

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Innere Medizin, I. Medizinische Klinik und Poliklinik

Direktor  
Prof. Dr. Ansgar W. Lohse

## **Charakterisierung des inflammatorischen Phänotyps von tumorassoziierten Makrophagen im hepatozellulären Karzinom**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Clara Sonja Lühr  
aus Hamburg

Hamburg 2016

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.07.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. J. Herkel**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. L. Diehl**

Für meine Eltern und meinen Bruder

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>1</b>
<b>Arbeitshypothese und Zielsetzung der experimentellen Arbeit.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Das hepatozelluläre Karzinom .....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Epidemiologie.....	5
1.1.2 Risikofaktoren des hepatozellulären Karzinoms.....	6
1.1.3 Die Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms .....	8
1.1.4 Klinische Aspekte des HCC.....	10
1.1.5 Histopathologische Charakteristika des hepatozellulären Karzinoms .....	12
1.1.6 Metastasierungswege .....	16
<b>1.2 Makrophagen im Überblick.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Tumorassoziierte Makrophagen .....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Übersicht über tumorassoziierte Makrophagen.....	17
1.3.2 Die Rekrutierung von Monozyten in den Tumor .....	18
1.3.3 „Spektrum der Makrophagen“- Die M1/M2-Hypothese.....	18
1.3.4 Der Phänotyp von TAM .....	21
1.3.5 Die Funktionen von TAM.....	22
<b>1.4 TAM im hepatozellulären Karzinom.....</b>	<b>24</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>27</b>
2.1.1 Laborgeräte.....	27
2.1.2 Kunststoff- und Verbrauchsmaterialien, weitere Materialien .....	27
2.1.3 Reagenzien .....	28
2.1.4 Kits .....	30
2.1.5 Antikörper.....	30
2.1.6 Primer.....	30
2.1.7 Puffer und Lösungen .....	31
<b>2.2 Vorbereitung der immunhistochemischen Färbungen .....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Auswahl von HCC-Patienten.....	31

2.2.2 Auswahl geeigneter Makrophagenmarker .....	32
2.2.3 Übersicht über gefärbte Antikörper.....	32
<b>2.3 Abläufe immunhistochemischer Färbungen.....</b>	<b>34</b>
2.3.1 Entparaffinieren .....	34
2.3.2 Demaskierung .....	34
2.3.3 Weiterer Ablauf.....	34
2.3.4 Aufsteigende Alkoholreihe.....	36
2.3.5 Anfertigung von Fotos mit einem digitalen Mikroskop .....	37
<b>2.4 Auswertung der Immunhistochemie .....</b>	<b>37</b>
2.4.1 Schematische Darstellung der ausgewählten Bildausschnitte .....	37
2.4.2 Zellzählungen mit dem Programm <i>ImageJ</i> .....	37
2.4.3 Statistische Auswertung .....	38
<b>2.5 Kultivierung von etablierten Zelllinien .....</b>	<b>39</b>
2.5.1 Die humane Monozytenzelllinie (THP-1 Zellen) .....	39
2.5.2 Humane Zelllinien aus einem HCC .....	39
2.5.3 Kultivierung von Suspensionszellen .....	39
2.5.4 Kultivierung von adhärenenten Zellen .....	40
2.5.5 Zellzählungen in der Neubauer-Zählkammer .....	41
2.5.6 Auftauen und Einfrieren von Zellen .....	41
2.5.7 Herstellung von Zelllysaten .....	42
2.5.8 RNA-Isolation .....	42
2.5.9 Umschreiben der Proben in cDNA .....	43
2.5.10 Durchführung der <i>Real-Time</i> PCR .....	43
<b>2.6 Durchführung von Ko-Kultur-Versuchen .....</b>	<b>44</b>
2.6.1 Ko-Kulturen mit HuH7 Zellen: Expressionsanalyse der THP-1 Zellen.....	44
2.6.2 Ko-Kulturen mit HuH7 Zellen: Immunfluoreszenzfärbungen .....	47
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an humanem HCC- Gewebe.....</b>	<b>49</b>
3.1.1 Vorversuch: Direkter Vergleich der Antikörper in identischen Gewebsarealen .....	52
3.1.2 Serienfärbungen der ausgewählten humanen HCC-Gewebe.....	54

3.1.3 Darstellung einzelner Färbeergebnisse der immunhistochemischen Färbungen .....	57
3.1.4 Zahlenmäßige Verteilung von Makrophagen im Vergleich verschiedener Gewebeareale .....	59
3.1.5 Verteilung von Makrophagen im Vergleich verschiedener Gewebeareale in Abhängigkeit von der Ätiologie .....	61
3.1.6 Verteilung von Makrophagen im Vergleich verschiedener Gewebeareale - Auswertung T-Stadien .....	63
3.1.7 Korrelationsbestimmungen der Anzahl an gezählten Makrophagen .....	65
3.1.8 Kategorieauswertungen der einzelnen Gewebsareale .....	68
<b>3.2 Ergebnisse der Ko-Kulturen mit HCC-Zellen: Expressionsanalyse der Makrophagen .....</b>	<b>68</b>
3.2.1 Pro-monozytäre Zellen im Kontakt mit HCC-Zellen .....	68
3.2.2 Differenzierte Makrophagen im Kontakt mit HCC-Zellen .....	74
<b>3.3 Ergebnisse der Ko-Kulturen mit HCC-Zellen: Immunfluoreszenz.....</b>	<b>80</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1 Makrophagen innerhalb eines HCC lassen sich dem M2-Phänotyp zuordnen .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2 Der M2-Phänotyp von TAM kann durch Tumorzellen des HCC induziert werden.....</b>	<b>88</b>
<b>4.3 TAM-Zahlen innerhalb des HCC und außerhalb des Tumors im Vergleich .....</b>	<b>89</b>
<b>4.4 Keine erhöhten TAM-Zahlen im kapselnahen Tumorbereich .....</b>	<b>92</b>
<b>4.5 Kritische Auseinandersetzungen mit den einzelnen Versuchen und weitere Versuchsoptionen.....</b>	<b>93</b>
4.5.1 Beeinflussung der Ergebnisse der Auszählungen durch angewandtes Zählsystem .....	93
4.5.2 Doppelfärbungen mit mehreren Makrophagenmarkern auf HCC-Gewebe	94
4.5.3 Ergänzung der Ko-Kulturen durch andere HCC-Zelllinien und primäre Makrophagen .....	94
4.5.4 Erhöhung der Fallzahl von HCC-Patienten .....	94
4.5.5 Optimierung der Immunfluoreszenzfärbungen in der Zellkultur .....	95

4.5.6 Erstellung eines Expressionsprofils von den HCC-Zellen der Ko-Kultur ...	95
<b>4.6 Tumorassoziierte Makrophagen als M2-ähnliche Makrophagen im humanen HCC.....</b>	<b>95</b>
<b>4.7 Ausblick .....</b>	<b>97</b>
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>6 Abstract.....</b>	<b>100</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>101</b>
<b>8 Publikationsliste .....</b>	<b>109</b>
<b>9 Danksagung .....</b>	<b>110</b>
<b>10 Lebenslauf .....</b>	<b>111</b>
<b>11 Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>113</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Arg 2	Arginase 2
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
BCLC	Barcelona Clinic Liver Cancer Staging Classification
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CAF	Cancer associated fibroblasts
CCL-2	Chemokin (C-C-Motiv) Ligand 2
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ct	Cycle threshold
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FCS	Fetal calf serum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCL	Salzsäure/Chlorwasserstoff
HCV	Hepatitis C-Virus
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1

HLA-DR	Human leukocyte antigen-DR
HRP	Horseradish peroxidase
HSC	Hepatic stellate cells
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
ITGAM	Integrin alpha M
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
LDL	Low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
Mac-1	Macrophage-1 antigen
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
M-CSFR	Macrophage colony-stimulating factor receptor
MHC II	Major histocompatibility complex II
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MSR1	Macrophage scavenger receptor 1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
ng	Nanogramm
NO	Stickoxid
NOS 2	Nitric oxide synthase 2
OPN	Osteopontin
PBC	Primäre biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Plateled-derived growth factor
PEI	Percutaneous ethanol injection

PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RFA	Radiofrequency ablation
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAM	Tumorassoziierte Makrophagen
TBS-T	Tris-buffered saline and Tween
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNM	Tumor, Lymphknoten, Metastasen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vascular endothelial growth factor
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

---

## Arbeitshypothese und Zielsetzung der experimentellen Arbeit

Entsprechend aktueller Forschungen wird der Phänotyp von tumorassoziierten Makrophagen (TAM) durch die Tumor- und Stromazellen geprägt. Dabei erlangen die TAM Eigenschaften, die insgesamt tumorfördernd wirken. Betrachtet man die TAM mit dem Hintergrund der M1/M2-Charakterisierung, lassen sich TAM in einigen Aspekten einem M2-Phänotyp zuordnen (Solinas et al. 2009).

Diese bisherige Charakterisierung von TAM soll als Grundlage für die Hypothesenbildung dieser Dissertationsarbeit dienen:

1. Makrophagen innerhalb des hepatozellulären Karzinoms (HCC) lassen sich dem M2-Phänotyp zuordnen
2. Der M2-Phänotyp von TAM kann durch Tumorzellen des HCC induziert werden.

Über den genauen Phänotyp von TAM im HCC ist bisher wenig bekannt. Mittels immunhistochemischer Färbungen sollen typische Makrophagenmarker auf humanem HCC-Gewebe gefärbt werden. Aus der Vielfalt existierender charakteristischer Marker sollen einige Antikörper für Serienfärbungen auf humanem HCC-Gewebe etabliert werden.

Außerdem soll in dieser Arbeit eine quantitative Auswertung der Makrophagen im HCC erfolgen. Es soll der Frage nachgegangen werden, ob sich höhere Zellzahlen innerhalb des Tumors oder in den tumorfreien Arealen befinden.

In Ko-Kultur-Experimenten in der Zellkultur soll der Einfluss von HCC-Zellen auf eine humane Monozytenzelllinie untersucht werden und mittels *Real-Time* PCR und Immunfluoreszenz ein breites Spektrum von Makrophagenmarkern und exprimierten Zytokinen analysiert werden. Die Ergebnisse der Zellkulturversuche sollen im Hinblick auf die dargestellte M1/M2-Hypothese interpretiert werden.

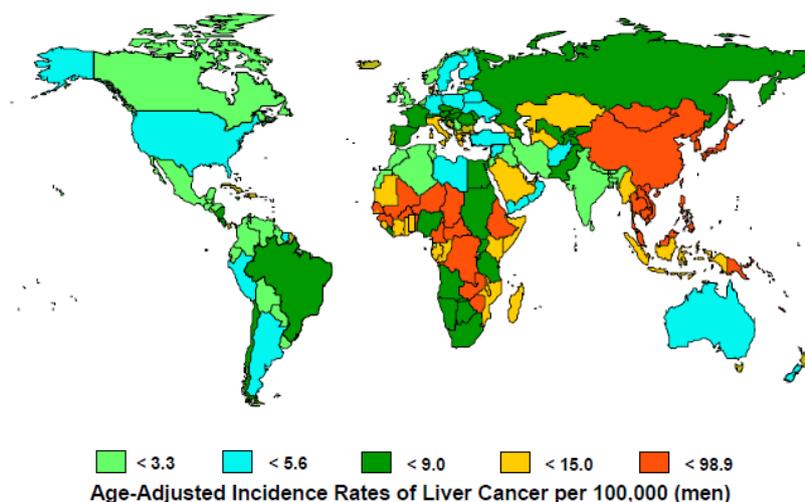
All diese Methoden sollen einen Beitrag dazu leisten, den Phänotyp von TAM im HCC besser zu charakterisieren und ebenfalls die Regulation dieses Phänotyps durch die Tumorzellen besser zu verstehen.

## 1. Einleitung

### 1.1 Das hepatozelluläre Karzinom

#### 1.1.1 Epidemiologie

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) macht den größten Teil aller primären Lebertumore aus (Paradis 2013). Insgesamt gesehen ist das HCC der sechst häufigste Tumor weltweit (Llovet et al. 2012, Mancuso 2013). In entwickelten Ländern handelt es sich beim HCC um eine Tumorerkrankung des höheren Alters, wobei das mediane Erkrankungsalter in diesen Ländern 70 Jahre beträgt (Mancuso 2013). Männer sind wesentlich häufiger von einem HCC betroffen als Frauen (El-Serag & Rudolph 2007, McGlynn et al. 2001). Ein Großteil aller HCC-Erkrankungen tritt in afrikanischen Regionen südlich der Sahara und im Osten Asiens auf (El-Serag 2012). Die Inzidenz des HCC ist regional sehr unterschiedlich. Hohe Inzidenzraten (mehr als 20 Erkrankungsfälle/100 000 Einwohner) sind in südlichen und östlichen Regionen Asiens und auch in Mittelfrika zu verzeichnen (El-Serag 2012). Südeuropäische Länder weisen im globalen Vergleich mittlere Inzidenzraten auf (zwischen 10 und 20 Erkrankungsfällen/100 000 Einwohner) (El-Serag 2012). Eine geringe Inzidenzrate mit weniger als fünf Erkrankungsfällen auf 100 000 Einwohnern wird in Nord- und Südamerika, Ozeanien und Nordeuropa beobachtet (Bruix et al. 2001, El-Serag 2012). Die Abbildung 1.1 zeigt eine Übersicht über die weltweiten Inzidenzraten des HCC.



**Abbildung 1.1:** Inzidenzraten des HCC weltweit. Die Daten beziehen sich auf die männliche Bevölkerung (Bosch et al. 2004).

### 1.1.2 Risikofaktoren des hepatozellulären Karzinoms

Ein sehr großer Teil aller HCCs entsteht auf dem Boden einer Leberzirrhose (Llovet et al. 2003, Lodato et al. 2006). Zu den Haupt-Risikofaktoren gehören virale Hepatitiden, langjähriger Alkoholabusus, nicht-alkoholtoxische Steatohepatitiden, Aflatoxine und die Hämochromatose (Bosch et al. 2004, El-Serag & Rudolph 2007). Regionale Unterschiede in der Gewichtung und der Bedeutung von Risikofaktoren werden in der Analyse der Ätiologie von HCCs ebenfalls deutlich. China weist die höchste Inzidenz dieses primären Karzinoms der Leber auf. Einem Großteil dieser HCC liegt eine chronische Infektion mit dem Hepatitis B-Virus (HBV) zu Grunde. Auch in Afrika liegt als wesentlicher Risikofaktor eine Hepatitis B-Infektion vor. Anders verhält es sich in den USA, wo Infektionen mit dem Hepatitis C-Virus (HCV) eine große Rolle zukommt und auch ein chronischer Alkoholkonsum ätiologisch relevant ist. In Europa liegt bei einem großen Teil der an einem HCC erkrankten Patienten ebenfalls eine chronische Hepatitis C-Infektion vor (Sherman 2005). Im Folgenden wird auf die für diese Arbeit relevanten Risikofaktoren näher eingegangen.

Ein wichtiger Risikofaktor für das HCC ist eine Infektion mit dem Hepatitis C-Virus (Davila et al. 2004, El-Serag & Rudolph 2007). Im Verlauf einer chronischen Erkrankung kann sich eine Zirrhose der Leber entwickeln, die wiederum die Grundlage für die Entstehung eines HCC sein kann (Degos et al. 2000). Bei etwa fünf bis zehn Prozent aller Patienten mit einer Infektion mit dem Hepatitis C-Virus kommt es zehn Jahre nach der Infektion zu einer Leberzirrhose. Dieser Anteil an Patienten, bei denen es im Verlauf der Erkrankung zu einer Zirrhose kommt, ist somit 10 bis 20-fach höher als bei einer Infektion mit dem Hepatitis B-Virus (Farazi & DePinho 2006). Das HCC-Erkrankungsrisiko ist bei Anti-HCV positiv getesteten Patienten etwa zwanzigfach höher als bei Anti-HCV negativen Patienten (Sherman 2005). Durch die Immunantwort der Hepatozyten auf eine Infektion mit dem Virus kommt es zum Zelltod und zu einer verstärkten Regeneration der Hepatozyten mit einem entsprechenden Mutationspotential. Auch die Immunantwort auf die Infektion selbst scheint die Tumorentstehung zu fördern (Farazi & DePinho 2006).

Ein weiterer, auch für diese Arbeit relevanter, Risikofaktor ist ein erhöhter Alkoholkonsum. Eine langjährige Trinkmenge von 50-70 g Alkohol am Tag ist nachweislich ein relevanter Risikofaktor für die Entstehung eines HCC (El-Serag &

Rudolph 2007). Liegt ein Alkoholkonsum von mehr als 80 g täglich über einen Zeitraum von mehr als zehn Jahren vor, verfünffacht sich das Risiko für die Entstehung eines HCC (Davila et al. 2004). Ethanol führt zu einem entzündlichen Geschehen in der Leber und löst über die Rekrutierung von Monozyten inflammatorische Prozesse in der Leber aus. Es kommt zu einer Aktivierung von Kupffer-Zellen, den Makrophagen der Leber, die proinflammatorische Zytokine wie das Interleukin (IL-6), den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und das Prostaglandin E2 sezernieren. Besonders den zytotoxischen Eigenschaften des TNF $\alpha$  gegenüber den Hepatozyten kommt eine Schlüsselrolle im Rahmen einer Destruktion von Hepatozyten und anschließender Regeneration, Aktivierung von *stellate cells*, einer möglichen Zirrhosebildung und Karzinomentstehung zu. Ethanol kann in der Leber oxidativen Stress auslösen und auf diesem Wege eine Fibrose und Zirrhose begünstigen. Außerdem fördert oxidativer Stress die Akkumulation von Mutationen und beeinflusst HCC-typische Signalwege (Farazi & DePinho 2006). Alkohol wird außerdem als positiver synergistischer Risikofaktor diskutiert. Das Risiko an einem HCC zu erkranken ist verdoppelt, wenn zu einem starken Alkoholkonsum eine HCV-Infektion hinzukommt (El-Serag & Rudolph 2007).

Ein HCC kann auch auf dem Grund einer Infektion mit dem Hepatitis B-Virus entstehen (Farazi & DePinho 2006, Ferenci et al. 2010). Das Risiko an einem HCC zu erkranken erhöht sich bei infizierten Patienten um das 5 bis 15-fache im Vergleich mit der Normalbevölkerung (El-Serag & Rudolph 2007). Bei Patienten mit einer Infektion mit dem Hepatitis B-Virus kann sich ein HCC auch ohne eine zu Grunde liegende Zirrhose entwickeln (Llovet et al. 2012). Eine Möglichkeit, das Infektionsrisiko mit dem Hepatitis B-Virus zu senken, stellt eine frühzeitige Impfung gegen Hepatitis B dar (El-Serag & Rudolph 2007).

In asiatischen und afrikanischen Regionen spielt das Mycotoxin Aflatoxin B1, der von dem Pilz *Aspergillus fungus* gebildet wird, eine wichtige Rolle (Llovet et al. 2012). Der Pilz wächst bevorzugt bei feuchtem und warmem Klima auf Getreiden und Nüssen (El-Serag & Rudolph 2007). Aflatoxin B1 führt zu Mutationen im Gen für p53. Außerdem können Onkogene wie z. B. HRAS aktiviert werden (Farazi & DePinho 2006). Das Aflatoxin B1 wird somit als hepatokanzerogen eingestuft. In vielen Ländern geht eine

Kontamination mit Aflatoxin B1 mit einer HBV-Infektion einher (El-Serag & Rudolph 2007).

Es existieren weitere Risikofaktoren für ein hepatozelluläres Karzinom, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll. Zu diesen Faktoren gehören Störungen des Stoffwechsels wie die Hämochromatose, Diabetes mellitus sowie Adipositas (El-Serag & Rudolph 2007). Ein  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangel und die Autoimmunhepatitis stellen weitere relevante Risikofaktoren dar (Ferenci et al. 2010, Llovet et al. 2012).

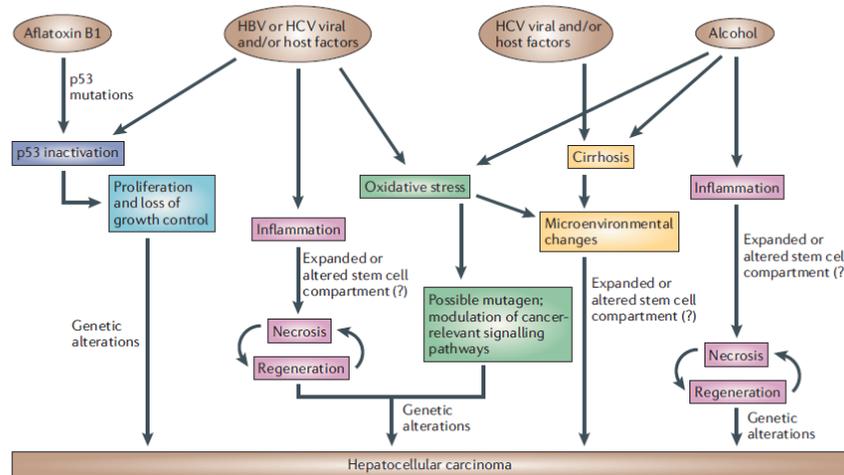
Ein insbesondere in der westlichen Welt wichtiger Aspekt ist die *non-alcoholic fatty liver disease* (NAFLD). Hierbei handelt es sich um eine sehr ausgeprägte Akkumulation von intrahepatischem Fett, ohne dass ethyltoxische Einwirkungen auf das Leberparenchym oder andere Ursachen vorliegen. Diese Lebererkrankung manifestiert sich zunächst als eine gutartige Erkrankung, es kann aber auch über das Stadium der *non-alcoholic steatohepatitis* (NASH) zur Entstehung eines HCC kommen (Ahmed 2015). Ahmed et al. postulieren in ihren Ausführungen, dass die NAFLD zu einer führenden Transplantationsindikation werden könnte, wenn sich die epidemiologischen Daten weiterhin so entwickeln wie bisher (Ahmed 2015). Immunologische Erkrankungen wie die primäre biliäre Zirrhose (PBC) haben in fortgeschrittenen Zirrhosestadien, besonders in männlichen Patienten, ein leicht erhöhtes Risiko ein HCC zu entwickeln (Fattovich et al. 2004). Liegt ein fortgeschrittenes Stadium der primären sklerosierenden Cholangitis (PSC) mit einer biliären Zirrhose vor, kann dieses die Entstehung eines HCC begünstigen (Harnois et al. 1997).

### 1.1.3 Die Pathogenese des hepatozellulären Karzinoms

Die Entstehung eines HCC stellt einen Prozess dar, der über Zwischenstadien verläuft (Oikawa et al. 2005). Oftmals steht ein Entzündungsgeschehen am Beginn dieses Prozesses (Capece et al. 2013). Ein überwiegender Teil der einleitend dargestellten Erkrankungen und Risikofaktoren bewirkt eine Schädigung der Hepatozyten. In der Folge kommt es vermehrt zu Regenerationsprozessen, die zu einer chronischen Lebererkrankung führen. Entstehende hyperplastischen Knoten werden oftmals als Beginn der Entwicklung eines Tumors angesehen, da dieses Gewebe über atypische Knoten im Leberparenchym zu dysplastischen Knoten dedifferenzieren kann. Es

kommt zu einer Zellkernvermehrung und einer Einlagerung von Lipiden und Glykogen in das Zytoplasma von Hepatozyten, sodass die Hepatozyten durch diese Einlagerungen klarzellig erscheinen. Die in gesundem Lebergewebe regelmäßig trabekuläre Struktur wird in dysplastischen Bereichen durch eine Verbreiterung einzelner Trabekel umgebaut (Farazi & DePinho 2006). Zytokine spielen ebenfalls eine wichtige Rolle hinsichtlich der Entstehung und der Progression eines HCC. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass IL-10, IL-12 und IL-2 innerhalb von HCCs hochreguliert wurden (Budhu & Wang 2006). Außerdem konnte der für das Tumorwachstum ebenfalls relevante *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) im Serum von HCC-Patienten signifikant erhöht gemessen werden (Okumoto et al. 2004). Ähnliches gilt auch für das im Entzündungsgeschehen relevante IL-6 (Murphy et al. 2012), das dem entzündlichen Infiltrat entstammt (Capece et al. 2013).

Untersuchungen von HCC-Gewebe legen eine Beeinträchtigung der Regulierung von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen nahe (Farazi & DePinho 2006). Der häufig gefundene Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 kommt beim HCC eine wichtige Bedeutung zu (S Lau & Guan 2005). Das im Wnt-Signalweg wichtige  $\beta$ -Catenin kann ebenfalls mit HCCs in Verbindung gebracht werden. Außerdem konnten Mutationen in der ErbB-Rezeptorfamilie und Methylierungen von bedeutsamen Genen im HCC beschrieben werden (Farazi & DePinho 2006). Die Abbildung 1.2 stellt eine Übersicht über die Risikofaktoren und die relevanten Prozesse dar, die zu einer Karzinomentstehung führen.



**Abbildung 1.2:** Mechanismen der Karzinogenese im Zusammenhang mit dargestellten Risikofaktoren (Farazi & DePinho 2006)

#### 1.1.4 Klinische Aspekte des HCC

Das hepatozelluläre Karzinom verursacht zunächst wenig Symptome. Patienten stellen sich erst vor, wenn die Erkrankung bereits vorangeschritten ist und die Chance auf eine Behandlung mit kurativem Ansatz gering ist. Im Verlauf auftretende Symptome sind Oberbauchschmerz, Gewichtsverlust, eine Hepatomegalie und eine Zunahme des Bauchumfangs. Durch ein verdrängendes Wachstum des Tumors kann Leberparenchym beeinträchtigt werden. Zudem können Lebervenen, die Portalvene oder Gallengänge infiltriert werden. In einem Großteil der Fälle ist die Funktion der Leber durch eine zu Grunde liegende Zirrhose bereits gestört. Patienten zeigen somit das klinische Bild einer dekompensierten Lebererkrankung, die durch eine Zunahme an Aszites, einem Verschlussikterus, Varizenblutungen und einer hepatischen Enzephalopathie gekennzeichnet ist. Einige Patienten stellen sich mit Symptomen eines metastasierten Tumors oder eines paraneoplastischen Syndroms vor. Für Patienten mit schwerwiegenden Symptomen kommt in der Regel keine kurative Therapie in Frage. Die mediane Überlebenszeit beträgt in diesen Fällen einen bis drei Monate (Goodman et al. 2012).

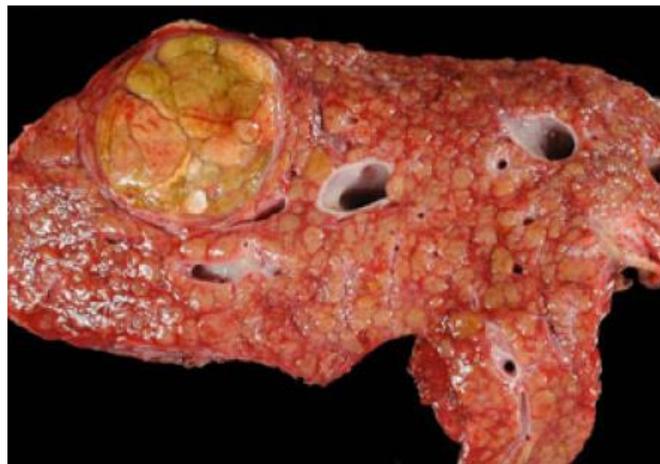
In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden HCCs mittels histologischer Untersuchungen diagnostiziert. Heutzutage ist die Diagnosestellung eines HCC ein weitestgehend radiologischer Prozess (Mancuso 2013). Relevant hierbei sind der Ultraschall, die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT)

und auch die Angiographie (Goodman et al. 2012). In radiologisch unklaren Fällen spielt die Biopsie in der Diagnostik eine zusätzliche Rolle (El-Serag 2011). Zur Verlaufskontrolle und für eine frühe Diagnostik bei Risikopatienten steht der Ultraschall an erster Stelle. Bei Patienten mit einer Leberzirrhose werden Ultraschallkontrollen und eine Messung von Tumormarkern im Serum in halbjährlichen Abständen empfohlen. Wichtig ist außerdem eine Darstellung des Gefäßprofils innerhalb eines HCC, das in der Diagnostik ebenfalls richtungsweisend sein kann (Goodman et al. 2012).

Hinsichtlich der Therapie eines HCC kann zwischen kurativen und palliativen Therapieansätzen unterschieden werden (Mancuso 2013). Liegen solitäre Tumoren und eine gute Leberfunktion vor, ist eine chirurgische Resektion die Erstlinientherapie. Bei solitären Tumoren, die kleiner als 5 cm sind oder bei multiplen Tumoren mit einer Größe von maximal 3 cm ist eine Lebertransplantation die Therapie der ersten Wahl (Llovet et al. 2012). Kommt eine chirurgische Therapie in frühen Krankheitsstadien nicht in Frage, bieten lokale Ablationen mittels hochfrequenten Wellen (*radiofrequency ablation- RFA*) eine Therapiealternative (Llovet et al. 2012). Die Resektion, die Transplantation und die RFA lassen sich den kurativen Therapieansätzen zuordnen (Bruix & Sherman 2011). Ein weiteres lokal einsetzbares Verfahren ist die lokale Injektion mit Ethanol (*percutaneous ethanol injection-PEI*) (Llovet et al. 2012). Eine palliative Therapiemöglichkeit, die in der Behandlung von HCCs zum Einsatz kommt, ist die transarterielle Chemoembolisation (TACE) (Bruix & Sherman 2011). Hierbei werden zytotoxische Substanzen intraarteriell appliziert und anschließend das den Tumor versorgende arterielle Blutgefäß embolisiert. Therapeutisch werden folglich zytotoxische Effekte und die Auswirkungen der lokalen Ischämie ausgenutzt. Für die TACE werden die Chemotherapeutika Cisplatin oder Doxorubicin empfohlen (Llovet et al. 2012). Das palliative Behandlungsspektrum kann durch eine Therapie mit Sorafenib ergänzt werden (Bruix & Sherman 2011). Hierbei handelt es sich um einen oral einsetzbaren Multi-Kinase-Inhibitor (Llovet et al. 2012), der Studien zu Folge die Überlebenszeit im Median um drei Monate im Vergleich zu einem Placebo verlängert (Mancuso 2013).

### 1.1.5 Histopathologische Charakteristika des hepatozellulären Karzinoms

Im makroskopischen Präparat stellen sich hepatozelluläre Karzinome sehr heterogen dar. Neben nekrotischen Arealen können auch hämorrhagische Bereiche in HCCs identifiziert werden. Ein HCC kann einzeln oder auch multipel im Leberparenchym vorliegen und zeigt Größenvariabilitäten von unter 1 cm bis über 30 cm im Durchmesser. Hinsichtlich der makroskopischen Erscheinung kann zwischen nodulären, infiltrativen und diffusen Formen unterschieden werden (Paradis 2013). Das farbliche Aussehen eines HCC kann sich vielgestaltig über lehmfarben bis gelblich, grünlich oder weiß bis gräulich erstrecken (Goodman et al. 2012). Liegt eine Leberzirrhose vor, werden die meisten HCCs von einer fibrösen Kapsel umgeben. In zirrrosefreien Lebern liegen HCCs hingegen ohne umgebene Kapsel vor (Hirohashi et al. 2000). Die Abbildung 1.3 zeigt ein noduläres HCC in einer zirrhotischen Leber.



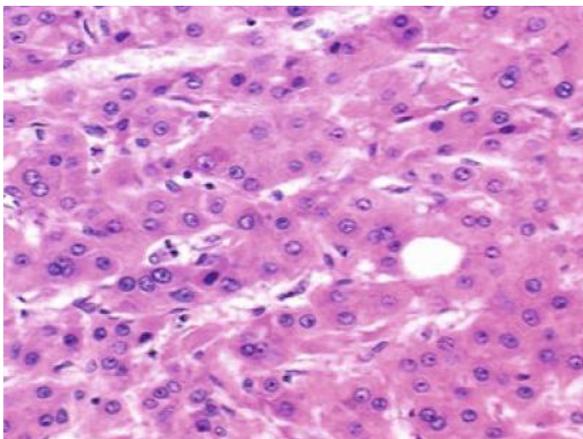
**Abbildung 1.3:** Hepatozelluläres Karzinom in einer zirrhotischen Leber (Paradis 2013)

Die Tumorzellen des HCC ähneln in ihrer mikroskopischen Erscheinung den Hepatozyten der Leber (Hirohashi et al. 2000). Hinsichtlich des Gewebeaufbaus können verschiedene Formen mikroskopisch unterschieden werden. In gut- und mittelmäßig differenzierten HCCs ist eine trabekuläre Anordnung von Tumorzellen die häufigste Form. Die einzelnen Trabekel können in ihrer Breite variieren. Zudem weisen andere hepatozelluläre Karzinome ein drüsenartiges Aussehen auf. Diese Form wird auch als „pseudoglandulär“ oder „azinär“ bezeichnet. In einigen Tumoren ist eine kompakt wirkende Wachstumsform der Tumorzellen vorherrschend. Sinusoidale Strukturen, die Blutgefäße enthalten, sind kaum zu erkennen. Dadurch erlangt das

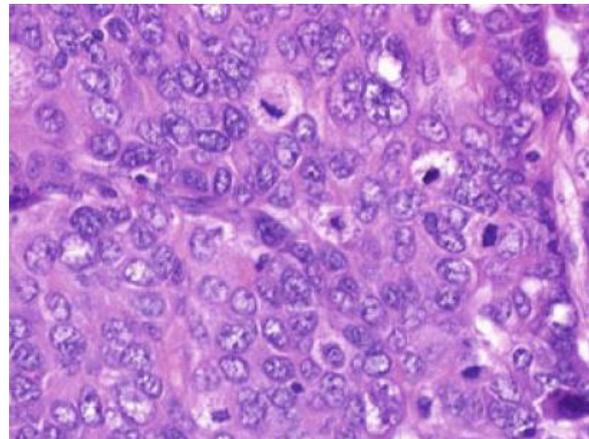
Tumorgewebe ein kompakteres Erscheinungsbild. Auch lassen sich in seltenen Fällen Tumoren durch eine deutlich erkennbare Fibrose entlang der sinusoidalen Strukturen charakterisieren (Hirohashi et al. 2000).

