siehe S. 18.

Durch Inkubation mit den Zytokinen IL-4 und IL-10 werden M2-Makrophagen induziert. Bereits eine Aktivierung für 24 Stunden führte dazu, dass nahezu sämtliche Zellen positiv für CD163 und CD206 waren (Abb. 4.18 A-F). Auch zeigte sich im Vergleich zu den GM1- und M1-Makrophagen ein geringerer Anteil positiv gefärbter Zellen für den M1-Marker HLA-DR (vgl. Kapitel 4.4 «Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression des M1-Markers HLA-DR»).

4.5 Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression des Phagozytose-Rezeptors FcγIII

Der Phagozytose-Rezeptor FcγIII (CD16) korreliert mit der Fähigkeit von Makrophagen zu phagozytieren (siehe Einleitung und Becker, S et al., 1987; Young, DA et al., 1990; Leidi, M et al., 2009).

Sowohl GM-CSF-Makrophagen als auch mit INF γ und LPS aktivierte GM1-Makrophagen exprimierten nahezu kein CD16. Lediglich zwischen 11 und 23 % der Zellen waren positiv für CD16 (Abb. 4.19 A-D).

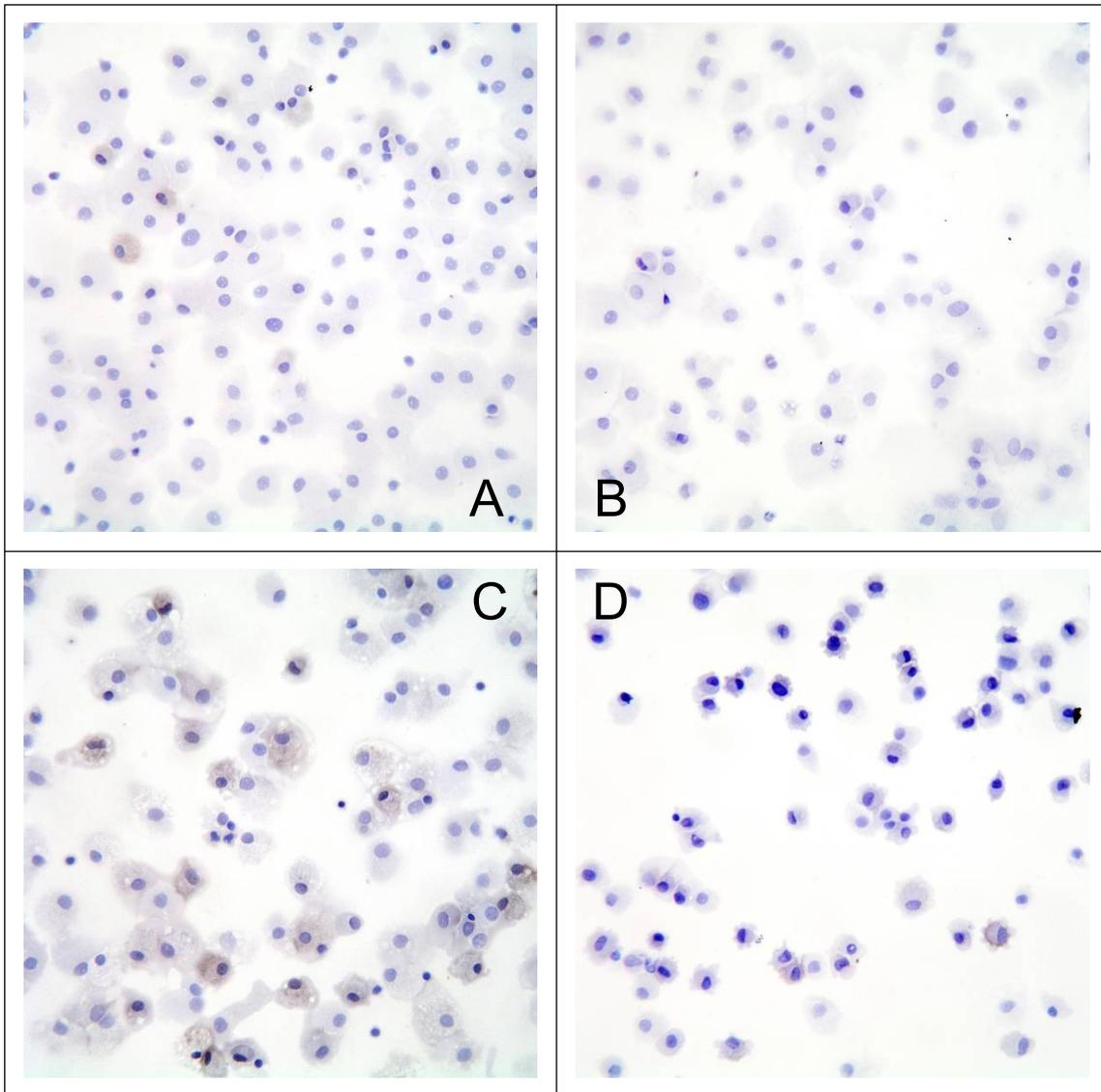


Abb. 4.19: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD16 auf GM-CSF- und GM1-Makrophagen. (A) nach sieben Tagen in Kultur mit 50 ng/mL GM-CSF (11 % positive Zellen Score 1); (B) 24 Stunden nach Aktivierung mit $\text{INF}\gamma$ und LPS (<10 % positive Zellen; Score 0); (C) 48 Stunden nach Aktivierung mit $\text{INF}\gamma$ und LPS (23 % positive Zellen; Score 1); (D) 72 Stunden nach Aktivierung mit $\text{INF}\gamma$ und LPS (14 % positive Zellen; Score 1). Vergrößerung: 600x. Zum Färbescore siehe S. 18.

Der Anteil CD16-positiver Zellen bei M1-Makrophagen war sehr hoch (bis zu 80 % positive Zellen, Score 3; Abb. 4.20 A-C). Somit ist von einer Phagozytoseaktivität bei M1-Makrophagen auszugehen, die sich damit von aktivierten GM1- und nicht aktivierten GM-CSF-Makrophagen deutlich unterscheiden. Der Anteil an CD16-positiven Zellen betrug hier maximal 23 % (Abb. 4.19 A-D). Diese Daten

deuten somit auf eine unterschiedliche Wirkung der beiden Wachstumsfaktoren M-CSF und GM-CSF auf die Expression von CD16 hin. M-CSF induziert die Expression von CD16 (Abb. 4.20), während GM-CSF keinen Effekt auf die Expression dieses Fc γ -III-Rezeptors hat (Abb. 4.19).

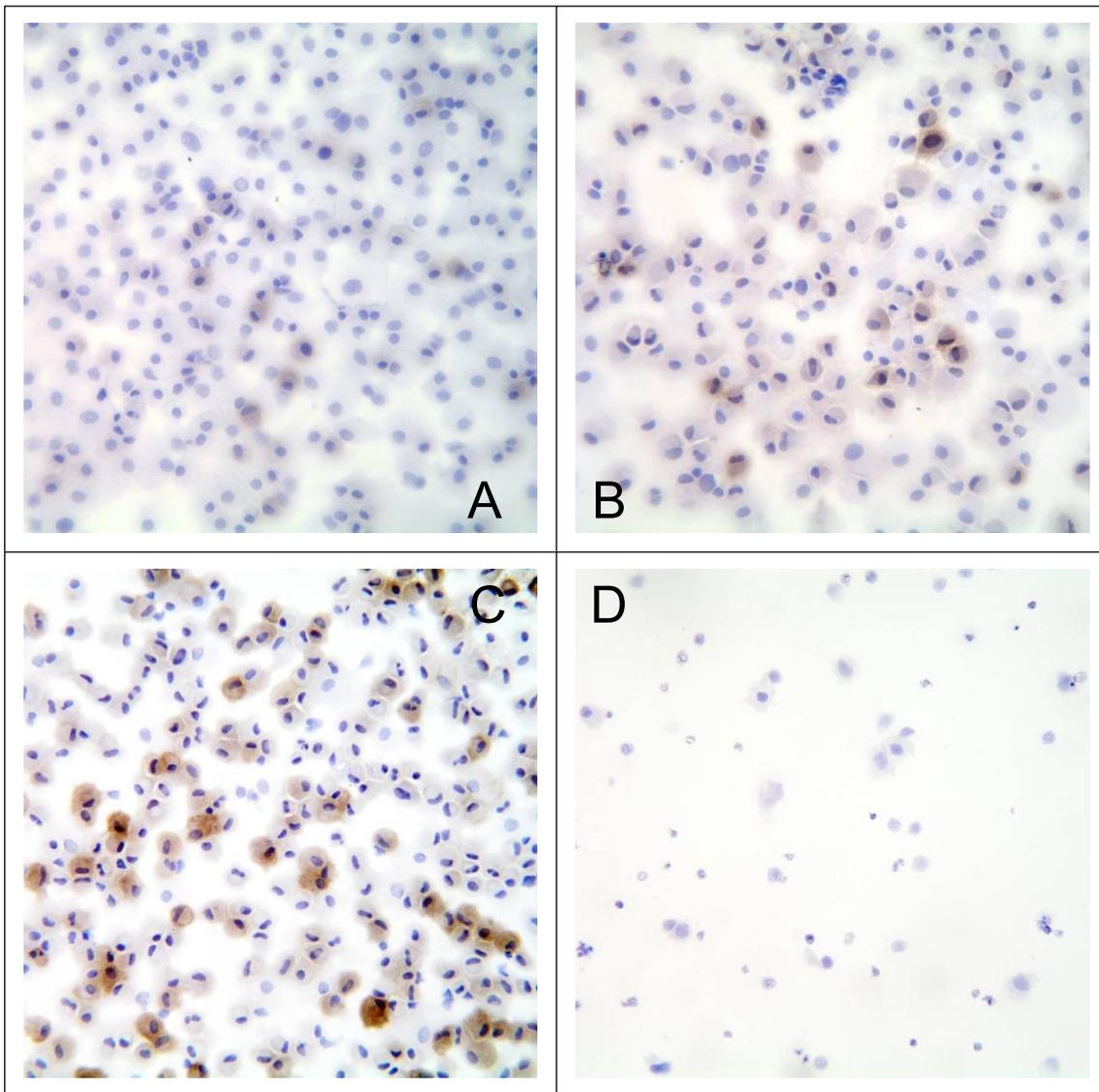


Abb. 4.20: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD16 auf M-CSF- und M1-Makrophagen. (A) M-CSF-Makrophagen nach sieben Tagen mit 50 ng/mL M-CSF (12 % positive Zellen; Score 1); (B) M1-Makrophagen nach Aktivierung für 48 Stunden mit 15 ng/mL IFN γ und 100 ng/mL LPS (32 % positive Zellen; Score 1); (C) nach Aktivierung für 72 Stunden (80 % positive Zellen; Score 3:); (D) nach sieben Tagen ohne Wachstumsfaktoren (< 10 % positive Zellen; Score 0). Vergrößerung: 600x. Zum Färbescore siehe S. 18. Der 24-Stundenwert blieb unberücksichtigt, da hier eine andere Verdünnung des anti-CD16-Antikörpers verwendet wurde, so dass der Score 0 auch durch die höhere Antikörper-Verdünnung (1:100 statt 1:50) zustande gekommen sein konnte.

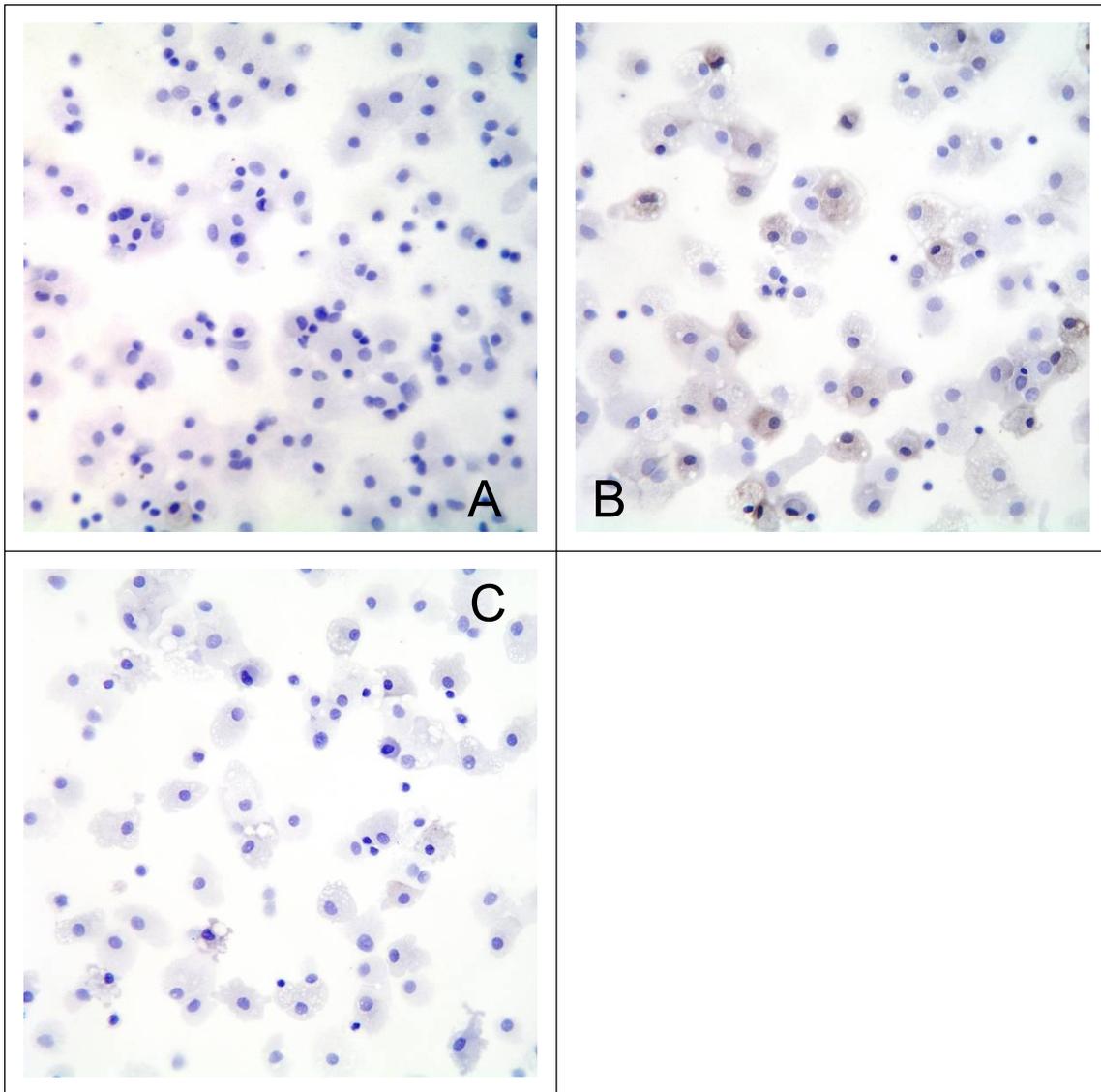


Abb. 4.21: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD16 auf M2-Makrophagen. (A) nach Aktivierung mit 15 ng/mL IL-4 und 15 ng/mL IL-10 für 24 Stunden (< 10 % positive Zellen; Score 0); (B) nach Aktivierung für 48 Stunden (26 % positive Zellen; Score 1); (C) nach Aktivierung für 72 Stunden (10 % positive Zellen; Score 0). Vor ihrer Aktivierung «reiften» die Makrophagen für sieben Tage mit 50 ng/mL M-CSF. Vergrößerung: 600x. Zum Färbescore siehe S. 18.

M2-Makrophagen exprimierten kaum CD16 (Abb. 4.21 A-C). Dies lässt vermuten, dass M2-Makrophagen wohl über keine wesentliche Phagozytoseaktivität verfügen, auch wenn die beiden anderen Fcγ-Rezeptoren – FcγI (CD64) und FcγII (CD32) – nicht direkt untersucht wurden. Die verringerte Expression von CD16 wurde auch von anderen Autoren beschrieben (z.B. Leidi M et al., 2009).

Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse der Kapitel 4.3 bis 4.5

«Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression des M1-Markers HLA-DR»; «Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression typischer M2-Marker»; «Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression des Phagozytose-Rezeptors FcγIII».

Tab. 4.2: Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen im Überblick (s. auch Abb. 1.1).

	M-CSF-Makrophagen	M1-Makrophagen	M2-Makrophagen	GM-CSF-Makrophagen	GM1-Makrophagen
HLA-DR	60 % (Abb. 4.10)	60, 75, 87 %^{*)} (Abb. 4.12)	34, 61, 43 % (Abb. 4.13)	87 % (Abb. 4.11)	60, 82, 30 % (Abb. 4.11)
CD163	93 % (Abb. 4.15)	75, 62, 100 % (Abb. 4.17)	100, 100, 100 % (Abb. 4.18)	10 % (Abb. 4.15)	55, 49, 39 % (Abb. 4.16)
CD206	47 % (Abb. 4.15)	44, 46, 32 % (Abb. 4.17)	55, 90, 94 % (Abb. 4.18)	100 % (Abb. 4.15)	57, 65, 40 % (Abb. 4.16)
CD16	12 % (Abb. 4.20)	32, 80 % (Abb. 4.20)	<10, 26, 10 % (Abb. 4.21)	11 % (Abb. 4.19)	<10, 23, 14 % (Abb. 4.19)

Anmerkung: M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen wurden aus Blutmonozyten durch Inkubation mit 50 ng/mL M-CSF bzw. 50 ng/mL GM-CSF für sieben Tage gewonnen. Die Aktivierung von M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen mit IFN γ und LPS führte zu M1- bzw. GM1-Makrophagen. Die Aktivierung von M-CSF-Makrophagen mit IL-4 und IL-10 führte zu M2-Makrophagen. ^{*)} Die drei Prozentwerte stehen für die Aktivierungsintervalle 24, 48 und 72 Stunden.

4.6 Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression von Chemokinen und IDO

Zusätzlich zur immunhistochemischen Charakterisierung von Makrophagen wurden zur weiteren Charakterisierung Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene durchgeführt. Dazu wurde die Aktivität von 4 Genen gemessen, die Martinez 2006 in einer umfassenden Arbeit dem M1- oder M2-Makrophagen-Typ zuordnete (Martinez, FO et al., 2006).

Die beiden Gene CCR7 und IDO1 sind insbesondere in M1-Makrophagen stark exprimiert, während das CCL18-Gen in M2-Makrophagen aktiv ist ^{**}).

Zusätzlich wurde die Expression von CCL2 untersucht, das ein bedeutendes Chemokin im Tumormilieu (siehe Einleitung) ist und dessen Expression von M-CSF reguliert wird (Fleetwood, AJ et al., 2007; Hamilton, JA, 2008). Bereits in nicht-aktivierten Makrophagen wurde eine Aktivität der Gene CCL18 in GM-CSF-Makrophagen und CCL2 in M-CSF-Makrophagen nachgewiesen (Abb. 4.22).

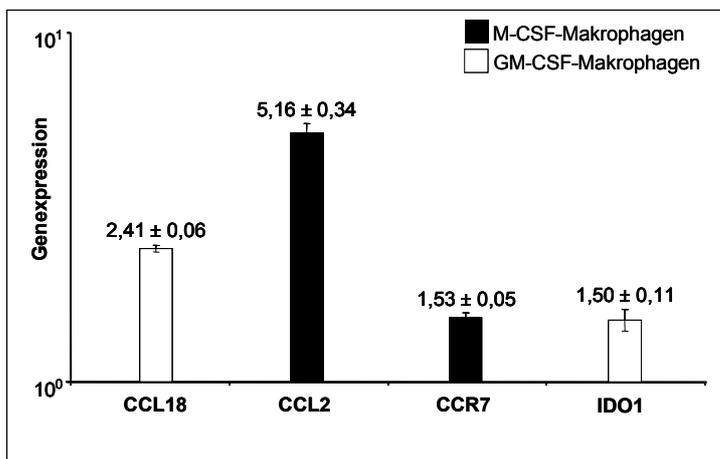


Abb. 4.22: Expression von CCL2, CCL18, CCR7 und IDO1 in M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen. Der Anteil an CCL2 mRNA in M-CSF-Makrophagen ist fünfmal höher als in GM-CSF-Makrophagen. Die Expression der Gene (Tab. 3.3) wurde auf die beiden Referenzgene β -Aktin und Peptidyl-Prolyl-Isomerase A (PPIA) normalisiert und die jeweilige Expression mit der $\Delta\Delta Cq$ -Methode bestimmt. Der

Unterschied in der Expression zwischen CCL18 und CCL2 ist mit $P < 0.001$ signifikant.

^{**}) CCR7 ist ein Rezeptor, der auf aktivierten Immunzellen zu finden ist und zum Nachweis von M1-Makrophagen verwendet wird (Brown, BN et al., 2009). Indolamin 2,3-Dioxygenase, bekannt als IDO1 oder INDO, ist ein Enzym, das durch $IFN\gamma$ induziert wird und eine zentrale Rolle in der Immunregulation spielt (Gu, T et al., 2010) CCL18 ist ein Chemokin, das oft im Zusammenhang mit tumorassoziierten Makrophagen (TAM) genannt wird.