Die Zellkerne des hepatozellulären Karzinoms haben eine rundliche Form und enthalten auffallend deutliche Nukleoli. Das Zytoplasma kann eosinophil und granuliert erscheinen (Paradis 2013). Außerdem ist die Kern-Plasma-Relation zu Gunsten des Kerns verschoben (Goodman et al. 2012).

Es lassen sich außerdem zytologische Varianten beschreiben. Tumoren variieren beispielweise in Größe, Form und Aussehen der Tumorzellen und des Zellkerns. Man spricht in diesem Fall auch von pleomorphen Zellen. Desweiteren gibt es Tumoren, die klarzellige Zelltypen enthalten. Klarzellige Tumorzellen besitzen ein deutlich helleres Zytoplasma, das in großen Mengen Glykogen enthält. Auch Fettgewebe kann in HCC-Geweben mikroskopisch darstellbar sein. Außerdem kann in erweiterten Gallengängen Galle zu erkennen sein. In diesen Fällen erscheint das gesamte HCC-Gewebe in gelblicher Farbe und schlägt bei Formalinfixierung in eine grünliche Farbe um (Hirohashi et al. 2000). In den Abbildungen 1.4a und 1.4b sind zwei histologische Bilder verschiedener hepatozellulärer Karzinome zu erkennen.



**Abbildung 1.4a:** HCC im histologischen Bild (Paradis 2013)



**Abbildung 1.4b:** HCC im histologischen Bild (Paradis 2013)

Bei hepatozellulären Karzinomen lassen sich mehrere Differenzierungsgrade unterscheiden. Dieses Spektrum reicht von gut über moderat bis hin zu schlecht differenzierten Tumoren. Daneben können undifferenzierte Typen erfasst werden (Hirohashi et al. 2000). Für das HCC existieren verschiedene Klassifikationssysteme. Ein relevantes klinisches Klassifikationssystem ist die *Barcelona Clinic Liver Cancer*

*Staging Classification* (BCLC). Hier spielt neben der Ausbreitung des Tumors und des Gesamtzustandes des Patienten auch die Leberfunktion eine Rolle. Zudem können hepatozelluläre Karzinome mittels der TNM-Klassifikation charakterisiert werden (Goodman et al. 2012). Die folgenden Abbildungen geben eine Übersicht über die genannten Klassifikationen.

**Tabelle 1:** TNM-Klassifikation des HCC (Goodman et al. 2012)

T1	Single tumour without vascular invasion
T2	Single tumour with vascular invasion or multiple nodules, none more than 5 cm in greatest dimension
T3a	Multiple tumours >5 cm
T3b	Single tumour or multiple tumours of any size involving a major branch of the portal or hepatic vein
T4	Tumour(s) with direct invasion of adjacent organ other than gallbladder or perforation of visceral peritoneum
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastases
N1	Regional lymph node metastases
M0	No distant metastases
M1	Distant metastases
Stage I	T1 N0 M0
Stage II	T2 N0 M0
Stage IIIA	T3a N0 M0
Stage IIIB	T3b N0 M0
Stage IIIC	T4 N0 M0
Stage IVA	Any T N1 M1
Stage IVB	Any T any N M1

**Tabelle 2:** *Barcelona Clinic Liver Cancer Staging Classification* (BCLC) des HCC (Goodman et al. 2012)

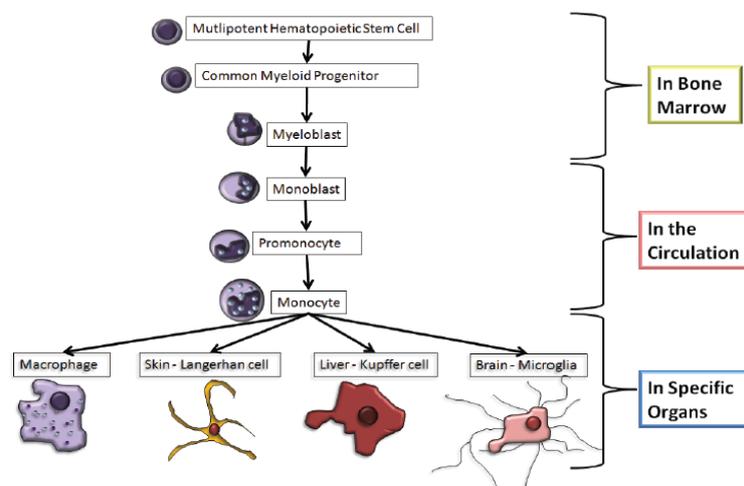
<b>Stage</b>	<b>ECOG performance status</b>	<b>Tumour</b>	<b>Okuda stage</b>	<b>Liver functional status</b>
0 (Very early HCC)	0	Single, <2 cm	I	Child–Turcotte–Pugh class A No portal hypertension Normal bilirubin
<b>A (Early HCC)</b>				
A1	0	Single, any size	I	No portal hypertension Normal bilirubin
A2	0	Single, any size	I	Portal hypertension present Normal bilirubin
A3	0	Single, any size	I	Portal hypertension Elevated bilirubin
A4	0	2 or 3 tumours, all <3 cm	I–II	Child–Turcotte–Pugh class A or B
<b>B (Intermediate)</b>	0	Large, multinodular	I–II	Child–Turcotte–Pugh class A or B
<b>C (Advanced HCC)</b>	1–2 <sup>a</sup>	Vascular invasion <sup>a</sup> or extrahepatic spread	I–II	Child–Turcotte–Pugh class A or B
<b>D (End-stage HCC)</b>	3–4 <sup>b</sup>	Any	IIIb	Child–Turcotte–Pugh class C <sup>b</sup>
a Stage C, either performance status 1–2 or vascular invasion or extrahepatic spread. b Stage D, either performance status 3–4 or Okuda stage III or Child–Turcotte–Pugh class C.				

### 1.1.6 Metastasierungswege

Typisch für ein HCC ist die Invasion des Tumors in umgebende Blutgefäße und die Pfortader. Über die Äste der Pfortader ist zudem eine intrahepatische Metastasierung möglich. Thromben, die sich aus Tumorgewebe zusammensetzen, können in 70% aller Autopsien von an fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinomen leidenden Patienten gefunden werden (Hirohashi et al. 2000). Extrahepatische Metastasen können in unterschiedlichsten Organen identifiziert werden. Der häufigste Ort von extrahepatischen Metastasen ist die Lunge (47%), gefolgt von den Lymphknoten (45%), den Knochen (37%) und der Nebenniere (12%). Auch im Gehirn konnten Metastasen gefunden werden (Uka et al. 2007). Die extrahepatische Metastasierung läuft dabei meistens auf hämatogenem Wege ab (Hirohashi et al. 2000).

### **1.2 Makrophagen im Überblick**

Makrophagen entstammen hämatopoietischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Als Promonozyten werden diese Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ausgeschwemmt und zirkulieren in der Blutbahn. Im Blut differenzieren diese Zellen weiter zu Monozyten (Lewis & Pollard 2006, Rogers & Holen 2011). Diese Monozyten können in Gewebe einwandern und anschließend in Gewebsmakrophagen differenzieren (Lewis & Pollard 2006). Eine Schlüsselrolle in der Reifung der Vorläuferzellen von Makrophagen kommt dem *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) zu (Solinas et al. 2009). Die Abbildung 1.5 gibt einen Überblick über die Entstehung von Makrophagen in den jeweiligen Kompartimenten.



**Abbildung 1.5:** Entstehung von Makrophagen in verschiedenen Kompartimenten (Rogers & Hoken 2011)

Ortsständige Makrophagen sind in vielen Organen des Menschen zu finden. In der Haut sind sie als Langerhans-Zellen, in der Leber als Kupffer-Zellen und im Gehirn als Mikroglia bekannt. Neben weiteren Makrophagen in anderen Organen lassen sich auch die Osteoklasten des Knochens den Makrophagen zuordnen (Pollard 2009). Ortsständige Makrophagen liegen unabhängig von Infektionen in ihrem Zielgewebe vor und sind terminal differenziert. Vergleicht man Makrophagen verschiedener Gewebe, fallen morphologische und phänotypische Unterschiede auf. Entsprechend des umgebenden Mikromilieus exprimieren Makrophagen mannigfaltige Rezeptoren. Neben der Phagozytose und Endozytose sind Makrophagen an der Bildung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderer Metaboliten beteiligt. Außerdem kommt ihnen eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr und auch im Gewebeumbau zu (Gordon & Martinez 2010).

## 1.3 Tumorassoziierte Makrophagen

### 1.3.1 Übersicht über tumorassoziierte Makrophagen

Bereits im 19. Jahrhundert hat Rudolf Virchow Leukozyten in Tumorgeweben beschrieben und somit einen Zusammenhang zwischen chronischen Entzündungen und malignen Prozessen dargestellt (Balkwill & Mantovani 2001). Auch in der näheren Beschreibung von „tumorassoziierten Makrophagen“ ist dieser Zusammenhang von Relevanz. So sind Tumoren mit chronischen Entzündungen assoziiert, die eine Rekrutierung von Zellen des Immunsystems bewirken (Rogers & Hoken 2011).

Tumoren setzen sich aus malignen Zellen und dem Tumorstroma zusammen (Allavena et al. 2008). Das Tumorstroma enthält unter anderem immunkompetente Zellen, Blut- und Lymphgefäße, Fibroblasten, Perizyten und mesenchymale Stammzellen (Rogers & Holen 2011). Zwei wichtige Populationen des Immunzell-Infiltrates stellen Makrophagen und Lymphozyten dar (Allavena et al. 2008). In einigen Tumoren machen diese Infiltrate etwa 50% der gesamten Tumorzellmasse aus (Murdoch et al. 2004). Diese Makrophagen werden auch als „tumorassoziierte Makrophagen“ (TAM) bezeichnet (Balkwill & Mantovani 2001, Murdoch et al. 2004)

### 1.3.2 Die Rekrutierung von Monozyten in den Tumor

Wie auch die bereits beschriebenen Gewebsmakrophagen entstehen TAM aus im Blut zirkulierenden Monozyten. Diese werden durch bestimmte Signalmoleküle in den Tumor gelockt und entsprechend dem umgebenden Mikromilieu geprägt (Solinas et al. 2009). Den Chemokinen mit ihren Untergruppen kommen Schlüsselfunktionen bei der Rekrutierung von Monozyten in das Tumorgewebe zu (Murdoch et al. 2004). Das Chemokin (C-C-Motiv) Ligand 2 (CCL-2) wird als eine treibende Kraft des Rekrutierungsprozesses beschrieben. Dieses Chemokin wird hauptsächlich von Tumorzellen gebildet, aber auch Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen innerhalb eines Tumors sind in der Lage, diese Chemokin zu sezernieren (Shirabe et al. 2012). Daneben sind der *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und weitere CC-Chemokine an einer Rekrutierung von Monozyten in den Tumor beteiligt (Allavena et al. 2008, Lewis & Pollard 2006, Shirabe et al. 2012, Solinas et al. 2009). Rekrutierte Monozyten reichern sich vorzugsweise in hypoxischen Regionen des malignen Gewebes an. Durch Hypoxie werden Faktoren wie der *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1) induziert, die an der Produktion von VEGF und anderen Chemokinen beteiligt sind. Diese Chemokine sind essentiell für eine Wanderung von Makrophagen in hypoxische Areale des Tumors (Murdoch et al. 2004, Sica et al. 2008).

### 1.3.3 „Spektrum der Makrophagen“- Die M1/M2-Hypothese

Makrophagen sind als Zellen des Immunsystems mit vielfältigen Phänotypen beschrieben worden. Schematisch können Makrophagen in M1- und M2-Makrophagen eingeteilt werden (Biswas et al. 2013, Mantovani et al. 2002, Pollard 2009, Shirabe et al. 2012, Solinas et al. 2009). Diese theoretische Beschreibung der M1- und M2-

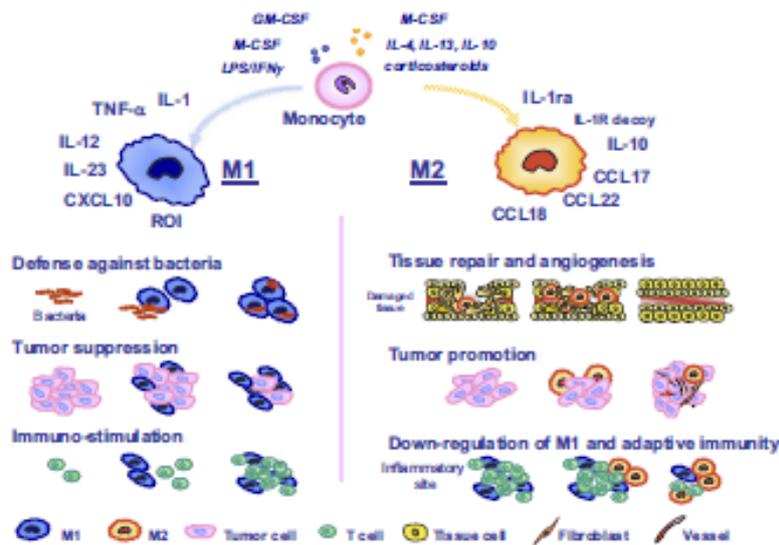
Phänotypen sollte jedoch als eine vereinfachte Darstellung der Extreme eines Kontinuums mit einer großen Heterogenität aufgefasst werden (Biswas et al. 2013, Mantovani et al. 2002, Mantovani, Sica et al. 2004).

Durch die Einwirkung von Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) allein oder in Kombination mit Lipopolysacchariden (LPS) auf der Zelloberfläche von Bakterien, mit Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) oder auch *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) entstehen „klassisch aktivierte“ Makrophagen. Diese werden in der Literatur auch als M1 bezeichnet (Allavena et al. 2008, Solinas et al. 2009). M1-Makrophagen sezernieren die Zytokine Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-23 (IL-23), Interleukin-6 (IL-6) und auch TNF- $\alpha$  (Mantovani, Sica et al. 2004, Solinas et al. 2009). Das immunsuppressive IL-10 wird von M1-Makrophagen nur in sehr geringen Mengen gebildet (Allavena et al. 2008). Eine wichtige Struktur der M1-Makrophagen ist hingegen der *major histocompatibility complex II* (MHC II-Komplex) (Cook & Hagemann 2013). Somit wird eine über Th1-Zellen vermittelte Immunantwort induziert (Allavena et al. 2008). Außerdem sind M1-Makrophagen an einer erhöhten zytotoxischen Aktivität gegenüber Pathogenen und Tumorzellen beteiligt. Sie produzieren vermehrt Stickoxid (NO), reaktive Sauerstoffspezies und wirken als antigenpräsentierende Zellen. Insgesamt gesehen haben M1-Makrophagen eine proinflammatorische Funktion in der Immunantwort, indem sie eine effektive Bekämpfung von Viren, Bakterien und auch Tumorzellen induzieren (Mantovani et al. 2002, Mantovani, Allavena et al. 2004, Solinas et al. 2009).

Den M1-Makrophagen können die „alternativ aktivierten“ M2-Makrophagen gegenübergestellt werden (Solinas et al. 2009). M2 ist ein Oberbegriff für sämtliche Subtypen von Makrophagen, die durch bestimmte Zytokine, Immunkomplexe und LPS oder auch Glukokortikoide induziert werden können (Allavena et al. 2008, Biswas et al. 2013, Solinas et al. 2009). Kommen Monozyten in Kontakt mit IL-4 und IL-13 entstehen M2a-Makrophagen. Ein weiterer Subtyp, M2b, kann mittels Immunkomplexen und Toll-like-Rezeptor-Agonisten induziert werden. Ein M2c-Phänotyp kann durch ein glukokortikoid- und IL-10-reiches Mikromilieu gebildet werden (Allavena et al. 2008, Mantovani, Sica et al. 2004, Solinas et al. 2009). M2-Makrophagen sezernieren neben IL-10 und weiteren Bestandteilen des IL-1-Stoffwechsels viele Zytokine und Chemokine. IL-12, das ein essentielles Produkt des

Zytokinstoffwechsels von M1-Makrophagen darstellt, wird nur in geringen Mengen exprimiert. Auch die Fähigkeit Antigene zu präsentieren, ist bei M2-Makrophagen vermindert. Vielmehr wirken „alternativ aktivierte“ Makrophagen immunregulierend und kontrollieren die von M1-Makrophagen getriggerte Immunantwort (Mantovani et al. 2005, Mantovani, Sica et al. 2004, Solinas et al. 2009). M2-Makrophagen weisen ein von „klassisch aktivierten“ Makrophagen abweichendes Oberflächenrezeptorprofil aus. So werden verschiedene Scavenger-Rezeptoren und Mannose-Rezeptoren auf der Zellmembran exprimiert (Mantovani et al. 2002, 2005, Mantovani, Sica et al. 2004, Solinas et al. 2009). Auch auf der Ebene der Stoffwechselwege zeigen M2-Makrophagen spezifische Charakteristika. Statt einer vermehrten Synthese von NO, kommt es im Argininstoffwechsel zu einer Produktion von Ornithin und Polyamin (Solinas et al. 2009). In ihrer Gesamtheit sind M2- Makrophagen an der Angiogenese, dem Abbau von Zellmaterial, der Wundheilung und am Gewebeumbau beteiligt. Einige Autoren schreiben diesem Phänotyp tumorfördernde Eigenschaften zu (Eljaszewicz et al. 2013, Mantovani et al. 2005, Solinas et al. 2009).

M1- und M2-Makrophagen befinden sich in einer ausgeglichenen Balance. Wird dieses Gleichgewicht gestört, kann es zu Erkrankungen kommen, die aus einer verstärkten Expression eines Phänotyps resultieren. Bei einem Überwiegen des M1-Phänotyps können sich im weiteren Verlauf chronische Entzündungen manifestieren. Zu einer deutlichen immunsuppressiven Wirkung kann es durch eine zu starke M2-induzierte Immunantwort kommen. Auch die Progression von neoplastischen Zellen kann als Resultat eines gestörten Gleichgewichts aufgefasst werden (Eljaszewicz et al. 2013, Solinas et al. 2009). Die Abbildung 1.6 zeigt in einer Übersicht die M1- und M2-Phänotypen. Dabei sind Details über die Entstehung und die jeweiligen Funktionen erkennbar.



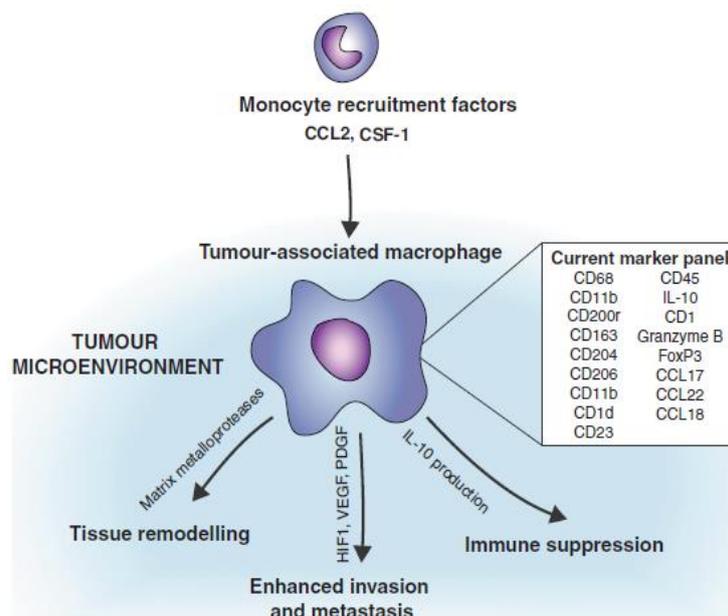
**Abbildung 1.6:** Darstellung der Entstehung von M1- und M2-Makrophagen mit jeweiligen Funktionen der Makrophagen (Solinas et al. 2009)

### 1.3.4 Der Phänotyp von TAM

Durch das biochemische Milieu eines Tumors wird die weitere Differenzierung von Makrophagen beeinflusst. Die einwirkenden Zytokine und viele weitere Moleküle prägen den entstehenden Phänotyp der Makrophagen. Aus einer Vielfalt von möglichen Phänotypen entstehen somit Makrophagen, die auf ihre Funktion im Tumor abgestimmt sind (Allavena et al. 2008, Galdiero et al. 2013, Solinas et al. 2009).

Durch die Abwesenheit von IFN $\gamma$  und LPS fehlen wesentliche Stimuli, um einen M1-Phänotyp zu induzieren. In malignen Geweben sind Th2-Lymphozyten zu finden, die die Zytokine IL-4 und IL-13 sezernieren und somit die Prägung des Phänotyps der Makrophagen beeinflussen. Tumorzellen oder auch regulatorischen T-Zellen sind zudem eine Quelle von IL-10 und TGF $\beta$  (Solinas et al. 2009). Diese Zytokine haben, wie auch IL-4 und bestimmte Prostaglandine, einen Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten. Die unreifen Makrophagen sind somit einem antiinflammatorischen Umfeld innerhalb des Tumors ausgesetzt und es kommt zu einer Phänotypendifferenzierung, die der eines M2-Phänotyps entspricht (Shirabe et al. 2012). Murdoch et al. beschreiben den Phänotyp von TAM in Abhängigkeit des Tumorstadiums. Chronische Entzündungen können ein Ausgangspunkt für maligne Prozesse sein. Hier liegen hauptsächlich „klassisch aktivierte“ Makrophagen vor.

Kommt es zu einer Progression des Tumors, ändert sich der Phänotyp der Makrophagen. Hinsichtlich vieler Merkmale ähneln diese Makrophagen M2-Makrophagen (Murdoch et al. 2008). TAM zeichnen sich durch ein Genexpressions- und Rezeptorprofil aus, das Ähnlichkeiten mit den M2-Makrophagen aufweist (Cook & Hagemann 2013, Rogers & Holen 2011, Shirabe et al. 2012) . Auf der Zelloberfläche von TAM werden Scavenger-Rezeptoren wie beispielsweise CD 163 und CD 204 exprimiert. Neben einer verstärkten Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 lassen sich TAM durch den Mannose-Rezeptor CD 206 charakterisieren (Cook & Hagemann 2013, Rogers & Holen 2011, Shirabe et al. 2012). Von TAM werden kaum inflammatorische Zytokine gebildet und auch die Fähigkeit Antigene zu präsentieren ist schwach ausgeprägt. Gegenüber Tumorzellen haben TAM keine zytotoxische Aktivität (Allavena et al. 2008). Die Abbildung 1.7 gibt einen Überblick über weitere bisher beschriebene TAM- Marker.



**Abbildung 1.7:** Übersicht über aktuelle TAM- Marker und Funktionen innerhalb eines Tumors (Cook & Hagemann 2013)

### 1.3.5 Die Funktionen von TAM

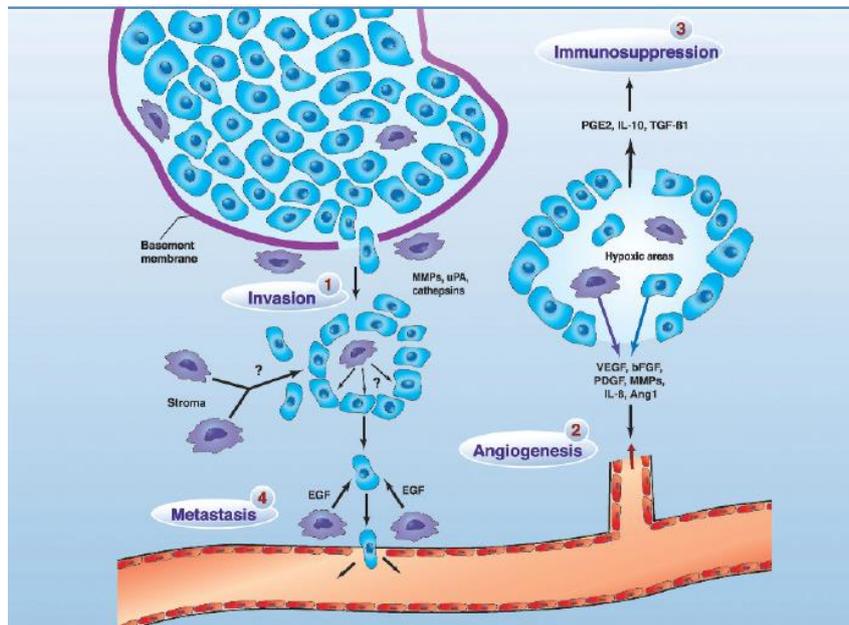
TAM werden vielfältige Funktionen zugeschrieben, die in ihrer Gesamtheit tumorfördernde Bedingungen bewirken (Solinas et al. 2009). Um Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, ist die Angiogenese ein wichtiger Prozess (Lewis & Pollard 2006). TAM sezernieren neben Zytokinen (Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ,

IL-8, IL-10) und Wachstumsfaktoren (VEGF, PDGF) weitere Faktoren, die die Neubildung von Blutgefäßen fördern. Eine wichtige Rolle kommt dabei auch den Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) zu. Der Zusammenhang zwischen der Angiogenese und TAM wird ebenfalls dadurch deutlich, dass eine Anreicherung von TAM in hypoxischen Bereichen des Tumors stattfindet und daraufhin die Angiogenese gefördert wird (Allavena et al. 2008, Lewis & Pollard 2006, Murdoch et al. 2008, Solinas et al. 2009).

Neben der Angiogenese fördern TAM die Invasion von Tumorzellen und den Prozess der Metastasierung (Solinas et al. 2009). In einigen Tumoren konnten hohe Zellzahlen von TAM mit einem früheren Beginn einer Metastasierung in Verbindung gebracht werden (Lewis & Pollard 2006). Durch die Freisetzung von Chemokinen, MMPs und weiteren Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF) durch TAM wird auch der Prozess der Metastasierung gefördert (Biswas et al. 2013, Mantovani & Sica 2010). Außerdem wird aufgrund eines kontinuierlichen Gewebeumbaus, der ebenfalls von Makrophagen getriggert wird, den Tumorzellen eine Invasion in umliegendes Gewebe und der Prozess der Metastasierung erleichtert (Solinas et al. 2009).

In gesunden Geweben sind Makrophagen in der Lage, tumorassoziierte Antigene zu präsentieren. In der Folge kommt es zu zytotoxischen Reaktionen gegen die Tumorzellen. TAM fehlt diese Eigenschaft entsprechend ihrer Prägung durch das Mikromilieu im Bereich des Tumors. Die zytotoxische Aktivität der TAM wird von sezernierten Produkten des Tumors vermindert. Dabei spielen eine Reihe von Zytokinen (IL-4, IL-6, IL-10, TGF $\beta$ ) und Prostaglandine eine Rolle (Lewis & Pollard 2006). Ein weiteres Charakteristikum von TAM ist die verminderte Expression des MHC-II Komplex (Allavena et al. 2008, Lewis & Pollard 2006). Auch durch eine im Tumor häufig vorkommende Hypoxie kann durch Stimulation von Prostaglandinen und IL-10 die zytotoxische Immunantwort der TAM inhibiert werden (Lewis & Pollard 2006).

Die Abbildung 1.8 soll die dargestellten Funktionen in Wechselwirkung mit dem Tumorumfeld darstellen.



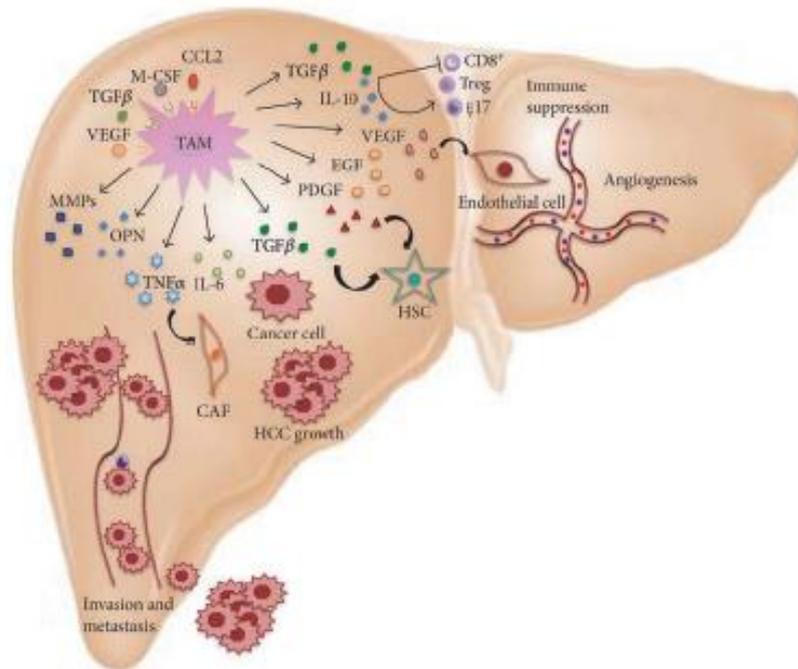
**Abbildung 1.8:** Schematische Darstellung der tumorfördernden Funktionen von TAM (Lewis & Pollard 2006)

### 1.4 TAM im hepatozellulären Karzinom

TAM stellen einen wichtigen Teil des leukozytären Infiltrates in einigen Tumoren dar (Mantovani et al. 2008). Andere Autoren charakterisieren TAM als wichtigen Bestandteil innerhalb des Wechselspiels zwischen Tumor- und Stromazellen (Capece et al. 2013). Wie auch andere Gewebsmakrophagen entstammen TAM innerhalb eines HCC monozytären Vorläuferzellen, die durch bestimmte Chemokine und andere Faktoren in den Tumor gelockt werden. Bei dem Rekrutierungsprozess in ein HCC spielen von Tumorzellen sezernierte Wachstumsfaktoren wie der VEGF, der *platelet-derived growth factor* (PDGF), der TGF-β und CC-Chemokine eine wichtige Rolle (Capece et al. 2013). Auch der M-CSF ist von erheblicher Relevanz für die Rekrutierung (Capece et al. 2013, Zhu et al. 2008).

TAM zeigen im hepatozellulären Karzinom eine Hochregulierung M2-assoziiierter Gene. Dies gilt unter anderem für den bereits als M2-Marker vorgestellten Scavenger-Rezeptor CD 163 (Capece et al. 2013). Peng et al. ordnen den TAM im HCC angiogenesefördernde Eigenschaften zu. Deutlich wird dies an einer korrelierenden hohen Makrophagenzahl mit der Dichte von Blutgefäßen im HCC-Gewebe (Peng et al.

2005). Die Rekrutierung von TAM in den Tumor kann als ein essentielles Ereignis aufgefasst werden, da durch die Sekretionsprodukte von TAM ein insgesamt tumorförderndes Milieu geschaffen wird. Auf diesem Wege haben die TAM Einfluss auf das Tumorstadium, die Invasion und auch die Metastasierung des HCC (Capece et al. 2013). Die Abbildung 1.9 gibt einen Überblick über die vielfältigen Funktionen von TAM im HCC.



**Abbildung 1.9:** TAM mit ihren vielfältigen Funktionen in einem hepatozellulären Karzinom (Capece et al. 2013)

Ein weiterer Aspekt, der auch Gegenstand dieser Arbeit ist, ist die Frage nach der genauen Verteilung von Makrophagen im HCC. Bis auf einige Hypothesen über die peritumorale Häufung ist das Verteilungsmuster von TAM bisher noch nicht exakt definiert. Vergleicht man die quantitative Verteilung von Makrophagen innerhalb des HCC-Gewebes mit dem peritumoralen Bereich, fallen Unterschiede auf. Lapis et al. konnten mittels immunhistochemischen Färbungen (CD 68) zeigen, dass außerhalb des HCC mehr Makrophagen zu finden sind, als innerhalb des malignen Gewebes (Lapis et al. 1995).

Einige Charakteristika von TAM im HCC könnten hinsichtlich therapeutischer Ansätze an Relevanz gewinnen. Zurzeit ist der genaue Phänotyp von TAM im HCC jedoch noch unklar, sodass insbesondere die Erstellung eines Expressionsprofils von TAM von großer Wichtigkeit ist. Auf dem Boden neuer Erkenntnisse, könnten neue

Therapieansätze etabliert werden. Shirabe et al. nennen eine Hemmung der Rekrutierung von Makrophagen in das HCC, eine Hemmung der Polarisierung in Richtung M2 sowie eine Hemmung tumorfördernder Eigenschaften von TAM als mögliche Therapieansätze (Shirabe et al. 2012). Erste Effekte auf die Angiogenese und das Tumorwachstum konnten in Tumormodellen unter anderem durch den Einsatz von Aminobisphosphonaten gezeigt werden (Shirabe et al. 2012). Zudem konnte in HCC-Mausmodellen nachgewiesen werden, dass eine Gabe von Sorafenib in einer Kombination mit der Depletion von Makrophagen mittels liposomalem Clodronat oder Zolidronsäure das Tumorwachstum, die Metastasierung und auch die Angiogenese signifikant gehemmt werden können (Zhang et al. 2010).

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Autoklav VX-120	Systec, Wetztenberg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Digitales Mikroskop: BZ-9000	KEYENCE, Neu-Isenburg
Laborwaage	Kern, Balingen-Frommern
Mikroskop: Wiluvert	Helmut Hundt GmbH, Wetzlar
Mikrowellengerät	Bosch, Gerlingen
Pipetten	Gilson, Villiers-Le-Bel, Frankreich
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
<i>Real-Time</i> -PCR-Gerät: Step One Plus	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Spektrophotometer: Nano Drop 2000	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Stickstofftank	Custom BioGenic Systems, Michigan, USA
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpe: Integra Vacusafe	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Vortex VF2	Janke & Kunkel, Staufen
Zellkulturbank	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge: Minifuge RF	Heraeus, Hanau

#### 2.1.2 Kunststoff- und Verbrauchsmaterialien, weitere Materialien

15 ml Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
24-Well-Schalen	Thermo Scientific Nunc, Schwerte
50 ml Reaktionsgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6-Well-Schalen	Sarstedt, Nümbrecht
Coverplates	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Deckgläschen (Immunfluoreszenz)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen (Immunhistochemie)	Carl Roth, Karlsruhe
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg

Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Glaspasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Thermo Scientific Nunc, Schwerte
Laborglasflaschen	DURAN Group GmbH, Mainz
Micro-Amp Fast Optical 96-Well Plate	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Nalgene/Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Slide rack	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Transwells für 24-Well-Schale (Porengröße: 0,4 µm)	Costar/Corning, Massachusetts, USA
Transwells für 6-Well-Schale (Porengröße: 0,4 µm)	Costar/Corning, Massachusetts, USA
Zellkulturflasche T175	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflasche T75	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.3 Reagenzien

1%iges Penicillin G/ Streptomycin	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
20X TBS Tween-20	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Bluing Reagent	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Bovines Serumalbumin, Fraktion 5	PAA/GE Healthcare Europe GmbH, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA-Aldrich, St.Louis, USA

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol „Baker analyzed“	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Eukitt	O. KINDLER GMBH& CO, Freiburg
Fetales Kälberserum (FCS) 10%	PAA/GE Healthcare Europe GmbH, München
Interferon $\gamma$	PeptoTech, Hamburg
Interleukin-13	PeptoTech, Hamburg
Interleukin-4	PeptoTech, Hamburg
Lab Vision Mayer`s Hematoxylin	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Lipopolysaccharid (LPS)	PeptoTech, Hamburg
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Carl Roth, Karlsruhe
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	SIGMA-Aldrich, St.Louis, USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-Medium	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Triton	SIGMA-Aldrich, St.Louis, USA
Trypanblau 0,4%	SIGMA-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsin	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Tween 20	SIGMA-Aldrich, St.Louis, USA
VECTASHIELD HardSet Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Kalifornien, USA
Vollentsalztes Wasser	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Xylol	Chemsolute, Renningen
$\beta$ -Mercaptoethanol	SIGMA-Aldrich, St.Louis, USA

2.1.4 Kits

Fast SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems/Life technologies, Darmstadt
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche, Mannheim
NucleoSpin TriPrep	MACHERY-NAGEL, Düren
Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

2.1.5 Antikörper

ALEXA Fluor 555 Goat Anti-Mouse	Life Technologies, Darmstadt
ALEXA Fluor 555 Goat Anti-Rabbit	Life Technologies, Darmstadt
Anti-ITGAM (CD11b)	SIGMA-Aldrich, St.Louis, USA
CD 14	Epitomics, Kalifornien, USA
CD 163 (Immunfluoreszenz)	AbD Serotec, Purchheim
CD 163 (Immunhistochemie)	Novocastra/ Leica, Newcastle, Großbritannien
CD 204 (MSR-1)	SIGMA-Aldrich, St.Louis, USA
CD 206	AbD Serotec, Purchheim
CD 68 (Immunfluoreszenz)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
CD 68 (Immunhistochemie)	DAKO, Glostrup, Dänemark
HLA-DR	Ebioscience, Frankfurt

2.1.6 Primer

Arginase 2	QIAGEN, Hilden
CD 14	QIAGEN, Hilden
CD 115	QIAGEN, Hilden
CD 163	QIAGEN, Hilden
CD 204	QIAGEN, Hilden
GAPDH	QIAGEN, Hilden
IL-10	QIAGEN, Hilden
IL-6	QIAGEN, Hilden

IL-8	QIAGEN, Hilden
MHC-II	QIAGEN, Hilden
MMP-9	QIAGEN, Hilden
NOS 2	QIAGEN, Hilden

### 2.1.7 Puffer und Lösungen

- Phosphate-buffered saline (PBS)
  - steril, Gibco/Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
  - ohne Calcium, Magnesium und Phenolrot
- PBS zehnfach Stock Solution:
  - NaCl 80 g, KCl 2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14,4 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,72 g
  - mit vollentsalztem Wasser auf 800 ml auffüllen und den pH auf 7,4 einstellen (mit HCL)
  - auf einen Liter auffüllen und autoklavieren
- TrisEDTA pH 9:
  - Tris 1,21 g, EDTA 0,37 g
  - mit vollentsalztem Wasser auf einen Liter auffüllen
  - Zugabe von 0,5 ml Tween 20 und gut mischen

## **2.2 Vorbereitung der immunhistochemischen Färbungen**

Um antigene Strukturen auf Geweben nachzuweisen, kann man sich die Eigenschaften der Immunhistochemie zunutze machen. Diese Methode stellte einen wesentlichen Aspekt dieser Arbeit in der Darstellung gewünschter immunologisch reaktiver Strukturen auf tumorassoziierten Makrophagen dar.

### 2.2.1 Auswahl von HCC-Patienten

Für die immunhistochemischen Färbungen auf humanem HCC-Gewebe, standen Paraffinschnitte mit einer Dicke von zwei µm aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung. Zuvor wurde eine Auswahl von Patienten durchgeführt. Es handelte sich um männliche Patienten, die an einem HCC erkrankt sind und sich im Zeitraum zwischen 2008 und 2010 einem resezierenden Eingriff unterzogen haben. Ätiologisch lag bei den Patienten eine HCV-Infektion oder ein alkoholtoxischer Leberschaden zugrunde. Ein weiteres

Patientenkriterium war das Fehlen einer Vorbehandlung mittels einer transarteriellen Chemoembolisation (TACE).

### 2.2.2 Auswahl geeigneter Makrophagenmarker

Im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen sollten Makrophagen im Tumorgewebe eines HCC dargestellt werden. Um einen Überblick über verschiedene in Frage kommende Makrophagenmarker zu bekommen, wurden Vorversuche mit klassischen Antikörpern durchgeführt. Mit dem im Folgenden beschriebenen Standardprotokoll wurden CD 14, CD 163, CD 204, CD 206, HLA-DR und CD 11b gefärbt. Weitere Details zu den einzelnen gefärbten Strukturen werden an anderer Stelle im Methodenteil dargestellt.

Aus allen etablierten immunhistochemischen Vorfärbungen wurden drei Marker für die Serienfärbungen der humanen Gewebe ausgewählt. Neben dem Pan-Makrophagenmarker CD 68 wurden die Scavenger-Rezeptoren CD 163 und CD 204 gefärbt. Letztere sind als klassische TAM-Marker beschrieben worden (Cook & Hagemann 2013).

### 2.2.3 Übersicht über gefärbte Antikörper

Um den inflammatorischen Phänotyp von Makrophagen in humanem HCC-Gewebe genauer zu charakterisieren, wurden charakteristische Makrophagenmarker auf humanem HCC-Gewebe mittels spezifischer Antikörpern gefärbt. Die bereits aufgelisteten Makrophagenmarker sollen an dieser Stelle hinsichtlich ihrer immunologischen und biochemischen Funktion näher beschrieben werden.

CD 14 ist auf der Zelloberfläche von Makrophagen, dendritischen Zellen und neutrophilen Granulozyten zu finden. Dieser Rezeptor erkennt LPS im Komplex mit dem LPS-bindenden Protein. LPS ist ein essentieller Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien (Murphy et al. 2012).

CD 68 ist ein Glykoprotein, das von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, Basophilen und Lymphozyten exprimiert wird. Eine andere Bezeichnung für dieses Glykoprotein ist Makrosialin (Murphy et al. 2012). Auch einige Zellorganellen wie Lysosomen und auch Phagosomen sind in der Lage, dieses Glykoprotein zu bilden (S K Lau et al. 2004).

CD 163 ist ebenfalls ein Glykoprotein, das den Scavenger-Rezeptoren zugeordnet werden kann. Dieser Rezeptor erkennt einen Komplex aus Hämoglobin und Haptoglobin. CD 163 wird auf der Zelloberfläche von Monozyten und Makrophagen exprimiert (S K Lau et al. 2004).

Auf myeloiden Zellen ist der *macrophage scavenger receptor 1* (MSR1) zu finden. Dieser Rezeptor ist ebenfalls unter dem Namen CD 204 geläufig (Murphy et al. 2012). Der MSR1 lässt sich den Scavenger-Rezeptoren der Klasse A zuordnen (Saito et al. 2014).

CD 206 ist ein Mannose-Rezeptor und befindet sich auf der Zelloberfläche von Makrophagen und Endothelzellen. Das Glykoprotein erkennt Mannose-Strukturen auf der Zelloberfläche von Pathogenen, wie Bakterien, Pilzen und Viren. Außerdem wird vermutet, dass dieser Rezeptor bei Abbauprozessen von körpereigenen Glykoproteinen eine wichtige Rolle spielen könnte (Murphy et al. 2012).

Antigene werden dem T-Zell-Rezeptor durch den MHC präsentiert. Hierbei wird zwischen zwei großen Gruppen unterschieden. MHC I ist auf allen Zellen des Körpers zu finden. Eine Ausnahme stellen hierbei Erythrozyten dar. MHC II-Moleküle, die in unseren immunhistochemischen Färbungen dargestellt wurden, sind auf bestimmten Zellen des Immunsystems zu finden. Dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen und Epithelzellen aus der Rinde des Thymus tragen den MHC II-Komplex. Mittels MHC-II werden den T-Zellen Antigene präsentiert und auf diese Weise komplexe Immunreaktionen aktiviert. Beim Menschen werden MHC-Moleküle als *human leucocyte antigen* (HLA) bezeichnet. Die sich zu HLA-Molekülen zusammensetzenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten werden von drei verschiedenen Genen codiert. Diese werden auch als HLA-DR, HLA-DP- und HLA-DQ bezeichnet. Der verwendete Antikörper in dieser Arbeit war spezifisch für HLA-DR (Murphy et al. 2012).

Für eine weitere Färbung wurde ein Antikörper gegen ITGAM verwendet. Das Gen ITGAM codiert für CD 11b, das die  $\alpha$ -Untereinheit des  $\beta$ 2-Integrins Mac-1 (Komplementrezeptor) darstellt (Zhou et al. 2013). Dieser Rezeptor vermag an Bestandteile des Komplementsystems zu binden und trägt somit zu einer effektiven Abwehr von Pathogenen bei (Murphy et al. 2012).

## 2.3 Abläufe immunhistochemischer Färbungen

Diesem endgültigen Färbeprotokoll liegen Vorversuche zugrunde, die mitsamt ihren Ergebnissen und technischen Besonderheiten zu einer Etablierung dieses Protokolls beigetragen haben. Insgesamt wurden CD 14, CD 68, CD 163, CD 204, CD 206, MHC II und CD 11b auf humanem Lebergewebe gefärbt.

### 2.3.1 Entparaffinieren

Der erste Schritt war die Überführung in ein wässriges Milieu der in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte. Der absteigenden Alkoholreihe gingen drei jeweils dreiminütige Inkubationen in reinem Xylol voraus. Anschließend wurden weitere Glasküvetten mit 100, 90, 70 und 50%igem Ethanol befüllt und die Objektträger in jeder Küvette für fünf Minuten inkubiert. Die nun entwässerten und entparaffinierten Gewebeschnitte wurden für einige Minuten in vollentsalztes Wasser überführt.

### 2.3.2 Demaskierung

Durch die Fixierung mit Formalin und Verarbeitung mit Paraffin sind zu färbende Antigene in ihrer Struktur verkettet und für viele Antikörper nicht detektierbar. Aus diesem Grund erfolgt in vielen Laboren eine enzymatische oder hitzeinduzierte Demaskierung des Paraffingewebes. Die Demaskierung ist auch unter dem Begriff *antigen-retrieval* bekannt. Für die genannten Antikörper kam in unseren Versuchen ein hitzeinduziertes *antigen-retrieval* zum Einsatz. Als optimaler Demaskierungspuffer wurde TrisEDTA mit dem pH-Wert 9 ermittelt. Zunächst wurde der Puffer in der Mikrowelle bei 900 Watt zum Kochen gebracht und anschließend die Objektträger mit den zu färbenden Geweben in den erhitzten Puffer gestellt. Die Schnitte wurden nun für 15 Minuten bei 600-900 Watt gekocht. Morphologisch gute Ergebnisse entstehen bei raschem Abkühlen nach dem *antigen-retrieval*. Aus diesem Grund wurde die Küvette für zehn Minuten auf Eis gestellt.

### 2.3.3 Weiterer Ablauf

Die gesamte Färbung wurde mit den Reagenzien des *Ultra Vision Quanto Detection System HRP DAB* durchgeführt. Als Waschpuffer für die Färbung wurde eine gebrauchsfertige Stock-Lösung des Puffers *Tris-buffered saline* und *Tween* (TBS-T) im Verhältnis 1:20 mit vollentsalztem Wasser verdünnt.

Nach dem Abkühlen wurden die nun demaskierten Schnitte in TBS-T überführt und für weitere zehn Minuten in diesem Waschpuffer belassen.

Um die Färbung durchzuführen wurden die Objektträger auf *Coverplates* aufgelegt und in die dafür vorgesehene Haltevorrichtung eingesetzt. Bei diesen *Coverplates* handelte es sich um Haltevorrichtungen aus Kunststoff, auf die ein Objektträger mit dem Gewebeschnitt aufgesetzt werden konnte. Zwischen dem zu färbendem Gewebe und dem *Coverplate* entstand ein Kapillarspalt, in den Reagenzien gegeben werden konnten. Entlang dieses Kapillarspalt verteilten sich die Reagenzien gleichmäßig über dem Gewebe. Nach dem Einsetzen aller *Coverplates* in der Haltevorrichtung schloss sich ein Waschvorgang mit TBS-T an. Hierfür wurden die *Coverplates* jeweils mit Puffer aufgefüllt und ein Abfließen der Flüssigkeit durch den Kapillarspalt abgewartet.

Um unspezifischen Hintergrund durch endogene Peroxidasen zu vermeiden, wurden jeweils drei Tropfen eines industriell erworbenen Peroxidase-Blocks in den Kapillarspalt appliziert und für zehn Minuten inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit TBS-T. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, wurde an dieser Stelle eine Blocklösung in den Kapillarspalt gegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde unmittelbar der Antikörper in der ermittelten Verdünnung auf den Objektträger gegeben. Für den Antikörper gegen CD 68 erwies sich eine Verdünnung von 1:100 als optimal. Für CD 204 war dies der Fall bei einer Verdünnung von 1:125 und bei CD 163 erfolgte die Verdünnung in einem Verhältnis von 1:100. Um die Antikörper zu verdünnen, wurde die im beschriebenen Färbekit enthaltene Lösung verwendet. Von der Antikörperlösung wurden 150 µl pro *Coverplate* auf den Kapillarspalt gegeben. Die Inkubation der Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde. Zwei Waschschrte mit TBS-T schlossen sich an.

Um das Farbsignal zu generieren, war ein zweiter Antikörper nötig, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet. In diesem Falle handelte es sich um einen *antibody amplifier*, der gezielt an Antikörper aus dem Kaninchen und der Maus bindet. Etwa drei Tropfen dieser gebrauchsfertigen Lösung wurden auf jeden Kapillarspalt gegeben und für zehn Minuten einwirken gelassen. Zwei Waschschrte schlossen sich diesem Vorgang an.

Der immunhistochemischen Färbereaktion liegt eine enzymatische Reaktion zugrunde. Dieses Enzym, das unter Hinzugabe des spezifischen Substrats eine spezifische Färbereaktion auslöst, ist an den zweiten Antikörper gebunden. Für den Ablauf der Färbung erfolgte eine Kopplung des *antibody amplifiers* mit *horseradish peroxidase* (HRP) durch eine zehnmünütige Inkubation mit einer HRP-Lösung aus dem Kit. Die HRP stellt das Enzym für die anschließende Farbreaktion dar. Als Färbechromogen dient das 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), das folgendermaßen verdünnt wurde: In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde 1 ml einer gebrauchsfertigen Verdünnungslösung gegeben. Aus einer kleinen Tropfflasche wurde exakt ein Tropfen zu der Verdünnungslösung gegeben und gut durchmischt. Für eine zehnmünütige Inkubation wurden 150 µl auf den jeweiligen Kapillarspalt gegeben. Eine Inkubationszeit mit DAB von zehn Minuten hat sich für die durchgeführten Färbungen als optimal erwiesen. Wurde eine stärkere oder schwächere Intensität der Färbung gewünscht, konnte die Inkubationszeit entsprechend angepasst werden. Um die Färbereaktion zu stoppen, wurden die Kapillarspalte vollständig mit vollentsalztem Wasser aufgefüllt und nach dem regelrechten Abfließen mit TBS-T gewaschen. Der regulären immunhistochemischen Färbung schloss sich eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin an, um weitere Strukturen des Gewebes histologisch beurteilen zu können. Durch diese Art der Gegenfärbung erschienen sämtliche Zellstrukturen in einem unterschiedlich starken Blau. Für die Gegenfärbung wurde Hämatoxylin im Verhältnis 1:5 mit vollentsalztem Wasser verdünnt und für zwei Minuten inkubiert. Nach einem Waschschrift mit Wasser wurde gebrauchsfertiges *bluing reagent* für 30 Sekunden auf den jeweiligen Kapillarspalt gegeben und anschließend die Objektträger aus den *Coverplates* entfernt.

### 2.3.4 Aufsteigende Alkoholreihe

Für eine Entwässerung nach der Färbung wurden die Objektträger mit den gefärbten Gewebeschnitten in eine aufsteigende Alkoholreihe sowie in Xylol überführt.

### Eindeckeln

Zur Abdeckung der gefärbten Gewebeschnitte wurde das Schnelleinschlussmittel Eukitt verwendet und schlussendlich ein Deckgläschen luftblasenfrei auf den Objektträger gelegt.

### 2.3.5 Anfertigung von Fotos mit einem digitalen Mikroskop

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen stand ein digitales Mikroskop zur Verfügung. Die Qualität und das Verteilungsmuster der erfolgten Färbungen wurden in verschiedenen Vergrößerungen begutachtet. Besonderes Augenmerk wurde auf die Bereiche innerhalb des HCC, auf kapselnahe Tumorbereiche und auf tumorfremde Areale gelegt. Zwecks manueller Zellzählung und anschließender statistischer Auswertungen der Färbungen wurden aus jedem der genannten Bereiche jeweils zehn Fotos mit dem Mikroskop aufgenommen. Um genauere Aussagen über die Struktur des Gewebes und die genaue Anordnung der Makrophagen im Lebergewebe zu machen, wurde für die Fotos die 40fache Vergrößerung gewählt. Mittels eines *quick full focus*-Modus wurden die Gewebeschnitte scharf gestellt und mit einer Autofunktion kontrastreich dargestellt. Die Belichtungszeit bei allen Fotos betrug  $\frac{1}{18}$  Sekunden. Durch eine zuvor erfolgte Übersichtsaufnahme konnte vermieden werden, dass Bereiche mehrfach fotografiert wurden.

## **2.4 Auswertung der Immunhistochemie**

### 2.4.1 Schematische Darstellung der ausgewählten Bildausschnitte

Pro Färbung und pro Patient wurden Bereiche innerhalb des Tumors, im kapselnahen Tumorbereich und außerhalb des Tumors ausgewertet. Die Abbildung 2.1 zeigt beispielhaft die ausgewerteten Bereiche. Die umrahmten Bildabschnitte wurden vergrößert und zur Zellzählung herangezogen.

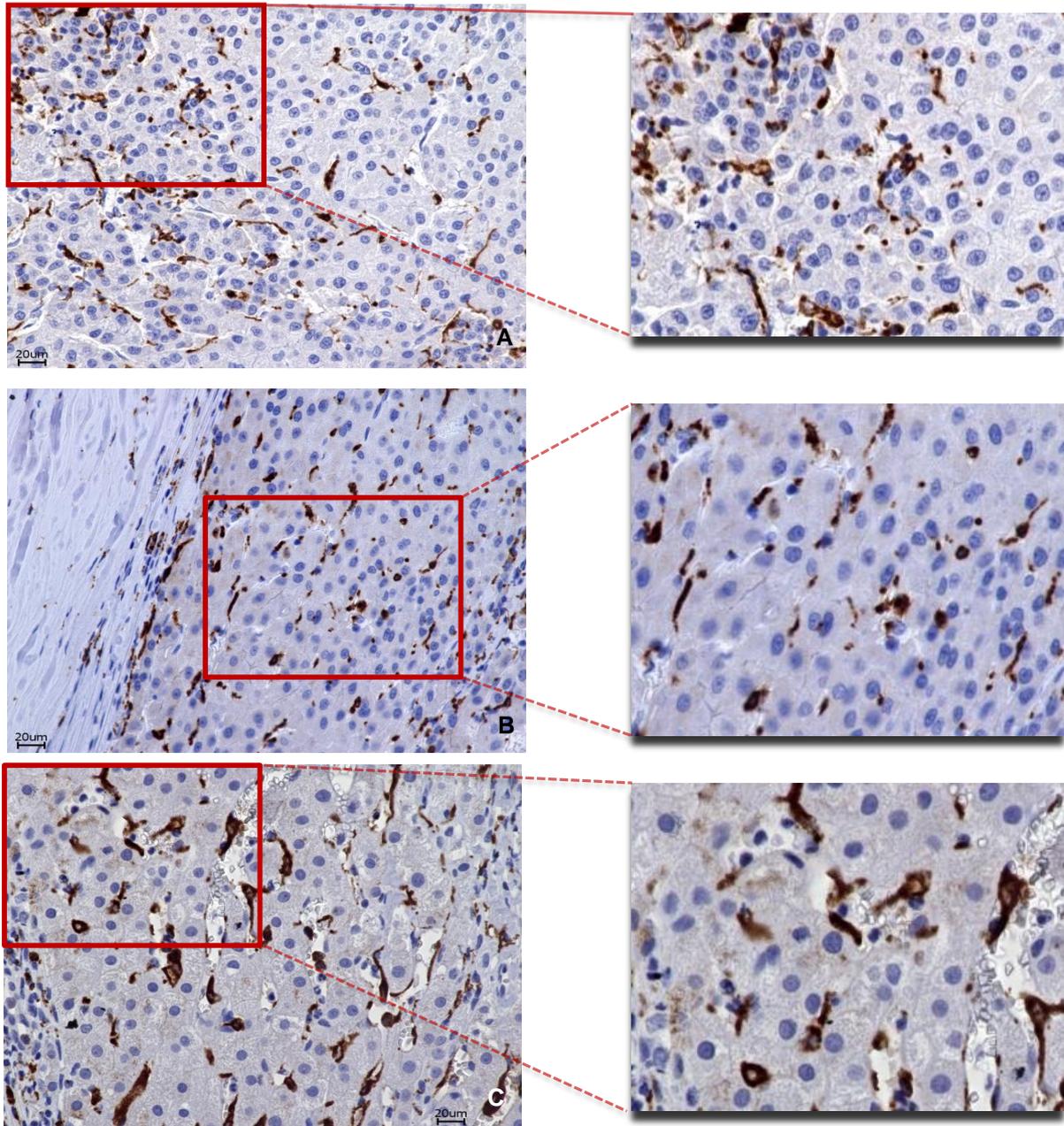
### 2.4.2 Zellzählungen mit dem Programm *ImageJ*

Die mittels eines digitalen Mikroskops angefertigten Bilder wurden in dem Programm *ImageJ* ausgewertet. Ein Viertel des jeweiligen Bildes wurde manuell ausgezählt. Um eine objektive Auswertung zu gewährleisten, wurde immer die linke obere Ecke ausgezählt. Im Falle der kapselnahen Bereiche des Tumors wurde ein Viertel ausgemessen. Dieser markierte Bereich wurde möglichst dicht an die Tumorkapsel geschoben, sodass das kapselnahe Tumorgewebe erfasst werden konnte. Auch hier wurde angestrebt, bei allen Fotos einen ähnlichen Bereich auszuwerten. Das Programm *ImageJ* liefert Informationen über die Größe des ausgezählten Bildabschnitts. Anhand einer vom digitalen Mikroskop eingefügten Scala konnten

diese Informationen zur Berechnung des gezählten Bildabschnitts angewendet werden. Dabei ergab sich eine ausgezählte Fläche von 0,027 mm<sup>2</sup>.

### 2.4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Zählergebnisse mittels T-Test sowie die graphische Darstellung wurden mit dem Programm *GraphPad Prism 4* durchgeführt. Eine Beurteilung der Signifikanz erfolgte wie unter Abschnitt 2.6.1 beschrieben.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung der ausgewerteten Areale, A: innerhalb des Tumors, B: kapselnaher Tumorbereich, C: außerhalb des Tumors

## **2.5 Kultivierung von etablierten Zelllinien**

Alle Zellkultur-Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Werkbank. Die Zellen wurden in geeigneten sterilen Kulturgefäßen kultiviert, in einem Brutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 ° C gehalten und in regelmäßigen Abständen passagiert.

### 2.5.1 Die humane Monozytenzelllinie (THP-1 Zellen)

Im Zentrum der Arbeit stand die Charakterisierung des inflammatorischen Phänotyps von TAM. Aus diesem Grund sollten die Zellkulturversuche mit einer humanen Pro-Monozytenzelllinie durchgeführt werden. Tsuchiya et al. etablierten in Japan eine humane monozytäre leukämische Zelllinie, die als THP-1 Zellen bezeichnet wurde. Aus dem Blut eines einjährigen Jungen, der an einer akuten myeloischen Leukämie erkrankt war, konnte die genannte Zelllinie kultiviert und charakterisiert werden. THP-1 Zellen weisen neben weiteren Charakteristika monozytäre Eigenschaften auf, die diese Zellen für die Erforschung von Monozyten im Immunsystem geeignet erscheinen lassen (Tsuchiya et al. 1980). Zudem ist eine Differenzierung in Makrophagen mit den THP-1 Zellen möglich. Aufgrund dieser monozytären Eigenschaften sind diese Zellen ein wesentlicher Bestandteil der Ko-Kultur-Versuche in dieser Arbeit.

### 2.5.2 Humane Zelllinien aus einem HCC

Für die Ko-Kultur-Versuche wurden Zelllinien benötigt, die das Milieu eines HCC darstellen. Einer Arbeitsgruppe gelang es, HCC-Zellen aus dem OP-Präparat von einem 57-jährigen männlichen Patienten zu isolieren, der an einem gut differenzierten HCC erkrankt war. Diese Zellen konnten als HuH7 Zellen weiter in bestimmten Zellkulturmedien kultiviert und etabliert werden (Nakabayashi et al. 1982). In unseren Ko-Kultur-Versuchen wurden diese Zellen verwendet, um ein HCC zu simulieren und einen entsprechenden Effekt des HCC auf die Makrophagen zu untersuchen.

Für weitere Immunfluoreszenz-Analysen wurden die HuH7 Zellen mit *green fluorescent protein* (GFP) gekoppelt. Im direkten Vergleich von GFP-gekoppelten HuH7 Zellen und ungekoppelten HuH7 Zellen zeigten sich die gleichen Effekte auf die Makrophagen.

### 2.5.3 Kultivierung von Suspensionszellen

Um Ko-Kultur-Versuche an Makrophagen durchzuführen, wurden die beschriebenen THP-1 Zellen ausgewählt. Bei diesen Zellen handelt es sich um Suspensionszellen,

die in einem geeigneten Zellkulturmedium in einer sterilen Zellkulturflasche kultiviert wurden. Für die geplanten Versuche wurden die THP-1 Zellen in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-Medium kultiviert, dem 1 %iges Penicillin G/Streptomycin und 10 %iges fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt wurden. Für die Versuche wurden Zellkulturflaschen mit einer Kultivierungsfläche von 175 cm<sup>2</sup> verwendet. Zweimal wöchentlich wurden die Zellen passagiert, indem die gewünschte Menge an Zellsuspension entnommen wurde und in eine neue Zellkulturflasche überführt wurde. Mit frischem RPMI-Medium wurde die Flasche auf ein Gesamtvolumen von 30 ml aufgefüllt. Bei der mikroskopischen Beurteilung der Zellen wurde auf Zellcluster und auf die Morphologie geachtet. Die Zellen waren im Idealfall glatt begrenzt und leicht transparent. Bei verstärkt auftretenden Zellverklumpungen oder der Ausbildung von Zellfortsätzen wurden die THP-1 Zellen verworfen. Durch regelmäßiges Zentrifugieren der Zellsuspension, Entnahme des Überstandes und einer erneuten Resuspension der Zellen in frischem Medium konnten die Kultivierungsbedingungen der THP-1 Zellen optimiert werden.

### 2.5.4 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Die HCC-Zelllinie (HuH7) sollte in den Ko-Kulturen ein HCC simulieren. Bei diesen Zellen handelt es sich um adhärenente Tumorzellen, die auf dem Boden der Zellkulturflasche fest anwachsen. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte in einem *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM)-Medium, dem wiederum 1%iges Penicillin G/Streptomycin und 10%iges FCS zugefügt wurden. Das beste Wachstumsverhalten wurde in Kulturflaschen mit einer Kultivierungsfläche von 75 cm<sup>2</sup> beobachtet. Bei vollständiger Konfluenz der jeweiligen Zellen wurden diese subkultiviert. Ein Splitten der Zellen war zu diesem Zeitpunkt wichtig. Wachsen die Zellen zu dicht, kommt es zum Prozess der Kontaktinhibition und eine weitere Proliferation der Zellen kann nicht erfolgen.

Um die Zellen zu teilen wurde das Zellkulturmedium mit einer Glaspipette abgesaugt. Unmittelbar danach wurde mit calcium- und magnesiumfreien PBS gewaschen, indem fünf ml PBS auf die Zellen gegeben wurden und die Zellkulturflasche vorsichtig geschwenkt wurde. Nach wiederholtem Absaugen des Puffers wurden 3 ml Trypsin/EDTA in die Flasche pipettiert. Anschließend wurde die Flasche für drei Minuten in den Inkubator gestellt. Trypsin ist eine Endopeptidase und bewirkt, dass

sich die Zellen vom Kunststoffboden der Zellkulturflasche lösen. Ob sich wirklich alle Zellen vom Boden der Flasche gelöst haben, wurde mikroskopisch kontrolliert. Diese Zellsuspension wurde resuspendiert und die gewünschte Menge in eine neue Zellkulturflasche überführt. Mit FCS-haltigem DMEM-Medium wurde die Reaktion des Trypsins abgestoppt und das Gesamtvolumen der neuen Zellkulturflasche auf 15 ml aufgefüllt. Entsprechend dem Wachstum der HuH7 Zellen, wurde alle zwei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt.

### 2.5.5 Zellzählungen in der Neubauer-Zählkammer

Für unsere Zellkulturversuche wurde eine bestimmte Anzahl von Zellen benötigt und auf verschiedenste Zellkulturschalen verteilt. Dieser Methode liegt eine möglichst genaue Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer zugrunde. Die Kammertiefe dieser Zählkammer betrug 0,1 mm. Standardmäßig wurden die vier äußeren Großquadrate ausgezählt.

Das gezählte Ergebnis wurde durch vier dividiert, um die Zellzahl für ein Quadrat aus dem Zählraster zu ermitteln. Da die Zellkammer geeicht ist, musste dieses Zählergebnis mit 10.000 multipliziert werden. Aufgrund der Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau, wurde dieses Ergebnis wiederum mit zwei multipliziert.

Nach dieser Methode erhielt man die Zellzahl in einem Milliliter. Für Versuche konnte diese Information auf andere Volumina umgerechnet werden und somit eine konkrete Zellzahl eingesetzt werden.

### 2.5.6 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zellen können über einen längeren Zeitraum in Stickstofftanks bei sehr niedrigen Temperaturen eingefroren werden. Um auf Zellen ähnlicher Passage zurückgreifen zu können, besteht die Möglichkeit diese Zellen wieder aufzutauen und in geeignetes Kulturmedium zu überführen.

Um Zellen einzufrieren wurden die Suspensionszellen zentrifugiert. Bei adhärenenten Zellen erfolgte zunächst ein Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mittels Trypsin wie bereits unter 2.5.4 geschildert. Nach einer Zentrifugation der Zellen wurde das Zellpellet in Einfriermedium (FCS und 10 % Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde jeweils 1 ml in ein Kryoröhrchen

überführt und in einem speziellen Einfrierbehälter über Nacht schrittweise heruntergekühlt. Anschließend erfolgte eine Lagerung in flüssigem Stickstoff.

### 2.5.7 Herstellung von Zelllysaten

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des NucleoSpin TriPrep-Kits der Firma *MACHERY-NAGEL* nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Um Zelllysate herzustellen, wurde ein gebrauchsfertiger Puffer aus dem genannten Kit verwendet. Pro Probe wurden 350 µl Puffer mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol gemischt. In unseren Versuchen wurde ein Ansatz für alle Proben erstellt. Da die Lysate in 6-Well-Platten durchgeführt wurden, wurde das Medium abgenommen und der Lysatpuffer hinzugegeben. Dieser wurde nach kurzer Inkubation vorsichtig mit einer Pipettenspitze auf dem Boden der 6-Well-Platte verteilt und dabei der Zellrasen gelöst. Der nun visköse Puffer mit den abgelösten Zellen wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgenommen und eingefroren. Alternativ kann bei Suspensionszellen nach einer kurzen Zentrifugation das Zellpellet in 350 µl Lysatpuffer aufgenommen werden. An das Anfertigen der Zelllysate schloss sich eine RNA-Isolation an.

### 2.5.8 RNA-Isolation

Alle erwähnten Reagenzien sind dem genannten Kit entnommen worden. Die gesamte RNA-Isolation wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Rahmen der RNA-Isolation wurden die Zelllysate auf Säulen gegeben, die kleine Membranen enthielten. Während der Isolation hafteten sich die Nukleinsäuren an die Membran. Durch mehrere Waschschriffe mit den dafür vorgesehenen Puffersubstanzen konnten andere ebenfalls an der Membran gebundenen Strukturen ausgewaschen werden. An jeden Waschschriff schlossen sich unterschiedlich lange Zentrifugationen bei 9000 rpm an. Ein wichtiger Schriff stellte dabei die Entfernung eventueller DNA am Membranmaterial dar. Hierfür wurde eine spezielle DNase auf die Membran gegeben. An diesen Schriff schloss sich wiederum ein Waschschriff mit RNase-freiem Wasser an. Für eine weitere Verarbeitung der RNA-Proben wurden diese unmittelbar nach der Isolierung auf Eis gestellt. Um die RNA-Konzentration zu ermitteln, wurde eine fotometrische Messung bei einer bestimmten Wellenlänge mit einem Spektrophotometer durchgeführt.