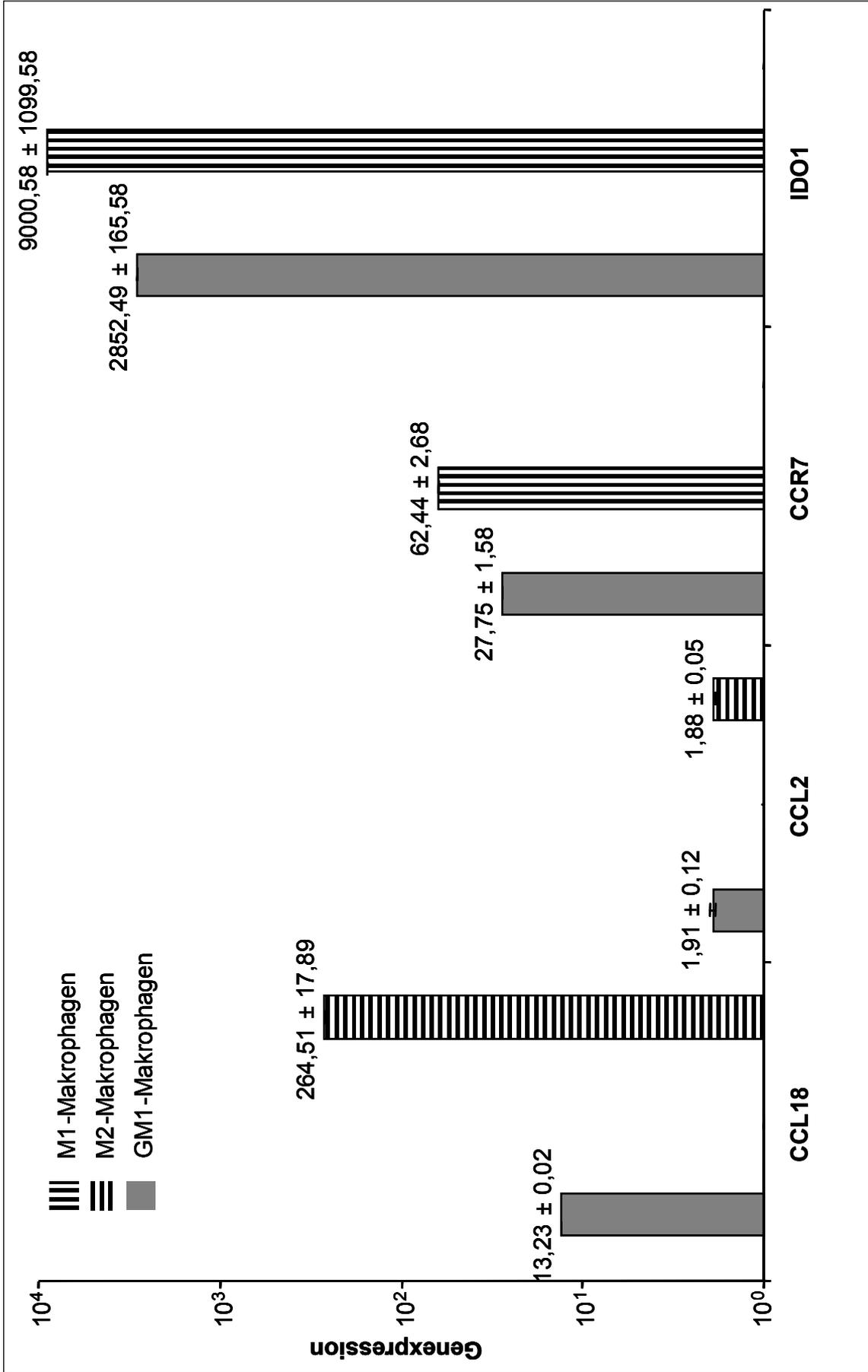
Tab. 4.3: Zugehörige Cq-Werte zu Abb. 4.22.

Population	Zielgen	MW Cq ^{**)}	Stabw Cq ^{***)}
M-CSF-Makrophagen ^{*)}	CCL18	28,15	0,10
	CCL2	18,83	0,09
	CCR7	22,61	0,04
	IDO1	30,61	0,09
GM-CSF-Makrophagen ^{*)}	CCL18	27,31	0,01
	CCL2	21,63	0,07
	CCR7	23,66	0,06
	IDO1	30,46	0,10

^{*)} Zur Induktion von M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen wurden adhärenente Monozyten mit 50 ng/mL M-CSF bzw. 50 ng/mL GM-CSF in Kulturmedium mit 1 % Serum für 7 Tage inkubiert. ^{**)} Mittelwert und ^{***)} Standardabweichung der Cq-Werte. Zum Cq-Wert siehe Kapitel 3.11.

Durch Aktivierung von M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen zu M1- bzw. M2-Makrophagen und GM1-Makrophagen stieg die Aktivität aller Zielgene deutlich an (Abb. 4.23). In den klassisch aktivierten M1- und GM1-Makrophagen ist die Expression von CCR7 und IDO1 am stärksten. Im Vergleich zu M2-Makrophagen ist die Expression von CCR7 um den Faktor 27 bzw. 62 und von IDO1 um den Faktor 2800 bzw. 9000 in M1- bzw. GM1-Makrophagen erhöht. Sowohl aktivierte GM1- als auch aktivierte M1-Makrophagen sind dem M1-Typ zuzuordnen. In M2-Makrophagen ist hingegen die Expression von CCL18 am stärksten. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit Daten aus der Arbeit von Martinez überein.

Abb. 4.23 (S. 54): Expression von CCL2, CLL2, CCR7 und IDO1 in M1- und GM1-Makrophagen sowie M2-Makrophagen. In M1- und GM1-Makrophagen dominiert die Expression der M1-Gene CCR7 und IDO1, während in M2-Makrophagen die Expression des M2-Gens CCL18 am stärksten ist. Zur Induktion von M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen wurden adhärenente Monozyten mit 50 ng/mL M-CSF bzw. 50 ng/mL GM-CSF in Kulturmedium mit 1 % Serum für 7 Tage inkubiert. Danach erfolgte ihre Aktivierung zu GM1- bzw. M1-Makrophagen durch Inkubation mit 15 ng/mL IFN- γ und 100 ng/mL LPS oder zu M2-Makrophagen durch Inkubation mit 15 ng/mL IL-4 und 15 ng/ml IL-10. Die Expression der Gene (Tab. 3.3) wurde auf die beiden Referenzgene β -Aktin und Peptidyl-Prolyl-Isomerase A (PPIA) normalisiert und die jeweilige Expression mit der $\Delta\Delta Cq$ -Methode bestimmt. Der Unterschied in der Expression von CCL18 zwischen M2- und GM1-Makrophagen sowie von CCR7 zwischen M1- und GM1-Makrophagen sowie von IDO1 zwischen M1- und GM1-Makrophagen ist jeweils mit $P < 0.001$ signifikant.



Tab. 4.4: Zugehörige Cq-Werte zu Abb. 4.23.

Population	Zielgen	MW Cq	Stabw Cq
M2-Makrophagen ^{*)}	CCL18	15,84	0,09
	CCL2	19,88	0,02
	CCR7	27,05	0,01
	IDO1	30,62	0,13
M1-Makrophagen ^{*)}	CCL18	24,42	0,16
	CCL2	21,33	0,06
	CCR7	21,62	0,04
	IDO1	18,02	0,17
GM1-Makrophagen ^{*)}	CCL18	22,76	0,01
	CCL2	22,45	0,09
	CCR7	24,85	0,08
	IDO1	21,74	0,08

^{*)} Zur Induktion von M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen wurden adhärenente Monozyten mit 50 ng/mL M-CSF bzw. 50 ng/mL GM-CSF in Kulturmedium mit 1 % Serum für 7 Tage inkubiert. Danach erfolgte ihre Aktivierung zu GM1- bzw. M1-Makrophagen durch Inkubation mit 15 ng/mL IFN γ und 100 ng/mL LPS oder zu M2-Makrophagen durch Inkubation mit 15 ng/mL IL-4 und 15 ng/mL IL-10. Zum Cq-Wert siehe Kapitel 3.11.

Die Aktivierung von M-CSF-Makrophagen mit den beiden M2-Stimuli IL-4 und IL-10 führte zu einer deutlichen Expression von CCL18, einem Marker für M2-Makrophagen. Die Expression von CCL18 war in M2-Makrophagen über 4.500-fach stärker als in M-CSF-Makrophagen (Abb. 4.24), während die für M1-Makrophagen charakteristischen Gene CCR7 und IDO1 kaum Aktivität in M2-Makrophagen zeigten.

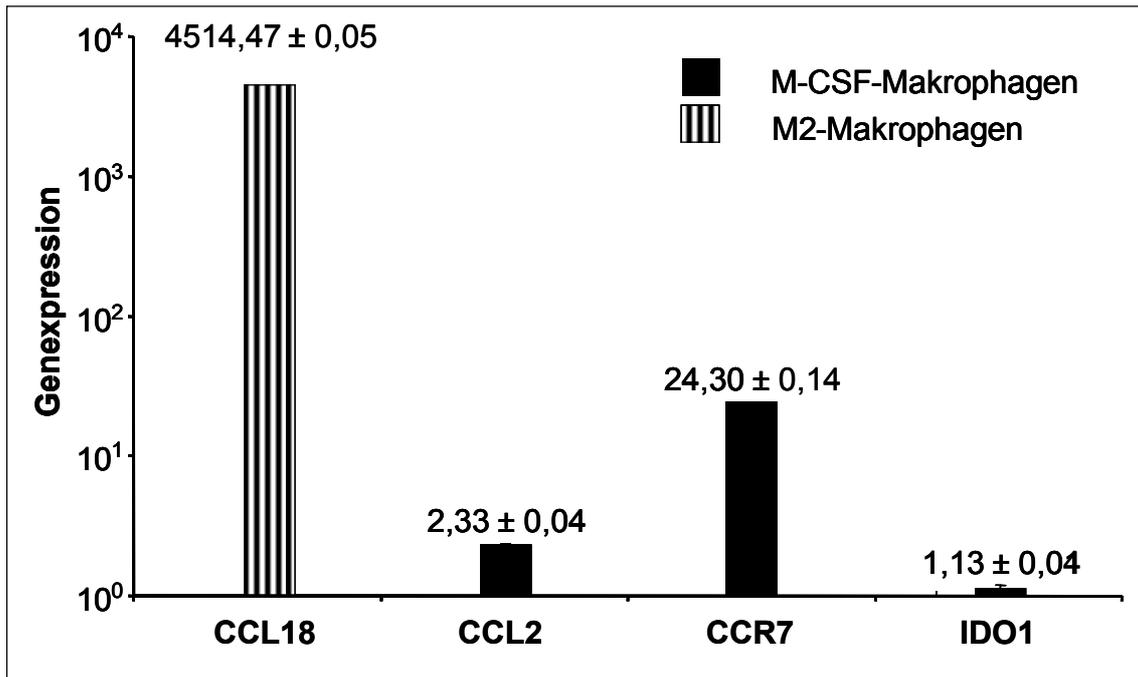


Abb. 4.24: Expression von CCL2, CLL2, CCR7 und IDO1 in M-CSF- und M2-Makrophagen. Alternativ aktivierte M2-Makrophagen zeigen eine 4500-fache Überexpression des M2-Gens CCL18, während M-CSF-Makrophagen eine 20-fach erhöhte Expression des M1-Gens CCR7 aufweisen. Zur Induktion von M-CSF-Makrophagen wurden adhärenzte Monozyten mit 50 ng/mL M-CSF in Kulturmedium mit 1 % Serum für 7 Tage inkubiert. Danach erfolgte ihre Aktivierung zu M2-Makrophagen durch Inkubation mit 15 ng/mL IL-4 und 15 ng/mL IL-10. Die Expression der Gene (Tab. 3.3) wurde auf die beiden Referenzgene β -Aktin und Peptidyl-Prolyl-Isomerase A (PPIA) normalisiert und die jeweilige Expression mit der $\Delta\Delta Cq$ -Methode bestimmt. Der Unterschied in der Expression zwischen CCL18 und CCL2 sowie zwischen CCR7 und IDO1 ist mit $P < 0.001$ signifikant.

Tab. 4.5: Zugehörige Cq-Werte zu Abb. 4.24.

Population	Zielgen	MW Cq	Stabw Cq
M2-Makrophagen	CCL18	15,84	0,09
	CCL2	19,88	0,02
	CCR7	27,05	0,01
	IDO1	30,62	0,13
M-CSF-Makrophagen	CCL18	28,15	0,10
	CCL2	18,83	0,09
	CCR7	22,61	0,04
	IDO1	30,61	0,09

Zum Cq-Wert siehe Kapitel 3.11.

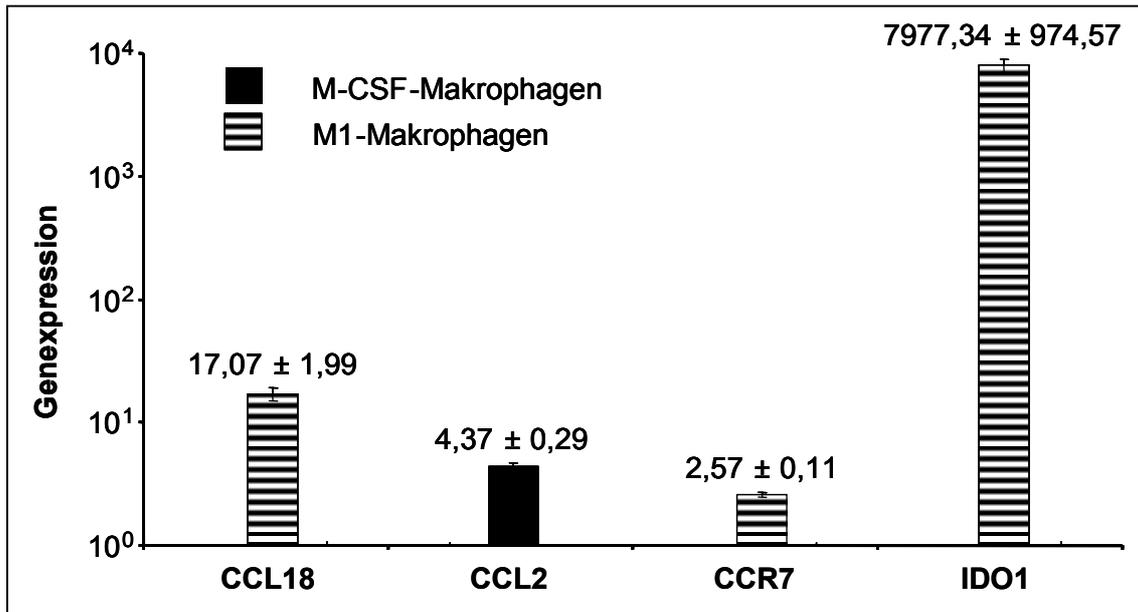


Abb. 4.25: Expression von CCL2, CCL18, CCR7 und IDO1 in M-CSF- und M1-Makrophagen. Durch die Aktivierung von M-CSF-Makrophagen mit $\text{INF}\gamma$ und LPS steigt die Aktivität des M1-Zielgens hIDO1 um das 8000-fache an. Die Aktivität des M2 ϕ -Zielgens hCCL2 sinkt hingegen um das 4-fache (M-CSF wurde über sieben Tage in Kultur belassen; danach erfolgte keine oder die Aktivierung durch 15 ng/mL $\text{INF}\gamma$ und 100 ng/mL LPS zu M1-Makrophagen). Die Expression der Gene (Tab. 3.3) wurde auf die beiden Referenzgene β -Aktin und Peptidyl-Prolyl-Isomerase A (PPIA) normalisiert und die jeweilige Expression mit der $\Delta\Delta\text{Cq}$ -Methode bestimmt. Der Unterschied zwischen in der Expression zwischen CCL18 und CCL2 sowie zwischen CCL18 und CCR7 sowie zwischen CCL18 und IDO sind mit jeweils $P < 0.001$ signifikant.

Tab. 4.6: Zugehörige Cq-Werte zu Abb. 4.25.

Population	Zielgen	MW Cq	Stabw Cq
M1-Makrophagen	CCL18	24,42	0,16
	CCL2	21,33	0,06
	CCR7	21,62	0,04
	IDO1	18,02	0,17
M-CSF-Makrophagen	CCL18	28,15	0,10
	CCL2	18,83	0,09
	CCR7	22,61	0,04
	IDO1	30,61	0,09

Zum Cq-Wert siehe Kapitel 3.11.

Der Vergleich von M-CSF und M1-Makrophagen zeigte eine erhöhte Expression von CCR7 und IDO1 in M1-Makrophagen (Abb. 4.25), also von Genen, die vor allem in klassisch aktivierten Makrophagen aktiv sind. In alternativ aktivierten M2-Makrophagen ist hingegen das Gen CCL18 bevorzugt aktiv (Abb. 4.24).

4.7 Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Sezernierung von NO und IL-12

Nach Charakterisierung der Differenzierung humaner Makrophagen mit immunhistochemischen und molekularen Methoden wird in diesem Kapitel die Funktion verschiedener Makrophagen-Populationen anhand der Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) und IL-12 untersucht. Beide proinflammatorische Marker sind zur Differenzierung von Makrophagenfunktionen in der Literatur akzeptiert (Moncada S et al., 1991; MacMicking J et al., 1997).

NO ist ein wichtiges physiologisches Effektormolekül, das neben seiner Funktion als *second messenger* z.B. im kardiovaskulären und neuronalen System, auch zelltoxisch wirkt und eine wichtige Rolle bei der Abtötung von Zielzellen spielt. IL-12, das auch unter der Bezeichnung *natural killer cell stimulatory factor* (NKSF) oder *cytotoxic lymphocyte maturation factor* (CLMF) bekannt ist, steigert sowohl Proliferation als auch Zelltoxizität von Zellen des Immunsystems wie z.B. zytotoxischer T-Zellen.

Als erstes wurde die NO-Produktion von M-CSF- und M1-Makrophagen miteinander verglichen (Abb. 4.26). Die mit IFN γ und LPS aktivierten M-CSF-Makrophagen (= M1-Makrophagen) sezernierten nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden mehr als doppelt soviel NO.

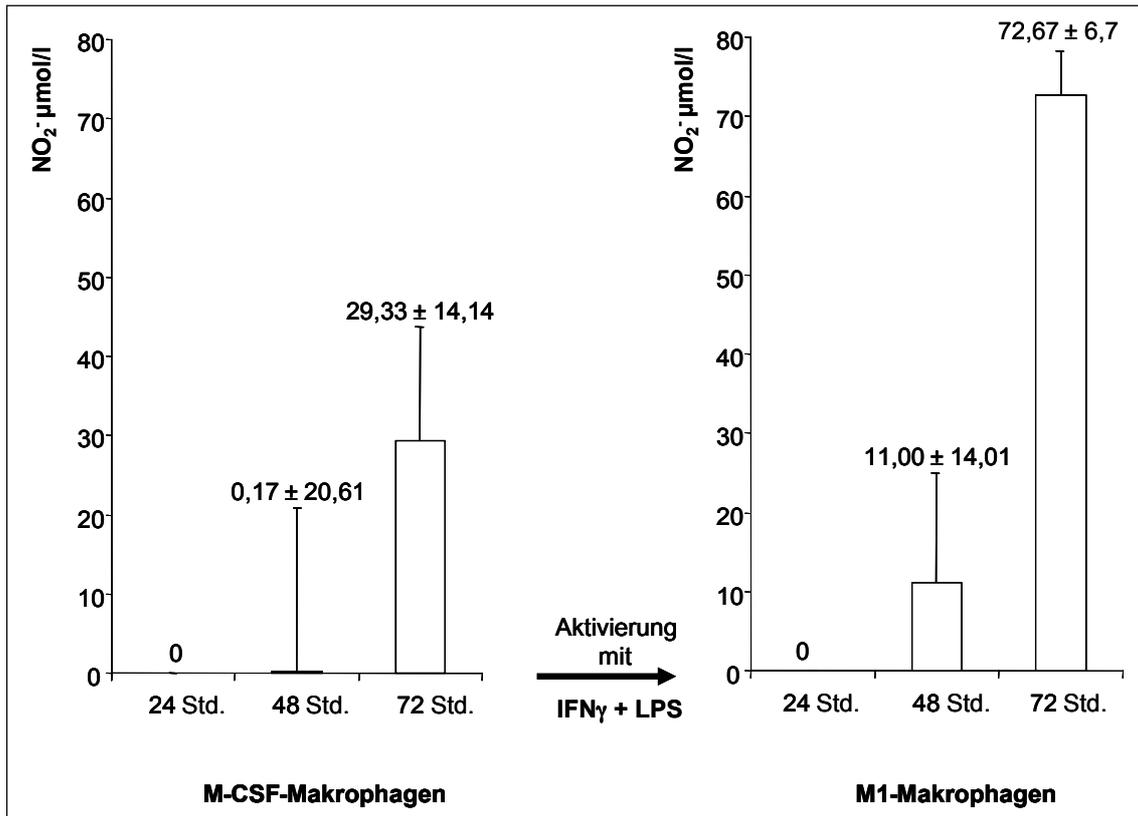


Abb. 4.26: Die Bildung von NO durch M-CSF- und M1-Makrophagen. Wie erwartet, produzieren klassisch-aktivierte M1-Makrophagen deutlich mehr NO (bis zum 2,5-fachen) als nicht-aktivierte M-CSF-Makrophagen. Dargestellt ist die NO_2^- -Konzentration als Maß für die tatsächliche NO-Produktion. Monozyten wurden für 7 Tage mit 50 ng/mL M-CSF inkubiert (= M-CSF-Makrophagen). Anschließend wurde das Medium gewechselt und sie für 24, 48 oder 72 Stunden mit (M1-Makrophagen) bzw. ohne (M-CSF-Makrophagen) 10 ng/mL $\text{IFN}\gamma$ und 100 ng/mL LPS stimuliert. Pro Ansatz wurden 2×10^7 Zellen ausgesät. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen mit bis zu 5 Parallelwerten im ELISA. Der Unterschied in der NO_2^- -Konzentration zwischen 48 und 72-Stunden Stimulation ist für M1-Makrophagen mit $P < 0.001$ signifikant.

Auch die NO-Produktion von GM1- und M1-Makrophagen wurde miteinander verglichen (Abb. 4.27). Dabei zeigte sich, dass GM1-Makrophagen zumindest in der frühen Phase der Stimulierung eine stärkere NO-Produktion aufweisen als M1-Makrophagen. Währenddessen war für M1-Makrophagen die NO-Produktion nach 72 Stunden Stimulation erhöht.