### 2.5.9 Umschreiben der Proben in cDNA

Die Grundlage der nachfolgenden cDNA-Synthese war das *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* der Firma Roche. Die nachfolgend aufgelisteten Reagenzien entstammen diesem Kit. Um die *Real-Time* PCR durchzuführen, musste die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Die Basis hierfür war die RNA, deren Konzentration spektrophotometrisch gemessen wurde. Für die weitere cDNA-Synthese wurden 250 ng RNA eingesetzt. In Abhängigkeit von der ermittelten RNA-Konzentration wurde das einzusetzende Volumen ermittelt und mit dem cDNA-Kit beigefügtem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Für die nachfolgende Synthese wurden pro Probe 1 µl *Oligo-dT* und 2 µl *Random Hexamer* als Primer zugegeben. Diese Primer wurden als Mix zuvor angesetzt. In jeden Reaktionsansatz wurden 3 µl aus diesem Primermix gegeben und anschließend für zehn Minuten im *Thermocycler* bei 25 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Proben unmittelbar auf Eis gestellt und ein Reaktionsmix entsprechend der Probenmenge angesetzt. Dieser setzte sich aus 4 µl *Transkription Reverse Buffer*, 0,5 µl *Protection RNase Inhibitor*, 2 µl *Deoxynucleotide Mix* und 0,5 µl *Transcript. Reverse Transkriptase* zusammen. Aus diesem Mix wurden 7 µl pro Probe zugegeben, sodass ein Probenvolumen von 20 µl erreicht wurde. Eine insgesamt 55-minütige Inkubation im *Thermocycler* bei 55°C, 85°C und 20 °C schloss sich an. Optional konnte die nun synthetisierte cDNA direkt für eine *Real-Time* PCR verwendet werden oder bei -20 °C eingefroren werden.

### 2.5.10 Durchführung der *Real-Time* PCR

Die Grundlage für die *Real-Time* PCR war die synthetisierte cDNA. Angewandt wurde der *Fast SYBR Green Master Mix* der Firma *Applied Biosystems*. Insgesamt wurde ein Volumen von 10 µl pro Probe eingesetzt. Die PCR wurde in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Der Master Mix enthielt *SYBR Green I Dye*, *AmpliTaQ Fast DNA Polymerase*, *Uracil-DNA Glycosylase*, *ROX dye Passive Reference* und *dNTPs* in einem geeigneten Puffer. Pro Well wurden folgende Bestandteile pipettiert:

- 3,5 µl RNase freies Wasser
- 5,0 µl Master Mix
- 0,5 µl Primer
- 1 µl cDNA der jeweiligen Probe

Die Messung jeder einzelnen Probe erfolgte in Doppelbestimmung. Folgende Primer wurden für die *Real-Time* PCR eingesetzt: CD 14, CD 115, CD 163, CD 204, IL-6, IL-8, IL-10, MMP-9, MHC-II, NOS2 und Arginase-2. Die relative Expression der einzelnen Gene wurde in unserem Fall zu der Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ermittelt.

Für die weitere Auswertung wurde der gemittelte Ct-Wert (*cycle threshold*) der Doppelbestimmungen angewandt. Der Ct-Wert gibt die Nummer des PCR-Zyklus an, ab wann eine gemessene Fluoreszenz den Schwellenwert übersteigt. Anhand dieses Wertes konnte die relative Expression des jeweiligen Zielgens im Vergleich zu unserem *housekeeper*-Gen GAPDH ermittelt werden.

### **2.6 Durchführung von Ko-Kultur-Versuchen**

Die Ko-Kultur-Versuche sollten der Untersuchung des inflammatorischen Phänotyps der Makrophagen in einem hepatozellulären Karzinom dienen. Grundlage für diese Versuche waren die bereits einleitend vorgestellten Zelllinien.

#### 2.6.1 Ko-Kulturen mit HuH7 Zellen: Expressionsanalyse der THP-1 Zellen

##### Arbeiten mit dem Transwell-System

Im Rahmen dieses Versuchs wurde das Aktivierungs- und Oberflächenprofil von THP-1 Zellen (Makrophagen) untersucht, die in indirektem Kontakt mit der HCC-Zelllinie HuH7 standen. Zu Beginn wurden THP-1 Zellen auf geeignete Zellkulturschalen ausplattiert. Für diese Versuche stellten sich 6-Well-Schalen als geeignete Reaktionsgefäße dar, damit jeder Versuchsdurchgang in Dreifachbestimmung erfolgen konnte. Somit wurden in jedes Well 400.000 THP-1 Zellen in DMEM-Medium mit den genannten Zusätzen gegeben. Für jedes Well war ein Gesamtvolumen von 2 ml vorgesehen. Insgesamt wurde mit vier Versuchsansätzen gearbeitet. Pro Ansatz wurde eine 6-Well-Platte angesetzt.

In einem ersten Versuchsansatz wurden die THP-1 Zellen pro-monozytär, also unbehandelt, belassen. Bei den weiteren Versuchsansätzen wurden die THP-1 Zellen mittels Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) in Makrophagen differenziert. Der zweite Versuchsansatz wurde lediglich mit PMA versetzt. Der dritte Versuchsansatz enthielt Makrophagen, die mit IFN $\gamma$  und LPS in M1-Makrophagen umgewandelt wurden. In einem vierten Versuchsansatz wurden die THP-1 Zellen mit IL-4 und IL-13

zu M2-Makrophagen weiterentwickelt. Die folgende Auflistung gibt eine Übersicht über die Versuchsgruppen:

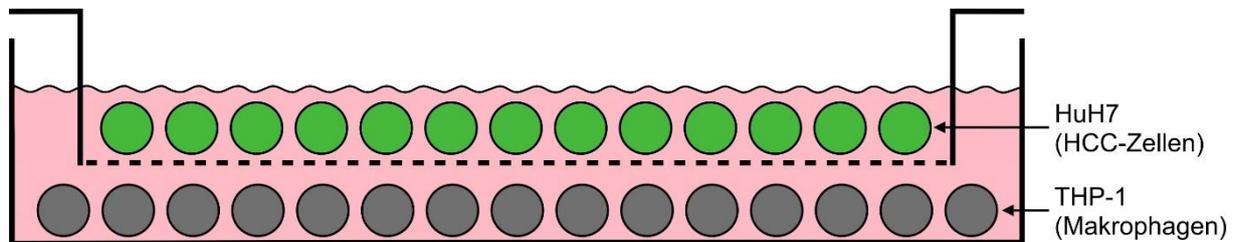
1. Pro-monozytär belassene THP-1 Zellen
2. Zugabe PMA
3. Zugabe PMA + IFN $\gamma$  + LPS  $\rightarrow$  M1-Gruppe
4. Zugabe PMA + IL-4 + IL-13  $\rightarrow$  M2-Gruppe

Bei der ersten Versuchsgruppe, die unstimuliert belassen wurde, wurden unmittelbar nach der Verteilung der THP-1 Zellen auf die 6-Well-Schale auf die unteren Wells drei Transwells aufgesetzt. In diese Transwells wurden jeweils 200.000 HuH7 Zellen (HCC-Zellen) in 1 ml DMEM-Medium ausplattiert. Diese Ko-Kultur wurde für 96 Stunden inkubiert. Anschließend wurden von den Makrophagen und HCC-Zellen Zelllysate erstellt und bei -80 °C eingefroren.

Bei den mit PMA vorbehandelten Versuchsansätzen wurde nach 24 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt. Durch die Zugabe von PMA wurden die THP-1 Zellen adhärent. Dieses wurde nach 24 Stunden mikroskopisch kontrolliert und diente als PMA-Erfolgskontrolle. Anschließend schloss sich eine zweitägige Inkubationszeit an. Bei der lediglich mit PMA belassenen Versuchsgruppe wurde anschließend ebenfalls der Versuch um eine Ko-Kultur mit HCC-Zellen im Transwell-System erweitert. Auch hier wurden 200.000 HCC-Zellen in 1 ml DMEM-Medium ausplattiert. Nach einer Inkubation der Ko-Kultur im Brutschrank wurden nach 48 Stunden ebenfalls Zelllysate erstellt und optional bei -80 °C eingefroren oder wie bereits an anderer Stelle beschrieben weiterverarbeitet.

Die Makrophagen der Versuchsgruppen drei und vier wurden nach der zweitägigen Inkubationszeit zu M1- oder M2-Makrophagen vorgeprimt. Bei der M1-Gruppe wurde das Medium gewechselt und durch DMEM-Medium ersetzt, dem 20 ng/ml IFN $\gamma$  und 50 ng/ml LPS zugesetzt waren. Die Zytokinstimulation sollte einen M1-Phänotyp induzieren. Bei der M2-Gruppe wurde eine Vordifferenzierung durch die Zugabe von 20 ng/ml IL-4 und IL-13 nach dem Mediumwechsel erreicht. Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde erneut das Medium gewechselt und die Ko-Kultur wie bereits beschrieben für 48 Stunden angesetzt. Auch hier wurden anschließend Zelllysate erstellt.

Beim Ansetzen der Ko-Kultur wurde der Raum unter den Transwells, in dem sich die Makrophagen befanden, auf circa 2,5 ml mit DMEM-Medium aufgefüllt, damit die Flüssigkeitsstände innerhalb der Transwells und der 6-Well-Platte auf einem Niveau waren. Die nachfolgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Ko-Kultur mit dem Transwell-System.



**Abbildung 2.2:** Schematischer Aufbau der Ko-Kultur. Auf ein Well mit THP-1 Zellen wurde ein Transwell mit HCC-Zellen aufgesetzt. Ein indirekter Zellkontakt durch eine semipermeable Membran (gestrichelte Linie) wurde somit hergestellt.

Als Kontrollgruppe für die HCC-Zellen, wurden die HuH7 Zellen in Dreifachkontrolle ohne THP-1 Zellen in den Transwells ausplattiert. Anstatt der THP-1 Zellen wurde lediglich DMEM-Medium unter die Transwells gegeben.

Alle Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Für die weitere Darstellung der Ergebnisse wurde ein repräsentativer Versuchsdurchgang ausgewählt.

Die Erstellung der Zell-Lysate wurde wie unter 2.5.7 beschrieben durchgeführt.

Die Durchführung der RNA-Isolierung erfolgte wie im Abschnitt 2.5.8 beschrieben.

Für eine anschließende *Real-Time* PCR-Analyse erfolgte ein Umschreiben der RNA in cDNA. Diese Umschreibung wurde wie oben erwähnt durchgeführt.

Die *Real-Time* PCR der THP-1 Zellen wurde wie unter 2.5.10 beschrieben durchgeführt.

Die Erstellung der Graphiken, die die Ergebnisse der Expressionsanalysen präsentieren, erfolgte mittels *Graphpad Prism 4*. Um die Ergebnisse in einen statistischen Zusammenhang einzuordnen, wurde als statistischer Test der T-Test

durchgeführt. Diese Berechnungen wurden mit *Microsoft Excel 2007* durchgeführt. Die entsprechenden P-Werte wurden mit folgenden Symbolen kodiert:

P-Wert: < oder = 0,05	*
P-Wert: < oder = 0,01	**
P-Wert: < oder = 0,001	***
P-Wert: < oder = 0,0001	****

### 2.6.2 Ko-Kulturen mit HuH7 Zellen: Immunfluoreszenzfärbungen

#### Ablauf der Arbeiten mit dem Transwell-System:

Bei diesem Ko-Kultur-Versuch sollten Oberflächenstrukturen der THP-1 Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbungen in einer 24-Well-Platte dargestellt werden. Außerdem sollte in diesem Versuch ermittelt werden, ob ein M1- oder M2-Phänotyp mittels IFN- $\gamma$  und LPS-Stimulation oder IL-4 und IL-13-Stimulation hervorgerufen werden kann.

In eine 24-Well-Platte wurden 100.000 THP-1 Zellen pro Well ausplattiert. Grundlage für diesen Versuch war ebenfalls das DMEM-Medium. Insgesamt befand sich in jedem Well ein Volumen von 0,5 ml. Um die THP-1 Zellen zu Makrophagen zu differenzieren und adhären zu werden zu lassen, wurden in den Ansatz wiederum 20 ng/ml PMA gegeben. 24 Stunden späterer folgte ein Mediumwechsel. Nach 96 Stunden wurden in der ersten Reihe der Platte Transwells aufgesetzt und darin 50.000 HuH7 Zellen pro Well in einem Volumen von 250  $\mu$ l ausplattiert. Diese Ko-Kultur wurde für 48 Stunden inkubiert. In der zweiten Reihe wurde mit 20 ng/ml IFN $\gamma$  und 50 ng/ml LPS stimuliert. In der dritten Reihe erfolgte dies mit 20 ng/ml IL-4 und IL-13, ebenfalls für 24 Stunden. In der letzten Reihe wurde das Medium gewechselt und die Zellen unstimuliert belassen. An diese Arbeiten in der Zellkultur schloss sich ein Fixierungsprozess mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) an.

#### Fixierung von Zellen auf dem Boden einer 24-Well Platte:

Um die auf dem Boden des Zellkulturgefäßes angewachsenen THP-1 Zellen für weitere Färbungen zu verwenden, schloss sich an die Arbeiten in der Zellkultur ein Fixierungsprozess in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) an. Zunächst wurden die Zellen mittels PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine zehnmünütige Inkubation mit PFA. Nach drei Waschgängen mit PBS von jeweils drei Minuten, wurde eine großzügige

Menge PBS auf die 24-Well-Platte gegeben und diese mit Parafilm abgeklebt. Die Lagerung der vorbereiteten 24-Well-Schale wurde bei 4 °C durchgeführt.

### Durchführung einer Immunfluoreszenzfärbung in einer 24-Well-Platte:

Grundlage für diesen Versuch waren entsprechend vorbehandelte THP-1 Zellen, die in der 24-Well-Platte fixiert wurden. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte, um eine spezifische Bindung des ersten Antikörpers zu gewährleisten, ein Blockierungsschritt für eine halbe Stunde mit 10% BSA in PBS, dem zusätzlich 0,1%iges Triton zugefügt waren. Anschließend wurde nach Abnahme der Blocklösung der erste Antikörper zugegeben. Dieser wurde jeweils in der Lösung bestehend aus 1%igem BSA, PBS und 0,1%igem Triton verdünnt. Es wurden die Antikörper CD 68 (1:100), CD 163 (1:300) und CD 204 (1:125) gegen humane Zellen verwendet.

Nach einer einstündigen Inkubation der Erstantikörper schlossen sich drei Waschschriffe von jeweils drei Minuten an. Als geeigneter Waschpuffer stellte sich 0,1%iges BSA in PBS/0,1%igem Triton heraus. Um die Antikörperfärbungen fluoreszenzmikroskopisch darzustellen wurde ein ALEXA-555-gekoppelter zweiter Antikörper verwendet und für 30 Minuten inkubiert. Dieser Antikörper wurde jeweils 1:200 in 1%igem BSA gelöst in PBS/0,1%igem Triton verdünnt. Nach wiederholten Waschschriffen wurden in jedes Well 20 µl 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Eindeckmedium gegeben und anschließend das Well mit einem runden Deckgläschen versehen.

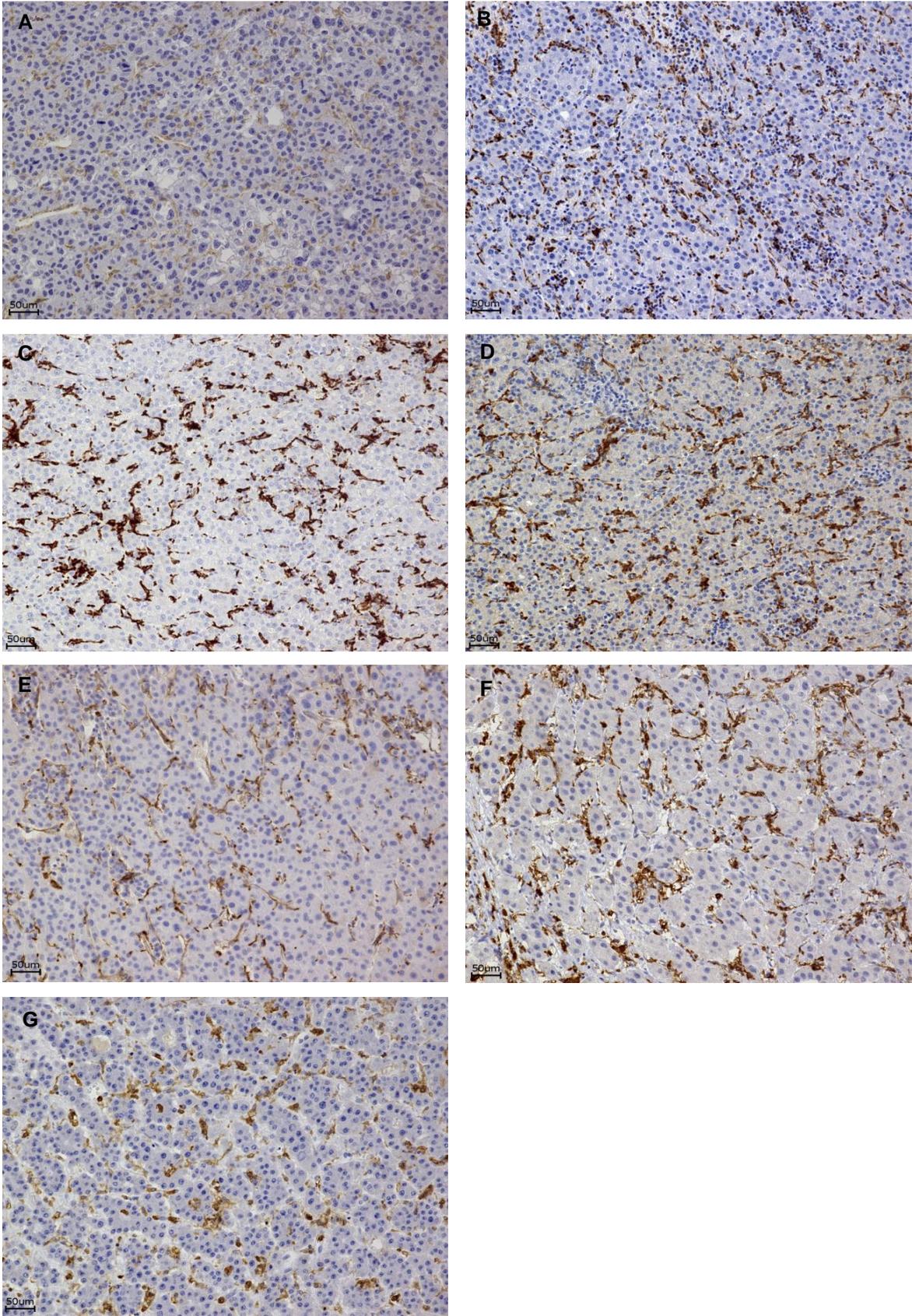
Um die Färbungen auszuwerten, wurde das bereits beschriebene Mikroskop verwendet. Es wurde jeweils eine Aufnahme gemacht, die die mit DAPI gefärbten Zellkerne darstellt. Zudem wurde mit einem weiteren Foto die spezifische Färbung der Antikörper aufgenommen. Als Kanal im Mikroskop wurde ALEXA-546 und der DAPI-Kanal gewählt. Spezifische Färbungen erschienen rot. Aus diesen Fotos wurden *overlay*-Bilder erstellt, sodass spezifische Färbungen einzelnen THP-1 Zellen zugeordnet werden können.

### **3. Ergebnisse**

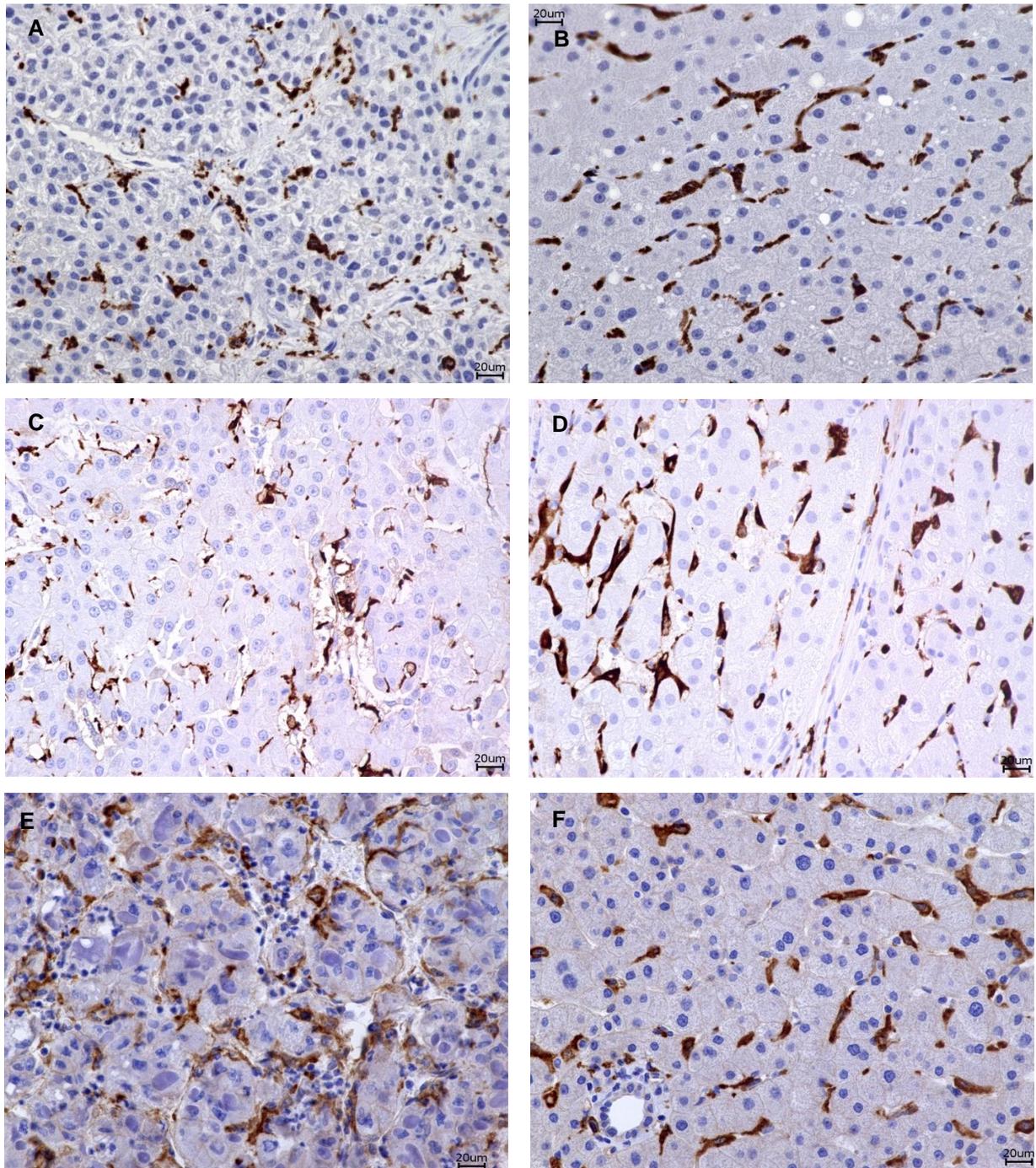
#### **3.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an humanem HCC-Gewebe**

Bei CD 14, CD 68, CD 163, CD 204, CD 206, CD 11b und HLA-DR handelt es sich um Oberflächenstrukturen, die auf Makrophagen zu finden sind. Spezifisch gefärbte Zellen stellen sich in brauner Farbe zwischen Hepatozyten in den Lebersinusoiden liegend dar. In allen Oberflächenfärbungen sind außerdem ansatzweise die makrophagentypischen Zellausläufer zu erkennen. Die Abbildung 3.1 stellt in einer Übersicht spezifische Makrophagenmarker auf humanem HCC-Gewebe dar.

Für die Serienfärbungen des HCC-Gewebes wurden der Pan-Makrophagenmarker CD 68 und die beschriebenen M2-Marker CD 163 und CD 204 ausgewählt und Serienfärbungen aller 19 Patienten durchgeführt. Die Abbildung 3.2 zeigt eine kleine Auswahl an Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen. Dabei werden Bereiche innerhalb des Tumors und außerhalb des Tumors im Vergleich abgebildet.



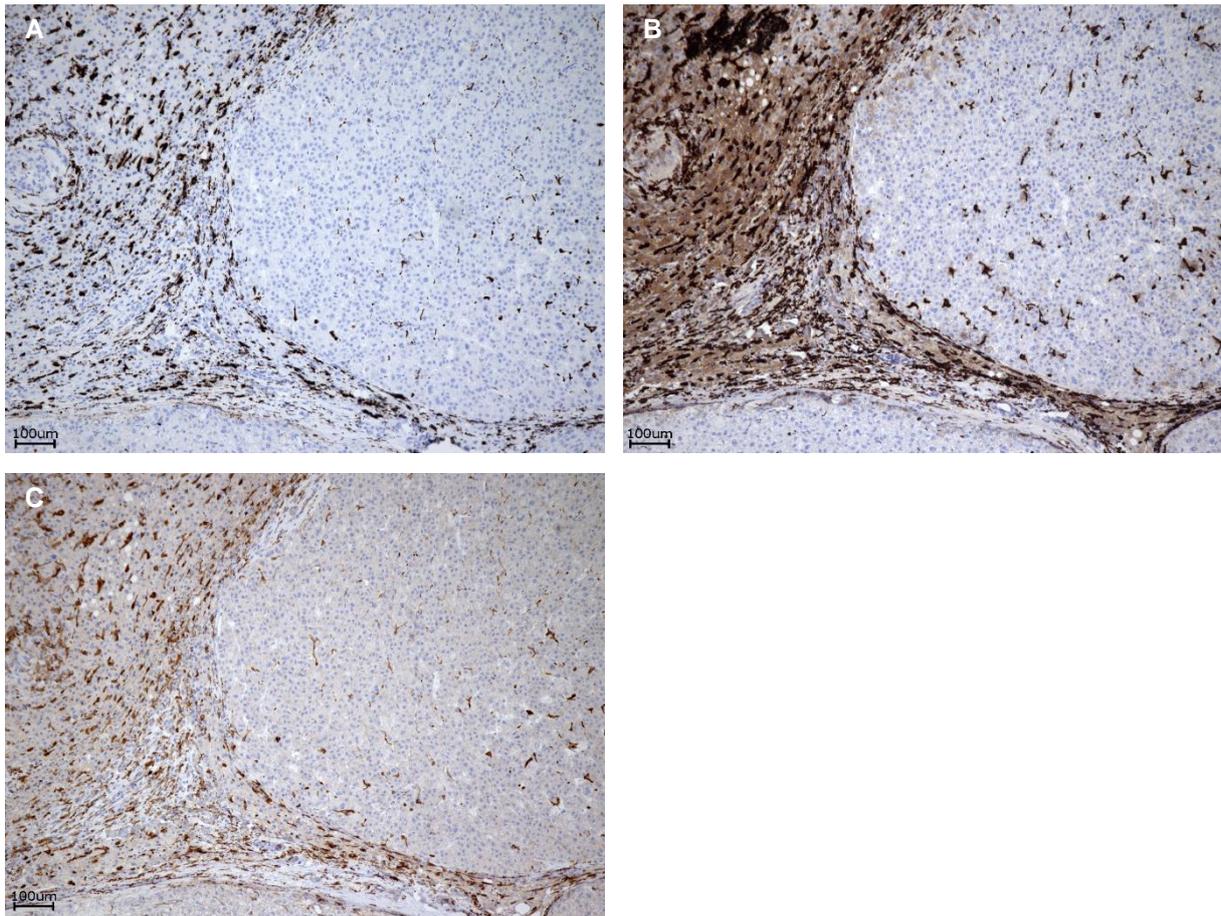
**Abbildung 3.1:** Übersicht über gefärbte Antikörper auf humanem HCC-Gewebe, 20fache Vergrößerung A: CD 14, B: CD 68, C: CD 163, D: CD 204, E: CD 206, F: HLA-DR, G: CD 11b



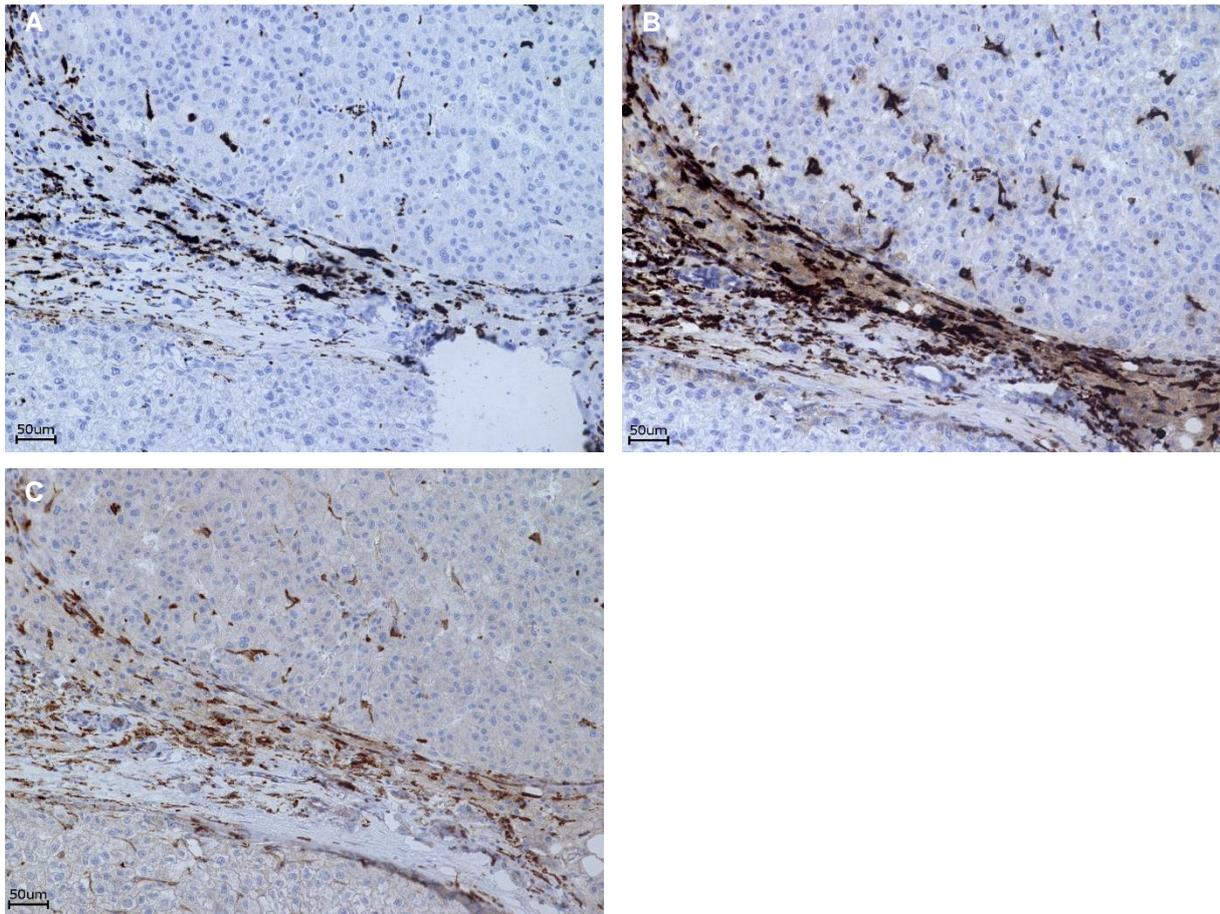
**Abbildung 3.2:** Übersicht über die verwendeten Antikörper für die Serienfärbungen, 40fache Vergrößerung A: CD 68 Tumor, B: CD 68 außerhalb des Tumors, C: CD 163 Tumor, D: CD 163 außerhalb des Tumors, E: CD 204 Tumor, F: CD 204 außerhalb des Tumors

### 3.1.1 Vorversuch: Direkter Vergleich der Antikörper in identischen Gewebsarealen

Um sich einen Überblick über das Färbemuster zu verschaffen und gleichzeitig zu prüfen, ob die drei gewählten Antikörper gegen CD 68, CD 163 und CD 204 spezifisch dieselben Zellen anfärben, wurde ein identischer Gewebeabschnitt in allen drei Färbungen gefärbt. Die folgenden Abbildungen zeigen einen Gewebeabschnitt eines HCC für jede Färbung in 10facher und 20facher Vergrößerung. Die Abbildung 3.5 zeigt einen Vergrößerungsausschnitt.

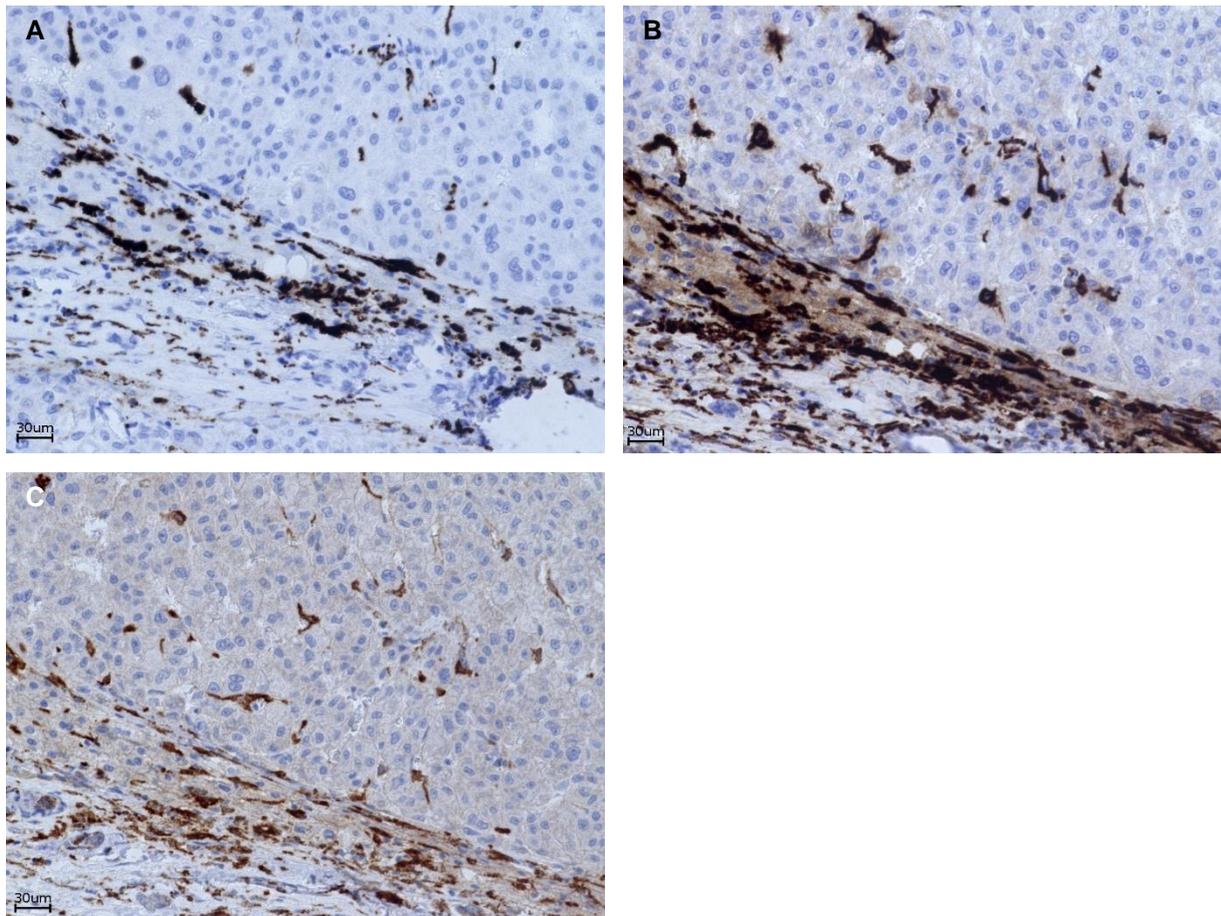


**Abbildung 3.3:** Direkter Vergleich eines Gewebeareals eines HCC in allen drei Färbungen, 10fache Vergrößerung, A: CD 68, B: CD 163, C: CD 204



**Abbildung 3.4:** Direkter Vergleich eines Gewebearials eines HCC in allen drei Färbungen, 20fache Vergrößerung, A: CD 68, B: CD 163, C: CD 204

Betrachtet man das Färbemuster dieser drei Färbungen, lässt sich sagen, dass dieses Färbemuster unter allen Färbungen sehr ähnlich ist. Es wurden jeweils Zellen angefärbt, die Zellausläufer haben und zwischen den mit Hämatoxylin gegengefärbten Hepatozyten liegen. In einigen Bereichen des Bildausschnitts lassen sich sogar positiv gefärbte Zellen erkennen, die sich an ähnlicher Stelle in allen drei Bildern wiederfinden. In diesen Abbildungen fällt auf, dass in der CD 163-Färbung mehr Zellen positiv gefärbt sind, als in den anderen beiden Färbungen.