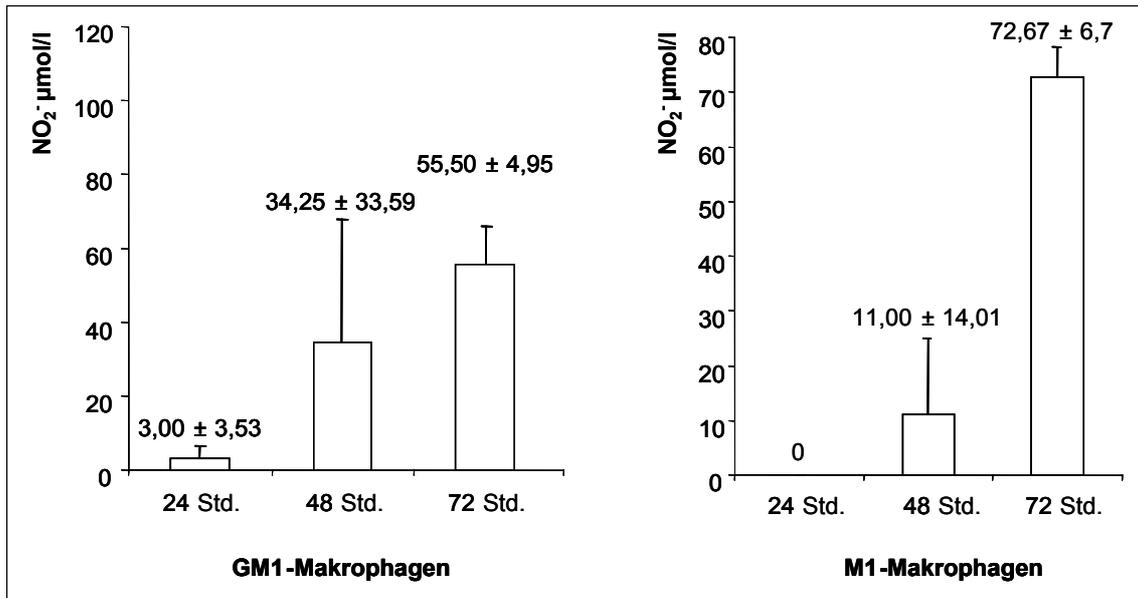


Abb. 4.27: Die Bildung von NO durch GM1- und M1-Makrophagen. Dargestellt ist die NO_2^- Konzentration als Maß für die tatsächliche NO-Produktion. Monozyten wurden für 7 Tage mit 50 ng/mL M-CSF (= M-CSF-Makrophagen) bzw. 50 ng/mL GM-CSF (= GM-CSF-Makrophagen) inkubiert, und anschließend wurden sie für 24, 48 oder 72 Stunden mit 10 ng/mL $\text{IFN}\gamma$ und 100 ng/mL LPS zu M1- bzw. GM1-Makrophagen aktiviert. Pro Ansatz wurden 2×10^7 Zellen ausgesät. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen mit bis zu 5 Parallelwerten im ELISA. Der Unterschied in der NO_2^- -Konzentration zwischen 48 und 72-Stunden Stimulation ist für M1-Makrophagen mit $P < 0.001$ signifikant.

Als nächstes wurde die NO-Produktion von M-CSF-Makrophagen mit der von M2-Makrophagen verglichen. Hierzu wurden M-CSF-Makrophagen mit IL-4 / IL-10 zu M2-Makrophagen aktiviert. Unerwartet war die massive NO-Produktion der M2-Makrophagen (Abb. 4.28). Möglicherweise ist der Nachweis von NO zur Unterscheidung von M1- und M2-Makrophagen ungeeignet (Denis, M, 1994).

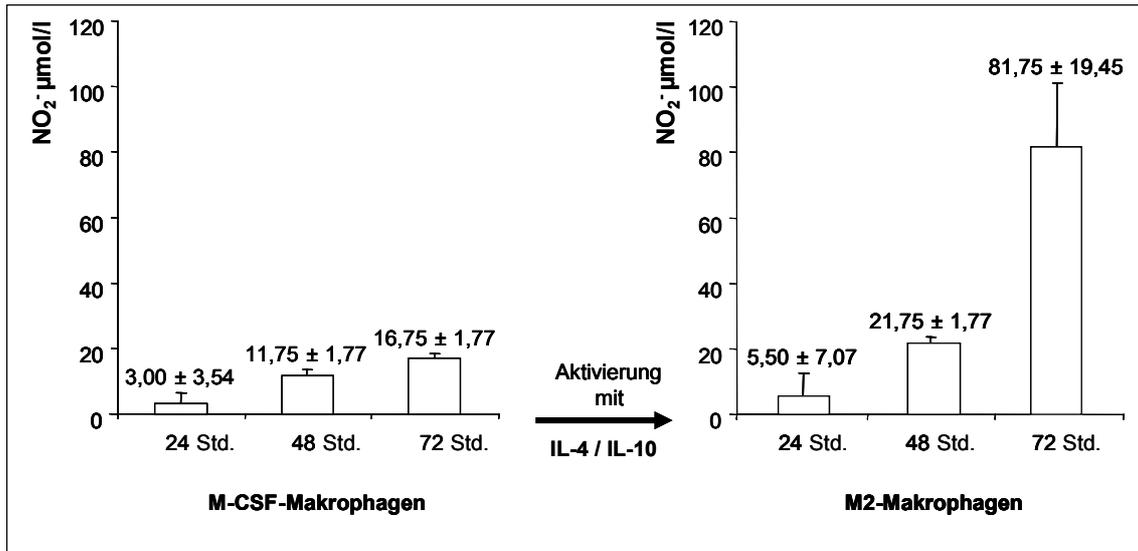


Abb. 4.28: Die Bildung von NO durch M-CSF- und M2-Makrophagen. Dargestellt ist die NO_2^- -Konzentration als Maß für die tatsächliche NO-Produktion. Monozyten wurden für 7 Tage mit 50 ng/mL M-CSF inkubiert (= M-CSF-Makrophagen), und anschließend wurden sie für 24, 48 oder 72 Stunden mit 15 ng/mL IL-4 und 15 ng/ml IL-10 zu M2-Makrophagen aktiviert. Pro Ansatz wurden 2×10^7 Zellen ausgesät. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen mit bis zu 5 Parallelwerten im ELISA. Der Unterschied in der NO_2^- -Konzentration zwischen 48 und 72-Stunden Stimulation ist für M1-Makrophagen mit $P < 0.001$ signifikant.

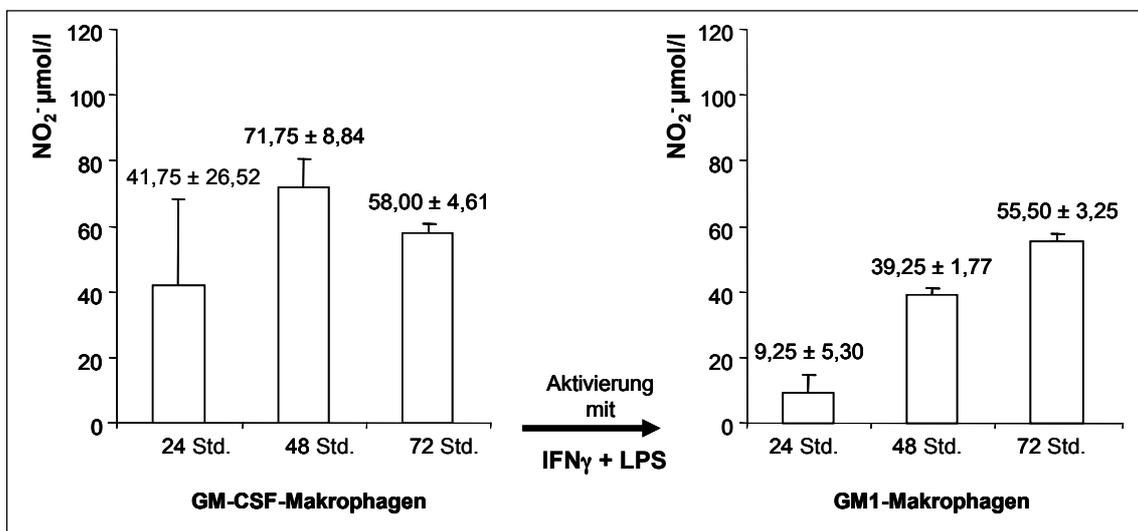


Abb. 4.29: Die NO-Produktion von GM-CSF- und GM1-Makrophagen. Monozyten wurden für 7 Tage mit 50 ng/mL GM-CSF (=GM-CSF-Makrophagen) inkubiert, und anschließend wurden sie für 24, 48 oder 72 Stunden mit 10 ng/mL $\text{IFN}\gamma$ und 100 ng/mL LPS zu GM1-Makrophagen aktiviert. Pro Ansatz wurden 2×10^7 Zellen ausgesät. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen mit bis zu 5 Parallelwerten im ELISA. Der Unterschied in der NO_2^- -Konzentration zwischen 24 und 48 Stunden sowie zwischen 48 und 72-Stunden Stimulation ist für GM1-Makrophagen mit jeweils $P < 0.001$ signifikant.

GM-CSF-Makrophagen produzierten bereits ohne vorherige Aktivierung große Mengen an NO (Abb. 4.29), während M-CSF- Makrophagen erst aktiviert werden mussten (Abb. 4.26).

In einer weiteren Versuchsserie wurde die Fähigkeit von Makrophagen untersucht, IL-12 zu sezernieren. Die IL-12-Sekretion wird u.a. durch LPS ausgelöst. In dieser Arbeit wurden dazu 100 ng/mL LPS eingesetzt. Im Gegensatz zu M-CSF scheint GM-CSF bereits zu einer proinflammatorischen Aktivierung zu führen. Die bei M-CSF-Makrophagen zu beobachtende Sekretion von IL-12 war um den Faktor 2,8 geringer als bei GM-CSF-Makrophagen (Abb. 4.30).

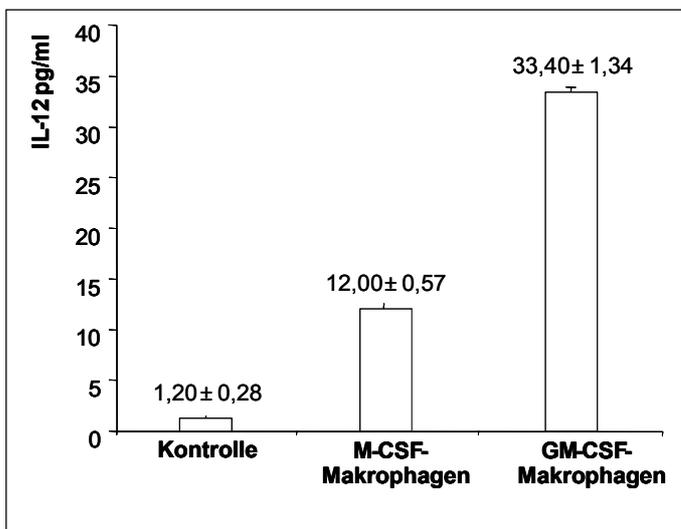


Abb. 4.30: Bildung von IL-12 durch M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen. GM-CSF-Makrophagen sezernieren bereits ohne Aktivierung große Mengen an IL-12. Monozyten wurden für 7 Tage mit 50 ng/mL M-CSF (=M-CSF-Makrophagen) oder 50 ng/mL GM-CSF (=GM-CSF-Makrophagen) inkubiert. Für die letzten 24 Stunden der Kultur wurden jeweils 100 ng/mL LPS hinzugegeben. Kontrolle: Monozyten, die ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. Es wurden

$1,5 \times 10^7$ Zellen pro Vertiefung eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen mit bis zu 3 Parallelwerten im ELISA. Der Unterschied in der IL-12-Konzentration zwischen M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen ist mit $P < 0.001$ signifikant.

Die klassisch aktivierten GM1- und M1-Makrophagen sezernierten IL-12, nicht aber die alternativ aktivierten M2-Makrophagen (Abb. 4.31). Die beiden Zytokine IL-4 und IL-10 verhindern sehr wahrscheinlich die Produktion von IL-12 (Essner R et al., 1989; de Waal Malefyt R et al., 1991; Isler P et al., 1999; Sica A et al., 2000).

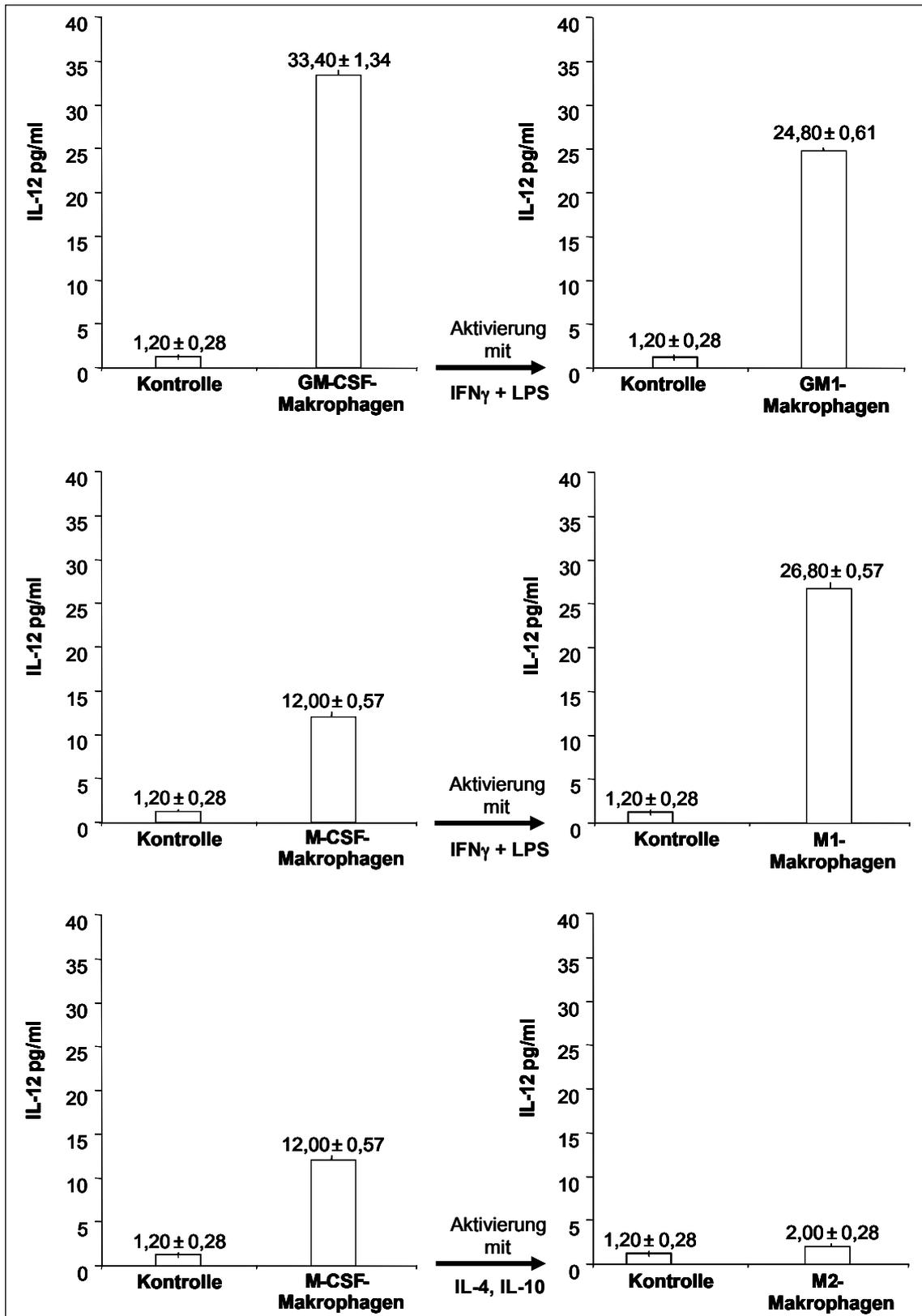


Abb. 4.31: Bildung von IL-12 durch M1-, GM1- und M2-Makrophagen. Nur die klassisch aktivierten M1- und GM1-Makrophagen bilden IL-12. Monozyten wurden für 7 Tage mit 50 ng/mL M-CSF (=M-CSF-Makrophagen) oder 50 ng/mL GM-CSF (=GM-CSF-Makrophagen) inkubiert. Anschließend wurden sie mit 10 ng/mL IFN γ und 100 ng/mL LPS zu M1- bzw. GM1-Makro-

phagen aktiviert. Durch Zugabe von 15 ng/mL IL-4 und 15 ng/mL IL-10 wurden M2-Makrophagen aktiviert. Für die letzten 24 Stunden der Kultur wurden jeweils 100 ng/mL LPS zu den Kulturen gegeben. Kontrolle: Monozyten, die ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. Es wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen pro Vertiefung eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen mit bis zu 3 Parallelwerten im ELISA. Die Daten wurden 24 Stunden nach Zugabe von LPS erhoben. Der Unterschied in der IL-12-Konzentration zwischen GM-CSF- und GM1-Makrophagen, zwischen M-CSF- und M1-Makrophagen und zwischen M-CSF- und M2-Makrophagen ist mit jeweils $P < 0.001$ signifikant.

Zusammenfassung der Kapitel 4.2 bis 4.7.

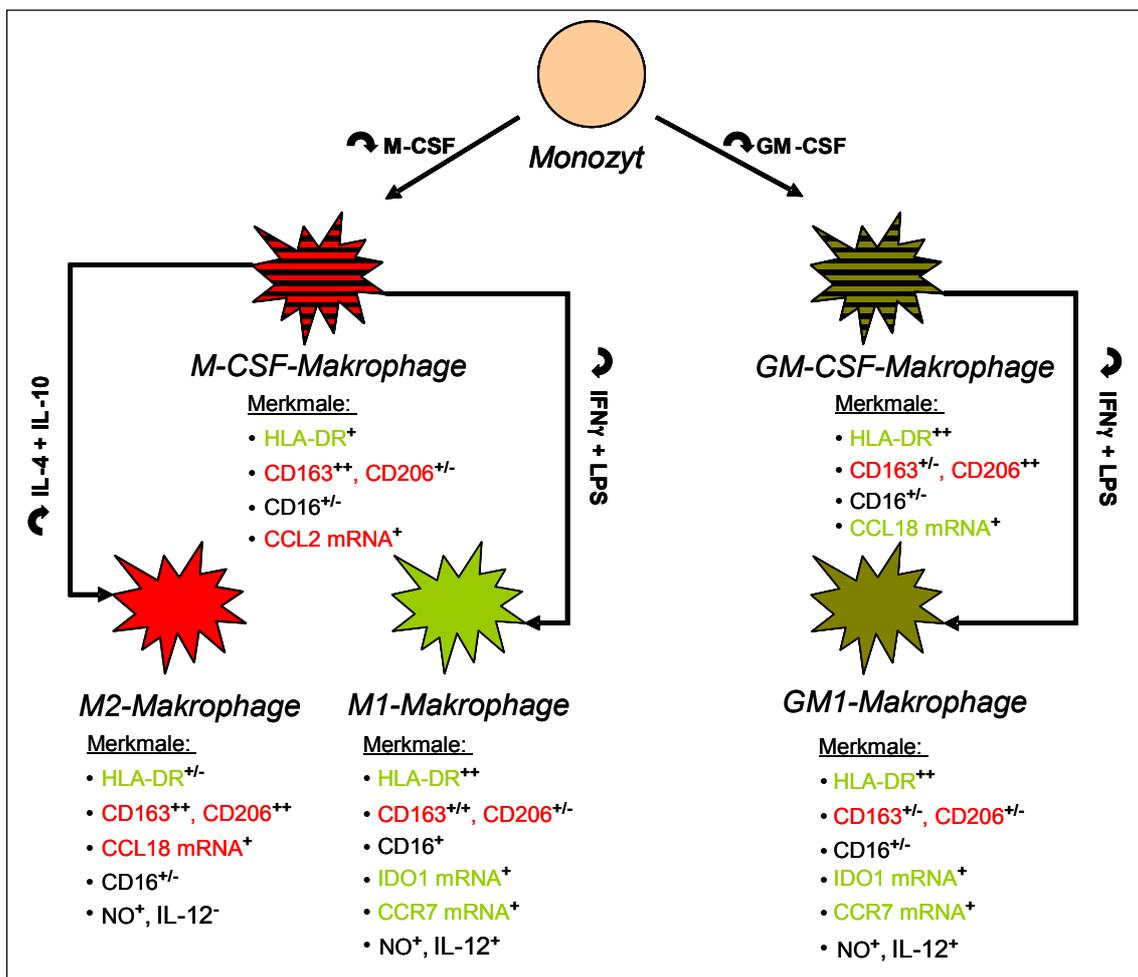


Abb. 4.32: Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 4.3 bis 4.7. Das wesentliche Ergebnis ist, dass M-CSF die Makrophagen-Differenzierung zu M2-ähnlichen M-CSF-Makrophagen und GM-CSF zu M1-ähnlichen GM1-Makrophagen dirigiert. Die Stärke der Expression von HLA-DR, CD163, CD206 und CD16 ist wie folgt quantifiziert: (+) = >50 % positive Zellen; (++) = >70 % positive Zellen und (+/-) = <50 % positive Zellen. Grün: M1-Marker (HLA-DR, IDO, CCR7, CCL18); Rot: M2-Marker (CD163, CD206, CCL2, CCL18). Das Plus hinter der entsprechenden mRNA bedeutet eine Expression, die mehr als doppelt so stark ist.

4.8 Einfluss von Laktat auf die Differenzierung von Makrophagen

Wie gezeigt, beeinflussen M-CSF und GM-CSF die Differenzierung von Monozyten. M-CSF- bzw. GM-CSF-Makrophagen unterscheiden sich im Phänotyp und in ihrer Funktion. Wie in der Einleitung erwähnt, deuten neuere Ergebnisse darauf hin, dass auch Laktat die Eigenschaften von Monozyten / Makrophagen verändern kann. Um dies zu überprüfen, wurden Monozyten für sieben Tage mit 15 mmol/L Laktat bei pH 7,2-7,4 inkubiert und die Zellen auf die Präsenz der Oberflächenmarker CD68, HLA-DR, CD163, CD206 und CD16 untersucht.

Tatsächlich hemmte Laktat die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen. So war der Anteil CD68-positiver Zellen mit 21 % (Abb. 4.33; Score 1) auffallend gering. Außerdem war bei zahlreichen Makrophagen eine Bläschenbildung und ein kondensierter Zellkern zu erkennen gewesen – zwei morphologische Korrelate für Apoptose.

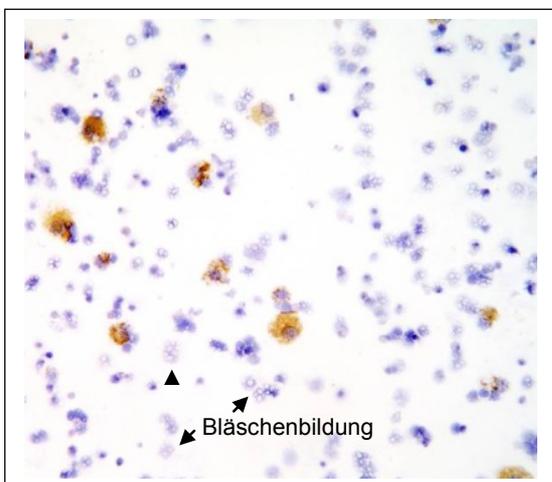


Abb. 4.33: Immunhistochemischer Nachweis CD68-positiver Makrophagen in Gegenwart von Laktat. Die Monozytenkulturen wurden für 7 Tage mit 15 mmol/L Laktat inkubiert. Der schwache Nachweis des Makrophagenmarkers CD68 deutet darauf hin, dass Laktat die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen hemmt. Zudem sind Bläschenbildung und die Kondensation des Zellkerns auffällig; zwei typische Merkmale der Apoptose.

Außer der geringen Expression von CD68 wurde nur noch eine schwach-positive Färbung für den M1-Markern HLA-DR beobachtet (Abb. 4.34 A-D).

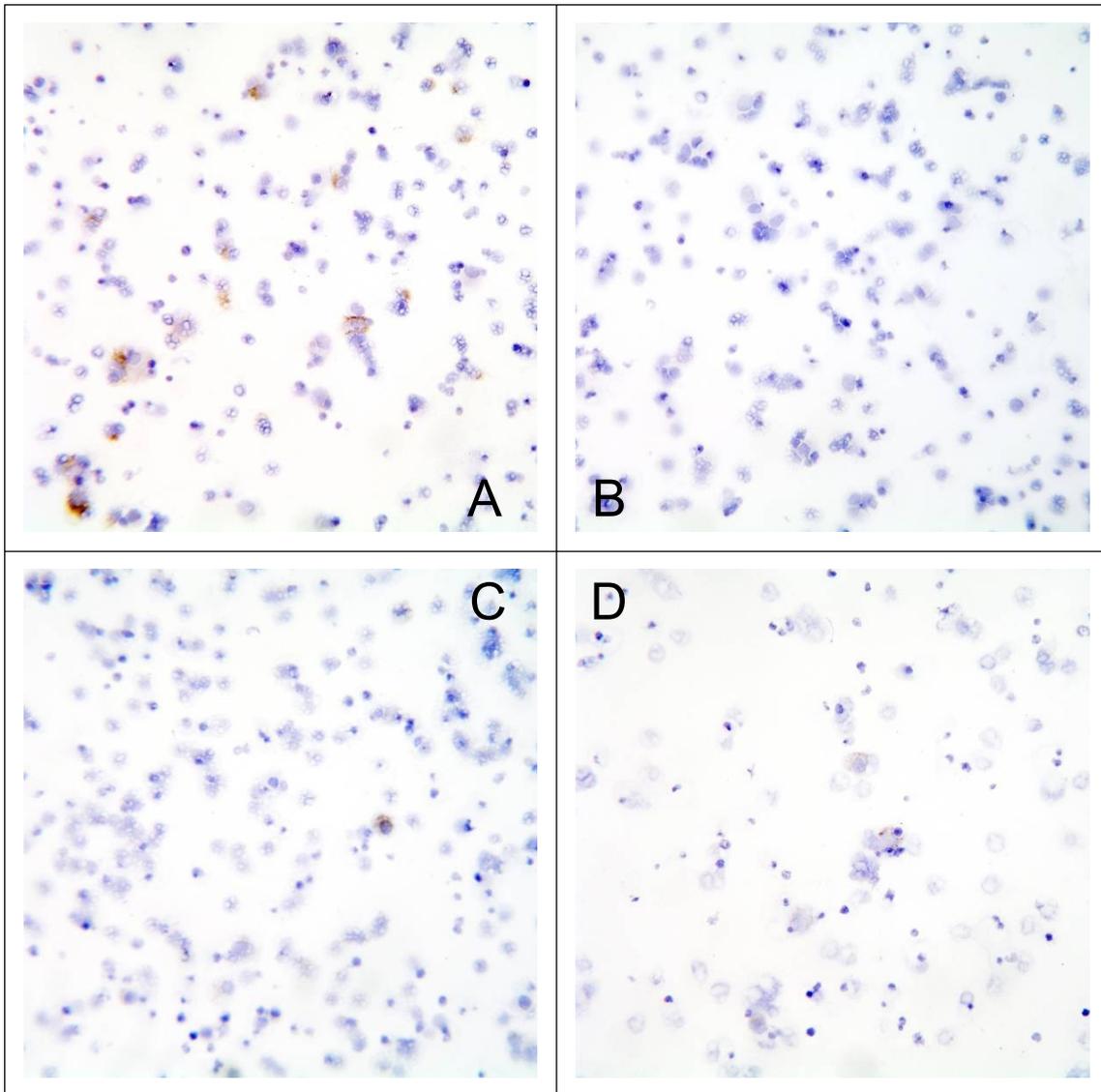


Abb. 4.34: Immunhistochemischer Nachweis von HLA-DR, CD16, CD163 und CD206 auf Makrophagen in Gegenwart von Laktat. (A) HLA-DR; (B) CD16; (C) CD163; (D) CD206. Vereinzelt waren HLA-DR-positive Zellen nachweisbar. Monozyten differenzieren sich nicht, oder nur wenig, in Gegenwart von Laktat (15 mmol/L).

Um den Effekt von Laktat auf bereits ausgebildete Makrophagen zu überprüfen, wurden M-CSF-, GM-CSF-, GM1-, M1- und M2-Makrophagen mit 15 mmol/L Laktat für 24 Stunden inkubiert und anschließend immunhistochemisch untersucht. Unterschiede waren dabei lediglich bei den M2-Makrophagen zu finden. Diese zeigten einen deutlich niedrigeren Anteil positiv gefärbter Zellen

für die M2-Marker CD163 und CD206 im Vergleich zu M2-Makrophagen, die bei Abwesenheit von Laktat aktiviert wurden:

Aktivierung zu M2-Makrophagen:

	in Gegenwart von Laktat	in Abwesenheit von Laktat
CD163	54 % positive Zellen; Score 2 (Abb. 4.35 A)	100 % positive Zellen; Score 3 (Abb. 4.18 E)
CD206	38 % positive Zellen; Score 2 (Abb. 4.35 B)	94 % positive Zellen; Score 3 (Abb. 4.18 F)

Entweder behindert Laktat die Expression der beiden M2-Marker oder die induzierten M2-Makrophagen sind instabil und verändern sich, nachdem IL-4 und IL-10 aus der Kultur entfernt wurden. Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Porcheray, F et al, 2005; Stout, RD et al., 2005).

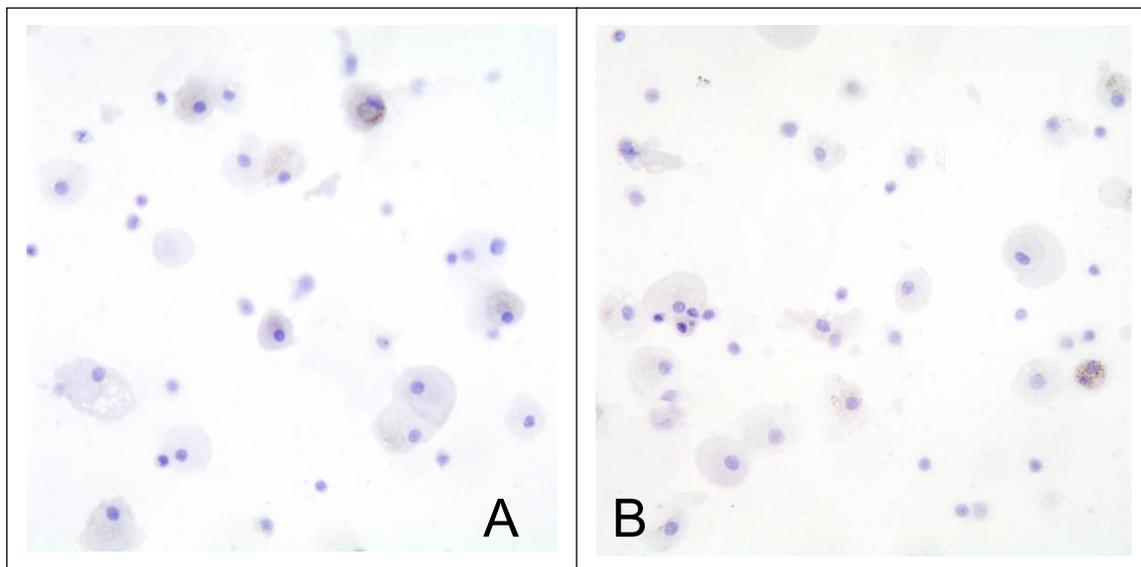


Abb. 4.35: Immunhistochemischer Nachweis von CD163 und CD206 auf M2-Makrophagen in Gegenwart von Laktat. (A) CD163 (54 % positive Zellen; Score 2); (B) CD206 (38 % positive Zellen; Score 2). Ausdifferenzierte M2-Makrophagen wurden für 24 Stunden mit 15 mmol/L Laktat inkubiert. Nach Inkubation mit Laktat nahm der Anteil der für beide Marker positiven Zellen deutlich ab (s. auch Text).

Laktat fördert nicht die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und beeinflusst zudem den M2-Phänotyp. Als nächstes wurde überprüft, ob Laktat die proinflammatorischen Eigenschaften von M1-Makrophagen beeinflusst. Der hemmende Effekt von Laktat auf die Ausschüttung von IL-12 war besonders deutlich bei proinflammatorischen M1-Makrophagen zu beobachten (Abb. 4.36). Die Ausschüttung von IL-12 war in Gegenwart von Laktat um den Faktor 4 geringer. Auch bei GM- und GM1-Makrophagen war ein hemmender Effekt von Laktat auf die Ausschüttung von IL-12 zu beobachten gewesen (Abb. 4.36).

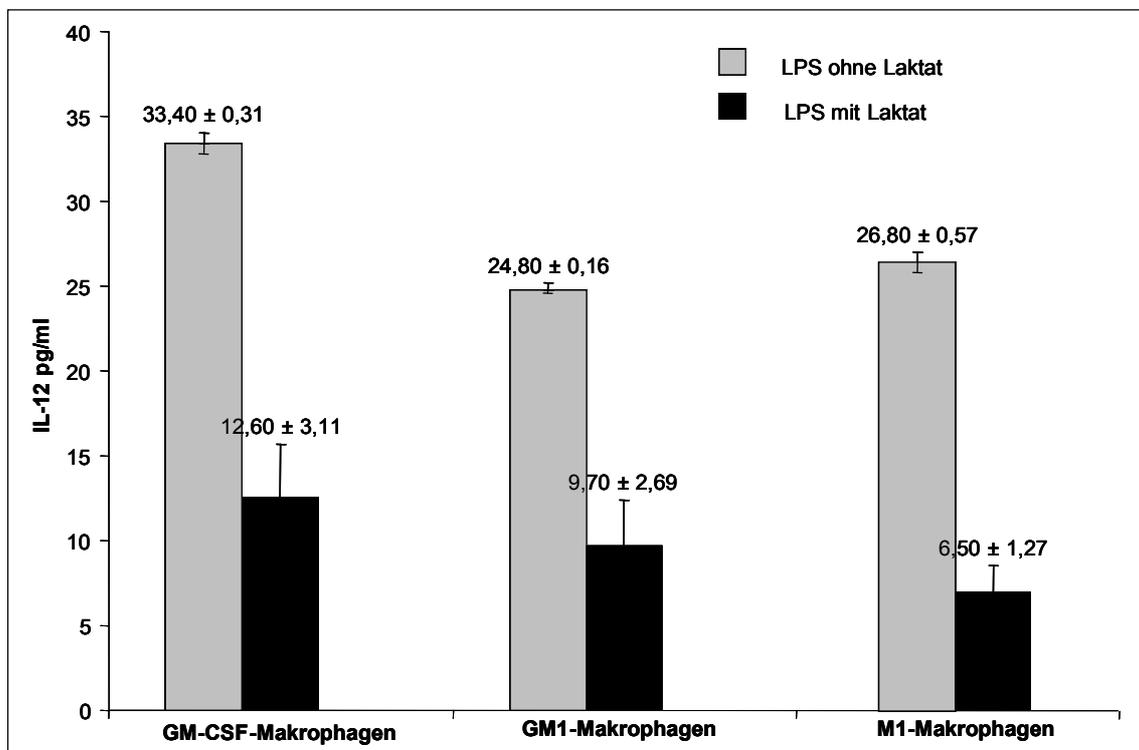


Abb. 4.36: Bildung von IL-12 durch (aktivierte) M1- und GM1-Makrophagen sowie durch (nicht-aktivierte) GM-CSF-Makrophagen bei An- und Abwesenheit von Laktat. Laktat hemmt effektiv die Produktion von IL-12 durch sowohl aktivierte als auch nicht-aktivierte Makrophagen. Die Induktion von GM-CSF- bzw. M-CSF-Makrophagen erfolgte durch Inkubation von Monozyten mit 50 ng/mL GM-CSF bzw. M-CSF für sieben Tage. Diese wurden mit 10 ng/mL IFN γ und 100 ng/mL LPS „klassisch“ zu GM1- bzw. M1-Makrophagen aktiviert. Für die gezeigten Ergebnisse wurden die Wachstums- bzw. Aktivierungsfaktoren durch Mediumwechsel entfernt und die Zellen für weitere 24 Stunden entweder mit oder ohne 100 ng/mL LPS inkubiert. Zusätzlich wurden 15 mmol/L Laktat („LPS mit Laktat“) hinzugegeben bzw. weggelassen („LPS ohne Laktat“). Es wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen pro Vertiefung eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen mit bis zu 3 Parallelwerten im ELISA. Der Unterschied in der IL-12-Konzentration zwischen der Stimulierung mit und ohne Laktat ist für die drei gezeigten Makrophagenpopulationen mit jeweils $P < 0.001$ signifikant.

5 Beantwortung der Fragen

1 Welchen Phänotyp weisen die durch M-CSF und GM-CSF induzierten nicht-aktivierten Makrophagen (M-CSF- bzw. GM-CSF-Makrophagen) auf?

M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen unterscheiden sich im Wesentlichen in der Expression von CD163 und CD206 (s. auch Abb. 4.32). **M-CSF-Makrophagen** exprimieren sehr stark CD163 (93 % der Zellen sind positiv) und nur gering CD206 (47 % positive Zellen). **GM-CSF-Makrophagen** hingegen exprimieren sehr stark CD206 (sämtliche Zellen sind für diesen Marker positiv) und nur 10 % der Zellen sind CD163-positiv. In beiden Makrophagenpopulationen exprimiert zudem ein Großteil der Zellen HLA-DR (zw. 60 und 87 %). Für M-CSF-Makrophagen ist zudem die Expression von CD163 und dem Chemokin CCL2 charakteristisch, während GM-CSF-Makrophagen positiv für CD206, HLA-DR und CCL18 sind. M-CSF-Makrophagen weisen eine spindelförmige Zellform auf, während GM-CSF-Makrophagen hauptsächlich eine spiegeleierförmige Zellform aufweisen.

2 Ähneln Phänotyp und Eigenschaften von M-CSF-Makrophagen bereits mehr M2-Makrophagen als M1-Makrophagen?

Nach Martinez und Verreck verfügen M-CSF-Makrophagen bereits mehr Eigenschaften von M2- als von M1-Makrophagen (Martinez, FO et al., 2006, Verreck, FA et al., 2006). Durch den Vergleich der drei Makrophagen-Populationen (s. hierzu auch Tab. 4.2 und Abb. 4.32) hinsichtlich der Expression von HLA-DR, CD16, CD163 und CD206 ist diese Aussage nicht eindeutig zu bestätigen. Hierbei ist zu bedenken, dass Martinez die Aktivität zahlreicher Gene gemessen hat und in dieser Arbeit die Expression weniger ausgewählter Gene betrachtet wurde. Am stärksten ähneln sich M-CSF- und M2-Makrophagen hinsichtlich der Expression von CD16 (ca. 10 bis 26 % der Zellen sind positiv) und CD163 (bis zu 100 % positive Zellen). Andererseits ähneln sich auch M-CSF- und M1-Makrophagen sehr stark hinsichtlich der Expression von CD206 (bis zu 47 % positive Zellen). Auch der Vergleich der Expression von Chemokinen zeigt keine

eindeutige Übereinstimmung zwischen M-CSF- und M2-Makrophagen. M1-Makrophagen sezernieren große Mengen an NO (bis 73 $\mu\text{mol/mL}$; Abb. 4.27), unerwartet aber auch M2-Makrophagen (bis 82 $\mu\text{mol/mL}$; Abb. 4.29). Im Gegensatz dazu sezernieren M2-Makrophagen kaum IL-12 (bis zu 2 pg/mL ; Abb. 4.32), M-CSF-Makrophagen sezernieren wenig IL-12 (12 pg/mL ; Abb. 4.32) und M1-Makrophagen viel IL-12 (bis 27 pg/mL ; Abb. 4.32). Dass M-CSF-Makrophagen mehr Eigenschaften von M2-Makrophagen aufweisen, lässt sich mit den Daten dieser Arbeit somit nicht eindeutig bestätigen. Eine Tendenz zu M2-Makrophagen zeigt aber v.a. die funktionelle Analyse.

3 Ähneln Phänotyp und Eigenschaften von GM-CSF-Makrophagen bereits mehr M1-Makrophagen als M2-Makrophagen? Welchen Phänotyp und welche Funktion weisen GM1-Makrophagen auf?

Auch diese Frage ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig zu beantworten. Doch insbesondere die Expression der M1-Marker HLA-DR, CCR7 und IDO1 sowie die Menge an sezerniertem IL-12 deuten bereits auf mehr Eigenschaften von M1-Makrophagen als von M2-Makrophagen hin. In Gegenwart proinflammatorischer Signale ($\text{IFN}\gamma$, LPS) werden GM-CSF-Makrophagen zu GM1-Makrophagen aktiviert. Im Vergleich zu M1-Makrophagen sollen GM1-Makrophagen eine verminderte Fähigkeit zur Phagozytose aufweisen (Verreck FA et al., 2006; Leidi M et al., 2009). Sie gehören aber nicht zu den M2-Makrophagen, da ihnen die für M2-Makrophagen charakteristischen Oberflächenproteine wie Scavenger (CD163)- und Mannose (CD206)-Rezeptoren fehlen. Hinsichtlich der Expression der M1-Marker CCR7 und IDO weisen GM1-Makrophagen große Ähnlichkeit zu M1-Makrophagen auf. Beide Makrophagenpopulationen sezernieren zudem vergleichbare Mengen an NO und IL-12. GM1-Makrophagen weisen somit mehr Eigenschaften von M1- als von M2-Makrophagen auf.

4 Laktat ist in Tumoren häufig erhöht, und Tumor-assoziierte Makrophagen weisen Eigenschaften von M2-Makrophagen auf.

Weist Laktat Eigenschaften eines Differenzierungsfaktors auf? Induziert Laktat M2-Makrophagen?

Lange Zeit wurde Laktat, das Salz der Milchsäure, als Stoffwechselendprodukt angesehen. Charakteristisch für das extrazelluläre Tumormilieu sind hohe Laktatkonzentrationen, die zwischen 6 bis 15 $\mu\text{mol/L}$ pro Gramm Tumorgewebe liegen, teilweise sogar bis zu 40 $\mu\text{mol/L}$. Bei Krebspatienten korrelieren hohe intratumorale Laktatspiegel in aller Regel mit einer schlechten Prognose. Bei Malignomen mit hohen Laktatspiegel treten häufiger Metastasen auf und die Tumorprogression läuft rascher ab. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Laktat die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen hemmt; dies belegt der geringe Anteil CD68-positiver Zellen (21 %; Score 1; Abb. 4.33) in Gegenwart von Laktat; zudem beeinflusst Laktat den M2-Phänotyp. Der hemmende Effekt von Laktat auf die Ausschüttung von IL-12 ist besonders deutlich bei M1-Makrophagen zu beobachten. Aber auch bei GM- und GM1-Makrophagen war ein hemmender Effekt von Laktat auf die Ausschüttung von IL-12 zu beobachten gewesen (Abb. 4.36).

6 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, das allgemein anerkannte Schema der auf zwei Stimuli beruhenden Makrophagenaktivierung (Abb. 1.1) zu überprüfen. Neuere Erkenntnisse zur Makrophagendifferenzierung lassen vermuten, dass M-CSF-Makrophagen bereits über Eigenschaften von M2-Makrophagen und GM-CSF-Makrophagen bereits über Eigenschaften von M1-Makrophagen verfügen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Aktivierung von GM-CSF-Makrophagen zu GM1-Makrophagen und die Aktivierung von M-CSF-Makrophagen zu M1-Makrophagen bzw. M2-Makrophagen untersucht. Zudem wurden die verschiedenen Makrophagen-Subtypen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, zelltoxisches NO und IL-12 zu sezernieren. Auch das Potential von Laktat als Differenzierungsfaktor für Monozyten wurde untersucht. Mit den Versuchen hierzu sollte die Frage beantwortet werden, ob das im Tumormilieu häufig erhöht vorzufindende Laktat selbst ein Differenzierungssignal darstellt und bevorzugt den protumoralen M2-Phänotyp induziert.

6.1 Differenzierungspotential der Wachstumsfaktoren M-CSF und GM-CSF

Makrophagen sind, nach der epithelialen Barriere, die erste «Verteidigungslinie» zur Abwehr eindringender Erreger. Diese werden entweder phagozytiert und so unschädlich gemacht oder mit zelltoxischen Substanzen «bombardiert». Um zelltoxische Eigenschaften zu erhalten, müssen so genannte naive oder ruhende Makrophagen aktiviert werden (Abb. 1.1).

Diese «naiven / ruhenden» Makrophagen werden in der vorliegenden Arbeit als M-CSF-Makrophagen oder GM-CSF-Makrophagen bezeichnet; also nach den Wachstumsfaktoren, mit deren Hilfe sie aus Monozyten differenziert wurden. M-CSF-Makrophagen weisen dabei, wie hier gezeigt, bereits einige Eigen-

schaften aktivierter M2-Makrophagen auf, doch können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Marker nur als ein Hinweis gewertet werden. Zum anderen weisen GM-CSF-Makrophagen bereits Eigenschaften von M1-Makrophagen auf. So exprimieren M-CSF-Makrophagen CD163 und CD206, was typisch ist für aktivierte M2-Makrophagen. Sie zeigen zudem eine verringerte NO- bzw. IL-12-Sekretion, die etwa auf dem Niveau von M2-Makrophagen liegt. Auch Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene bestätigen, dass M2-Makrophagen in Verwandtschaft zu M-CSF-Makrophagen stehen, da Änderungen nur im typischen M2-Zielgen CCL18 zu sehen waren. Die tabellarische Zusammenfassung der Expressionsanalysen ist in Tab. 10.1. auf Seite 106 zu finden.