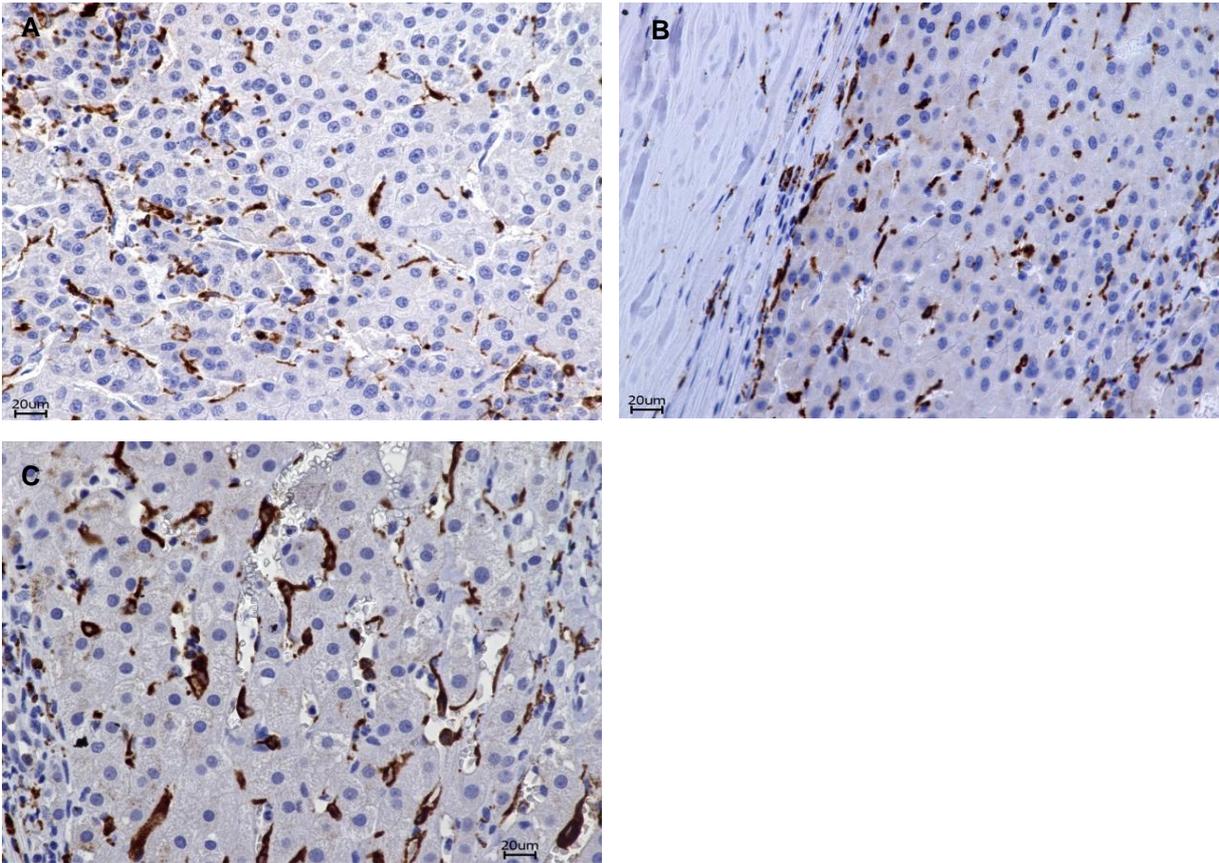
**Abbildung 3.5:** Direkter Vergleich eines Gewebeareals eines HCC in allen drei Färbungen, Vergrößerungsausschnitt, A: CD 68, B: CD 163, C: CD 204

### 3.1.2 Serienfärbungen der ausgewählten humanen HCC-Gewebe

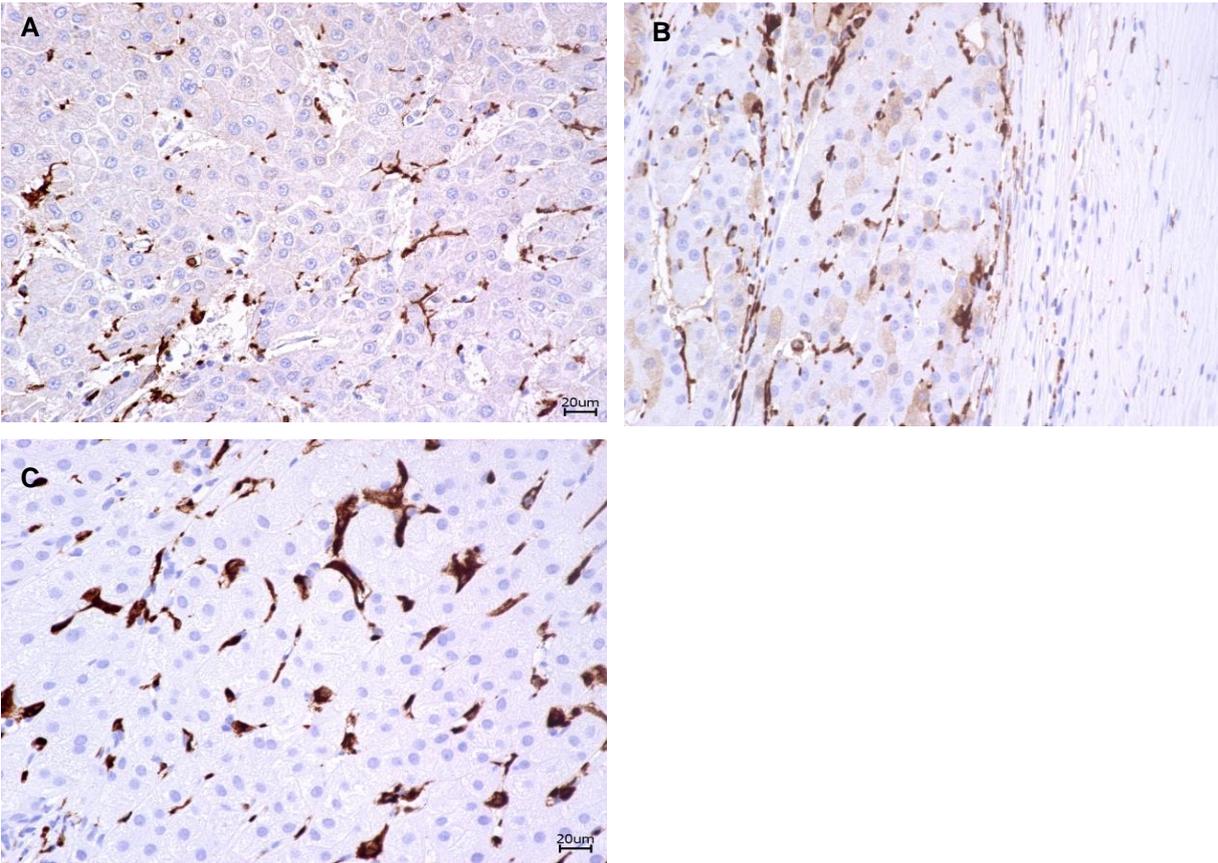
Da es sich bei CD 68, CD 163 und CD 204 um Rezeptormoleküle handelt, wurde die Oberfläche von Makrophagen entsprechend des Färbechromogens dunkelbraun gefärbt.

Die verwendeten Gewebeschnitte enthielten HCC-Herde, tumorfremie Areale, Strukturen von Tumorkapseln, Bindegewebssepten und Regeneratknoten. Es ergaben sich erkennbare Unterschiede hinsichtlich der Verteilung positiv gefärbter Zellen und der Zellzahl in den unterschiedlichen Gewebearealen. Für die folgende Auswertung wurden Abschnitte im zentralen Bereich des HCC-Herdes, im kapselnahen Tumorbereich und außerhalb des Tumors herangezogen.

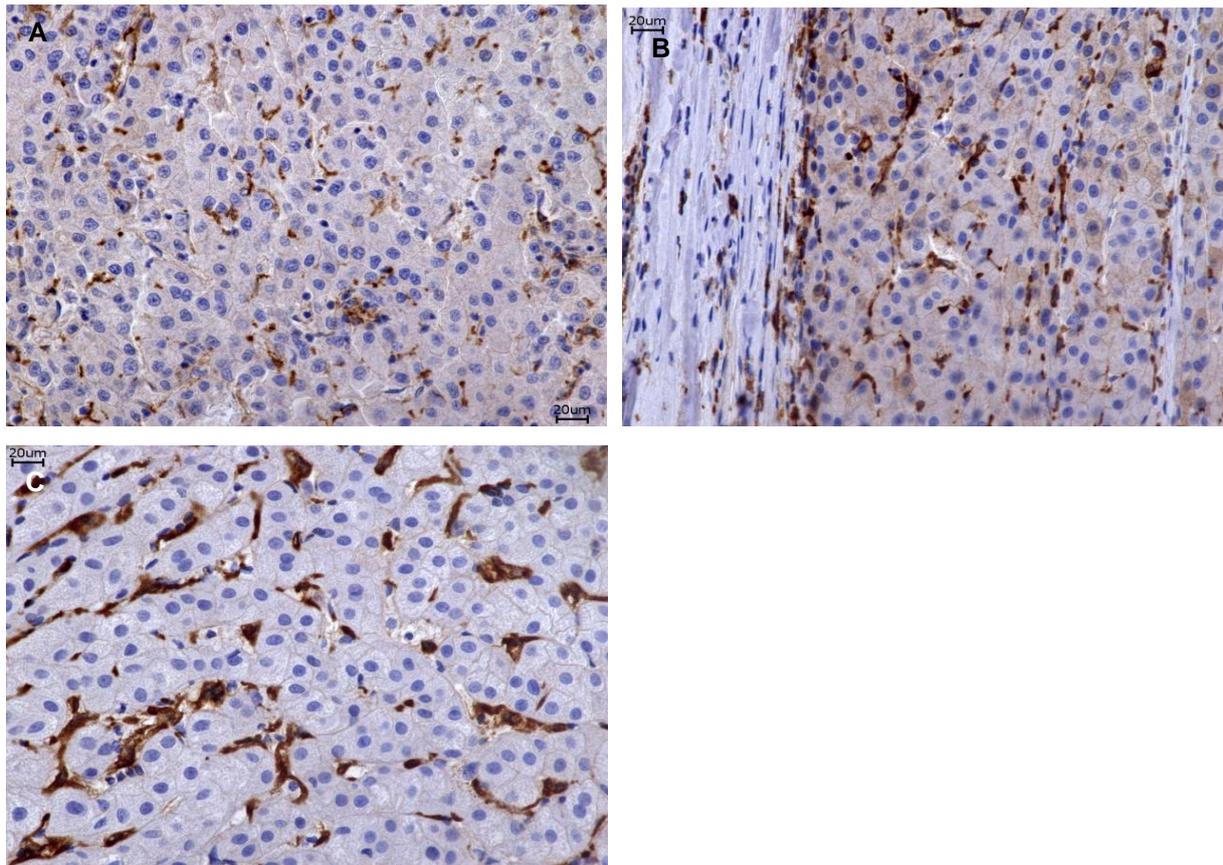
Mit den folgenden Abbildungen sollen die ausgewerteten Bereiche verdeutlicht werden:



**Abbildung 3.6:** CD 68-Färbung, 40fache Vergrößerung A: innerhalb des Tumors, B: kapselnaher Tumorbereich, C: außerhalb des Tumors



**Abbildung 3.7:** CD 163-Färbung, 40fache Vergrößerung, A: innerhalb des Tumors, B: kapselnahe Tumorbereich, C: außerhalb des Tumors



**Abbildung 3.8:** CD 204-Färbung, 40fache Vergrößerung, A: innerhalb des Tumors, B: kapselnaher Tumorbereich, C: außerhalb des Tumors

Vergleicht man das Färbemuster der drei Färbungen, fallen deutliche Ähnlichkeiten zwischen den drei Färbungen auf. Da jeweils Oberflächenstrukturen von Makrophagen angefärbt wurden, sind diese Zellen mit ihren Ausläufern, in Abhängigkeit von der Schnittebene, deutlich im Lebergewebe zu erkennen. Die Makrophagen kleiden mit ihren Ausläufern die Sinusoide der Leber aus und sind somit zwischen den Hepatozyten beziehungsweise zwischen den Tumorzellen erkennbar.

### 3.1.3 Darstellung einzelner Färbeergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

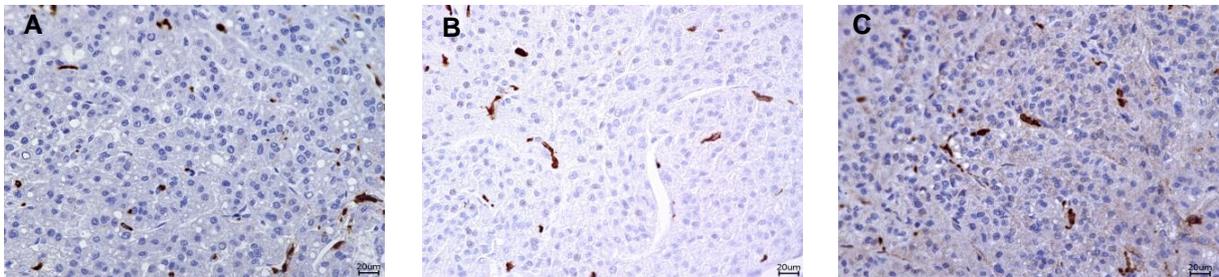
In einer ersten Betrachtung der Bilder fallen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Anzahl an positiv gefärbten Zellen auf. Es wird deutlich, dass erheblich mehr Zellen in der CD 163- und CD 204-Färbung positiv gefärbt sind, als in der CD 68-Färbung.

Einige HCCs sind in großen Mengen von Makrophagen durchzogen und in allen angeschnittenen Bereichen des Tumors spezifisch angefärbt worden. Andererseits gibt es Tumorgewebe, die nahezu keine immunhistochemisch markierten

Makrophagen aufweisen. Außerdem wird deutlich, dass die Makrophagen sehr heterogen innerhalb eines HCC verteilt sind. Die Schwankungsbreite hinsichtlich gefärbter Zellen innerhalb eines angeschnittenen Tumors ist sehr breit. Die nächsten Abbildungen sollen einen Eindruck vom Erscheinungsbild der Makrophagen in verschiedenen HCCs vermitteln:

### Abbildungen mit wenig positiv gefärbten Zellen

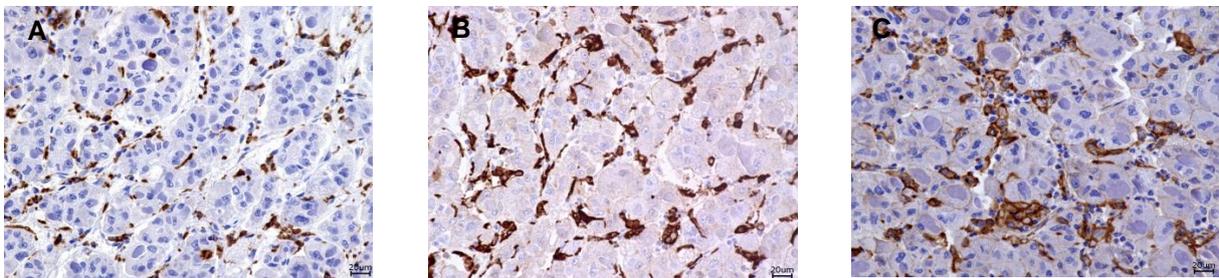
Diese Abbildungen zeigt exemplarisch ein HCC mit wenig positiv gefärbten Zellen in den fotografierten und ausgewerteten Bereichen. Die niedrigen Zellzahlen konnten in allen drei Färbungen verzeichnet werden.



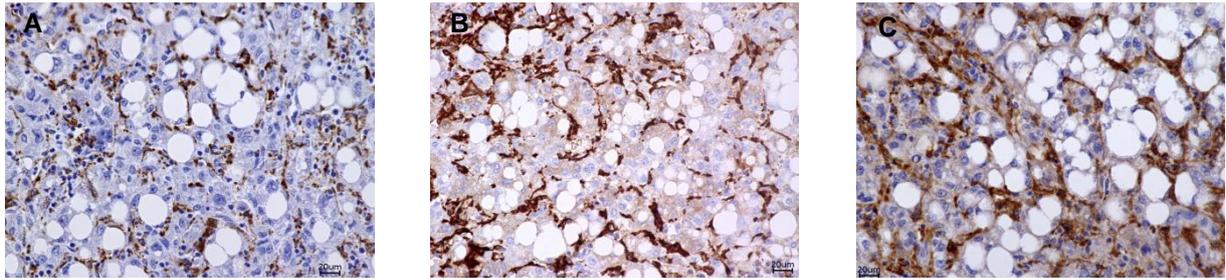
**Abbildung 3.9:** HCC mit wenigen positiv gefärbten Makrophagen, 40fache Vergrößerung, A: CD 68, B: CD 163, C: CD 204

### Abbildungen mit vielen positiv gefärbten Zellen

In einigen Tumoren konnten sehr viele Makrophagen gefärbt werden. In den Abbildungen 3.10 bzw. 3.11 werden HCCs zweier verschiedener Patienten dargestellt.



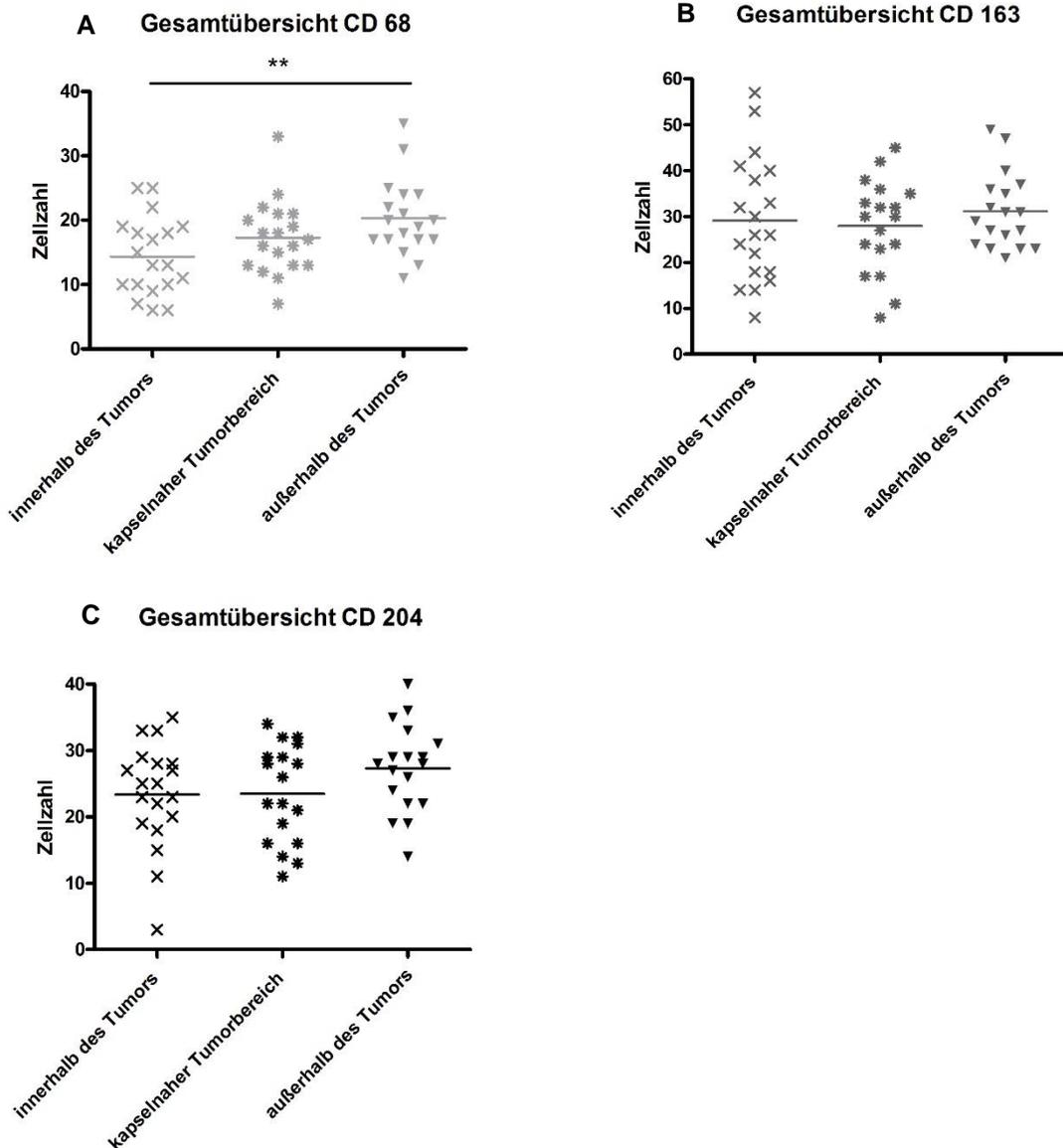
**Abbildung 3.10:** HCC mit vielen positiv gefärbten Makrophagen, 40fache Vergrößerung, A: CD 68, B: CD 163, C: CD 204



**Abbildung 3.11:** HCC mit vielen positiv gefärbten Makrophagen, 40fache Vergrößerung, A: CD 68, B: CD 163, C: CD 204

### 3.1.4 Zahlenmäßige Verteilung von Makrophagen im Vergleich verschiedener Gewebeareale

Für diesen Teil der Auswertung wurden die absoluten Zellzahlen in einem bestimmten Gewebsareal ausgezählt. Für die CD 68-Färbung ist erkennbar, dass außerhalb des Tumors signifikant mehr Makrophagen positiv gefärbt wurden als innerhalb eines HCC-Herdes. Auch im kapselnahen Tumorbereich sind geringfügig höhere Zellzahlen zu vermerken. Bei der CD 163-Färbung ist die Zellzahl im kapselnahen Tumorbereich niedriger. Bei der CD 204-Färbung liegen die Zellzahlen im gesamten Tumorbereich in etwa auf einem Niveau. Bei allen drei Färbungen finden sich ebenfalls außerhalb des HCC die höchsten absoluten Zellzahlen.



**Abbildung 3.12:** Gesamtübersicht verschiedener Gewebeareale von allen 19 HCC-Patienten. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen eines Viertelgesichtsfeldes (Durchschnittswerte) für alle drei Färbungen. A: CD 68, B: CD 163, C: CD 204

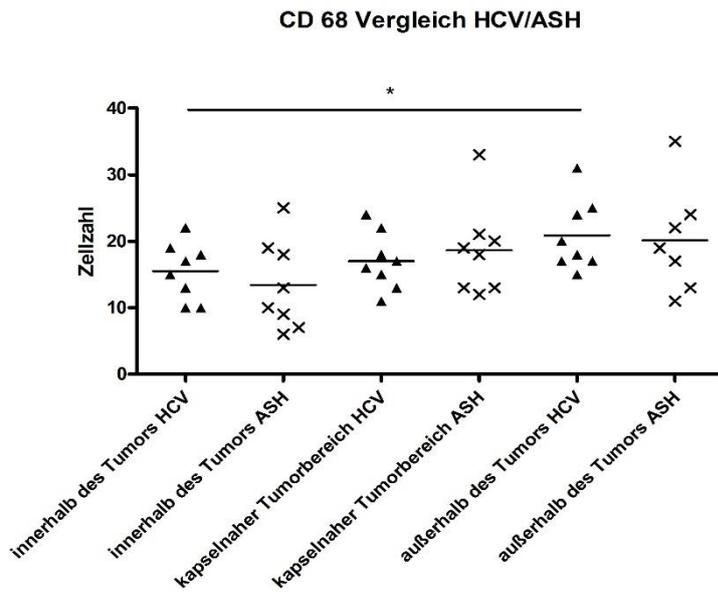
### 3.1.5 Verteilung von Makrophagen im Vergleich verschiedener Gewebeareale in Abhängigkeit von der Ätiologie

Ein wichtiger Aspekt der Arbeit sollte die Analyse der Anzahl von Makrophagen in HCCs unterschiedlicher Ätiologie sein. Aus diesem Grund wurden die beschriebenen immunhistochemischen Färbungen an 19 verschiedenen Patienten durchgeführt. Eine Patientengruppe wies eine Infektion mit dem Hepatitis C-Virus auf. Patienten der zweiten Versuchsgruppe hatten eine Leberzirrhose bzw. eine alkoholische Steatohepatitis (ASH) aufgrund chronischer Einwirkungen von Alkohol. In den nachfolgenden Texten und Abbildungen wird die zweite Versuchsgruppe als ASH-Gruppe bezeichnet. Die folgenden Abbildungen zeigen die absoluten Zellzahlen im direkten Vergleich der beiden Gruppen. Bei einer ersten Betrachtung der Bilder fällt auf, dass in der CD 163-Färbung insgesamt mehr Zellen positiv gefärbt wurden als in den anderen beiden Färbungen. Etwas geringere Zellzahlen weist die CD 204-Färbung auf. Die niedrigsten Zellzahlen sind in der CD 68-Färbung zu verzeichnen.

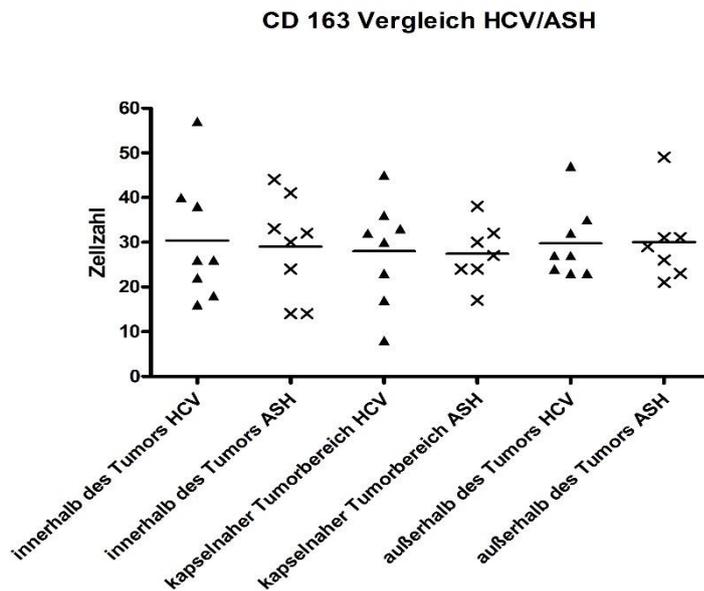
Bei der CD 68-Färbung ist erkennbar, dass in den Bereichen innerhalb des Tumors in der HCV-Gruppe mehr positiv gefärbte Zellen zu verzeichnen sind als bei einer ethyltoxischen Genese. Im kapselnahen Tumorbereich sind in der HCV-Gruppe weniger Zellen positiv gefärbt. Insgesamt fällt auf, dass die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sehr gering für die CD 68-Färbung ausfallen.

In der CD 163-Färbung ist das Ergebnis ähnlich. In der HCV-Gruppe sind in geringem Maße im Tumorbereich höhere Zellzahlen für positiv gefärbte Zellen zu vermerken. Auch hier fallen die Unterschiede zwischen den beiden Ätiologien gering aus.

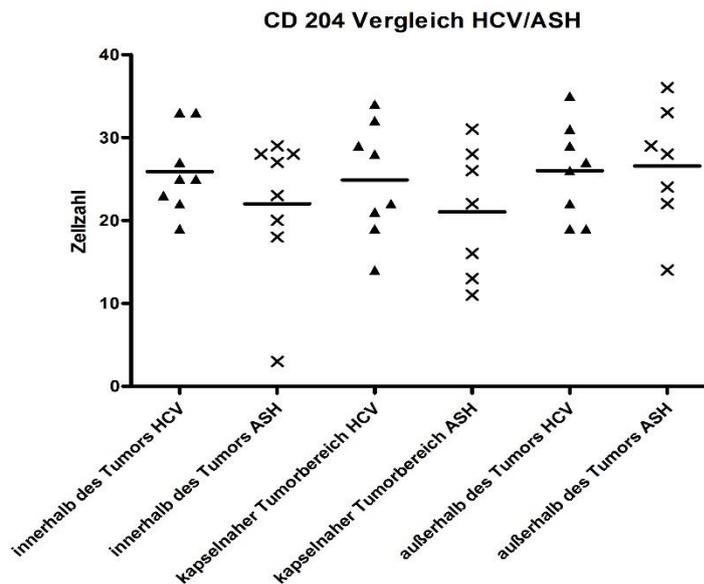
In der CD 204-Färbung hingegen fallen die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen deutlicher auf. Dies trifft insbesondere auf die Bereiche im Tumorgewebe zu, wo wiederum in der HCV-Gruppe mehr positiv gefärbte Zellen zu erkennen sind. Außerhalb des Tumors ist der Unterschied zwischen beiden Gruppen wiederum geringer. In der HCV-Gruppe sind die Zellzahlen in allen Bereichen in etwa auf einem Niveau. In der ASH-Gruppe ist der Sprung zwischen Tumorbereichen und tumorfreien Arealen erheblich höher. Diese Beobachtung trifft in geringerem Maße auch auf die CD 68-Färbung zu. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Makrophagenzahlen in HCCs unterschiedlicher Ätiologie.



**Abbildung 3.13:** Absolute Zellzahl im Vergleich verschiedener HCC-Ätiologien. Darstellung nach verschiedenen Geweberealen. HCV: Patienten mit einer Hepatitis C, ASH: Patienten mit alkoholischer Steatohepatitis. CD 68.



**Abbildung 3.14:** Absolute Zellzahl im Vergleich verschiedener HCC-Ätiologien. Darstellung nach verschiedenen Geweberealen. HCV: Patienten mit einer Hepatitis C, ASH: Patienten mit alkoholischer Steatohepatitis. CD 163.

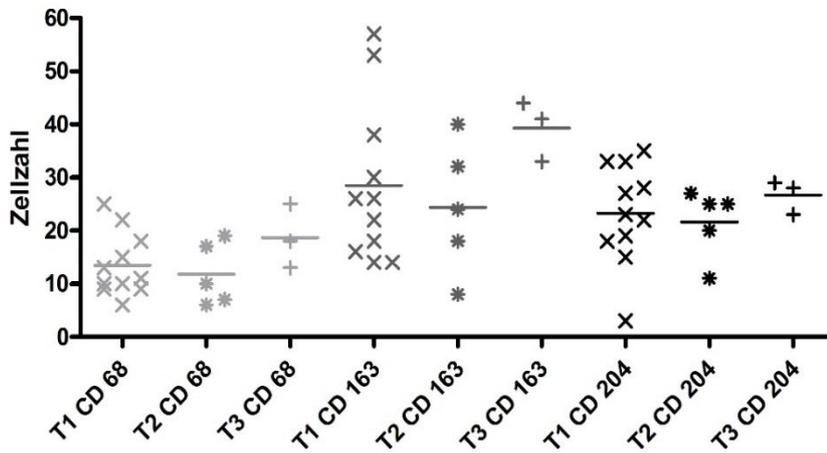


**Abbildung 3.15:** Absolute Zellzahl im Vergleich verschiedener HCC-Ätiologien. Darstellung nach verschiedenen Gewebearealen. HCV: Patienten mit einer Hepatitis C, ASH: Patienten mit alkoholischer Steatohepatitis. CD 204.

### 3.1.6 Verteilung von Makrophagen im Vergleich verschiedener Gewebeareale - Auswertung T-Stadien

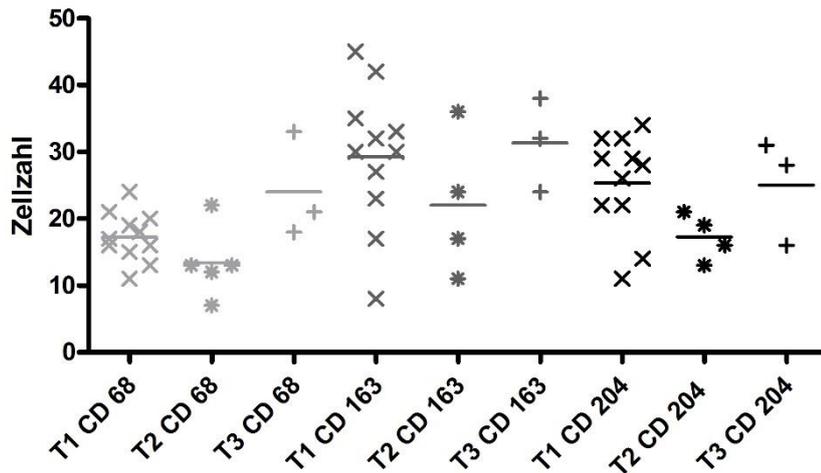
Die gezählten Zellzahlen sollten in einem weiteren Auswertungsschritt mit pathologischen Kriterien eines Tumors in Verbindung gebracht werden. Aus diesem Grund wurden die T-Stadien aus der TNM-Klassifikation in die Auswertung mit einbezogen. Für jeden der 19 Patienten wurde aus dem Datensystem des Instituts für Pathologie aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf die TNM-Klassifikation ermittelt. Die anschließenden Abbildungen zeigen die gezählten Zellzahlen (Y-Achse) in Abhängigkeit des T-Stadiums (X-Achse). Die Abbildungen sind entsprechend der gezählten Areale aufgeteilt. In einem Diagramm sind jeweils alle T-Stadien für alle drei Färbungen aufgezeigt. Die Abbildungen 3.16, 3.17 und 3.18 zeigen die Auswertungen der T-Stadien innerhalb und außerhalb des Tumors sowie im kapselnahen Tumorbereich. Hierbei sind keine signifikanten Ergebnisse erkennbar, was möglicherweise auf die geringe Fallzahl zurückzuführen ist. Es lässt sich jedoch die Tendenz erkennen, dass die als T2 eingestuftes HCCs etwas niedrige Zellzahlen aufweisen als in anderen T-Stadien. Dieser Trend zeigt sich in allen betrachteten Bereichen.