GM-CSF-Makrophagen exprimieren hingegen HLA-DR und CD163; dieser Phänotyp ähnelt dem aktivierter M1-Makrophagen. Auch sezernieren GM-CSF-Makrophagen bereits großen Mengen der proinflammatorischen Moleküle NO und IL-12. Der quantitative Vergleich zwischen GM-CSF- und M1-Makrophagen hinsichtlich der Menge an NO und IL-12 lässt eine vergleichbare starke Aktivität vermuten. Eine Übersicht hierzu ist in Tab. 10.2 auf Seite 107 zu finden. Die Aktivierung der GM-CSF-Makrophagen durch die klassischen M1-Aktivatoren IFN γ und LPS führten zu keiner wesentlichen Stimulierung hinsichtlich der sezernierten Mengen an NO und IL-12. Die beiden Wachstumsfaktoren scheinen damit sowohl «priming»- als auch «triggering»-Eigenschaften aufzuweisen. Dies lassen auch andere *in vitro* Arbeiten vermuten (Verreck FA et al., 2006).

Aktuelle Daten bestätigen die biologisch relevante Bedeutung der beiden Wachstumsfaktoren M-CSF und GM-CSF. So wird M-CSF und dessen Rezeptor verstärkt exprimiert bei Tumorerkrankungen (z.B. Eierstock-, Endometrium- und Brustkrebs) exprimiert (Pollard JW, 2004; Roca H et al., 2009; Solinas G et al., 2009). Die gemessenen M-CSF-Spiegel korrelieren dabei mit dem histologischen Grading. Hohe M-CSF-Spiegel werden in aller Regel bei histologisch undifferen-

zierten Tumoren beobachtet (Richardsen E et al., 2009). Die Daten der vorliegenden *in vitro* Arbeit belegen, dass sich aufgrund der für das Tumormilieu typischen Zytokine M-CSF sowie IL-10 und IL-4 Monozyten in alternativ-aktivierte M2-Makrophagen differenzieren. In der Literatur werden eben diese M2-Makrophagen auch als tumorassoziierte Makrophagen (TAM) bezeichnet, und sie sind u.a. durch die Hochregulierung von CD163, CD206 sowie durch eine verminderte Fähigkeit, Tumorzellen zu lysieren, charakterisiert (Lewis CE, Pollard JW, 2006; Solinas G et al., 2009). Zudem zeigen Knock-out Mäuse mit einem genetischen Defekt im M-CSF-Gen ein vermindertes Monozyteninfiltrat in Milz und Leber, aber auch im Tumor. Auch zeigen diese Tiere ein verzögertes Tumorfortschreiten. Wichtig dabei ist, dass nicht das Tumorwachstum an sich, sondern die Entwicklung hin zu einem malignen Phänotyp verzögert ist (Lin EY et al, 2001; Pollard JW, 2004).

Gerade durch den Mangel an M1-Stimuli wie GM-CSF oder IFN- γ im Tumormilieu findet keine Differenzierung zu inflammatorischen, zelltoxischen M1-Makrophagen statt. Bei der Transplantatabstoßung hingegen weisen die infiltrierenden Makrophagen ein zelltotoxisches Potential auf. Im Transplantat dominiert der Wachstumsfaktor GM-CSF das Zytokinmilieu (Kajiwara I et al., 1996). Auch in den seltenen Fällen, bei denen die tumorinfiltrierenden Makrophagen aktiv an der Tumorregression beteiligt sind, ist mit einem GM-CSF-reichen Mikromilieu zu rechnen. Beobachtungen bei onkologischen Patienten, denen GM-CSF verabreicht wurde, lassen die Vermutung zu, dass vor allem GM-CSF das immunstimulierende und tumorregredierende Potential von Makrophagen entfaltet (Dranoff G, 2002). Tatsächlich wurde in klinischen Studien oft ein Sistieren des Tumorwachstums festgestellt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern eine mögliche Erklärung für den Wirkmechanismus von GM-CSF. Denn mit GM-CSF differenzierte Monozyten entwickeln ein dem M1-Typ vergleichbares proinflammatorisches und zytotoxisches Potential; auch im

Phänotyp gibt es Übereinstimmungen. GM-CSF ist auch an der Reifung dendritischer Zellen beteiligt.

In der Literatur werden T-Lymphozyten als die Hauptquelle für GM-CSF angesehen. Dies macht biologisch Sinn, da gerade unter infektiösen Bedingungen, wo inflammatorische Makrophagen zur Abwehr notwendig sind, T-Lymphozyten häufig anzutreffen sind (Moore KW et al., 1993; Sica A et al., 2000; Guiducci C et al., 2005; Sica A et al., 2006; Li Z et al., 2009; Solinas G et al., 2009). GM-CSF ist also im Gegensatz zu M-CSF, das autoregulatorisch von Monozyten sezerniert wird, nicht permanent im Körper nachzuweisen (Lee MT et al., 1990; Rutherford MS et al., 1993).

6.2 Laktat-abhängige Effekte auf Monozyten- / Makrophagenkulturen

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass Laktat über kein Differenzierungspotential verfügt. Laktat fördert nicht die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Laktat einen antiinflammatorischen Effekt auf M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen ausübt; insbesondere aber auf die proinflammatorischen M1- und GM1-Makrophagen. So war die NO- und IL-12-Produktion bei den mit Laktat inkubierten Makrophagentypen um den Faktor 2 (bei M-CSF-Makrophagen) bis 3 (für die GM-CSF-, GM1- und M1-Makrophagen) geringer als bei Makrophagen, die ohne Laktat kultiviert wurden.

Somit kann Laktat unter bestimmten Bedingungen die Funktion von Makrophagen beeinflussen. Andere Arbeiten belegen ähnliche Ergebnisse für Dendritische Zellen (DC), die zwischen angeborenem und adaptivem

Immunsystem vermitteln und effektive zelluläre Immunantworten (T-Lymphozyten) induzieren. Differenzieren sich Vorläufer-DC in einer Umgebung, die reich an Laktat ist, so führt dies zur Entwicklung eines speziellen Phänotyps, der als Tumor-assoziierte DC (TADC) bezeichnet wird und der funktionell anerg zu sein scheint (Balkwill F, Mantovani A, 2001; Gottfried E et al., 2006). Laktat beeinflusst auch die Funktion zytotoxischer T-Lymphozyten (CTLs). Reichert sich Laktat im Zytoplasma dieser Zellen an, so führt dies zu einer Herunterregulierung ihres Metabolismus (Fischer K et al., 2007).

Stickstoffmonoxid ist ein wichtiges Molekül in der angeborenen Immunabwehr z.B. in der Abwehr parasitischer Würmer, die von Makrophagen nicht phagozytiert werden. Die Wirkungsweise von NO ist unspezifisch und extrem zelltoxisch – in manchen Experimenten auch für die Makrophagen selbst (MacMicking J et al., 1997). Zudem ist NO ein wichtiges Effektormolekül bei der Transplantatabstoßung (Bingaman AW et al., 2000; Matuschek A et al., 2009). Diese wenigen Beispiele verdeutlichen, dass die Aktivierung von Makrophagen und damit die Produktion und Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) unter sehr kontrollierten Bedingungen ablaufen muss, da NO unspezifisch zelltoxisch wirkt und nicht zwischen Krankheitserregern und körpereigenen Zellen unterscheidet. Zudem unterliegen aktivierte Makrophagen keiner Kontrolle.

6.3 Dynamik der Immunantwort von Monozyten-/ Makrophagen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass differenzierte Makrophagen nicht enddifferenziert sind. So zeigte sich bei den proinflammatorischen GM1- und M1-Makrophagen eine vermehrte Expression der typischen M2-Marker CD163 und CD206. Beides sind Marker, die für die Auflösung einer Entzündung von Bedeutung sind (siehe Einleitung). Gleichzeitig nahm die Ausschüttung von IL-12 leicht ab. Andererseits nahm bei M2-Makrophagen die NO-Sekretion nach 72 Stunden von 18,0 µmol/L auf 90,50 µmol/L deutlich zu.

Zeitgleich dazu stieg auch die Expression des M1-Markers HLA-DR von einem anfänglichen Score 1 auf Score 2 an (vg. auch Porcheray, F et al., 2005). Diese Beispiele aus der eigenen Arbeit deuten darauf hin, dass die autoregulatorische Fähigkeit von Makrophagen selbst bei gleichbleibenden Stimuli eine Änderung der eingeschlagenen Immunantwort auszulösen, als Ausdruck einer hohen Dynamik und «Sensibilität» dieser Zellen zu werten ist. Genau diese Eigenschaften von Monozyten / Makrophagen erlaubt es dem Organismus, auf die zahlreichen äußeren Einflüsse flexibel reagieren zu können. Zudem bietet diese Fähigkeit auch die Möglichkeit, eine «fehlgeleitete» Immunantwort zu «korrigieren».

7 Ausblick

Die Bedeutung von Makrophagen für die Entwicklung und das Wachstum von Tumoren ist sehr komplex. Tumorassoziierte Makrophagen, die im Stroma zahlreicher Tumoren zu finden sind, gehören überwiegend zur Population der alternativ aktivierten M2-Makrophagen. Als Abwehrzellen sollen Makrophagen eigentlich dazu beitragen, Tumorzellen abzutöten bzw. deren Wachstum zu hemmen. Stattdessen fördern TAM Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung. Bei einigen Tumoren, wie z. B. beim Brustkrebs, können die eingewanderten Makrophagen bis zu 50 % der Tumormasse ausmachen. Das Vorhandensein von TAM kann zudem mit einer ungünstigen Prognose einhergehen.

Wie Tumoren es aber möglich ist, Monozyten / Makrophagen in ihrer Umgebung umzuprogrammieren, ist weitgehend unverstanden. In den letzten Jahren ist immer deutlicher geworden, über welches biologische Potential Laktat verfügt. So hemmt Laktat z.B. verschiedenste Immunzellen wie zytotoxische T-Lymphozyten, die den Tumor dann nicht mehr attackieren können (Fischer K, et al., 2007). Auch induziert Laktat die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren durch Makrophagen, was wiederum die Zellteilungsaktivität von Tumorzellen fördert (Shime H et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden hemmende Effekte von Laktat auf die Ausschüttung von NO und IL-12 bei unterschiedlichen Makrophagenpopulationen gefunden. Die Versuche hierzu sollten ausgeweitet werden und möglicherweise, da sie bei unphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt wurden, bei Sauerstoffkonzentrationen wiederholt werden, die für den Tumor charakteristisch sind.

8 Zusammenfassung

Unter dem Einfluss von M-CSF und GM-CSF entwickeln sich CD14-positive periphere humane Blutmonozyten zu CD68-positiven M-CSF- bzw. GM-CSF-Makrophagen. M-CSF-Makrophagen lassen sich mit $\text{INF}\gamma$ und LPS zu M1-Makrophagen, oder mit IL-4 und IL-10 zu M2-Makrophagen aktivieren. Durch GM-CSF werden aus Monozyten GM-CSF-Makrophagen induziert. Im Gegensatz zu M1-Makrophagen sind GM1-Makrophagen bisher noch wenig untersucht. Mit $\text{INF}\gamma$ und LPS werden GM-CSF-Makrophagen zu GM1-Makrophagen aktiviert. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, wie groß die Übereinstimmung zwischen M-CSF- und M2-Makrophagen sowie zwischen GM-CSF- und M1-Makrophagen ist. Im Gegensatz zu M1-Makrophagen sind GM1-Makrophagen bisher noch wenig untersucht.

M-CSF-Monozyten weisen eine spindelförmige Zellform mit langgestrecktem Zellkörper auf, während GM-CSF-Monozyten eine runde, an «Spiegeleier» erinnernde Zellform aufweisen. Werden M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen mit $\text{INF}\gamma$ und LPS aktiviert, so zeigen M1- als auch GM1-Makrophagen eine spindelförmige Zellform. Während bei M1-Makrophagen der Anteil HLA-DR-positiver Zellen mit der Kulturdauer zunahm (bis zu 87 % positive Zellen), blieb der Anteil HLA-DR-positiver GM1-Makrophagen nahezu konstant (zwischen 60 und 82 % positive Zellen). GM-CSF scheint somit die HLA-DR-Expression bereits stark zu forcieren, während M1-Makrophagen hierfür eine Aktivierung benötigen.

Aus M-CSF-Makrophagen entwickeln sich unter dem Einfluss von IL-4 und IL-10 M2-Makrophagen, die folgendes Oberflächenprofil aufweisen: CD163 (100 % positive Zellen), CD206 (55 % positive Zellen) und HLA-DR (bis zu 61 % positive Zellen). Die Daten lassen vermuten, dass M-CSF die Entwicklung von Makrophagen in Richtung M2-Makrophagen lenkt. Da auch tumorassoziierte

Makrophagen (TAM) einen Phänotyp von M2-Makrophagen aufweisen, spricht dies für eine mögliche Schlüsselfunktion von IL-4 und IL-10 für die Differenzierung tumoraler M2-Makrophagen.

GM-CSF-Makrophagen weisen den Phänotyp klassisch-aktivierter M1-Makrophagen auf. Sie exprimieren HLA-DR (bis zu 87 % positive Zellen), CD206 (100 % positive Zellen), CD163 (10 % positive Zellen) und CD16 (11 % positive Zellen). Die Aktivierung mit IFN γ und LPS führt interessanterweise zu einer Änderung der CD206-Expression. Der Anteil von 100 % CD206-positiven Zellen bei GM-CSF-Makrophagen verringert sich auf 55 % positive Zellen bei GM1-Makrophagen. GM-CSF-Makrophagen entsprechen somit phänotypisch eher aktivierten M1-Makrophagen. Dies spricht dafür, dass GM-CSF die Entwicklung von Makrophagen in Richtung M1-Makrophagen lenkt.

In den letzten Jahren sind die vom Laktat induzierten biologischen Effekte immer besser verstanden. Vermutlich ist Laktat auch an der Induktion tumorassoziierter Makrophagen (TAM), die der Gruppe der M2-Makrophagen zuzuordnen sind, beteiligt. Im Gegensatz zu M-CSF- und GM-CSF stellt Laktat aber keinen Differenzierungsfaktor für Monozyten dar. Jedoch beeinflusst Laktat den Phänotyp von M2-Makrophagen und hemmt die Ausschüttung von IL-12 durch M1- und GM1-Makrophagen.

GM-CSF-Makrophagen und aktivierte GM1-Makrophagen wurden phänotypisch und funktionell als inflammatorische M1-Makrophagen charakterisiert. Zudem wurde zum erstenmal der Einfluss von Laktat auf die Differenzierung und Funktion von Makrophagen untersucht. Inwieweit die *in vitro* beobachteten biologischen Effekte von Laktat auch relevant für die *in vivo* Situation sind, bleibt weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

9 Literaturverzeichnis

- Adorini L. **Interleukin-12, a key cytokine in Th1-mediated autoimmune diseases.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 1999; 55: 1610-1625.
- Allavena P et al. **The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance.** *Immunological Reviews* 2008; 222: 155-161.
- Aron-Wisniewsky J et al. **Human adipose tissue macrophages: M1 and M2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss.** *Journal of Clinical Endocrinol Metab* 2009; 94: 4619–4623.
- Balkwill F, Mantovani A. **Inflammation and Cancer: Back to Virchow?** *Lancet* 2001; 357: 539-545.
- Becker S. **Interferons as modulators of human monocyte-macrophage differentiation. I. Interferon-gamma increases HLA-DR expression and inhibits phagocytosis of zymosan.** *Journal of Immunology* 1984; 132(3): 1249-1254.
- Becker S et al. **Colony-Stimulating Factor-Induced Monocyte Survival and Differentiation into Macrophages in Serum-Free Cultures.** *The Journal of Immunology* 1987; 139(11): 3703-3709.
- Bingaman AW, Pearson TC, Larsen CP. **The role of CD40L in T cell-dependent nitric oxide production by murine macrophages.** *Transplantation Immunology* 2000; 8: 195-202
- Bogdan C, Nathan C. **Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1993; 685: 713-739.
- Braun RD et al. **Fourier analysis of fluctuations of oxygen tension and blood flow in R3230Ac tumors and muscle in rats.** *American Journal of Physiology (Heart Circulatory Physiology)* 1999; 277: 551-568.
- Brown BN et al. **Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component.** *Biomaterials* 2009; 30, 1482-1491.
- Brugger W et al. **Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Required for Human Monocyte Survival and Acts as a Cofactor for Their Terminal Differentiation to Macrophages In Vitro.** *Journal of Leukocyte Biology* 1991; 49: 483-488.

- Bustin SA et al. **The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.** *Clinical Chemistry* 2009; 4(55): 611-622.
- Cao W et al. **CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells.** *Biochemical Journal* 2005; 385(1): 85-93.
- Chomczynski P, Sacchi N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Annals of Biochemistry* 1987; 162(1): 156-159.
- Clarkson SB, Ory PA. **CD16. Developmentally Regulated IgG Fc Receptors On Cultured Human Monocytes.** *Journal of Experimental Medicine* 1988; 167(2): 408-420.
- Crowther M et al. **Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors.** *Journal of Leukocyte Biology* 2001; 70(4): 478-490.
- DeBerardinis RJ et al. **Brick by brick: metabolism and tumor cell growth.** *Current Opinion in Genetics & Development* 2008; 18: 54-61.
- Denis M. **Human monocytes/macrophages: NO or no NO?** *Journal of Leukocyte Biology* 1994; 55: 682-684.
- Dietz AB et al. **A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreuction system chambers.** *Transfusion* 2006; 46: 2083-2089.
- Doherty DE et al. **Human Monocyte Adherence: A Primary Effect of Chemotactic Factors on the Monocyte to Stimulate Adherence to Human Endothelium.** *Journal of Immunology* 1987; 138: 1762-1771.
- Dranoff G. **GM-CSF-based cancer vaccines.** *Immunological Reviews* 2002; 188: 147-154.
- East L, Isacke CM. **The mannose receptor family.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1572(2-3): 364-386.
- Essner R et al. **IL-4 Down-Regulates IL-1 and TNF Gene Expression in Human Monocyte.** *Journal of Immunology* 1989; 142(11): 3857-3861.
- Fischer K et al. **Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells.** *Blood* 2007; 109(9): 3812-3819.
- Fleetwood A et al. **Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differences in**

Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation. *Journal of Immunology* 2007; 178: 5245-5252.

Fonseca JE et al. **Macrophage subpopulations in rheumatoid synovium: reduced CD163 expression in CD4⁺-T-Lymphocyte-rich microenvironments.** *Arthritis & Rheumatism* 2002; 46(5): 1210-1216.

Gatenby RA, Gillies RJ. **Why do cancers have high aerobic glycolysis.** *Nature Reviews* 2004; 4: 891-899.

Gilead A, Neeman M. **Dynamic Remodeling of the Vascular Bed Precedes Tumor Growth: MLS Ovarian Carcinoma Spheroids Implanted in Nude Mice.** *Neoplasia* 1999; 1(3): 226-230.

Gladden LB. **Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium.** *Journal of Physiology* 2004; 558(1): 5-30.

Goerdts S et al. **Alternative versus classical activation of macrophages.** *Pathobiology* 1999; 67: 222-226.

Goerdts S, Orfanos C. **Other Functions, Other Genes: Alternative Activation Of Antigen-Presenting Cells.** *Immunity* 1999; 10: 137-142.

Gordon S, Taylor P. **Monocyte and Macrophage Heterogeneity.** *Nature Reviews Immunology* 2005; 5: 953-964.

Gottfried E et al. **Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression.** *Blood* 2006; 107 (5): 2013-2021.

Goyer SM et al. **The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors.** *Science* 1988; 29(239): 497-500.

Guiducci C et al. **Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection.** *Cancer Research* 2005; 65(8): 3437-3446.

Gu T et al. **Central Role of IFN γ -Indoleamine 2,3-Dioxygenase Axis in Regulation of Interleukin-12-Mediated Antitumor Immunity.** *Cancer Research* 2010; 70(1): 129-138.

Hamilton JA. **Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity.** *Nature Reviews* 2008; 8: 533-543.

Hashimoto S et al. **Enhancement of Macrophage Colony-Stimulating Factor – Induced Growth and Differentiation of Human Monocytes by Interleukin-10.** *Blood* 1997; 89(1): 315-321.

- Hashimoto S et al. **IL-10 Inhibits Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor-dependent Human Monocyte Survival at the Early Stage of the Culture and Inhibits the Generation of Macrophages.** *Journal of Immunology* 2001; 167: 3619-3625.
- Haskill S et al. **Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes.** *Journal of Immunology* 1988; 140(5): 1690-1694.
- Haugen TS et al. **CD14 Expression and Binding of Lipopolysaccharide to Alveolar Macrophages and Monocytes.** *Inflammation* 1998; 22(5): 521-532.
- Haziot A et al. **The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage.** *Journal of Immunology* 1988; 141(2): 547-552.
- Holness C, Simmons D. **Molecular Cloning of CD68, a Human Macrophage Marker Related to Lysosomal Glycoproteins.** *Blood* 1993; 81(6): 1607-1613.
- Hsieh C et al. **Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an c43 T-cell-receptor transgenic system.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1992; 89: 6065-6069.
- Hsieh C et al. **Development of TH1 CD4 T Cells Through IL-12 Produced by Listeria-Induced Macrophages.** *Science* 1993; 260: 547-549.
- Isler P et al. **Interleukin-12 Production by Human Alveolar Macrophages Is Controlled by the Autocrine Production of Interleukin-10.** *American Journal of Respiratory Cellular Molecular Biology* 1999; 20: 270-278.
- Jensen TO et al. **Macrophage Markers in Serum and Tumor Have Prognostic Impact in American Joint Committee on Cancer Stage I/II Melanoma.** *Journal of Clinical Oncology* 2009; 27(20): 3330-3337.
- Kajiwara I et al. **An analysis of monocyte/macrophage subsets and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in renal allograft biopsies.** *Nephron* 1996; 73(4): 536-543.
- Kambayashi T et al. **Potential Involvement of IL-10 in Suppressing Tumor-Associated Macrophages, Colon-26-Derived Prostaglandin E, Inhibits TNF- α Release Via a Mechanism Involving IL-10.** *Journal of Immunology* 1995; 154: 3383-3390.
- Kawamura K et al. **Detection of M2 macrophages and colony-stimulating factor 1 expression in serous and mucinous ovarian epithelial tumors.** *Pathology International* 2009; 59: 300-305.