**Auswertung T-Stadien: innerhalb des Tumors**



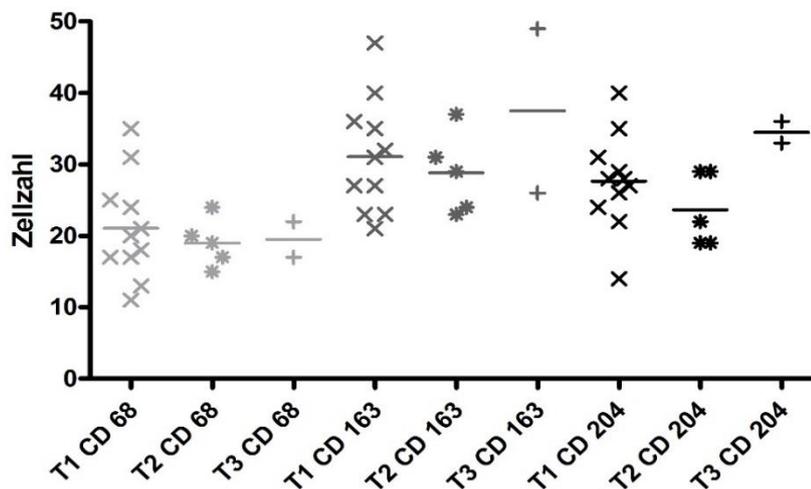
**Abbildung 3.16:** Auswertung der T-Stadien für alle drei Färbungen. Innerhalb des Tumors.

**Auswertung T-Stadien: kapselnaher Tumorbereich**



**Abbildung 3.17:** Auswertung der T-Stadien für alle drei Färbungen. Kapselnaher Tumorbereich.

### Auswertung T-Stadien: außerhalb des Tumors



**Abbildung 3.18:** Auswertung der T-Stadien für alle drei Färbungen. Außerhalb des Tumors.

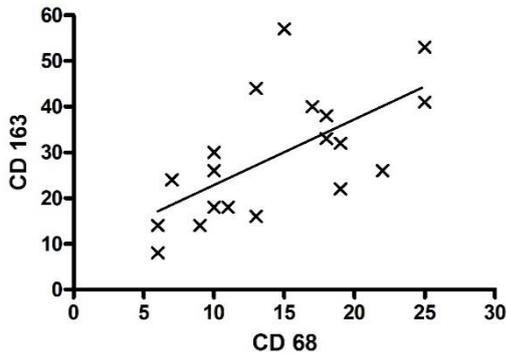
#### 3.1.7 Korrelationsbestimmungen der Anzahl an gezählten Makrophagen

Dieser Abschnitt der Auswertungen soll einen Überblick über mögliche statistische Zusammenhänge zwischen den einzelnen Färbungen vermitteln. Für eine graphische Darstellung wurden jeweils die gezählten Zellzahlen pro Patient für zwei Färbungen in ein Diagramm eingezeichnet. Die eingezeichnete Korrelationsgerade und der berechnete Korrelationskoeffizient geben an, ob es einen statistischen Zusammenhang gibt. Die Abbildung 3.19 zeigt die Korrelationsgeraden und Korrelationskoeffizienten für die gezählten Zellzahlen für jeweils zwei Färbungen.

In der Gesamtbetrachtung fällt auf, dass in allen gezeigten Graphiken eine positive Korrelation besteht. Wurden für einen Patienten in der einen Färbung hohe Zahlen an positiv gefärbten Makrophagen gezählt, zeigen sich tendenziell in einer anderen Färbung für denselben Patienten ebenfalls hohe Zellzahlen. Diese Wechselwirkung wird durch einen höheren Korrelationskoeffizienten charakterisiert. Besonders bei der Korrelation der Färbungen CD 163 und CD 204 ist dieser statistische Zusammenhang deutlich zu erkennen.

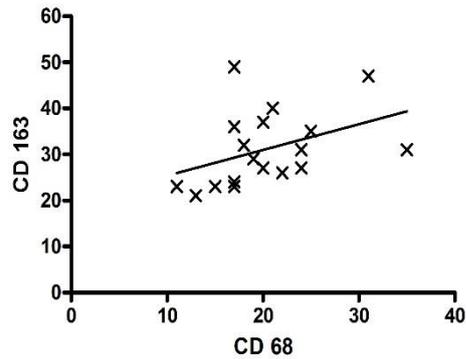
Eine weitere Auffälligkeit zeigt sich beim Vergleich der Korrelationskoeffizienten innerhalb des HCC und in den Bereichen außerhalb des Tumors. Außerhalb des Tumors lassen sich kleinere Korrelationskoeffizienten verzeichnen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der statistische Zusammenhang der gezählten Zellzahlen innerhalb des malignen Gewebes stärker ist.

**A Korrelation CD 68/CD 163 Tumor**



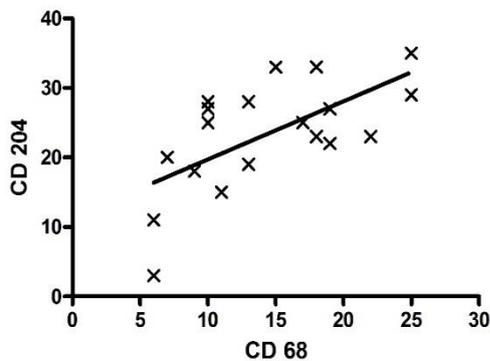
x CD 163  $r = 0,6371$   $r^2 = 0,4059$

**B Korrelation CD 68/ CD 163 außerhalb des Tumors**



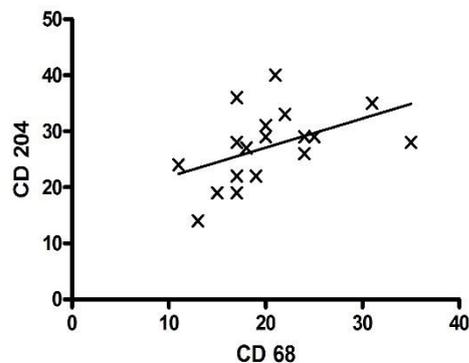
x CD 163  $r = 0,4055$   $r^2 = 0,1644$

**C Korrelation CD 68/CD 204 Tumor**



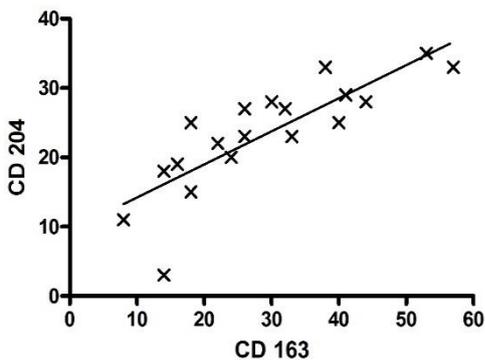
x CD 204  $r = 0,6366$   $r^2 = 0,4053$

**D Korrelation CD 68/CD 204 außerhalb des Tumors**



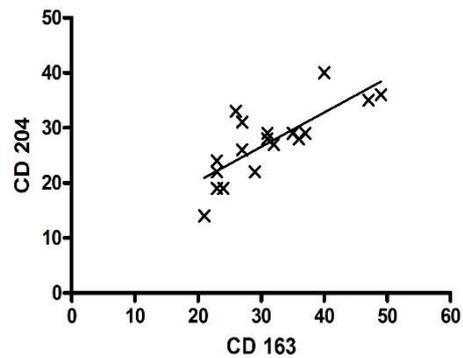
x CD 204  $r = 0,4694$   $r^2 = 0,2203$

**E Korrelation CD 163/CD 204 Tumor**



x CD 204  $r = 0,8225$   $r^2 = 0,6765$

**F Korrelation CD 163/CD 204 außerhalb des Tumors**



x CD 204  $r = 0,7786$   $r^2 = 0,6062$

**Abbildung 3.19:** Korrelationsauswertung der drei Färbungen. Die Daten beziehen sich auf die Zellzählungen innerhalb und außerhalb des Tumors; A: CD 68/CD 163 Tumor, B: CD 68/CD 163 außerhalb des Tumors, C: CD 68/CD 204 Tumor, D: CD 68/CD 204 außerhalb des Tumors, E: CD 163/CD 204 Tumor, F: CD 163/CD 204 außerhalb des Tumors

### 3.1.8 Kategorieauswertungen der einzelnen Gewebsareale

Um neben der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen mit absoluten Zellzahlen eine vereinfachte Auswertungsmethode zu verwenden, wurde eine Zuordnung der gezählten Zellzahlen zu einzelnen Kategorien durchgeführt. Da die Kategorieauswertung jedoch keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn lieferte, wird auf eine ausführlichere Darstellung an dieser Stelle verzichtet.

### **3.2 Ergebnisse der Ko-Kulturen mit HCC-Zellen: Expressionsanalyse der Makrophagen**

Im Ko-Kultur-Versuch der Zellkultur wurden die Makrophagen (THP-1 Zellen) in einen indirekten Kontakt mit HCC-Zellen (HuH7 Zellen) gebracht. Ziel dieses Versuchs war es, die dadurch induzierten Veränderungen der Expression von makrophagenspezifischen Oberflächenstrukturen, Enzymen und Zytokinen der THP-1 Zellen zu analysieren und diese in einen möglichen Zusammenhang mit der formulierten M1/M2-Hypothese zu bringen. Die Zellkulturversuche wurden an pro-monozytär belassenen und vorgeprimten Makrophagen durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt nach jeweiliger Vorbehandlung der Makrophagen und Art des Makrophagenmarkers.

#### 3.2.1 Pro-monozytäre Zellen im Kontakt mit HCC-Zellen

Um den Effekt der HCC-Zellen auf die Monozyten zu beschreiben, wurden in ersten Versuchen die Monozyten in einen indirekten Kontakt mit den HCC-Zellen gebracht. Durch diesen indirekten Kontakt konnten nach 96 Stunden im Lichtmikroskop Veränderungen der Makrophagen hinsichtlich ihrer Morphologie erkannt werden. An der Oberfläche der Makrophagen wurden feine Zellausläufer sichtbar und es erfolgte ein Anheften der Suspensionszellen am Kunststoffboden der Zellkulturschale.

Um die M1/M2-Hypothese näher zu untersuchen und die Makrophagen dieses Versuchs in den Komplex der Thematik einzuordnen wurden makrophagenspezifische Marker mittels *Real-Time* PCR untersucht. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der *Real-Time* PCR. Auf der Y-Achse ist die jeweilige relative Expression der einzelnen Makrophagenmarker und Zytokine im Verhältnis zu GAPDH dargestellt. Die X-Achse ist mit den Versuchsgruppen beschriftet.

### Oberflächenmarker:

Makrophagen können entsprechend ihrem Expressionsprofil von Oberflächenstrukturen genauer charakterisiert werden. Aus diesem Grund wurden spezifische Oberflächenmarker näher untersucht.

CD 14, das von M1-Makrophagen und ebenfalls auf der Zelloberfläche von M2-Makrophagen exprimiert wird (Mantovani, Sica et al. 2004), wird durch die Ko-Kultur sehr deutlich hochreguliert.

Der *macrophage colony-stimulating factor receptor* (M-CSFR), der ebenfalls unter CD 115 bekannt ist (Murphy et al. 2012), wurde in unseren Ko-Kulturen untersucht. Auch bei diesem ist eine signifikante Hochregulierung bei den pro-monozytär belassenen Makrophagen zu erkennen.

Der Scavenger-Rezeptor CD 163 wurde bisher als M2-Marker beschrieben (S K Lau et al. 2004, Mantovani, Sica et al. 2004, Solinas et al. 2009). Durch den indirekten Kontakt mit den HCC-Zellen zeigt sich auch hier eine deutlich gesteigerte Expression des Rezeptors.

Ein weiterer Marker, der bisher den M2-Makrophagen zugeschrieben wurde, ist CD 204 (Saito et al. 2014). Für diesen Makrophagenmarker zeigt sich bei den Monozyten eine deutliche Expressionssteigerung. Die Abbildung 3.20 zeigt das Expressionsprofil der Oberflächenmarker.

### Zytokine:

Um die TAM in den Zusammenhang des entzündlichen Umfelds innerhalb eines HCC einzuordnen, wurden neben den Oberflächenstrukturen Zytokine hinsichtlich ihres Expressionsprofils untersucht.

Das im Entzündungsgeschehen proinflammatorisch wirkende IL-6 (Allavena et al. 2008) zeigt auch im indirekten Kontakt mit den HuH7 Zellen eine Expressionssteigerung. Ein weiteres in der Immunantwort relevantes Zytokin ist das IL-8 (CXCL8), das auch im Rahmen der Angiogenese eine Schlüsselrolle spielt (Murphy et al. 2012). Im dargestellten Zellkulturmodell werden IL-6 und IL-8 verstärkt exprimiert.

Ein weiteres Zytokin, das im Zellkulturmodell untersucht wurde, war das IL-10. Diesem Zytokin werden immunsuppressive Aufgaben im Rahmen von Entzündungen zugeschrieben (Allavena et al. 2008). In der Abbildung 3.21, die die Ergebnisse der *Real-Time* PCR der pro-monozytären Zellen zeigt, wird IL-10 im Kontakt mit den HCC-Zellen herunterreguliert.

Ein weiteres proinflammatorisches Zytokin ist TNF $\alpha$  (Murphy et al. 2012). Die Expression dieses Zytokins wurde ebenfalls in den Ko-Kultur Experimenten ermittelt, um die Funktion von TAM im Tumorgeschehen besser zu verstehen. Die Monozyten erfahren eine signifikante Hochregulierung im indirekten Kontakt mit den HuH7 Zellen. Die Abbildung 3.21 zeigt das Expressionsprofil der beschriebenen Zytokine.

### Weitere Makrophagenmarker:

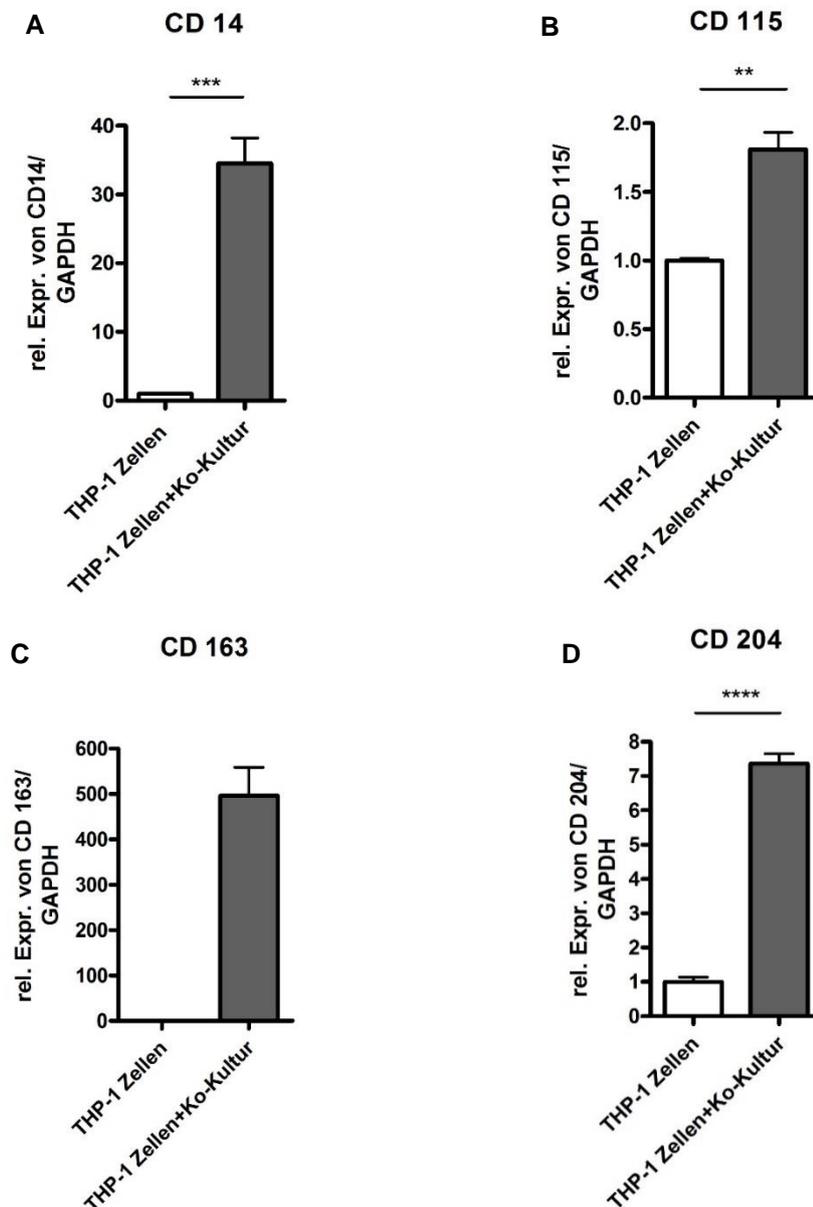
M1-Makrophagen sind insbesondere in der Infektabwehr aktiv. Aus diesem Grund tragen sie den MHC-II-Komplex, der an der Präsentation von Antigenen beteiligt ist (Murphy et al. 2012). Auch dieses Charakteristikum der Makrophagen wurde in unser Zellkulturmodell mit einbezogen. So zeigt sich für MHC-II eine verstärkte Expression als die Monokulturen.

In der Abbildung 3.22 ist außerdem eine Expressionsanalyse für die MMP-9 dargestellt, die eine wichtige Rolle im Gewebeumbau und im Prozess der Metastasierung spielt (Chantrain et al. 2004). Wie bei den anderen Makrophagenmarkern auch bereits beschrieben, ist hier eine vermehrte Expression der MMP zu verzeichnen.

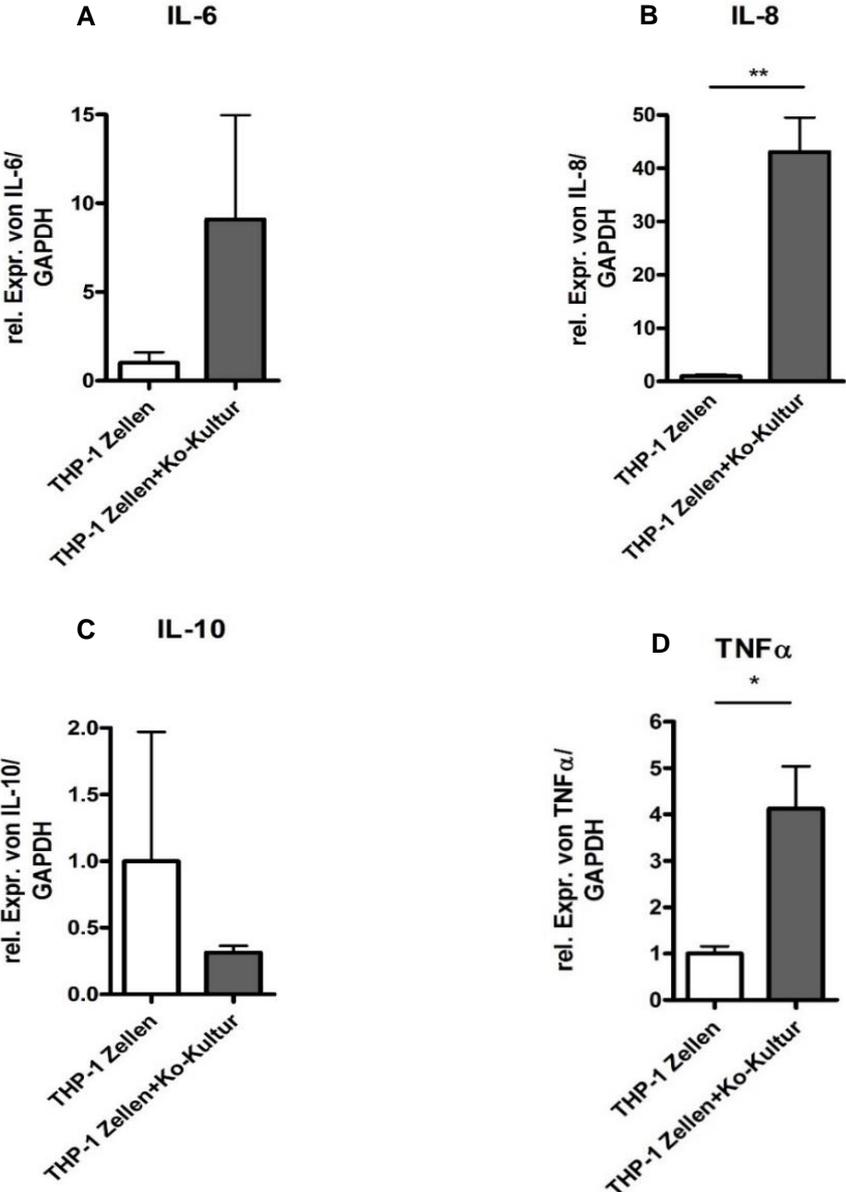
Arginase 2 spielt eine essentielle Rolle im Arginin- und Ornithinstoffwechsel. Auch in Makrophagen ist dieses Enzym in niedrigen Konzentrationen zu finden und kann deshalb als Marker für Makrophagen genutzt werden (Chang et al. 1998, Mantovani et al. 2002). Im Zellkulturmodell zeigt sich in der Ko-Kultur eine Hochregulierung dieses Enzyms durch die Monozyten im Kontakt mit Tumorzellen.

Makrophagen besitzen, wie andere Phagozyten auch, Strategien, um bakterielle Erreger intrazellulär abzutöten. Wichtig hierbei sind antimikrobielle Peptide, das Stickoxid und reaktive Sauerstoffspezies. Wichtige reaktive Sauerstoffspezies sind das Hyperoxid-Anion und auch das Wasserstoffperoxid. NO wird von einer induzierbaren

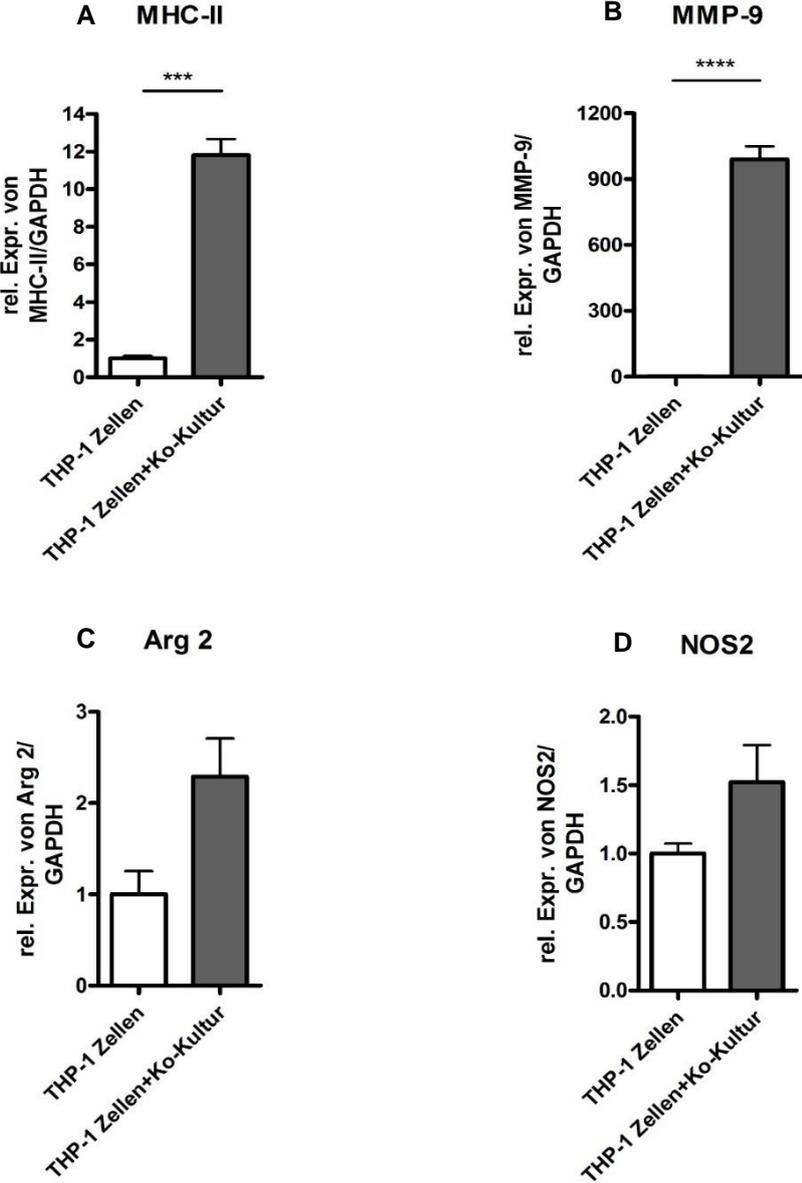
Stickstoff-Oxid-Synthase (iNOS2/NOS2) gebildet. Dieses Enzym kann durch eine Signalkaskade in Phagozyten in seiner Funktion aktiviert werden. Bakterielle Polypeptide sind ein Stimulus für Rezeptoren, die am Anfang entsprechender Signalkaskaden stehen (Murphy et al. 2012). Das Enzym NOS2 wurde im beschriebenen Zellkulturmodell ebenfalls zur Charakterisierung des Phänotyps der Makrophagen herangezogen, da diesem Enzym eine Schlüsselfunktion in der Infekt- und Tumorabwehr zukommt. In der Abbildung 3.22 wird deutlich, dass auch hier die indirekte Ko-Kultur eine verstärkte Expression dieses Enzyms bewirkt. Die Abbildung 3.22 zeigt weitere Makrophagenmarker.



**Abbildung 3.20:** PCR-Ergebnisse der Monozyten im Kontakt mit HCC-Zellen. Expressionsprofil der Oberflächenmarker. A: CD 14; B: CD 115; C: CD 163; D: CD 204



**Abbildung 3.21:** PCR-Ergebnisse der Monozyten im Kontakt mit HCC-Zellen. Expressionsprofil der Zytokine. A: IL-6, B: IL-8, C: IL-10, D: TNFα



**Abbildung 3.22:** PCR-Ergebnisse der Monozyten im Kontakt mit HCC-Zellen. Expressionsprofil der weiteren Makrophagenmarker. A: MHC-II, B: MMP-9, C: Arg2, D: NOS2

### 3.2.2 Differenzierte Makrophagen im Kontakt mit HCC-Zellen

Die vorweg dargestellten Ergebnisse der Ko-Kultur zeigen für alle verwendeten Makrophagenmarker Expressionsveränderungen. Die meisten im Zellkulturmodell näher untersuchten Zytokine oder Oberflächenstrukturen werden von den Monozyten in indirekter Ko-Kultur verstärkt gebildet.

In einem weiteren Schritt war eine Expressionsanalyse der Makrophagen von großer Relevanz. In einer Versuchsgruppe wurden die Monozyten mittels PMA in Makrophagen überführt. Hierbei wurde beobachtet, dass das PMA die THP-1 Zellen nach 24 Stunden auf dem Plastikboden der Zellkulturschale adhärent werden ließ. Der lediglich mit PMA belassene Versuchsansatz wird im Folgenden als „unbehandelte“ Gruppe bezeichnet. Bei zwei weiteren Versuchsgruppen erfolgte ergänzend zu einer PMA-Stimulation der Zusatz ausgewählter Zytokine. Mit der Zytokinstimulation mit IFN $\gamma$ /LPS und IL-4/ IL-13 sollte eine Differenzierung in M1- oder M2- Makrophagen erreicht werden. In der folgenden Auswertung werden die mit IFN $\gamma$ /LPS stimulierten Makrophagen als M1-Gruppe und die mittels IL-4/ IL-13 differenzierten Makrophagen entsprechend als M2-Gruppe bezeichnet. Im Zusammenhang mit den Ko-Kulturen sollte beobachtet werden, ob das zelluläre Milieu der Ko-Kultur die spezifischen Expressionen der Marker beeinflussen oder deutlich verändern kann. Des Weiteren sollte der Frage nachgegangen werden, ob ein durch die Zytokinvorbehandlung induzierter Phänotyp durch den indirekten Kontakt mit HCC- Zellen modifiziert werden kann.

#### Oberflächenmarker:

Die Abbildung 3.23 zeigt die Ergebnisse der Expressionsanalyse für die mit Zytokinen vorbehandelten Makrophagen.

Eine Hochregulierung des Glykoproteins CD 14 lässt sich in den Makrophagen und zusätzlich in der M1-Gruppe erkennen. In der mit IL-4 und IL-13 vorgeprimten Gruppe ist diese Tendenz der Hochregulierung nicht zu erkennen.

Eine vermehrte Expression von CD 115 zeigt sich in der Versuchsgruppe, die durch IFN $\gamma$ /LPS zu einem M1-Phänotyp differenziert wurde. Eine gegenteilige Expressionsänderung ist in den beiden anderen Ansätzen verdeutlicht.

Eine alleinige Stimulation der Makrophagen mit IL-4/IL-13 führt zu einer vermehrten Expression von CD 163. Im indirekten Kontakt mit den HCC-Zellen wird CD 163 in geringerem Maße exprimiert.

Signifikante Ergebnisse ergeben sich für den Scavenger-Rezeptor CD 204. Eine Steigerung der Expression zeigt sich bei den Makrophagen. Auch in den Versuchsgruppen, die vordifferenzierte M1- und M2-Makrophagen enthalten, ist der Expressionsanstieg sehr deutlich zu erkennen.

### Zytokine:

Auch das Expressionsprofil der vordifferenzierten Makrophagen wurde hinsichtlich der bereits beschriebenen Zytokine untersucht.

Ein signifikantes Ergebnis zeigt sich in Abbildung 3.24 für das Zytokin IL-6 nur bei den nicht weiter differenzierten Makrophagen. Das IL-6 wird durch die Ko-Kultur verstärkt exprimiert. In den zusätzlich mit Zytokinen vorgeprimten Versuchsgruppen lässt sich eine ähnliche Tendenz erkennen.

Ähnliches gilt für das die angiogenesefördernde IL-8. Hier ist in allen drei in Abbildung 3.24 dargestellten Versuchsgruppen eine signifikante Hochregulierung dieses Interleukins zu erkennen. Eine im besonderen Maße verstärkte Expression zeigt sich in der M1-Gruppe, die zuvor mit IFN $\gamma$ /LPS versetzt wurde. Anders als bei IL-6 fällt die Expressionssteigerung der M2-Gruppe geringer aus als in der M1-Gruppe.

Im Gegensatz zu den Monozyten werden von den Makrophagen, die mit IFN $\gamma$ /LPS und IL-4/IL-13 differenziert wurden, vermehrt IL-10 gebildet. Eine sehr deutliche Expressionssteigerung lässt sich in der unbehandelten Gruppe erkennen.

Das ebenfalls untersuchte TNF $\alpha$  zeigt in allen vorbehandelten Versuchsgruppen eine verstärkte Expression durch die vorgeprimten und durch PMA differenzierten Makrophagen. Signifikante Veränderungen zeigen sich in der unbehandelten und in der M2-Gruppe.

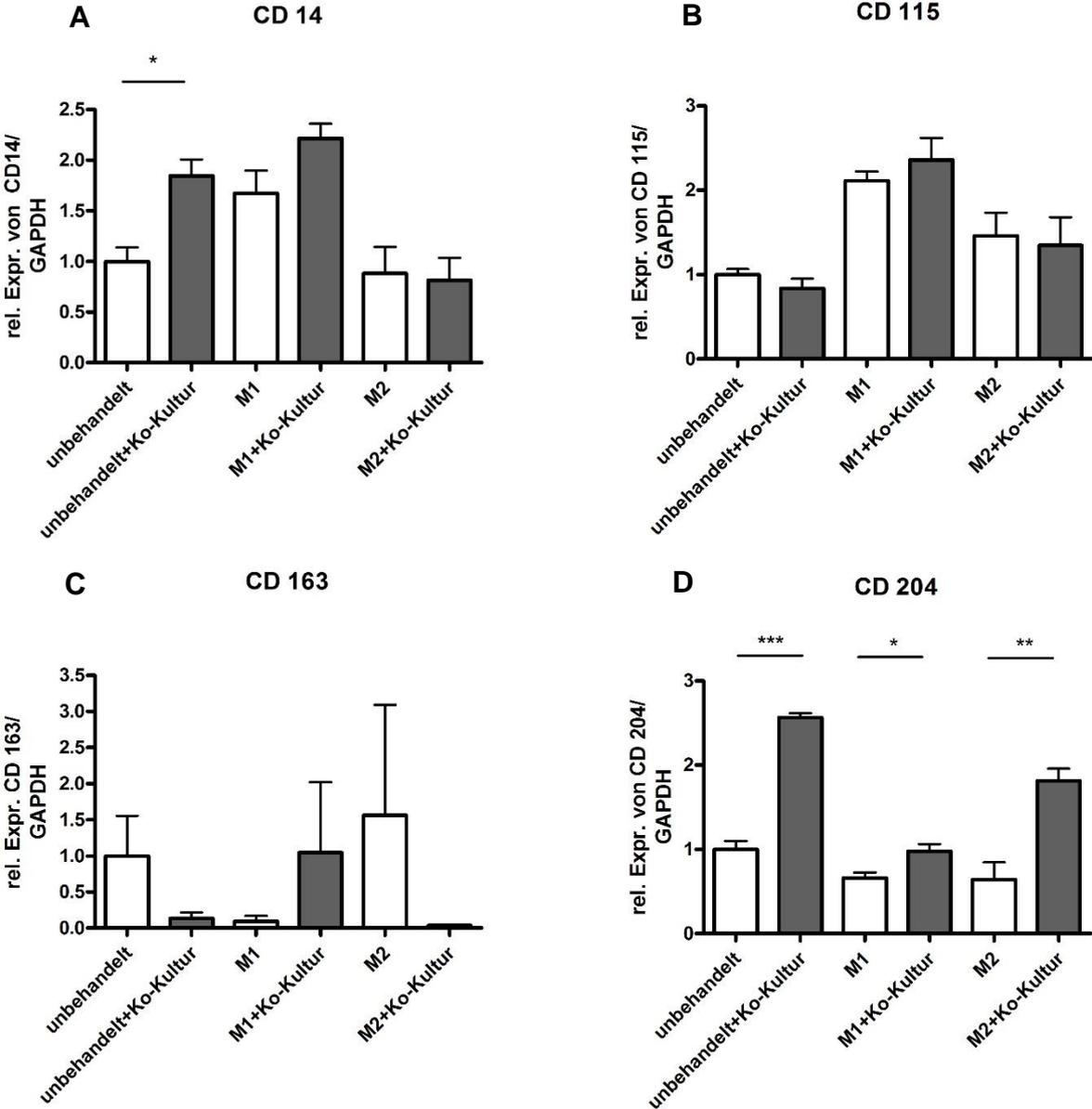
### Weitere Makrophagenmarker:

Signifikante Expressionssteigerungen des MHC-II-Komplexes sind neben der beschriebenen unbehandelten Versuchsgruppe auch in der mit IL-4 und IL-13 vorgeprimten Gruppe erkennbar. Eine ähnliche Tendenz zeigt sich in den nicht weiter differenzierten Makrophagen der Ko-Kultur. Ein relativ hohes Expressionsniveau zeigt die M1-Gruppe. Auch hier wird der MHC-II Komplex in der Gruppe der Ko-Kultur vermehrt exprimiert.