- Kimura H et al. **Fluctuations in Red Cell Flux in Tumor Microvessels Can lead to Transient Hypoxia and Reoxygenation in Tumor Parenchyma.** *Cancer Research* 1996; 56: 5522-5528.
- Kreutz M et al. **Restricted HIV Type 1 Replication under Serum-Free Culture Conditions in Human Monocyte-Derived Macrophages.** *AIDS Research and Human Retroviruses* 1998; 14(17): 1581-1588.
- Kroemer G, Pouyssegur J. **Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Hell.** *Cancer Cell* 2008; 13: 472-482.
- Landmann R et al. **Effect of Cytokines and Lipopolysaccharide on CD14 Antigen Expression in Human Monocytes and Macrophages.** *Journal of Cellular Biochemistry* 1991; 47: 317-329.
- Langowski JL et al. **IL-23 promotes tumour incidence and growth.** *Nature* 2006; 442: 461-466.
- Lechmann M et al. **CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation.** *Trends in Immunology* 2002; 23(6): 273-275.
- Lee Mei-Ting et al. **Differential Expression of M-CSF, G-CSF, and GM-CSF by Human Monocytes.** *Journal of Leukocyte Biology* 1990; 47: 275-282.
- Leidi M et al. **M2 Macrophages Phagocytose Rituximab-Opsonized Leukemic Targets More Efficiently than M1.** *Journal of Immunology* 2009; 182: 4415-4422.
- Lewis CE, Pollard J. **Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments.** *Cancer Research* 2006; 66(2): 605-612.
- Lewis C, Murdoch C. **Macrophage Responses to Hypoxia Implications for Tumor Progression and Anti-Cancer Therapies.** *American Journal of Pathology* 2005; 167(3): 627-635.
- Li Z et al. **Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity.** *Cellular and Molecular Immunology* 2009; 6: 415-422.
- Lin EY et al. **Colony-stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy.** *Journal of Experimental Medicine* 2001; 193(6): 727-739.
- Lipman M et al. **Changes to alveolar macrophage phenotype in HIV infected individuals with normal CD4 counts and no respiratory disease.** *Thorax* 1995; 50: 777-781.
- Loike JD et al. **Lactate Transport in Macrophages.** *Journal of Immunology* 1993; 150: 1951-1958.

- Locksley RM. **Interleukin 12 in host defense against microbial pathogens.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993; 90: 5879-5880.
- MacMicking J et al. **Nitric Oxide And Macrophage Function.** *Annual Revision of Immunology* 1997; 15: 323-350.
- Mantovani A et al. **Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes.** *Trends in Immunology* 2002; 23(11): 549-555.
- Mantovani A et al. **The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.** *Trends in Immunology* 2004; 25: 677-686.
- Mantovani A et al. **Cancer related inflammation.** *Nature* 2008; 454: 436-447.
- Martinez FO et al. **Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression.** *Journal of Immunology* 2006; 177: 7303-7311.
- Matera L, Galetto A. **In Vitro Maturation of Dendritic Cells from Blood Progenitors.** *Methods in Molecular Biology* 2003; 215: 417-426.
- Matés JM et al. **Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics.** *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 41: 2051-2061.
- Matuschek A et al. **Analysis of parathyroid graft rejection suggests alloantigen-specific production of nitric oxide by iNOS-positive intragraft macrophages.** *Transplantation Immunology* 2009; 21: 183-191
- Mautino G et al. **Heterogeneous spontaneous and interleukin-4-induced nitric oxide production by human monocytes.** *Journal of Leukocyte Biololgy* 1994; 56: 15-20.
- Moestrup SK et al. **CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response.** *Annals of Medicine* 2004; 36(5): 347-354.
- Moncada S. **Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology.** *Pharmacological Reviews* 1991; 43(2): 109-142.
- Moore KW et al. **Interleukin-10.** *Annual Reviews of Immunology* 1993; 11: 165-190.
- Mosser DM. **The many faces of macrophage activation.** *Journal of Leukocyte Biology* 2003; 73: 209-212.
- Mosser D, Edwards J. **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** *Nature Rev Immunology* 2008; 8(12): 958-969.

- Murdoch C et al. **Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues.** *Blood* 2004; 104: 2224-2234.
- Nareika A. **Sodium lactate increases LPS-stimulated MMP and cytokine expression in U937 histiocytes by enhancing AP-1 and NF- κ B transcriptional activities.** *American Journal of Physiology* 2005; 289: 534-542.
- Nguyen T et al. **Expression of CD163 (Hemoglobin Scavenger Receptor) in Normal Tissues, Lymphomas, Carcinomas, and Sarcomas Is Largely Restricted to the Monocyte/Macrophage Lineage.** *American Journal of Surgical Pathology* 2005; 29: 617-624.
- Ohno S et al. **The degree of macrophage infiltration into the cancer cell nest is a significant predictor of survival in gastric cancer patients.** *Anticancer Research* 2003; 23(6D): 5015-5022.
- Ohri CM et al. **Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival.** *European Respiratory Journal* 2009; 33: 118-126.
- Philippidis P et al. **Anti-inflammatory haemoglobin scavenging monocytes are induced following coronary artery bypass surgery.** *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 2010; 37: 1360-1366.
- Pollard JW **Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis.** *Nature Reviews Cancer* 2004; 4: 71-78.
- Porcheray F et al. **Macrophage activation switching: an asset for the resolution of Inflammation.** *Clinical and Experimental Immunology* 2005; 142: 481-489.
- Richardsen E et al. **Expression of M-CSF and CSF-1R is Correlated with Histological Grade in Soft Tissue Tumors.** *Anticancer Research* 2009; 29(10): 3861-3866.
- Roca H et al. **CCL2 and IL-6 promote survival of human CD11b⁺-peripheral blood mononuclear cells and induce M2-Type macrophage polarization.** *Journal of Biological Chemistry*, 2009; 284(49): 34342-34354.
- Romani N et al. **Generation of mature dendritic cells from human blood An improved method with special regard to clinical applicability.** *Journal of Immunological Methods* 1996; 196: 137-151.
- Rutherford MS et al. **Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited.** *Journal of Leukocyte Biology* 1993; 53: 602-618.

- Samuvel D et al. **Lactate Boosts TLR4 Signaling and NF- κ B Pathway-Mediated Gene Transcription in Macrophages via Monocarboxylate Transporters and MD-2 Up-Regulation.** *Journal of Immunology* 2009; 182: 2476-2484.
- Semenza G et al. **The metabolism of tumors: 70 years later.** *Novartis Found Symp* 2001; 240: 251-260.
- Shime H, Yabu M, Akazawa T, Kodama K, Matsumoto M, Seya T, Inoue N. **Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway.** *Journal of Immunology* 2008; 180(11): 7175-7183.
- Sica A, Vincenzo B. **Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development.** *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 1155-1166.
- Sica A et al. **Autocrine Production of IL-10 Mediates Defective IL-12 Production and NF- κ B Activation in Tumor-Associated Macrophages.** *Journal of Immunology* 2000; 164: 762-767.
- Sica A et al. **Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy.** *European Journal of Cancer* 2006; 42: 717-727.
- Solinas G et al. **Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation.** *Journal of Leukocyte Biology* 2009; 86(5): 1065-1073.
- Stout RD et al. **Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences.** *Journal of Immunology* 2005; 175 (1): 342-349.
- Stein, MJ et al. **Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation.** *Journal of Experimental Medicine* 1992; 176(1): 287-292.
- Sulahian T et al. **Human Monocytes Express CD163, which is Upregulated by IL-10 and Identical to p155.** *Cytokine* 2000; 12(9): 1312-1321.
- Sweet M, Hume D. **Endotoxin signal transduction in macrophages.** *Journal of Leukocyte Biology* 1996; 60: 8-26.
- Sztejn M et al. **Regulation of human peripheral blood monocyte DR antigen expression in vitro by lymphokines and recombinant interferons.** *Journal of Clinical Investigation* 1984; 73: 556-565.

- Takahashi K. **Development and differentiation of macrophages and related cells: Historical review and current concepts.** *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 2000; 41(1): 1-33.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome Biology* 2002; 3(7): RESEARCH0034.
- van der Heiden MG et al. **Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation.** *Science* 2009; 324: 1029-1033.
- van den Heuvel MM et al. **Regulation of CD163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation.** *Journal of Leukocyte Biology* 1999; 66: 858-866.
- Varin A, Gordon S. **Alternative activation of macrophages: Immune function and cellular biology.** *Immunobiology* 2009; 214: 630-641.
- Vaupel P et al. **Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review.** *Cancer Research* 1989; 49: 6449-6465.
- Verreck FA et al. **Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ - and CD40L-mediated costimulation.** *Journal of Leukocyte Biology* 2006; 79: 285-293.
- Volk HD et al. **Decrease of HLA-DR Antigen Expression by Human Monocytes During Cultivation in Absence of Exogenous or Endogenous Interferon- γ .** *Immunology Letters* 1985; 10: 103-107.
- De Waal Malefyt R et al. **Effects of IL-13 on Phenotype, Cytokine Production, and Cytotoxic Function of Human Monocytes: Comparison with IL-4 and Modulation by IFN- γ or IL-10.** *Journal of Immunology* 1993; 151(11): 6370-6381.
- De Waal Malefyt R et al. **Interleukin 10(IL-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of Produced by Monocytes.** *Journal of Experimental Medicine* 1991; 174: 1209-1220.

- Walenta S et al. **High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases, Tumor Recurrence and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers.** *Cancer Research* 2000; 60(4): 916-921.
- Walenta S et al. **Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology.** *Current Medicinal Chemistry* 2004; 11(16): 2195-2204.
- Walenta S, Mueller-Klieser WF **Lactate. Mirror and Motor of Tumor Malignancy.** *Seminars in Radiation Oncology* 2004; 14: 267-274.
- Warburg O, Posener K, Negelein N. **Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle.** *Klinische Wochenschrift* 1925; 12: 534-536.
- Young DA et al. **Comparison of the effects of IL-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and macrophage colony-stimulating factor in supporting monocyte differentiation in culture. Analysis of macrophage antibody-dependent cellular cytotoxicity.** *Journal of Immunology* 1990; 145(2): 607-615.

10 Appendix

Frisch gewonnene Blutleukozyten und Leukozyten der Apherese 33 wurden hinsichtlich der Expression von CD14 (Monozytenmarker), CD68 (Makrophagenmarker), CD83 (Marker für Dendritische Zellen) und CD16 (Marker für phagozytierende Zellen) untersucht. Hierzu wurden die Zellen über Nacht in Kulturmedium mit 10 % FCS (hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum, Cell Concepts GmbH, Umkirch) anstelle von humanem AB-Serum und ohne weitere Zusätze angezüchtet. Die Expression der angegebenen Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 10.1, S. 92).

CD83: Marker für Dendritische Zellen (Lechmann M et al., 2002; Cao W et al., 2005)

CD16: Marker für phagozytierende Zellen und typischerweise auf aktivierten Makrophagen, natürlichen Killerzellen und neutrophilen Leukozyten; bedingter Reifungsmarker für *in-vitro* Monozytenkulturen (Clarkson SB und Ory PA, 1988; Young DA et al., 1990; Leidi M et al., 2009)

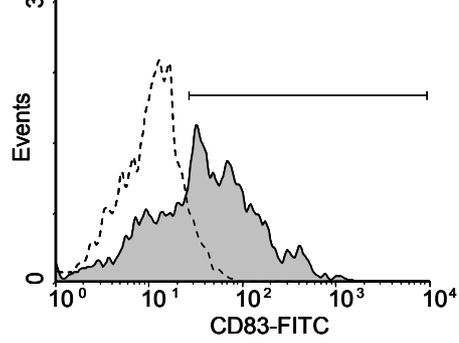
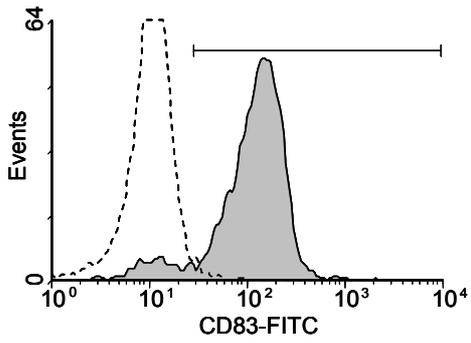
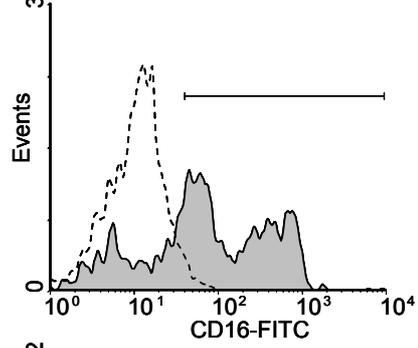
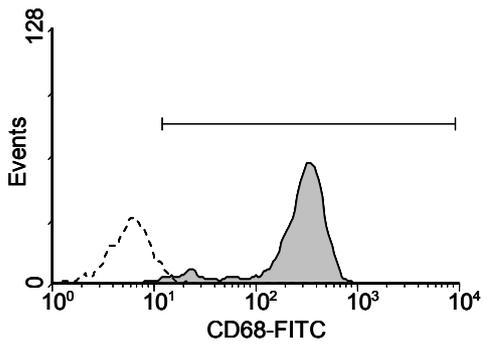
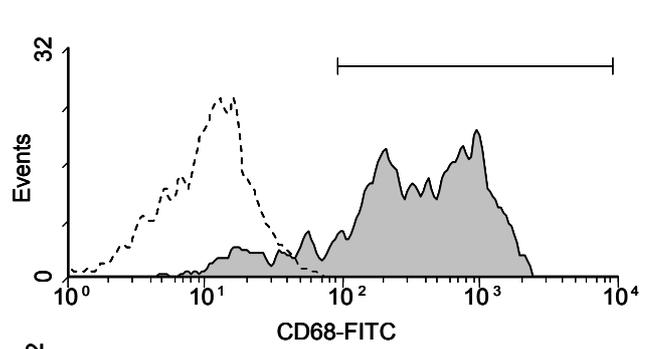
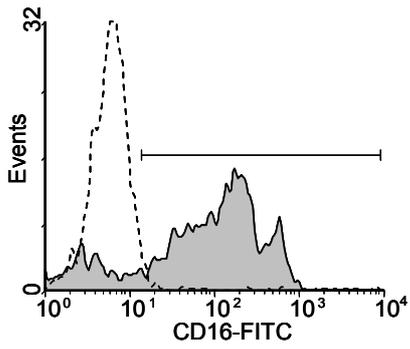
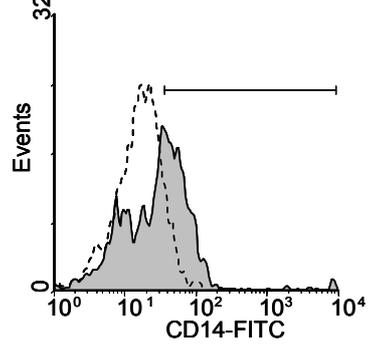
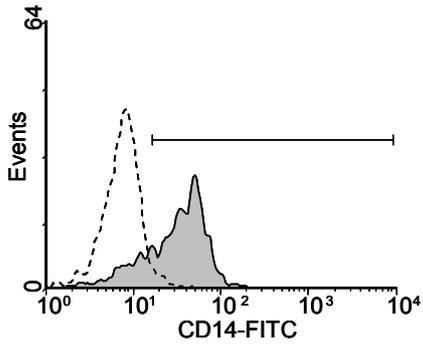
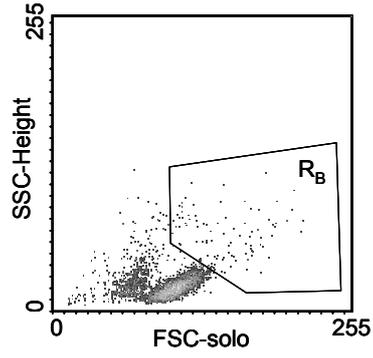
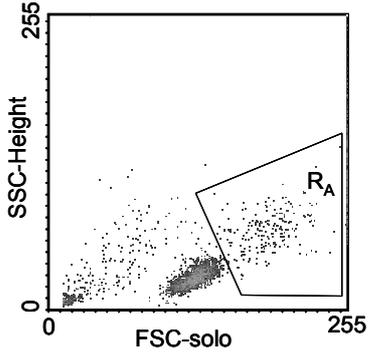


Abb. 10.1 (S. 92): Durchflusszytometrische Charakterisierung von Monozyten aus frisch gewonnenen Blutleukozyten (A) und Apheresen (B). Repräsentative Darstellung von drei unterschiedlichen Untersuchungen. Hierzu wurden die Monozyten im Bereich R_A (13, 14 %) für frisch gewonnene Blutleukozyten (A) und im Bereich R_B (11,41 %) für Leukozyten der Apherese 33 (B) untersucht.

Auffällig war, dass bei gleichen Kulturbedingungen nach 24 Stunden nahezu sämtliche ausgesäten frisch gewonnenen Blutleukozyten im Überstand zu finden waren. Hierbei handelt es sich um einen typischen Effekt im Reifungsprozess dendritischer Zellen. Diese verlieren bei der Entwicklung von unreifen zu reifen Zellen die Fähigkeit zur Adhärenz zu Gunsten erhöhter Motilität (Romani N et al., 1996; Matera L und Galetto A, 2003). Hingegen ist die Zunahme der Adhärenz ein Hinweis auf die Reifung von Monozyten zu Makrophagen. Monozyten gelangen aus dem Knochenmark in die Blutbahn und zirkulieren dann im Gefäßsystem des Körpers, um schließlich in verschiedenen Geweben zu Makrophagen zu differenzieren. Dazu müssen sie an Endothelzellen adhären, bevor sie in das jeweilige Gewebe einwandern können (Doherty DE et al., 1987; Brugger W et al., 1991). Die Zunahme der Adhärenz wurde bei sämtlichen Versuchen mit den Apheresen 33 und 34 beobachtet.

Auch nach einer Kultivierungszeit von 8 Tagen und trotz Zusatz von M-CSF (50 ng/mL) sowie Zugabe von hitzeinaktiviertem humanem AB-Serum (5 %) anstelle von FCS zu den aus Transfusionssystemen frisch gewonnenen Blutleukozyten proliferierten die meisten Zellen im Überstand (Abb. 10.2 A).

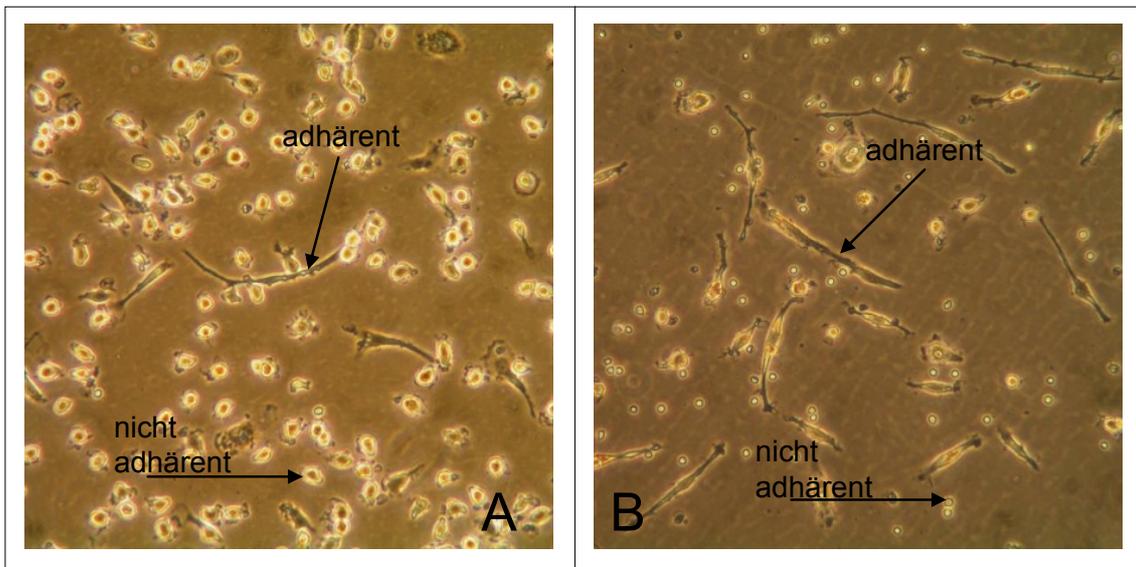


Abb. 10.2: Morphologie humaner Makrophagen in Kultur. (A) Frisch gewonnene Blutleukozyten nach acht Tagen in Kultur mit 50 ng/mL M-CSF und 5 % humanem AB-Serum. Zu erkennen sind wenige adhärenente spindelförmige Zellen, die am ehesten Makrophagen darstellen und viele größere rundliche Zellen, die nicht adhärenent sind, und wahrscheinlich Dendritische Zellen darstellen; (B) Monozyten der Apherese 33 nach sieben Tagen in Kultur mit 50 ng/mL M-CSF und 5 % humanem AB-Serum. Der überwiegende Anteil der Zellen war adhärenent und spindelförmig und somit sehr wahrscheinlich Makrophagen.

Frisch gewonnene Blutleukozyten wurden für 8 Tage mit 50 ng/mL M-CSF und 5 % AB-Serum für acht Tage kultiviert und anschließend durchflusszytometrisch phänotypisiert (Abb. 10.3).

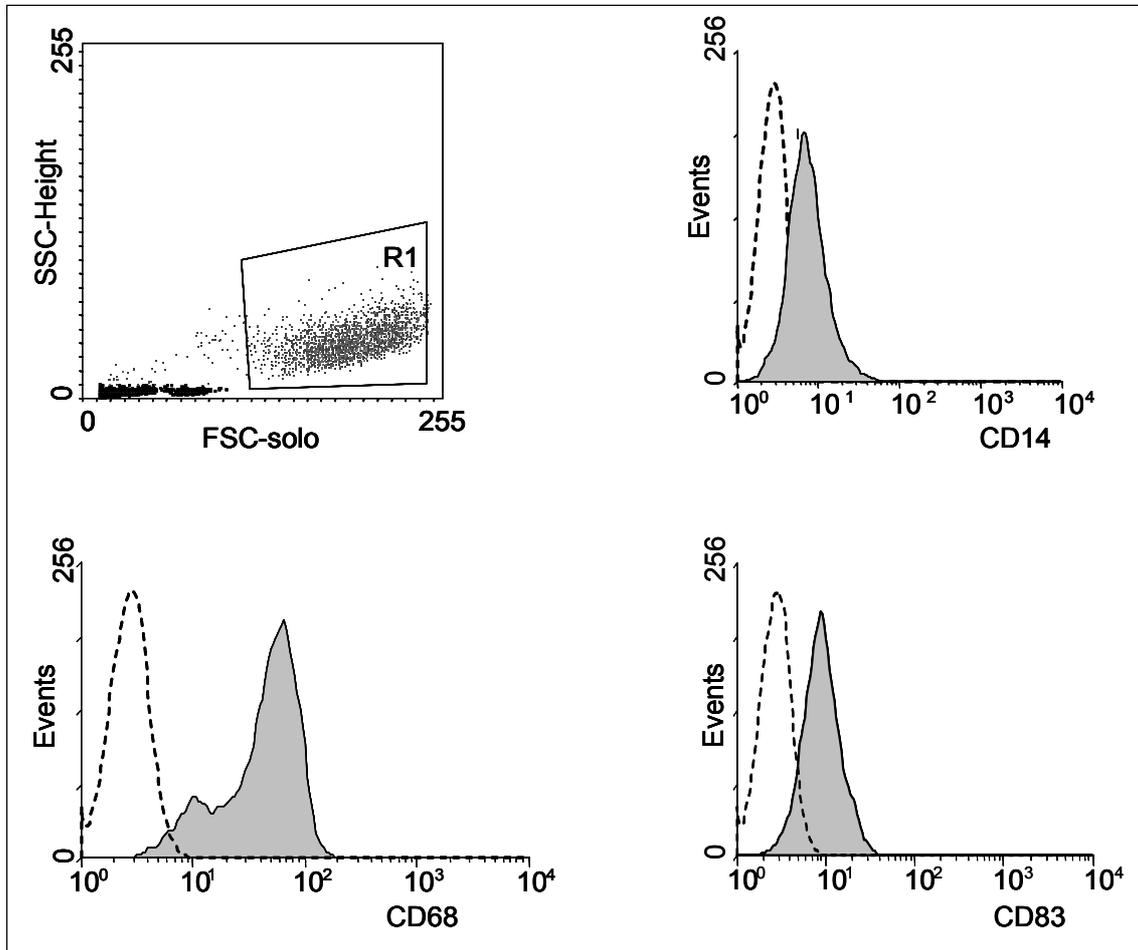


Abb. 10.3: Durchflusszytometrische Charakterisierung von Monozyten / Makrophagen nach acht Tagen in Kultur. Die Zellen im Bereich R1 (64,13 %) wurden analysiert. Die Monozyten wurden mit 50 ng/mL M-CSF und 5 % humanem AB-Serum kultiviert.

Die Makrophagen wurden auch immunhistochemisch analysiert (Abb. 10.4).

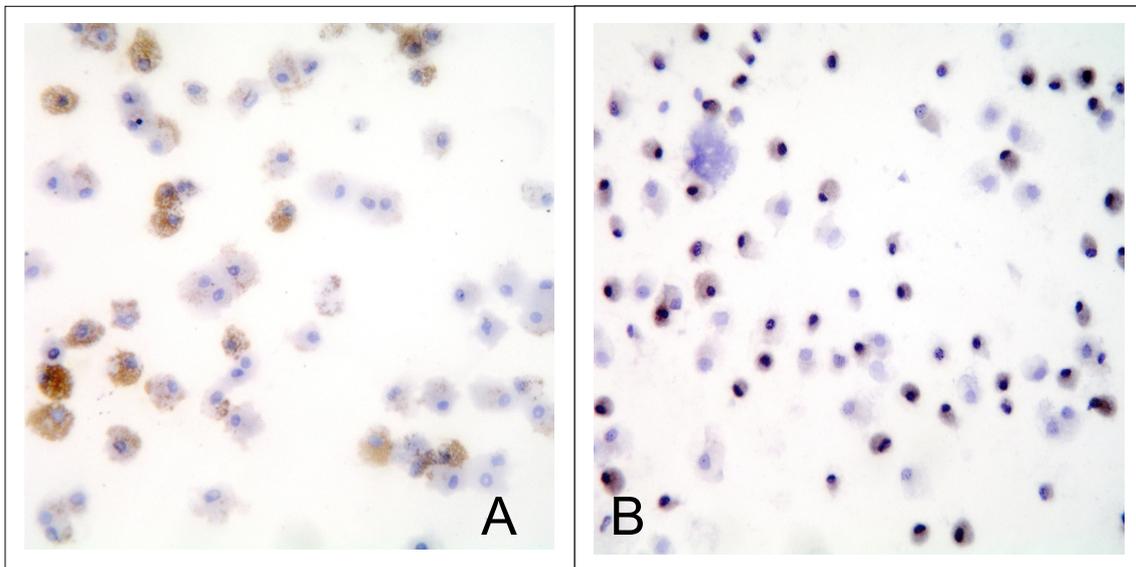


Abb. 10.4: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD68 und CD83 auf M-CSF-Makrophagen. Die Monozyten wurden für acht Tage mit 50 ng/mL M-CSF und 5 % humanem AB-Serum kultiviert. (A) CD68 (s. auch Abb. 4.2); (B) CD83 (82 % positive Zellen; Score 3).

Bei den frisch gewonnenen Blutleukozyten aus Transfusionszapfen (Abb. 3.1) scheint bereits die Entwicklung zu Dendritischen Zellen initiiert zu sein^{††}.

In einer publizierten Arbeit wurde die durch LRSCs («leukreduction system chamber») gewonnenen CD14-positiven Zellen sogar als «hervorragende Quelle» für die Generierung reifer Dendritischer Zellen bezeichnet (Dietz AB et al., 2006). Zur *in vitro* Generierung von Makrophagen waren diese Leukozyten jedoch weniger geeignet.

^{††}) Diese Beobachtung deckt sich mit Erfahrungen aus dem Labor von Frau Prof. Dr. U. Kämmerer der Universitäts-Frauenklinik Würzburg. Auch hier wurde eine extrem kurze Reifungsdauer zu reifen Dendritischen Zellen aus Transfusionszapfen gewonnenen Leukozyten beobachtet.

Zu Abb. 4.5 in Kapitel 4.1: Kulturbedingungen für nicht-aktivierte und aktivierte Makrophagen

Auch für GM-CSF wurde ein positiver Effekt auf die Proliferation von Monozyten / Makrophagen gemessen (Abb. 10.5).

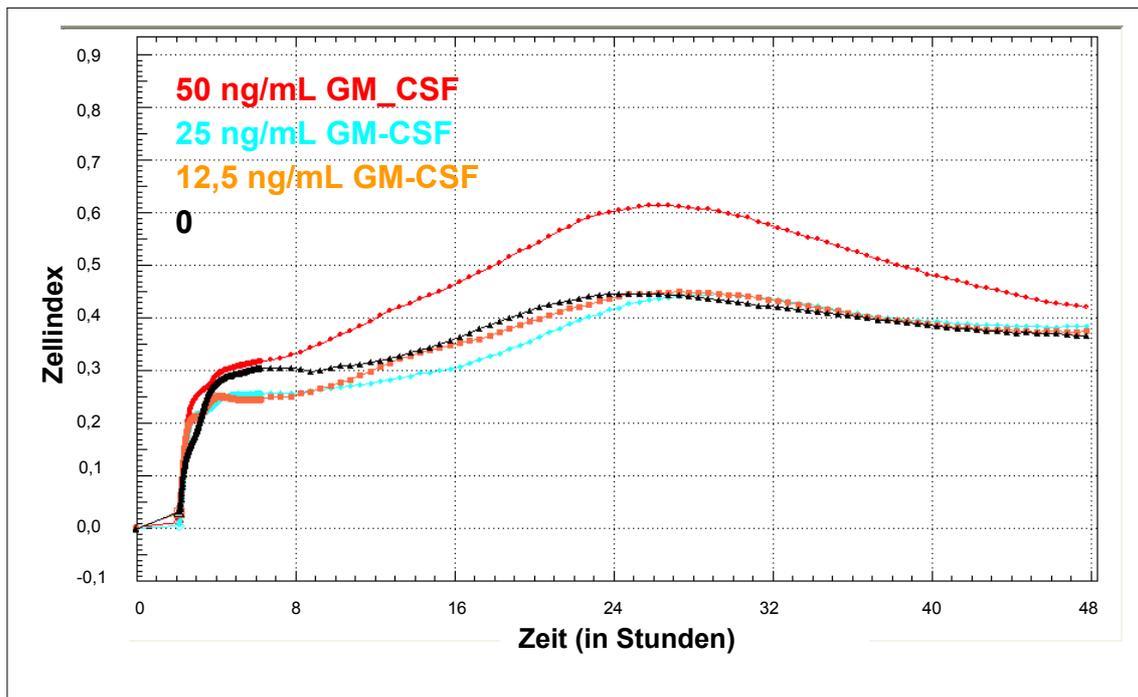


Abb. 10.5: Wachstumskurven von Makrophagenkulturen bei verschiedenen Konzentrationen an GM-CSF. Rote Linie: 50 ng/mL GM-CSF, türkise Linie: 25 ng/mL GM-CSF; orange Linie: 12,5 ng/mL GM-CSF und schwarz Linie: Kontrolle ohne GM-CSF.

Zur Morphologie nicht-aktivierter und aktivierter Makrophagen (Kapitel 4.2)

Bei der Stimulation mit den beiden immunmodulierenden Zytokinen IL-4 und IL-10 blieb ein Mischbild aus Fibrozyten- und Spiegelei-Form erhalten (Abb. 4.8 A-D). Auch nach 72 stündiger Stimulation waren beide Zellformen noch gut zu erkennen.

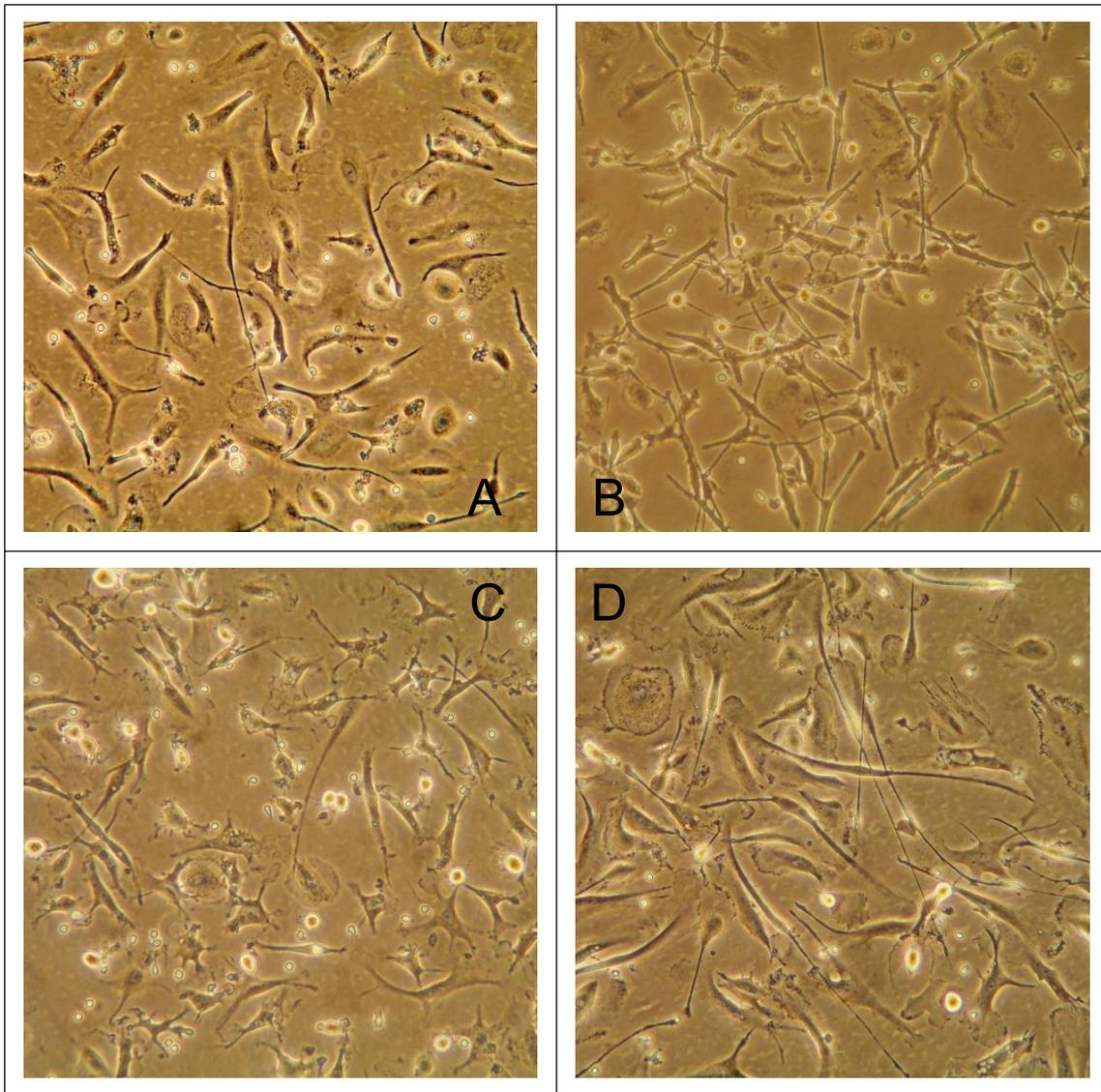


Abb. 10.6: Morphologie humaner Makrophagen in Kultur. (A) M-CSF-Makrophagen nach sieben Tagen in Kultur mit M-CSF (50 ng/mL); (B, C) M-CSF-Makrophagen nach weiteren 24 Stunden mit IL-4 (15 ng/mL) und IL-10 (15 ng/mL); (D) nach 72 Stunden mit IL-4 und IL-10.

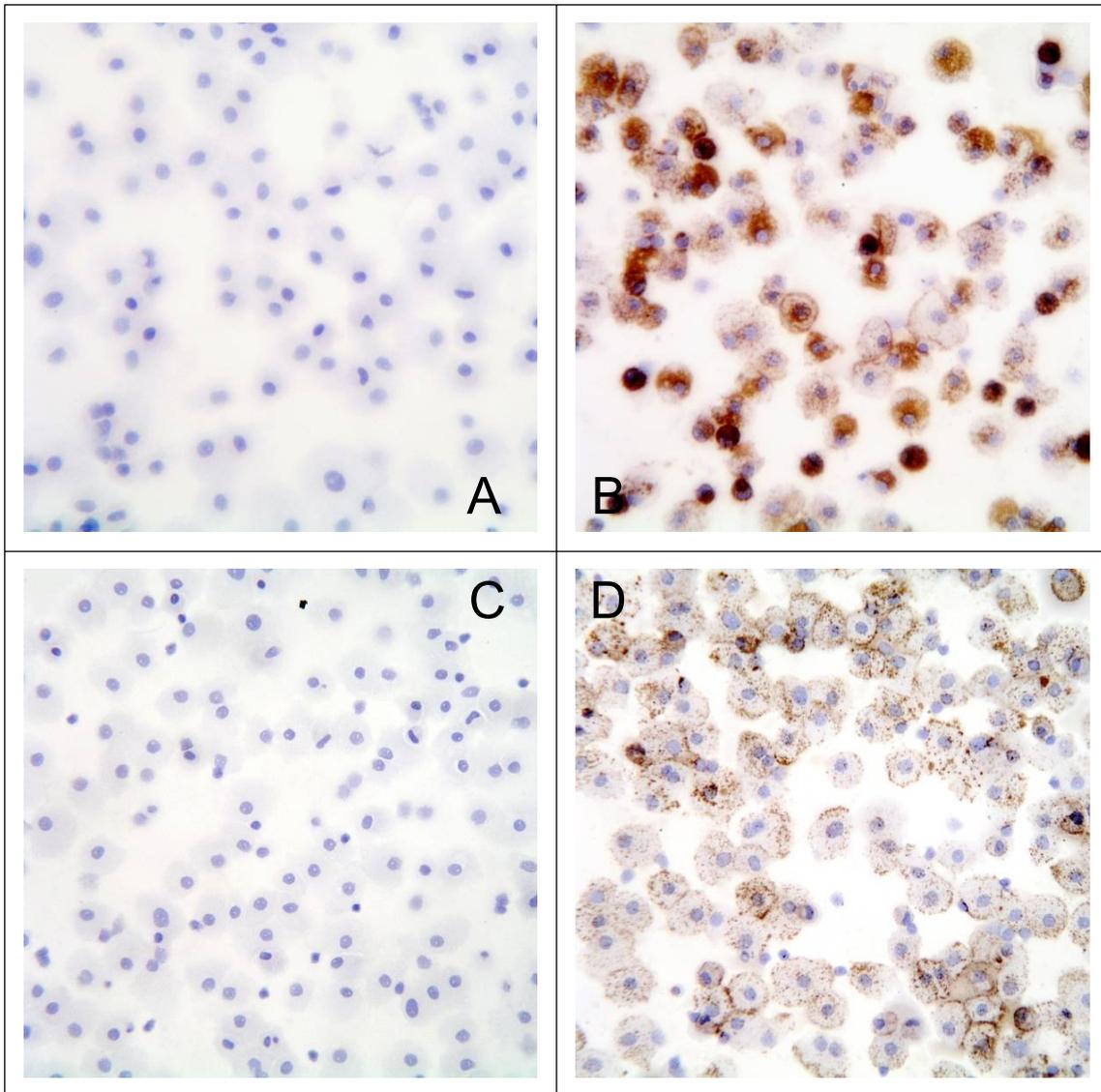


Abb. 10.7: Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD68. (A & C) Sekundärantikörper (Kontrollantikörper); (B & D) anti-CD68 Antikörper. Untersucht wurden Makrophagen der Apherese 33 nach sieben Tagen in Kultur mit 50 ng/mL M-CSF (C) bzw. mit 50 ng/mL GM-CSF (D).

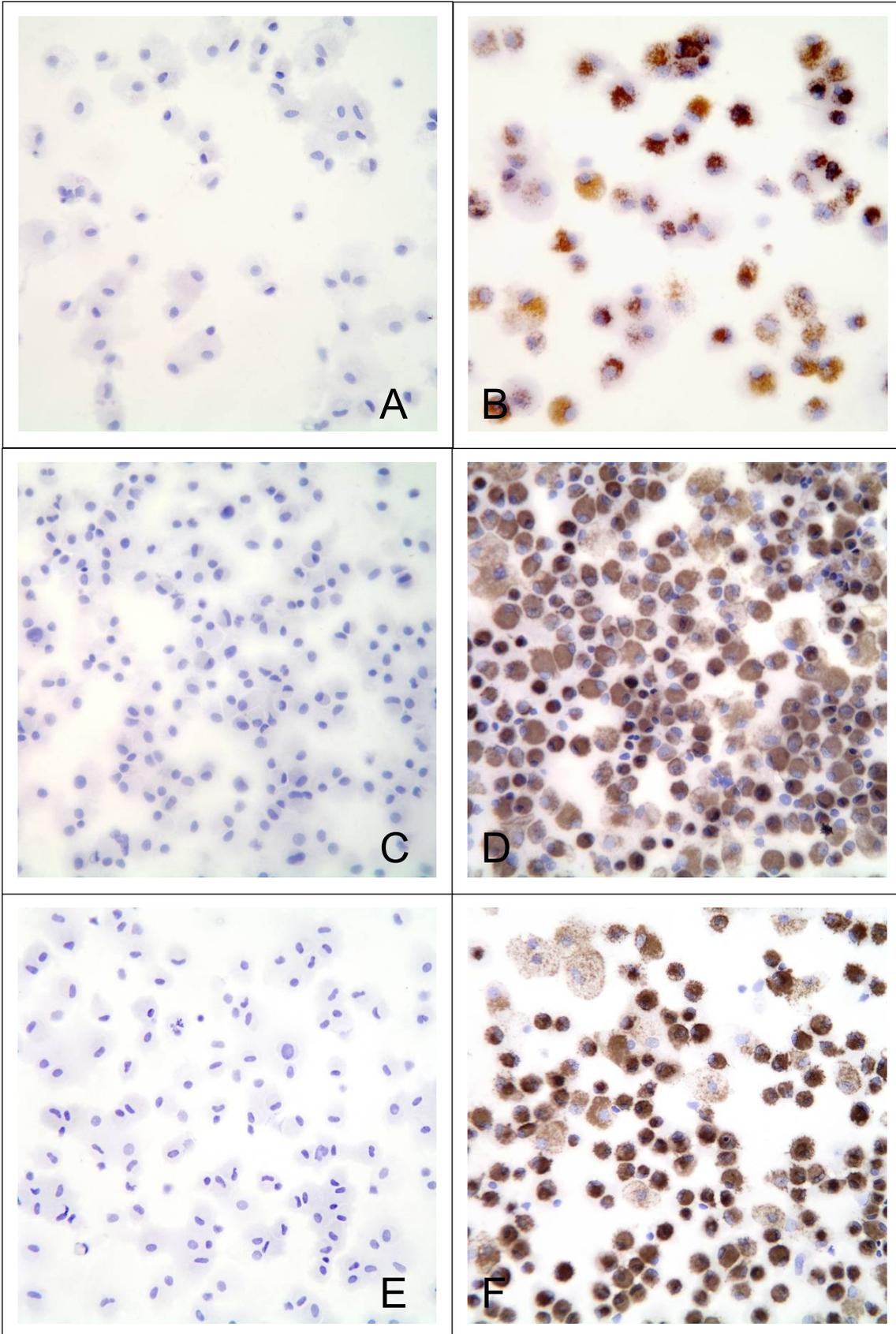


Abb. 10.8 (S. 100): Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD68 auf GM1-Makrophagen. Untersucht wurden Makrophagen der Apherese 33. (A, C, E) Sekundärantikörper (Kontrollantikörper); (B, D, F) CD68 (Score 3) nach 24, 48 und 72 Stunden in Kultur.