Auch für MMP-9 können in allen Versuchsgruppen deutliche Expressionssteigerungen verzeichnet werden.

Von den mit IFN $\gamma$ /LPS und IL-4/IL-13 vorgeprimten Makrophagen wird in Abbildung 3.25 vermehrt Arginase 2 exprimiert. In den unbehandelten Makrophagen ist eine leichte Runterregulierung zu verzeichnen.

Das Enzym NOS2 wird durch den indirekten Kontakt mit HCC-Zellen in geringeren Mengen von den Makrophagen aller Versuchsgruppen exprimiert. Ein signifikantes Ergebnis zeigt sich in den unbehandelten Makrophagen. An dieser Stelle ist die verminderte Expression sehr deutlich zu erkennen.



**Abbildung 3.23:** PCR-Ergebnisse der Makrophagen im Kontakt mit HCC-Zellen. Expressionsprofil der Oberflächenmarker. A: CD 14, B: CD 115, C: CD 163, D: CD 204

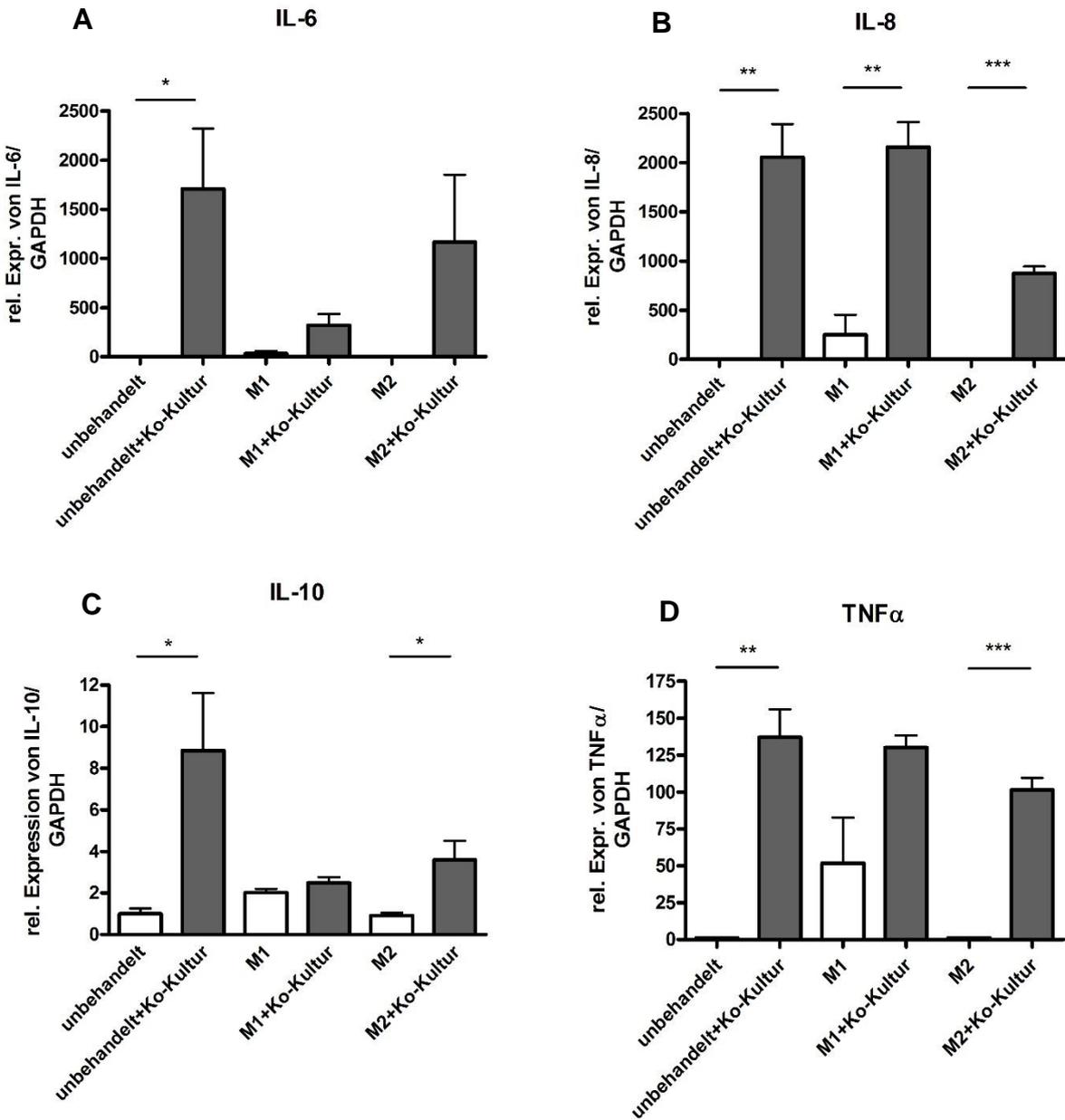
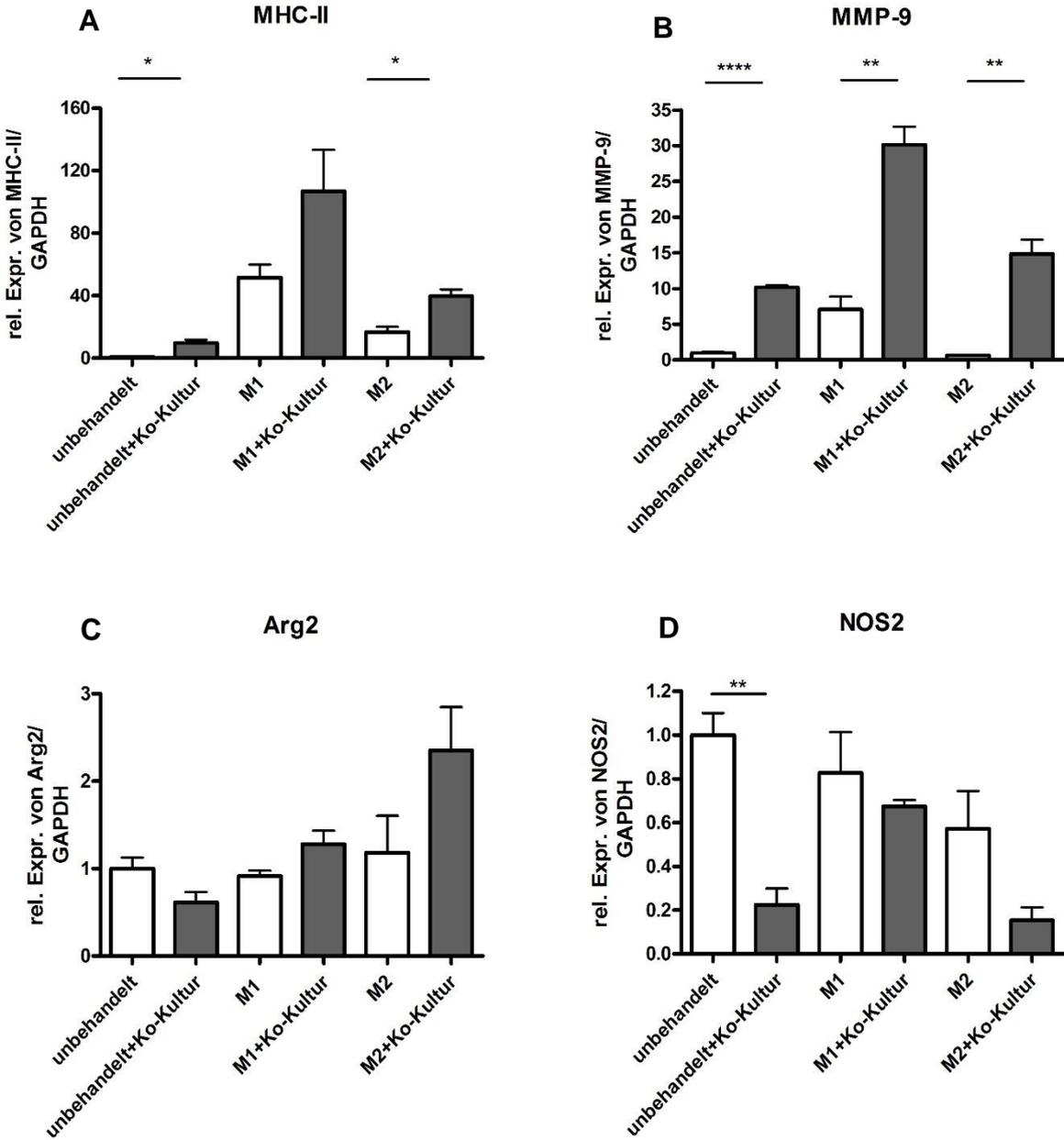


Abbildung 3.24: PCR-Ergebnisse der Makrophagen im Kontakt mit HCC-Zellen. Expressionsprofil der Zytokine. A: IL-6, B: IL-8, C: IL-10, D: TNFα



**Abbildung 3.25:** PCR-Ergebnisse der Makrophagen im Kontakt mit HCC-Zellen. Expressionsprofil der weiteren Makrophagenmarker. A: MHC-II, B: MMP-9, C: Arg2, D: NOS2

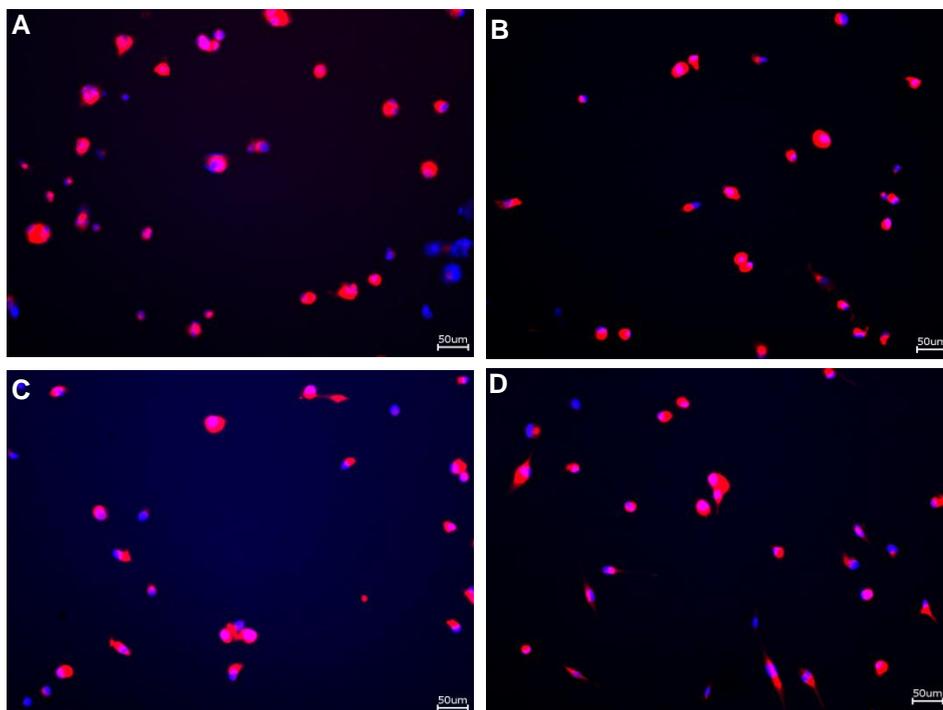
### 3.3 Ergebnisse der Ko-Kulturen mit HCC-Zellen: Immunfluoreszenz

Die in einer 24-Well Platte ausgesäten Monozyten wurden weiter zu Makrophagen differenziert. Im Anschluss erfolgten ein indirekter Kontakt mit einer HCC-Zelllinie und eine Stimulation mit den bereits beschriebenen Zytokinen, die eine Entwicklung in einen M1- oder M2-Phänotyp zulassen.

Nach abgeschlossener Immunfluoreszenzfärbung erschienen alle Zellkerne der Makrophagen durch das 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) in einem leuchtenden blau, wenn das Fluorochrom zuvor mit Licht einer entsprechenden Wellenlänge angeregt wurde.

In dem beschriebenen Versuch wurden Antikörper verwendet, die die Antigene CD 68, CD 163 und CD 204 binden und mit dem Fluorochrom ALEXA Fluor 555 gekoppelt waren. Hieraus ergibt sich, dass spezifisch gefärbte Zellen im mikroskopischen Bild rot erscheinen.

#### Färbeergebnis: CD 68



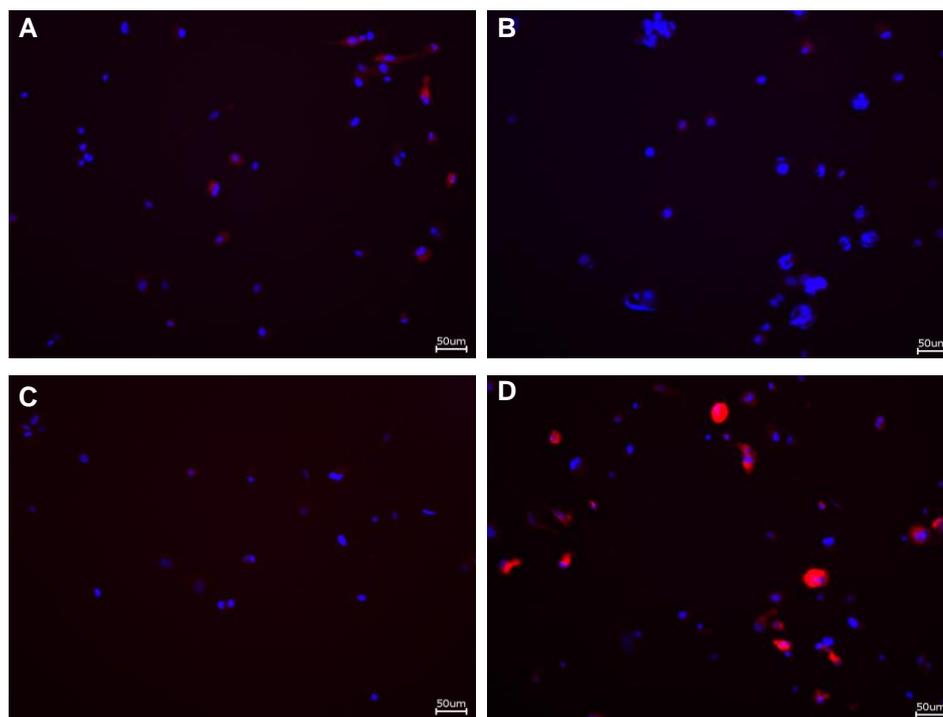
**Abbildung 3.26:** Immunfluoreszenz CD 68. A: unbehandelte Makrophagen, B: Makrophagen+Ko-Kultur, C: Makrophagen+IFN $\gamma$ /LPS, D: Makrophagen+IL-4/IL-13, Rot: CD 68, Blau: DAPI

Die Abbildung 3.26 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung für den Pan-Makrophagenmarker CD 68. In Graphik 3.26 ist erkennbar, dass alle Makrophagen positiv gefärbt sind und somit in diesem Zellkulturmodell das Oberflächenmolekül CD 68 tragen. Ähnlich verhält es sich mit den Makrophagen, die einen indirekten Kontakt mit HuH7 Zellen erfahren haben.

Durch eine Stimulation mit dem IFN $\gamma$  und mit LPS erfolgte ein Priming der Makrophagen, sodass diese einen Phänotyp ausbildeten, der einem M1-Phänotyp entspricht. Auch diese Versuchsgruppe konnte durch ein positives Fluoreszenzsignal für die CD 68-Färbung charakterisiert werden.

Auch in der M2-Gruppe waren die THP-1 Zellen nach der Fixierung und Färbung größtenteils positiv für das Transmembran-Glykoprotein CD 68. Die Versuchsgruppe, die nur mit PMA belassen wurde, diente in unserem Fall als Kontrollgruppe.

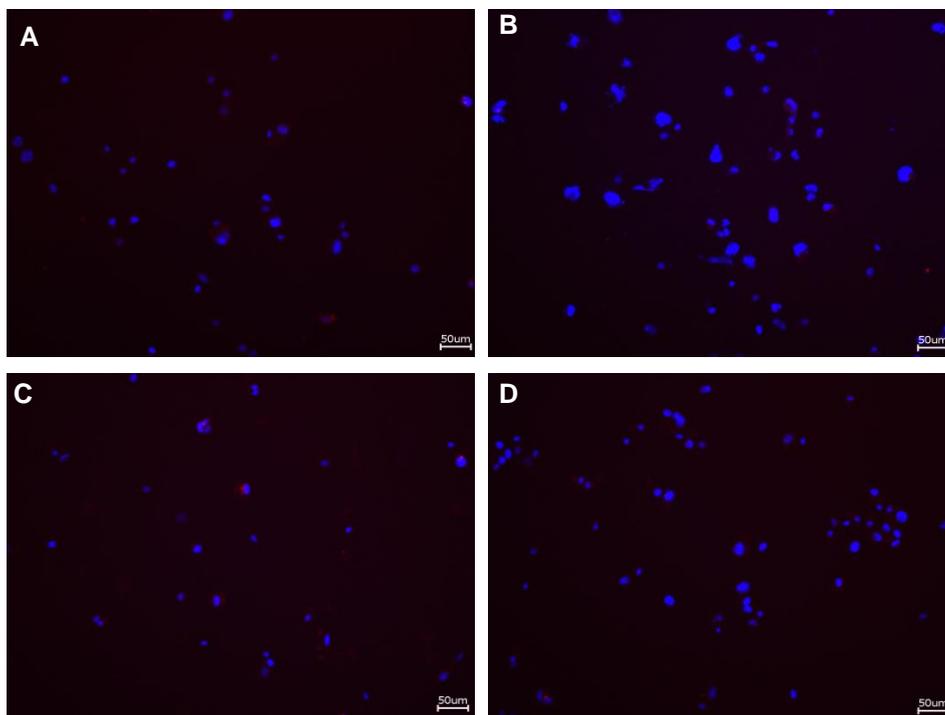
### Färbeergebnis: CD 163



**Abbildung 3.27:** Immunfluoreszenz CD 163. A: unbehandelte Makrophagen, B: Makrophagen+Ko-Kultur, C: Makrophagen+IFN $\gamma$ /LPS, D: Makrophagen+IL-4/IL-13, Rot: CD 163, Blau: DAPI

Die obige Abbildung 3.27 zeigt das Ergebnis der Immunfluoreszenz für CD 163. CD 163 wurde in vielen Publikationen als klassischer M2- Marker beschrieben. Durch eine Stimulation mit IL-4 und IL-13 wird ein M2-Phänotyp in den Makrophagen induziert, der in der Immunfluoreszenz durch eine positive Färbung für CD 163 charakterisiert werden kann. Auch in der PMA-Kontrolle ist eine leichte Färbung zu erkennen. Anders verhält es sich in der Gruppe der Ko-Kultur und in der M1-Gruppe. In diesen Fällen sind nahezu keine THP-1 Zellen zu erkennen, die CD 163 auf ihrer Oberfläche exprimieren.

### Färbeergebnis: CD 204



**Abbildung 3.28:** Immunfluoreszenz CD 204. A: unbehandelte Makrophagen, B: Makrophagen+Ko-Kultur, C: Makrophagen+IFN $\gamma$ /LPS, D: Makrophagen+IL-4/IL-13, Rot: CD 204, Blau: DAPI

In der Abbildung 3.28 ist die Fluoreszenzfärbung für den als M2-Marker klassifizierten Scavenger-Rezeptor CD 204 zu erkennen. Schwach positiv gefärbte Zellen sind bei den nicht weiter differenzierten Makrophagen und in der M1-Gruppe zu erkennen. In den anderen beiden Versuchsgruppen fällt das Färbeergebnis negativ aus.

## 4. Diskussion

### 4.1 Makrophagen innerhalb eines HCC lassen sich dem M2-Phänotyp zuordnen

Makrophagen stellen einen großen Teil des Immunzell-Infiltrates in Tumoren dar und spielen eine relevante Rolle im Wechselspiel zwischen Tumor- und Stromazellen (Capece et al. 2013, Mantovani et al. 1992). Schematisch können Makrophagen in einen M1- und einen M2-Phänotyp unterteilt werden. Durch den Kontakt mit IFN $\gamma$  und LPS werden klassische M1-Makrophagen gebildet, die proinflammatorisch agieren und somit essentiell in der Bekämpfung von Mikroorganismen sind. Kommen Monozyten in Kontakt mit IL-4, IL-13 oder Glukokortikoiden, differenzieren diese in alternativ aktivierte M2-Makrophagen, die am Gewebeumbau und der Angiogenese beteiligt sind (Mantovani et al. 2002) TAM weisen nach bisherigen Beschreibungen einen alternativen Phänotyp und somit Eigenschaften auf, die denen der M2-Makrophagen zugeordnet werden können (Sica et al. 2006). Ausgehend von dieser M1/M2-Hypothese sollte in dieser Arbeit mittels immunhistochemischer Färbungen und *in vitro*-Ko-Kulturrexperimenten der inflammatorische Phänotyp von TAM im HCC näher beschrieben werden.

M2-Makrophagen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche die für alternativ aktivierte Makrophagen charakteristischen Marker CD 163 und CD 204 (Komohara et al. 2008, Saito et al. 2014). Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden neben dem Pan-Makrophagenmarker CD 68 die erwähnten Scavenger-Rezeptoren immunhistochemisch gefärbt. Dabei zeigten sich unabhängig von der zugrunde liegenden HCC-Ätiologie positiv gefärbte Zellen in der CD 163- und der CD 204-Färbung (Abbildung 3.12). Dieses Ergebnis legt nahe, dass TAM im HCC M2-typische Charakteristika aufweisen. Immunhistochemische Färbungen von Makrophagen bzw. Mikroglia in humanen Gliomen zeigten ebenfalls eine Expression von CD 163 und CD 204. Folglich wurden die infiltrierenden Makrophagen dieser Tumoren in ihrem Aktivitätsprofil den M2-Makrophagen zugeordnet (Komohara et al. 2008).

Bronkhorst et al. führten Immunfluoreszenzfärbungen auf Paraffin-Gewebe aus Aderhautmelanomen durch. Eine gleichzeitige Expression von CD 68 und CD 163 in Doppelfärbungen bekräftigt wiederum die Hypothese, dass TAM Charakteristika eines M2-Phänotyps innehaben (Bronkhorst et al. 2011).

Ko-Kultur-Experimente von Makrophagen und HCC-Zellen dienen im experimentellen Teil dieser Doktorarbeit der Erstellung von Expressionsprofilen der TAM. In diesen *in vitro*-Versuchen wurden die im indirekten Kontakt mit den HCC-Zellen stehenden Makrophagen auf Oberflächenstrukturen, Zytokine und weitere Marker, die charakteristisch für Makrophagen sind, untersucht.

Unter der Annahme, dass auch die Makrophagen in unseren *in vitro*-Experimenten die M2-Marker CD 163 und CD 204 exprimieren, wurden diese in den Ko-Kulturen näher untersucht. Die Abbildung 3.23 zeigt eine deutliche Expressionssteigerung des Scavenger-Rezeptors CD 204 in allen Versuchsgruppen nach dem Kontakt mit den HCC-Zellen. An dieser Stelle können Parallelen zu dem Ergebnis in der Immunhistochemie gezogen werden. In der Immunfluoreszenz konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden (Abbildung 3.28). Bei der Interpretation der Immunfluoreszenz muss allerdings auch die Möglichkeit eines technischen Fehlers mit einbezogen werden. Im Abschnitt 4.5.5 wird hierauf näher eingegangen. Da jedoch in unseren Expressionsanalysen und in der Immunhistochemie an Paraffingewebe eine Expression des M2-Markers CD 204 in den TAM ermittelt werden konnte, lässt sich schlussfolgern, dass unsere TAM auch an dieser Stelle ein wichtiges Charakteristikum von M2-Makrophagen aufweisen. Anders verhält es sich mit dem vielfach als M2-Marker beschriebenen Scavenger-Rezeptor CD 163. In der Immunhistochemie zeigt sich eine deutliche Positivität für diesen Marker. Dieses Ergebnis findet sich in den Expressionsanalysen nicht wieder. Hier zeigen sich unabhängig von der Versuchsgruppe ein insgesamt niedriges Expressionsniveau sowie eine hohe Standardabweichung (Abbildung 3.23). Auch in der Immunfluoreszenz lässt sich in der Ko-Kultur keine deutliche Färbung detektieren (Abbildung 3.27). Daraus lässt sich schließen, dass CD 163 möglicherweise kein optimaler M2-Marker ist oder unsere TAM die Eigenschaft, diesen Scavenger-Rezeptor zu exprimieren, in den *in vitro*-Experimenten nicht oder nur unvollständig erlangen.

Die Angiogenese ist ein elementarer Prozess für die Progression und das Wachstum eines Tumors (Hanahan & Folkman 1996). Ruffell et al. beschreiben TAM als eine Zellpopulation, die in der Lage ist, einen Einfluss auf die Angiogenese zu nehmen (Ruffell et al. 2012). TAM sind daran beteiligt, neben bestimmten Wachstumsfaktoren wie beispielsweise VEGF, PDGF und TGF- $\beta$ , weitere Chemokine zu bilden, die den

Vorgang der Angiogenese fördern (Eljaszewicz et al. 2013, Solinas et al. 2009). Eine bedeutende Rolle spielt dabei das IL-8. Koch et al. konnten anhand von *in vitro* und *in vivo*-Experimenten darstellen, dass von Makrophagen stammendes IL-8 maßgeblich an dem Prozess der Angiogenese beteiligt ist (Koch et al. 1992). Im beschriebenen Zellkulturmodell dieser Doktorarbeit wurde ebenfalls der Effekt von HCC-Zellen auf die Produktion von IL-8 durch Makrophagen untersucht (Abbildungen 3.21 und 3.24). Hier konnte gezeigt werden, dass die Makrophagen in unserem Ko-Kultur-Modell vermehrt dieses Interleukin bilden und auf diesem Wege eine Angiogenese begünstigen können. Diese Erkenntnis spiegeln auch die immunhistochemischen Auswertungen von Peng et al. wieder. Diese Arbeit zeigt eine Korrelation zwischen TAM-Zahlen und der Anzahl an kleinen Gefäßen in HCC-Geweben. Diese Versuche lassen ebenfalls die Schlussfolgerung zu, dass TAM die Angiogenese begünstigen (Peng et al. 2005).

Im beschriebenen Ko-Kulturmodell können die Makrophagen durch eine signifikante Hochregulierung von MMP-9 charakterisiert werden (Abbildungen 3.22 und 3.25). Die vermehrte Bildung dieser MMP ist unabhängig von der jeweiligen Vorbehandlung mit Zytokinen in allen Versuchsgruppen erkennbar. Die Produktion von MMP-9 durch TAM wurde bereits von einigen Autoren beschrieben (Bingle et al. 2002, Rogers & Holen 2011, Solinas et al. 2009). Wie dem IL-8 kommt der MMP-9 ebenfalls eine essentielle Rolle im Prozess der Angiogenese zu. Chantrain et al. konnten in einem Maus-Modell und anhand einer humanen Neuroblastom-Zelllinie zeigen, dass MMP-9 an der Angiogenese beteiligt ist und zudem auf die Architektur von Blutgefäßen innerhalb eines Tumors Einfluss nimmt (Chantrain et al. 2004). Versuche an primären Makrophagen konnten verdeutlichen, dass neben neutrophilen Granulozyten insbesondere die M2-Makrophagen Vorstufen von MMP-9 sezernieren (Zajac et al. 2013). Eine Ko-Kultivierung von Makrophagen mit verschiedenen humanen Brustkrebszelllinien konnte ebenfalls eine signifikante Expressionssteigerung von MMPs nachweisen (Hagemann et al. 2004).

Neben der Angiogenese ist auch die Metastasierung ein relevanter Tumor fördernder Prozess, den M2-Makrophagen mit ihren vielfältigen Eigenschaften begünstigen können (Mantovani & Sica 2010). Gelingt eine Hemmung von MMP-9 in *in-vitro*-Experimenten, kann die Metastasierung von malignen Zellen eingeschränkt werden. Als Grundlage für entsprechende Experimente diente Hua und Muschel eine

Fibroblastenzelllinie aus Rattenembryos. Diese Zelllinie exprimiert in hohem Maße MMP-9. Um den Zusammenhang von MMP-9 und der Metastasierung näher zu untersuchen, wurde die MMP-9 gezielt mittels eines Ribozyms gehemmt. Nach Injektion dieser Zellen in Nacktmäusen konnte eine Reduzierung von Lungenmetastasen ermittelt werden (Hua & Muschel 1996). Diese Ausführungen zeigen sehr deutlich, dass MMP-9 eine wichtige Rolle im komplexen Prozess der Metastasierung spielt. Vergleicht man diese Erkenntnisse mit dem MMP-9-Expressionsprofil unserer TAM, lässt sich der Schluss ziehen, dass durch unsere Ko-Kultur-Experimente ein weiteres typisches M2-Charakteristikum der TAM deutlich geworden ist.

Entsprechend ihrem Funktionsprofil lassen sich TAM dem Phänotyp der M2-Makrophagen zuordnen. So lässt sich die Sekretion des anti-inflammatorischen IL-10 ebenfalls als ein M2-Charakteristikum auffassen (Shirabe et al. 2012). Dieses anti-inflammatorische Zytokin zeigte in unseren Expressionsanalysen eine Steigerung der Expression in vorbehandelten Makrophagen, die mit HCC-Zellen in Kontakt waren (Abbildung 3.24). Auch in Ko-Kultur-Experimenten von CD 14-positiven primären Makrophagen mit Zellen eines nicht-metastasierten Magenkarzinoms konnte eine Expressionssteigerung des IL-10 vermerkt werden (Shen et al. 2012). Helm et al. untersuchten das Expressionsprofil von *in vitro* generierten M1- und M2-Makrophagen im Vergleich von TAM, die aus Adenokarzinomen des Pankreas gewonnen wurden. Hier zeigte sich eine deutliche Steigerung in der Expression des IL-10 bei den aus Pankreaskarzinomen gewonnenen Makrophagen und den M2-Makrophagen (Helm et al. 2014).

Makrophagen stellen eine wichtige Zellpopulation in der Effektabwehr dar. Neben reaktiver Sauerstoff-Spezies bilden Makrophagen ebenfalls das toxisch wirkende Stickoxid (Murphy et al. 2012). Das freie Radikal NO wird mittels des Enzyms iNOS/NOS2 unter Abspaltung von L-Citrullin aus dem Edukt L-Arginin gebildet (Van Ginderachter et al. 2006). Die Bildung des Enzyms NOS2 in Makrophagen kann als Charakteristikum von M1-Makrophagen aufgefasst werden und durch den Kontakt mit LPS oder auch INF $\gamma$  stimuliert werden (Chang et al. 1998, Mantovani et al. 2002). Auch in unseren Zellkulturversuchen wird in der M1-Guppe vermehrt NOS2 gebildet (Abbildung 3.25). Diese Abbildung zeigt ebenfalls, dass der indirekte Kontakt mit HCC-

Zellen eine Herunterregulierung des Enzyms NOS2 in reifen und als M1- und M2-Makrophagen differenzierten Zellen bewirkt. Dieses Ergebnis kann bedeuten, dass in TAM im beschriebenen Versuchsmodell diese M1-Eigenschaft geringer ausgeprägt ist und diese somit weniger in der Lage sind, Tumorzellen und Mikroorganismen mit zytotoxischen Abwehrreaktionen zu begegnen. Anhand von Versuchen an Adenokarzinomen der Mamma von Mäusen konnten DiNapoli et al. ebenfalls zeigen, dass in TAM geringere Mengen von NO produziert werden und folglich das Vermögen, eine zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen zu erzielen, vermindert ist (Dinapoli et al. 1996).

In einem direkten Zusammenhang mit einer verminderten Expression von NOS2 in M2- und ebenfalls in den tumorassoziierten Makrophagen dieser Arbeit steht eine verstärkte Expression des Enzyms Arginase-2. In unseren Versuchen wurde die Isoform Arginase-2 näher untersucht. In der hier zitierten Literatur wird von der Arginase allgemein gesprochen. Von einigen Autoren wird das Enzym Arginase als ein Marker für M2-Makrophagen beschrieben (Mantovani et al. 2002, Rogers & Holen 2011). Arginase ist relevant für den Argininstoffwechsel in Makrophagen. Dieses Enzym hydrolysiert Arginin zu Ornithin und Harnstoff (Modolell et al. 1995). Die Enzyme NOS2 und Arginase katalysieren somit chemische Reaktionen, die beide L-Arginin als Substrat besitzen. Chang et al. beschreiben eine Kontrolle der NO-Produktion durch Arginase. Durch eine kompetitive Wirkung der Arginase um das L-Arginin kann es zu einer Unterbindung der NO-Produktion kommen (Chang et al. 1998).