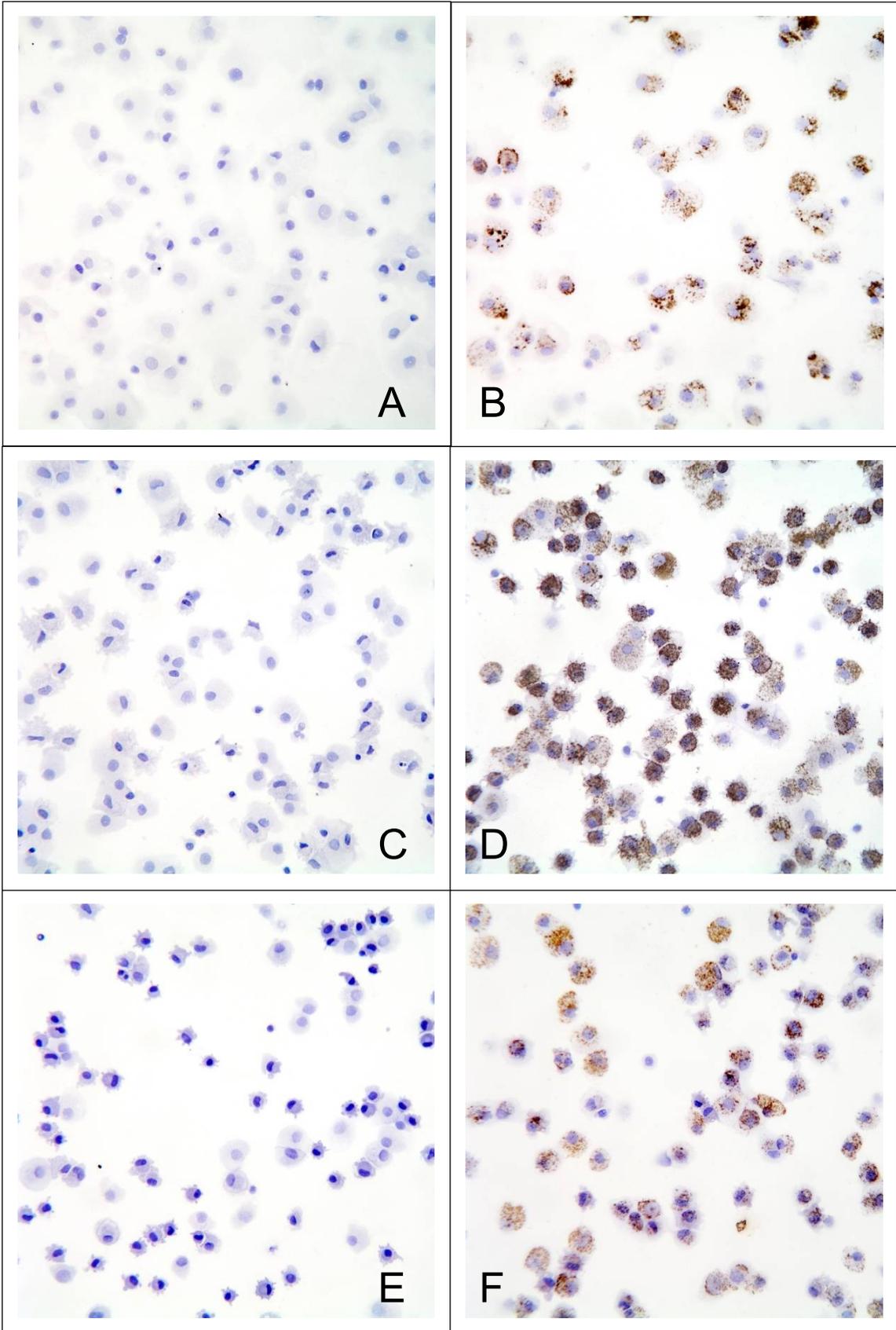


Abb. 10.9 (S. 102): Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD68 auf M1-Makrophagen. Untersucht wurden Makrophagen der Apherese 33. (A, C, E) Sekundärantikörper (Kontrollantikörper); (B, D, F) CD68 (Score 3) nach 24, 48 und 72 Stunden in Kultur.

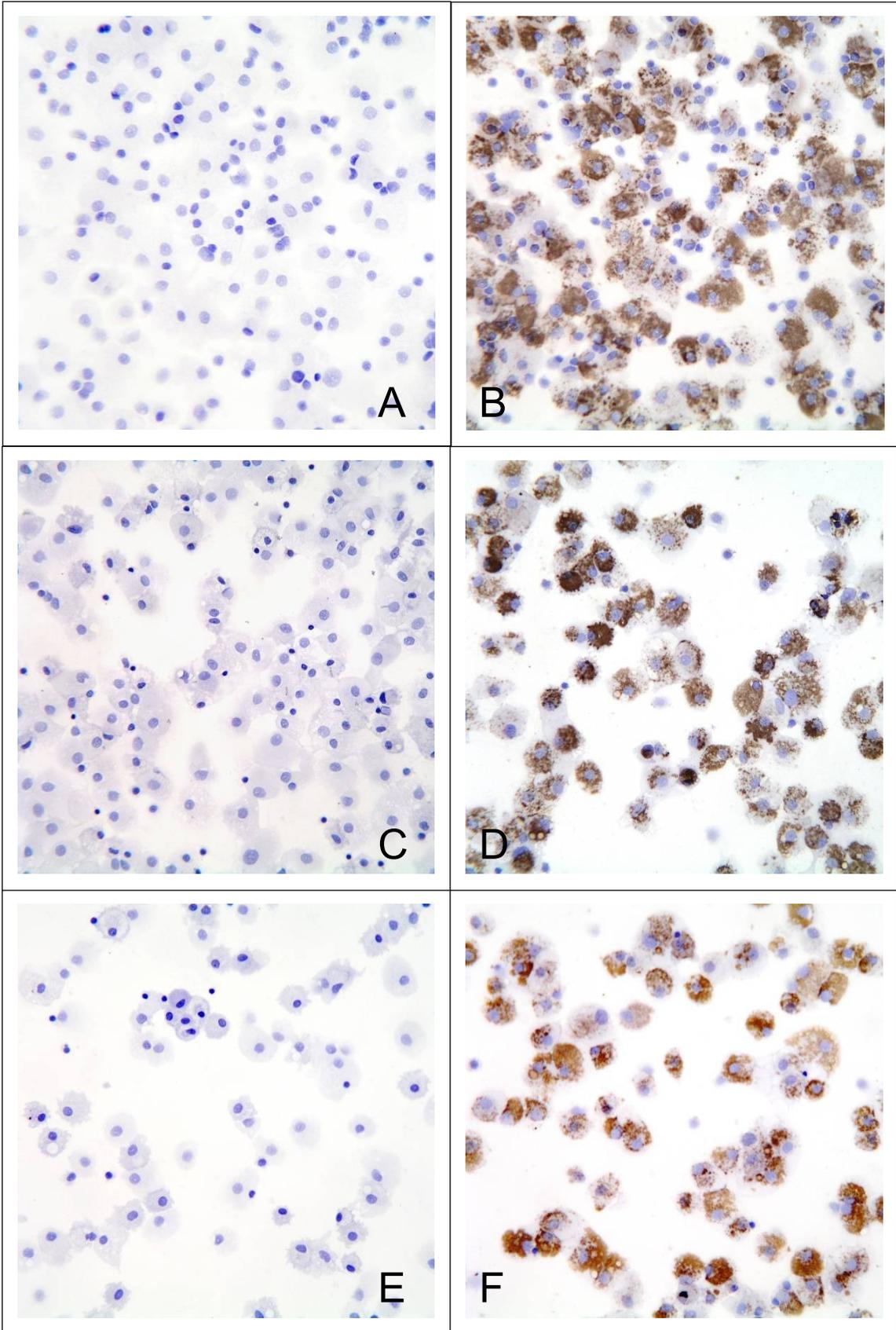


Abb. 10.10 (S. 104): Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD68 auf M2-Makrophagen. Untersucht wurden Makrophagen der Apherese 33. (A, C, E) Sekundärantikörper (Kontrollantikörper); (B, D, F) CD68 (Score 3) nach 24, 48 und 72 Stunden in Kultur.

Zu Kapitel 4.6 «Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Expression von Chemokinen undIDO»

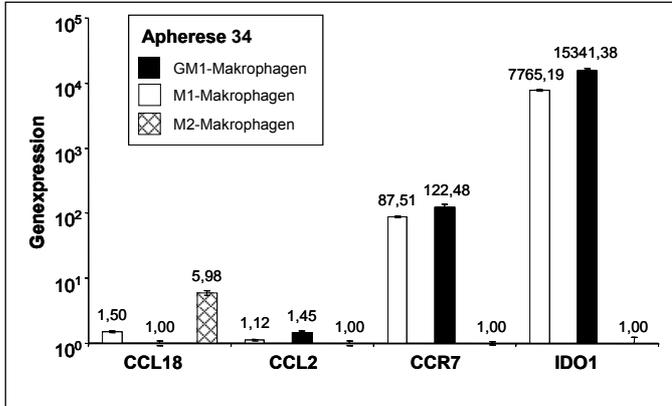
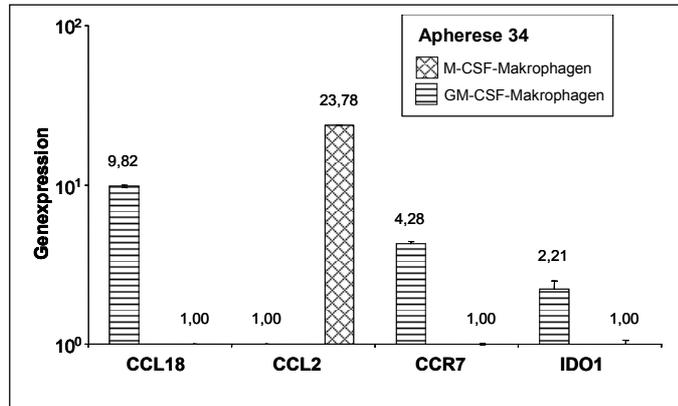


Abb. 10.11: Expression von CCL18, CCL2, CCR7 und IDO1 in GM1-Makrophagen, M1- und M2-Makrophagen der Apherese 34. Zu den Kulturbedingungen siehe Informationen zu den Abb. 4.22-4.25.

Abb. 10.12: Expression von CCL18, CCL2, CCR7 und IDO1 in M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen der Apherese 34. Zu den Kulturbedingungen siehe Informationen zu den Abb. 4.22-4.25.



Tab. 10.1: Zusammenfassung der Ergebnisse zu Kapitel 4.6. Für den Überblick sind ausschließlich Expressionstärken von über Faktor 2 berücksichtigt.

Makrophagen	M1-Marker		M2-Marker	Tumor
	CCR7	IDO	CCL18	CCL2
M-CSF				+
GM-CSF			+	
M1	+	+		
M2	-	-	+	
GM1	+	+	+	

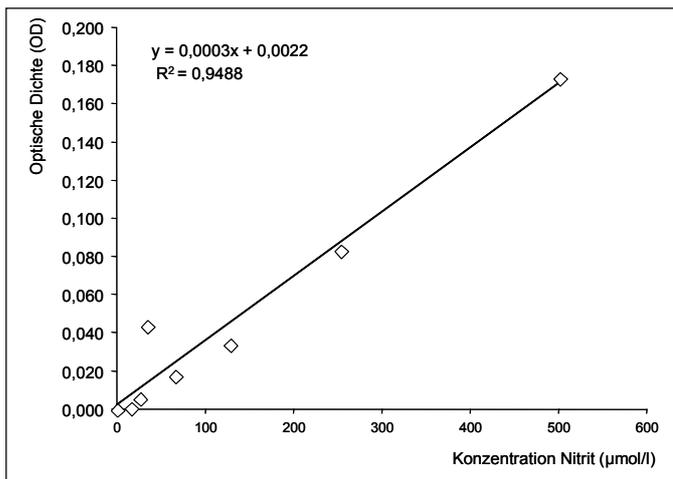


Abb. 10.13: Bestimmung von Stickstoffmonoxid mittels Natriumnitrit (NaNO₂)-Standardproben. Weitere Informationen siehe Material und Methoden bzw. Abb. 4.26-4.29.

Zu Kapitel 4.7 «Einfluss von Aktivierungssignalen auf die Sezernierung von NO und IL-12»

Tab. 10.2: Übersicht zu den sezernierten Mengen an NO und IL-12 durch die einzelnen Makrophagenpopulationen.

Makrophagen	24 Std.	48 Std.	72 Std.	
M-CSF	0	0,17 ± 20,61	29,33 ± 14,14	NO (µmol/L)
	12,00 ± 0,57		2,10 ± 0,71	IL-12 (pg/mL)
GM-CSF	41,75 ± 26,52	71,74 ± 8,84	58,00 ± 4,61	NO (µmol/L)
	33,4 ± 1,34		1,80 ± 0,57	IL-12 (pg/mL)
M1	0	11,00 ± 14,01	72,67 ± 6,7	NO (µmol/L)
	26,80 ± 0,57		26,40 ± 0,85	IL-12 (pg/mL)
M2	5,5 ± 7,07	21,75 ± 1,77	81,75 ± 19,45	NO (mmol/L)
	2,00 ± 0,28		1,00 ± 0,85	IL-12 (pg/mL)
GM1	3,0 ± 3,51	34,25 ± 33,59	55,5 ± 4,95	NO (µmol/L)
	24,80 ± 0,61		18,00 ± 1,13	IL-12 (pg/mL)

Kontrollen IL-12 (Medium): 1,20 ± 0,28 pg/mL (24 Stunden); 3,00 ± 0,28 pg/mL (72 Stunden). Die Werte für die 72-stündige Inkubation sind für IL-12 grafisch nicht dargestellt.

11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	8
Die in dieser Arbeit untersuchten Wege der Makrophagenaktivierung.	
Abb. 3.1:	11
Leukozytenreicher «Blutzapfen» oder LRSC.	
Abb. 3.2:	16
Prinzip der immunhistochemischen Färbung (<i>Sandwich</i> -Technik).	
Abb. 3.3:	18
Beispiele zum Färbescore.	
Abb. 4.1:	27
Immunhistochemischer Nachweis CD68-positiver Makrophagen nach 7 Tagen in Kultur.	
Abb. 4.2:	28
Immunhistochemischer Nachweis CD68-positiver Makrophagen nach 7 Tagen in Kultur.	
Abb. 4.3:	29
Morphologie humaner Makrophagen nach 7 Tagen in Kultur.	
Abb. 4.4:	30
Repräsentative Beispiele zum Wachstum von Makrophagen nach 7 Tagen in Kultur mit M-CSF bzw. GM-CSF.	
Abb. 4.5:	31
Wachstumskurven von Makrophagenkulturen bei verschiedenen Konzentrationen an M-CSF.	
Abb. 4.6:	32
Morphologie von Makrophagen nach 7 Tagen in Kultur.	
Abb. 4.7:	33
Morphologie von Makrophagen nach 10 Tagen in Kultur.	
Abb. 4.8:	34
Morphologie von Makrophagen in Kultur.	
Abb. 4.9:	35
Morphologie von Makrophagen in Kultur.	
Abb. 4.10:	37
Immunhistochemischer Nachweis der Expression von HLA-DR auf der Zelloberfläche von Makrophagen nach 7 Tagen in Kultur.	
Abb. 4.11:	38
Immunhistochemischer Nachweis der Expression von HLA-DR auf Makrophagen.	

Abb. 4.12:	39
Immunhistochemischer Nachweis der Expression von HLA-DR auf M1-Makrophagen.	
Abb. 4.13:	40
Immunhistochemischer Nachweis der Expression von HLA-DR auf M2-Makrophagen.	
Abb. 4.14:	41
Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD163 und CD206 auf Makrophagen.	
Abb. 4.15:	42
Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD163 und CD206 auf M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen.	
Abb. 4.16:	43
Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD163 und CD206 auf GM1-Makrophagen.	
Abb. 4.17:	45
Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD163 und CD206 auf M1-Makrophagen.	
Abb. 4.18:	46
Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD163 und CD206 auf M2-Makrophagen.	
Abb. 4.19:	48
Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD16 auf GM-CSF- und GM1-Makrophagen	
Abb. 4.20:	49
Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD16 auf M-CSF- und M1-Makrophagen.	
Abb. 4.21:	50
Immunhistochemischer Nachweis der Expression von CD16 auf M2-Makrophagen.	
Abb. 4.22:	52
Expression von CCL2, CCL18, CCR7 und IDO1 in M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen.	
Abb. 4.23:	54
Expression von CCL2, CLL2, CCR7 und IDO1 in M1- und GM1-Makrophagen sowie M2-Makrophagen.	

Abb. 4.24:	56
Expression von CCL2, CLL2, CCR7 und IDO1 in M-CSF- und M2-Makrophagen.	
Abb. 4.25:	57
Expression von CCL2, CLL2, CCR7 und IDO1 in M-CSF- und M1-Makrophagen.	
Abb. 4.26:	59
Die Bildung von NO durch M-CSF- und M1-Makrophagen	
Abb. 4.27:	60
Die Bildung von NO durch GM1- und M1-Makrophagen.	
Abb. 4.28:	61
Die Bildung von NO durch M-CSF- und M2-Makrophagen.	
Abb. 4.29:	61
Die Bildung von NO durch GM-CSF- und GM1-Makrophagen.	
Abb. 4.30:	62
Bildung von IL-12 durch M-CSF- und GM-CSF-Makrophagen.	
Abb. 4.31:	63
Bildung von IL-12 durch M1-, GM1- und M2-Makrophagen.	
Abb. 4.32:	64
Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kapitel 4.3 bis 4.7.	
Abb. 4.33:	65
Immunhistochemischer Nachweis CD68-positiver Makrophagen in Gegenwart von Laktat.	
Abb. 4.34:	66
Immunhistochemischer Nachweis von HLA-DR, CD16, CD163 und CD206 auf Makrophagen in Gegenwart von Laktat.	
Abb. 4.35:	67
Immunhistochemischer Nachweis von CD163 und CD206 auf M2-Makrophagen in Gegenwart von Laktat.	
Abb. 4.36:	68
Bildung von IL-12 durch (aktivierte) M1- und GM1-Makrophagen sowie durch (nicht-aktivierte) GM-CSF-Makrophagen bei An- und Abwesenheit von Laktat.	
Abb. 10.1 - 10.13:	91-107
Abbildungen Anhang	

12 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1:	12
Liste der verwendeten Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse.	
Tab. 3.2:	17
Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.	
Tab. 3.3:	23
Informationen zu den in dieser Arbeit verwendeten Primer-Paaren.	
Tab 3.4:	24
Qualitätsdaten zur Charakterisierung der quantitative RT-PCR.	
Tab. 4.1:	36
Die Ergebnisse zur Zellmorphologie unterschiedlicher Makrophagenpopulationen im Überblick.	
Tab. 4.2:	51
Die Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen im Überblick.	
Tab. 4.3:	53
Zugehörige Cq-Werte zu Abb. 4.22.	
Tab. 4.4:	55
Zugehörige Cq-Werte zu Abb. 4.23.	
Tab. 4.5:	56
Zugehörige Cq-Werte zu Abb. 4.24.	
Tab. 4.6:	57
Zugehörige Cq-Werte zu Abb. 4.25.	
Tab. 10.1:	106
Zusammenfassung der Ergebnisse zu Kapitel 4.6.	
Tab. 10.2:	107
Übersicht zu den sezernierten Mengen an NO und IL12 durch die einzelnen Makrophagenpopulationen.	

Publikation

Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden auf dem Workshop des Arbeitskreises «Transplantationsimmunologie» der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) am 16. / 17. April 2010 in Würzburg präsentiert.

Der Titel der Präsentation lautete: «Bedeutung von M-CSF und GM-CSF für die *in vitro* Differenzierung humaner Makrophagen aus peripheren Blutmonozyten».

Danksagung

Mein Dank gilt als erstes Herrn Prof. Dr. med. C.-T. Germer, Direktor der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die ausgezeichneten Möglichkeiten es zu bearbeiten und die viele Geduld und Zeit, die er für die Ausarbeitung dieser Arbeit aufbrachte.

Frau Manuele Schneider danke ich für die Hilfsbereitschaft, das Einarbeiten in die notwendigen Methoden und Geduld, die sie mir trotz ihrer Belastung in Klinik und Forschung entgegenbrachte.

Ebenso danke ich den Mitarbeiterinnen Monika Koospal, Bettina Mühling und Sabine Gahn für die freundliche Unterstützung, die zur Vollendung der Experimente notwendig war, sowie die gute Zusammenarbeit und gemeinschaftliche Atmosphäre, in der mir ein zügiges Abschließen der Arbeit möglich war.

Lebenslauf

Michael Hausmann

geb. am 28.11.1984 in Würzburg, Arzt

Beruf (seit April 2012)

Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin am Krankenhaus Fürth

Ausbildung

Besuch des städtischen Schönborn-Mozart-Gymnasiums Würzburg:

Sept. 1995 - Juni 2004

Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife :

Juni 2004

Beginn des Medizinstudiums:

SS 2005

Absolvierung des Praktischen Jahres in der Missionsärztlichen Klinik Würzburg mit dem Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe:

Aug. 2010 - Juli 2011

Abschluss mit Staatsexamen:

Nov. 2011

Doktorarbeit mit dem Thema «Untersuchungen zum Differenzierungspotential humaner Monozyten / Makrophagen in vitro »:

Okt. 2009 - April 2010

Promotion

April 2013

Erfahrung

Pflegepraktikum im Missionsärztlichem Institut, Würzburg

Nov. 2004 bis Feb. 2005

Famulatur im Klinikum Bad Salzungen

s

Frühjahr 2008

Famulatur im Dialysezentrum Würzburg, Virchowstraße

Sommer 2008

Famulatur in der Urologischen Poliklinik der Universität Würzburg

Frühjahr 2009

Famulatur in der Neurologie der Stiftung Juliusspital Würzburg

Sommer 2009

Kenntnisse

sehr gute Kenntnisse in englischer Sprache, gute Computerkenntnisse (Windows, Linux, MacOS, Open Office, MS Office)

Hobbies

Klavierspielen, Fahrradfahren, Schwimmen, Fußball, Typographie