Anhand unserer Ko-Kultur-Experimente kann gezeigt werden, dass Arginase-2 von TAM verstärkt exprimiert wird (Abbildung 3.25). Einen besonders deutlichen Anstieg der Expression dieses Enzyms wird in der M2-Gruppe deutlich, die mit den Zytokinen IL-4 und IL-13 vorgeprimt wurde. Mit einer verstärkten Expression der Arginase wird eine weitere Tumor fördernde Eigenschaft in TAM relevant. Ornithin kann zu Polyaminen und Kollagenen weiter verstoffwechselt werden und ist somit eine wichtige Substanz für die Zellreplikation und den Prozess der Wundheilung (Mills et al. 2000). Die erkennbare Expressionsminderung des Stickstoffoxids in den Ko-Kultur-Experimenten kann auf diese Weise ebenfalls als ein tumorfördernder Mechanismus aufgefasst werden, der den M2-Makrophagen zuzuordnen ist.

Die beschriebenen Marker werden in der Literatur eher den M2-Makrophagen zugeschrieben. In unseren Expressionsanalysen waren diese Marker durch eine Hochregulierung der Expression im Kontakt mit HCC-Zellen charakterisiert. Daraus lässt sich schließen, dass die Makrophagen in unserem Versuchsmodell mit HCC-Zellen und den immunhistochemischen Färbungen einen Phänotyp ausbilden, der M2-Charakteristika innehat. Diese Hypothese kann an dieser Stelle um einen weiteren Aspekt ergänzt werden. Bei den Auswertungen der histologischen Färbungen wurde neben den TAM-Zahlen im HCC besonderes Augenmerk auf die Zellzahlen in tumorfreien Gewebearealen gelegt. Da in diesen Bereichen sehr deutlich positiv gefärbte Zellen in der CD 163-Färbung und der CD 204-Färbung zu erkennen sind, lässt sich der Schluss ziehen, dass die Makrophagen in unmittelbarer Nähe eines HCC Oberflächenstrukturen ausbilden, die als M2-Charakteristika beschrieben worden sind.

### **4.2 Der M2-Phänotyp von TAM kann durch Tumorzellen des HCC induziert werden**

Zu Beginn dieser Arbeit wurde postuliert, dass die HCC-Zellen einen M2-Phänotyp der Makrophagen in der Ko-Kultur induzieren können. Aus diesem Grund wurde in unseren Zellkulturversuchen für die Expressionsanalysen ein „*Vorpriming*“ in M1- und M2-Makrophagen durchgeführt. Auf dieser Basis sollte analysiert werden, ob die HCC-Zellen in der Lage sind, den Phänotyp von M1-Makrophagen so zu modulieren, dass dieser dem von M2-Makrophagen entspricht. Bei genauerer Betrachtung der Resultate der Expressionsanalysen kann diese Hypothese in weiten Ansätzen bestätigt werden. Eine signifikante Expressionssteigerung durch den indirekten Kontakt mit HCC-Zellen in als M1 vordifferenzierten Makrophagen zeigt sich für den Scavenger-Rezeptor CD 204. Für CD 163 lässt sich keine signifikante Expressionssteigerung verzeichnen. Die bereits erläuterten M2-Marker MMP-9 und Arginase-2 lassen sich ebenfalls durch einen indirekten Kontakt durch HCC-Zellen in M1-Makrophagen induzieren (Abbildung 3.25). Eine signifikante Induktion des für die Angiogenese relevanten IL-8 lässt sich ebenfalls in unserem Ko-Kultur-Modell erreichen. Anders verhält es sich mit dem IL-10, das typischerweise von M2-Makrophagen gebildet wird. Hier ist nur eine sehr geringe Expressionssteigerung zu erkennen. Des Weiteren lässt sich die Beobachtung anführen, dass durch das *in vitro* generierte Tumormilieu in unserem Versuch M1-typische Charakteristika herunterreguliert werden können. In der Abbildung 3.25 ist

erkennbar, dass das für die Infekt- und Tumorbabwehr wichtige Enzym NOS2 auch in der M1-Gruppe herabreguliert wird.

Eine Umwandlung des M1-Phänotyps in einen M2-Phänotyp bei primären Makrophagen nach indirektem Kontakt mit Adenokarzinomzellen des Pankreas konnten Helm et al. beobachten. Hierbei war eine deutliche Expressionssteigerung der M2-assoziierten Marker CD 16 und CD 163 nach indirektem Kontakt mit Pankreaskarzinomzellen zu erkennen (Helm et al. 2014). Das durch die HCC-Zellen geprägte Tumormilieu in unseren Ko-Kultur-Versuchen führte zu einer Induktion sämtlicher M2-assoziiierter Marker. Dieser Erkenntnis kann die Expressionssteigerung proinflammatorischer Zytokine wie das IL-6 und TNF- $\alpha$  (Abbildung 3.24) gegenübergestellt werden, die eher den M1-Makrophagen zugeordnet werden (Allavena et al. 2008, Solinas et al. 2009). Helm et al. beobachteten in ihren Ko-Kulturversuchen ein ganz ähnliches Ergebnis. Auch hier zeigte sich eine Expressionssteigerung des proinflammatorischen IL-6 und TNF- $\alpha$ . Die Autoren schlussfolgern aus diesem Ergebnis, dass die TAM im Adenokarzinom des Pankreas in der *in vitro*-Situation einen gemischten M1/M2-Phänotyp aufweisen (Helm et al. 2014). Dieser Erklärungsansatz hat auch in der Interpretation unserer Ergebnisse seine Gültigkeit, da sowohl proinflammatorische als auch M2-Marker in M1-Makrophagen durch die HCC-Zellen induziert werden können. In der Zusammenschau dieses und unserer Ergebnisse lässt sich folgern, dass das umgebende Tumormilieu in der Lage ist, einen Makrophagentyp zu induzieren, der M1- und M2-Charakteristika innehat. Betrachtet man das Oberflächenprofil der TAM, ist dieses mit CD 204 und CD 163 deutlich den M2-Makrophagen zuzuordnen. Dem Oberflächenprofil lässt sich das Zytokinprofil gegenüberstellen. Neben den dargestellten M2-Markern werden auch TNF $\alpha$  und IL-6 exprimiert, die in ihrer proinflammatorischen Wirkungsweise eher als M1-Marker aufgefasst werden können.

### **4.3 TAM-Zahlen innerhalb des HCC und außerhalb des Tumors im Vergleich**

Die immunhistochemischen Färbungen der HCC-Gewebe machen deutlich, dass durch den Pan-Makrophagenmarker CD 68 außerhalb des Tumors signifikant mehr Makrophagen positiv gefärbt wurden als innerhalb des malignen Gewebes (Abbildung 3.12). Dieses Ergebnis bedeutet, dass in den peritumoralen tumorfreen Arealen mehr Makrophagen zu finden sind. Zu einer vergleichbaren Erkenntnis kommen Lapis et al.

anhand von Untersuchungen an HCCs bei Affen. Diese Arbeitsgruppe verglich unter anderem die Anzahl von Kupffer-Zellen innerhalb von HCC-Geweben und tumorfreien Arealen. Hierbei zeigte sich eine deutliche Minderung der Anzahl von Kupffer-Zellen innerhalb malignen Lebergewebes (Lapis et al. 1995). Neben Untersuchungen an HCCs von Rhesusaffen existieren in der Literatur weitere Versuchsmodelle an männlichen Ratten. Hierbei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass innerhalb von hepatozellulären Karzinomen weniger Kupffer-Zellen als außerhalb des Tumorgewebes gefunden werden konnten (Janossy et al. 1986). Eine weitere Untersuchung, die der Verteilung von Makrophagen innerhalb chirurgisch entnommener HCC-Proben nachgeht, stammt von Tanaka et al. Auch hier wurde die Zahl von Kupffer-Zellen innerhalb des Lebergewebes ermittelt und an verschiedenen Bereichen miteinander verglichen. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine niedrigere Anzahl von Makrophagen in malignen Gewebearealen. Dabei fiel auf, dass die Zahl von gefärbten Kupffer-Zellen mit wachsendem Tumordurchmesser und einem geringeren Differenzierungsgrad des Tumors abnimmt (Tanaka et al. 1996). Liu et al. untersuchten anhand aus Hepatektomie-Präparaten gewonnenen Materials die Anzahl von Kupffer-Zellen innerhalb des Tumors, in unmittelbarer Nähe des Tumors und in gesundem Lebergewebe. Um die Makrophagen zu detektieren, wurde auch hier eine CD 68-Färbung durchgeführt. Die immunhistochemischen Analysen kamen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Makrophagenanzahl innerhalb des HCC signifikant niedriger ist, als außerhalb des Tumors. Die Anzahl an Kupffer-Zellen nahm auch hier mit der Größe des Tumors und einer schlechteren Differenzierung des Tumors ab (Liu et al. 2003). Eine niedrigere Makrophagenanzahl in HCC-Geweben, die mittels CD 68 ermittelt wurde, zeigt sich auch in anderen Beispielen in der Literatur (Avădănei et al. 2014, Ding et al. 2009). An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob die beschriebene Tendenz auch für die anderen angewandten immunhistochemischen Marker gilt. Aus der Abbildung 3.12 kann man schlussfolgern, dass dies für die CD 163-Färbung nicht sehr deutlich zu erkennen ist und sich entsprechend keine signifikant erhöhte Zellzahl außerhalb des Tumors zeigt (Abbildung 3.12). Diesem Resultat aus unseren Färbungen kann die Analyse von HCC-Geweben von Kong et al. gegenüber gestellt werden. Diese Arbeitsgruppe führte Färbungen an HCC-Geweben durch und verglich dabei die Zellzahlen für in der CD 68- und der CD 163-Färbung positive Makrophagen innerhalb des Tumors und in tumorfreien Arealen. Die

Auswertung dieser Färbungen zeigt hier deutlich, dass sich für beide Färbungen signifikant höhere Makrophagenzahlen außerhalb des Tumors finden lassen (Kong et al. 2013). Für den M2-Marker CD 204 lässt sich bei einem Vergleich der absoluten Zellzahlen in verschiedenen Tumorarealen nur eine leichte Erhöhung der Makrophagenzahl außerhalb des Tumors verzeichnen (Abbildung 3.12). Hypothetisch kann die hohe Makrophagenzahl dadurch erklärt werden, dass gerade der den Tumor umgebende Bereich des Lebergewebes immunologisch relevant ist. So kommt es besonders hier zu einer Ansammlung von Makrophagen, die mit ihren bereits beschriebenen Charakteristika ein tumorförderndes Milieu im Umfeld des HCC begünstigen können.

In der Literatur und in unseren Ergebnissen lässt sich eine höhere Makrophagenzahl außerhalb des Tumors als innerhalb des malignen Gewebes feststellen. Diesen Ausführungen können die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen von Peng et al. gegenüber gestellt werden. Diese Arbeitsgruppe konnte höhere TAM-Zahlen innerhalb des HCC-Gewebes als außerhalb des Tumors ermitteln. Auch hier wurde der Pan-Makrophagenmarker CD 68 angewandt, um die Makrophagen zu detektieren. Als Erklärungsansatz für die höheren TAM-Zahlen innerhalb des Tumors führen Peng et al. die besondere Relevanz von TAM im HCC an (Peng et al. 2005).

Eine weitere relevante Auffälligkeit zeigt sich bei dem Vergleich der absoluten Zellzahlen in den drei verschiedenen Färbungen (Abbildung 3.12). In unseren Auswertungen zeigten sich die wenigsten positiv gefärbten Zellen in der CD 68-Färbung. Deutlich höhere Zellzahlen ließen sich in den beiden anderen Färbungen erkennen. Die bereits dargestellte Studie von Kong et al. kommt ebenfalls zu dem Ergebnis, dass sowohl innerhalb des HCC-Gewebes und in peritumoralen Bereichen höhere Zellzahlen in der CD 163-Färbung als in der CD 68-Färbung zu verzeichnen sind (Kong et al. 2013). Ein anderes Bild ergibt sich bei der immunhistochemischen Untersuchung von Makrophagen im Pankreaskarzinom. In dieser Studie zeigten sich die höchsten Zellzahlen in der CD 68-Färbung und somit das genaue Gegenteil unserer Färbungen (Kurahara et al. 2011).

In Anbetracht der Ergebnisse von Kong et al. und unseren Resultaten für die CD 68-Färbung soll an dieser Stelle der Frage nachgegangen werden, wie die niedrigeren Makrophagenzahlen in der CD 68-Färbung interpretiert werden können. Da CD 68 als

Pan-Makrophagenmarker beschrieben worden ist und somit auch M2-Makrophagen anfärben müsste, würde man in den durchgeführten histologischen Färbungen entsprechend hohe Zellzahlen erwarten. Spekulativ kann an dieser Stelle angenommen werden, dass das Mikromilieu des Tumors einen Einfluss auf die Expression von CD 68 nimmt und diesen Makrophagenmarker entsprechend herunterreguliert. Ein Aspekt der Ausführungen von Liu et al. kann möglicherweise in diesem Sinne interpretiert werden. Im Vergleich mit tumorfreien Arealen zeigten sich im HCC die niedrigsten Zellzahlen in der CD 68-Färbung. Zudem kommen Liu et al. zu dem Ergebnis, dass die Anzahl von CD 68-positiven Kupffer-Zellen mit zunehmender Größe des Tumors abnimmt und auch in schlecht differenzierten Karzinomen die Makrophagenanzahl sinkt (Liu et al. 2003).

Eine ähnliche Tendenz wie bei der CD 163-Färbung zeigt sich auch für den als M2-Marker charakterisierten Scavenger-Rezeptor CD 204. Die Abbildung 3.12 demonstriert ebenfalls ein insgesamt höheres Zellzahlniveau als bei der Auszählung des Pan-Makrophagenmarkers CD 68. In der Konsequenz weisen die Färbungen CD 163/CD 204 somit eine gute Korrelation zueinander auf ( $r=0,82$  und  $r^2=0,68$ ; Abbildung 3.19).

#### **4.4 Keine erhöhten TAM-Zahlen im kapselnahen Tumorbereich**

Das peritumorale Stroma stellt im Hinblick auf Prozesse wie Metastasierung und die Invasion von HCCs einen besonders wichtigen Bereich dar. In der Literatur existieren anschauliche Beispiele für die Akkumulation von Makrophagen in ebendiesen Bereichen (Kuang et al. 2007, 2010). Um Aussagen über die Verteilung von Makrophagen im HCC-Gewebe zu machen, wurde in unseren Auswertungen der Immunhistochemie neben den Bereichen innerhalb und außerhalb des Tumors auch der kapselnahe Tumorbereich bei den Zellzählungen berücksichtigt. Kuang et al. bezeichnen diesen Bereich des HCC als „*invading edge*“ und schreiben diesem eine besonders wichtige Rolle in der Angiogenese zu (Kuang et al. 2011). Unsere Zellzählungen im kapselnahen Tumorbereich führten in allen drei Färbungen zu dem Ergebnis, dass keine höheren Zellzahlen als außerhalb des Tumors ermittelt werden konnten. Für die M2-Marker CD 163 und CD 204 sind die Zahlen von positiv gefärbten Makrophagen im kapselnahen Tumorbereich nahezu auf einem Niveau wie innerhalb des Tumors. Lediglich in der CD 68-Färbung sind die Zellzahlen im kapselnahen

Tumorbereich geringfügig höher als innerhalb des Tumors (Abbildung 3.12). Eine gesonderte Betrachtung des Tumorrandbereichs führten auch Ding et al. bei der Untersuchung von Makrophagen im HCC durch. In Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen ergab sich neben höheren Zellzahlen für Makrophagen außerhalb des Tumors ein sehr heterogenes Bild bezüglich der Makrophagenzahl im Tumorrandbereich. Eine Auswertung erfolgte hier semiquantitativ in Kategorien von geringen Infiltrationen von Makrophagen bis hin zu hohen Makrophagenzahlen im Randbereich. Anschließende Auswertungen mittels Kaplan-Meier-Analysen konnten eine direkte prognostische Relevanz der Makrophagenzahlen im Tumorrandbereich bezüglich des krankheitsfreien Überleben und des Gesamtüberleben zeigen. Hierbei wurde deutlich, dass neben vielen Makrophagen innerhalb des Tumors eine hohe Makrophagenzahl im Tumorrandbereich prognostisch negativ wirken (Ding et al. 2009). Wie bereits Ding et al. spekulieren, lässt sich an dieser Stelle postulieren, dass insbesondere die Makrophagen im Randbereich des Tumors eine Invasion der malignen Zellen in umliegendes Gewebe begünstigen (Zhang et al. 2010). Auch für weitere Untersuchungen unsererseits wäre es von Bedeutung diese Makrophagen immunhistochemisch näher zu charakterisieren.

### **4.5 Kritische Auseinandersetzungen mit den einzelnen Versuchen und weitere Versuchsoptionen**

#### 4.5.1 Beeinflussung der Ergebnisse der Auszählungen durch angewandtes Zählsystem

Die gezeigten immunhistochemischen Färbungen wurden in unserem Fall manuell ausgezählt. Im Vorfeld wurde festgelegt, welche Charakteristika erfüllt werden müssen, damit ein gefärbter Bereich als zu zählende Zelle gewertet wurde. Die CD 68-Färbung konnte unter Anwendung dieses Zählsystems problemlos ausgewertet werden. Anders verhielt es sich bei den beiden anderen Färbungen. Das Färbemuster bei der CD 163- und der CD 204-Färbung war detailreicher und eine Abgrenzung einzelner Zellen erheblich schwieriger. Während dieser Auswertungen wurde besonders deutlich, dass Ergebnisse von manuell gezählten Zellen, durchaus durch das entwickelte Zählsystem beeinflusst werden können. Eine mögliche Ergänzung wäre an dieser Stelle die Etablierung eines automatisierten Auswertungssystems, das beispielsweise die prozentuale Fläche eines Farbtons angibt.

### 4.5.2 Doppelfärbungen mit mehreren Makrophagenmarkern auf HCC-Gewebe

In Vorversuchen an HCC-Gewebe wurden identische Gewebsabschnitte mit unseren ausgewählten Makrophagenmarkern gefärbt. Dabei sollte der Frage nachgegangen werden, ob das Färbemuster bei allen drei Färbungen ähnlich ist und ob sogar erkennbar ist, dass einzelne Makrophagen für alle drei Färbungen positiv sind. Eine mögliche Erweiterung dieses Versuchsteils stellen Doppelfärbungen dar. Mit Doppelfärbungen besteht die Möglichkeit, exakte Aussagen darüber zu treffen, ob gefärbte Makrophagen mehrere Marker gleichzeitig exprimieren. Somit ließe sich der Phänotyp der Makrophagen noch exakter beschreiben. Doppelfärbungen gestalten sich insbesondere auf Paraffingewebe schwierig. Eine Erweiterung dieses Versuchs könnte die Etablierung eines Färbeprotokolls mit zwei verschiedenen Färbechromogenen sein, um die gefärbten Strukturen voneinander unterscheiden zu können.

### 4.5.3 Ergänzung der Ko-Kulturen durch andere HCC-Zelllinien und primäre Makrophagen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sollten die Makrophagen innerhalb eines hepatozellulären Karzinoms präziser charakterisieren. Neben immunhistochemischen Färbungen wurden in Zellkulturmodellen *in vitro*-Versuche durchgeführt. In unserem Fall wurden für die Ko-Kulturen HuH7-Zellen verwendet, um ein HCC simulieren. Als weitere Versuchsoption, die dieses Projekt erweitern würde, können diese Ko-Kultur-Versuche ebenfalls mit anderen HCC-Zelllinien durchgeführt und anschließend ein Vergleich der Ergebnisse angestrebt werden. Eine weitere Option der Komplettierung der Ko-Kultur-Versuche wäre ein Versuchsansatz mit primären Makrophagen oder HCC-Zellen. Interessant wäre dabei, ob sich die ermittelten Expressionsprofile in primären Makrophagen bestätigen ließen.

### 4.5.4 Erhöhung der Fallzahl von HCC-Patienten

Die immunhistochemischen Serienfärbungen, die neben den Ko-Kultur-Versuchen im Zentrum dieser Arbeit standen, wurden an HCC-Gewebe von 19 Patienten durchgeführt. Eine sinnvolle Ergänzung hinsichtlich dieses Versuchsteils wären weitere Färbungen mit einer höheren Anzahl von Patienten, um die statistische Aussagekraft der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen zu erhöhen.

### 4.5.5 Optimierung der Immunfluoreszenzfärbungen in der Zellkultur

Die Makrophagenmarker CD 68, CD 163 und CD 204 wurden in der Ko-Kultur zusätzlich mittels Immunfluoreszenzfärbungen dargestellt. Dabei ergaben sich für die CD 68- und die CD 163-Färbung auswertbare Ergebnisse. Sowohl in der Immunhistochemie und den Expressionsprofilen der TAM zeigte sich eine deutliche Positivität für den M2-Marker CD 204. Dieses Ergebnis ließ sich in der Immunfluoreszenz nicht reproduzieren. In Anbetracht der Relevanz dieses M2-Markers im Zusammenhang mit M2-Makrophagen in der Literatur und in dieser Arbeit muss die Möglichkeit eines nicht optimalen Protokolls für diesen Antikörper bei unseren Versuchsbedingungen angeführt werden. Einen Ausblick in die weitere Fortführung der Fragestellung dieser Arbeit stellt beispielsweise die Verwendung anderer Erst- und Zweitantikörper dar.

### 4.5.6 Erstellung eines Expressionsprofils von den HCC-Zellen der Ko-Kultur

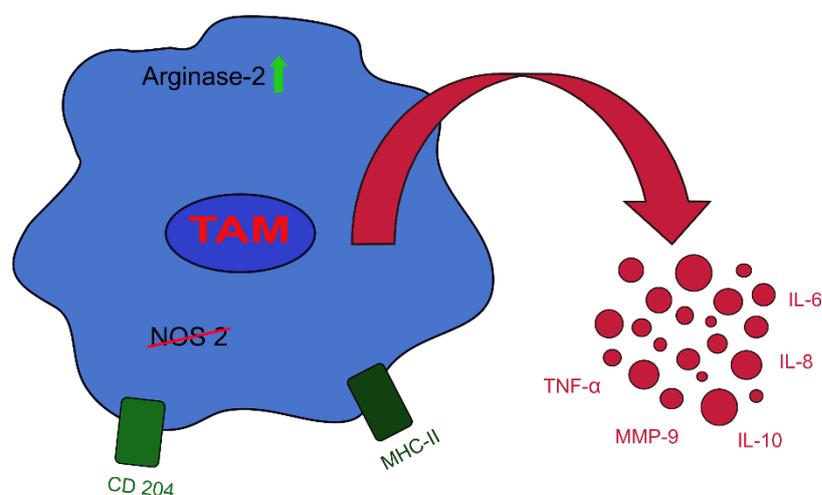
Mittels PCR-Analysen wurden die Makrophagen nach indirektem Kontakt mit den HCC-Zellen auf Oberflächenstrukturen, Zytokine und weitere Makrophagenmarker untersucht. Ein anderer Versuchsansatz stellt die weitere Analyse der HCC-Zellen dar. Mit Ergebnissen dieser Ko-Kultur-Ansätze könnten die Aussagen über die Interaktion zwischen Makrophagen und Tumorzellen ausgeweitet werden. Außerdem könnte durch eine Analyse der HCC-Zellen der Frage nachgegangen werden, wie die Tumorzellen durch die *in vitro*-Ko-Kultur verändert werden.

## **4.6 Tumorassoziierte Makrophagen als M2-ähnliche Makrophagen im humanen HCC**

Die Expressionsanalysen aus den Ko-Kultur-Experimenten zeigen, dass durch den Einfluss von Tumorzellen M2-charakteristische Strukturen in den Makrophagen gebildet werden. Eine signifikante Hochregulierung des Scavenger-Rezeptors CD 204 lässt sich durch die HCC-Zellen induzieren. Auch in den Ergebnissen der Immunhistochemie ist erkennbar, dass Makrophagen innerhalb von HCC-Gewebe diesen Rezeptor tragen. Die weiteren Ergebnisse der Ko-Kulturen zeigen zudem eine verstärkte Expression der M2-Marker IL-8 und IL-10. Das Enzym Arginase und MMP-9 sind ebenfalls Charakteristika von M2-Makrophagen, die einen Tumor fördernden Einfluss haben. Diese Interleukine konnten ebenfalls durch den indirekten Tumorzellkontakt in der Ko-Kultur hochreguliert werden. Das Expressionsprofil von

NOS2 zeigt eine verminderte Expression in den Ko-Kulturen, was außerdem für einen M2-Phänotyp beschreibend ist. Die beschriebenen Rezeptoren, Zytokine und Enzyme sind kennzeichnend für M2-Makrophagen. Somit weisen die Makrophagen der dargestellten Zellkulturversuche relevante M2-Charakteristika auf. Zudem konnte in unseren Versuchen gezeigt werden, dass die HCC-Zellen sogar in als M1-Makrophagen vordifferenzierten Zellen eine Induktion einer Vielzahl untersuchter M2-Marker bewirken können.

Neben den Hochregulierungen der M2-Marker konnten durch die Ko-Kultur weitere Marker in ihrer Expression verstärkt werden, die in ihren Eigenschaften eher M1-Makrophagen zugeordnet werden können. Dies betrifft beispielsweise die Expressionssteigerung von IL-6, TNF- $\alpha$  und dem MHC-II-Komplex. Somit muss die Aussage, dass TAM einen M2-Phänotyp innehaben um die Tatsache ergänzt werden, dass trotz des Mikromilieus innerhalb eines Tumors proinflammatorische M1-Charakteristika exprimiert werden können. Neben ihrer proinflammatorischen Wirkung im Entzündungsgeschehen zeigen IL-6 und TNF- $\alpha$  aber auch Eigenschaften, die tumorfördernd wirken (Lewis & Pollard 2006, Rogers & Holen 2011, Wei et al. 2003) Daraus lässt sich folgern, dass die TAM auch durch die Sekretion dieser M1-assoziierten Zytokine einen tumorfördernden Einfluss nehmen.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung eines tumorassoziierten Makrophagen mit den in dieser Arbeit ermittelten Charakteristika.

#### 4.7 Ausblick

Bisher ist wenig über den inflammatorischen Phänotyp von Makrophagen innerhalb von HCCs bekannt. In dieser Arbeit konnten die Charakteristika von TAM im Kontakt mit HCC-Zellen näher beschrieben werden. Dabei zeigte sich ein Phänotyp bei den TAM, der sowohl M1- als auch M2-Charakteristika aufweist. Beschreibungen in der Literatur und unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass TAM die Angiogenese, die Invasion und die Metastasierung eines Tumors begünstigen. Außerdem konnte in unseren Ko-Kultur-Versuchen der Verlust einiger proinflammatorischer Kennzeichen nachgewiesen werden. Es existieren Studien, die einen Zusammenhang zwischen der Infiltration von Makrophagen und einer schlechteren Prognose herstellen. So konnten Ding et al. zeigen, dass eine hohe Makrophagendichte innerhalb eines HCC und in Tumorrandbereichen das Gesamtüberleben und das krankheitsfreie Intervall negativ beeinflussen (Ding et al. 2009). Zudem lassen sich in der Literatur Hinweise finden, dass auch zahlreiche Makrophagen im peritumoralen Bereich eines HCC mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Zhu et al. 2008). Diese Tatsache leitet über zu der Frage, ob Makrophagen in der Zukunft als Target für Therapieansätze in Frage kommen, da diese in mehreren Punkten eine Progression des Tumors begünstigen. Ein möglicher Ansatz wäre dabei die gezielte Blockierung von TAM gebildeter Produkte, die beispielweise die Angiogenese oder die Metastasierung fördern. Zur Veranschaulichung wären dabei eine Hemmung des IL-8 oder der MMP-9 zu nennen. Eine Kombination des Proteinkinaseinhibitors Sorafenib mit Zoledronat oder Clodronat-haltigen Liposomen (Clodrolip) konnte in Nacktmäusen, denen zuvor Zellen humaner HCC-Zelllinien orthotop implantiert wurden, eine deutlich erkennbare Reduzierung der Tumorangiogenese bewirkt werden. Auch konnte mit der genannten Kombinationstherapie eine Reduzierung der Tumorprogression und Metastasierung in die Lunge erreicht werden (Zhang et al. 2010). Ein weiterer möglicher Therapieansatz, der ebenfalls bei den tumorinfiltrierenden Makrophagen ansetzt, ist die bloße Reduzierung der Makrophagen innerhalb des Tumors. Auch hier zeigt die von Zhang et al. durchgeführte Studie vielversprechende Ergebnisse. Durch eine Kombination von Sorafenib mit Zoledronat oder Clodrolip lässt sich eine Minimierung der TAM-Zahl herbeiführen (Zhang et al. 2010).

Tumorzellen sind in der Lage, den Phänotyp von M1-Makrophagen so weit zu modifizieren, dass M2-Charakteristika exprimiert werden entsteht. Hieraus lässt sich

auf eine weitere mögliche Therapieoption schließen. Bestünde die Möglichkeit, die Makrophagen im HCC von einem M2-Phänotyp zu einem M1-Phänotyp umzuprägen, könnten auf diese Weise die proinflammatorischen und zytotoxischen Charakteristika von Makrophagen in den Mittelpunkt gelangen und eine weitere Progression des Tumors möglicherweise einschränken. Untersuchungen von Mammakarzinomen in Mäusen konnten zeigen, dass eine Polarisation von M2-Makrophagen zu M1-Makrophagen innerhalb eines Tumors möglich ist. Ausgelöst wurde dieser Effekt durch eine Behandlung der Mäuse mit dem chemisch zu den Bisphosphonaten gehörenden Zoledronat. Neben einer Reduzierung der TAM konnte einer Konversion in einen M1-Phänotyp induziert werden (Coscia et al. 2010).

Einen anderen Angriffspunkt für eine Therapieoption greifen Shirabe et al. in ihren Ausführungen auf (Shirabe et al. 2012). Sie nennen die Hemmung der Rekrutierung der Makrophagen und eine Hemmung der M2-Polarisierung als mögliche Angriffspunkte (Shirabe et al. 2012). Würde man therapeutisch an diesen Punkten ansetzen, könnten tumorfördernde Eigenschaften der TAM sehr früh gehemmt werden oder in ihrer Ausprägung von vornherein verhindert und somit eine effektive Therapie erzielt werden. Auch von Seiten der Immuntherapie lassen sich in der Literatur Therapieansätze finden. DNA-Impfungen gegen eine auf TAM überexprimierte Asparaginyl-Endopeptidase (Legumain) konnten eine gegen TAM gerichtete T-Zell-Antwort hervorrufen, die die TAM-Zahl in Tumoren erheblich verringerte und eine Senkung der tumorfördernden Sekretionsprodukte der TAM bewirkte (Luo et al. 2006).

In der Zusammenschau bereits existierender Therapieansätze wird deutlich, dass TAM innerhalb von Tumoren einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Behandlung von Tumorpatienten darstellen könnten. Diese Forschungsansätze zeigen zudem sehr deutlich die Relevanz eines gut charakterisierten Phänotyps von Makrophagen. Einen kleinen Beitrag zu dem Wissen über TAM im HCC sollte auch diese Arbeit liefern, um diese in Tumoren wichtige Zellpopulation besser zu verstehen. Mit diesem Erkenntniszuwachs ergibt sich zudem die Möglichkeit, unsere Ko-Kulturen zu erweitern und in einem ergänzenden Schritt auch mit primären Makrophagen zu arbeiten. Dabei könnte in Erfahrung gebracht werden, welchen inflammatorischen Phänotyp diese Zellen nach einem Kontakt mit HCC-Zellen exprimieren.

## 5 Zusammenfassung

Makrophagen machen einen großen Teil der Tumor infiltrierenden Zellen aus. Dabei kommt ihnen eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Tumorzellen und Tumorstroma zu. Betrachtet man den Phänotyp von Makrophagen schematisch, lassen sich proinflammatorisch wirkende M1-Makrophagen von tumorfördernden M2-Makrophagen abgrenzen. TAM werden Charakteristika zugesprochen, die eher den M2-Makrophagen zuzuordnen sind. Nach bisherigem Wissenstand fördern TAM die Angiogenese, die Metastasierung sowie die Invasion von Tumorzellen. Zudem werden zytotoxische Eigenschaften der Makrophagen unterdrückt. Es ist größtenteils unklar, welche Oberflächenstrukturen auf TAM im HCC zu finden sind und durch welches Zytokinprofil sie charakterisiert werden können. Die erste Hypothese dieser Arbeit besagt, dass Makrophagen innerhalb des HCC dem M2-Phänotyp zuzuordnen sind. Die zweite Hypothese beinhaltet die Aussage, dass der M2-Phänotyp der TAM durch Tumorzellen des HCC induziert werden kann. Mit Blick auf die erste Hypothese, konnte in der Immunhistochemie gezeigt werden, dass TAM im HCC positiv für die M2-Marker CD163 und CD204 sind. Diese M2-Marker positiven Makrophagen lassen sich auch im peritumoralen Stroma nachweisen. Um die zweite Hypothese zu prüfen, wurden Makrophagen in den Ko-Kulturexperimenten in indirekten Kontakt mit HCC-Zellen gebracht und anschließend das Expressionsprofil untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche Expressionssteigerung der M2-Marker für CD 204, IL-8, IL-10 und MMP-9. NOS2 wurde hingegen herunterreguliert. IL-6, TNF $\alpha$  und MHC-II (M1-Marker) wurden durch den indirekten Kontakt mit HCC-Zellen ebenfalls verstärkt exprimiert. In der Zusammenschau dieser Ergebnisse zeigen TAM im HCC bzw. im *in vitro* hergestellten indirekten Kontakt mit HCC-Zellen einen gemischten Phänotyp. Neben CD 204 als M2-Marker werden von den Makrophagen tumorfördernde Zytokine sezerniert, die die Angiogenese, die Metastasierung und die Invasion von Tumorzellen fördern. Mit der Expression von MHC-II, IL-6 und TNF $\alpha$  weisen die Makrophagen dieser Versuche auch M1-Marker auf und erweitern somit den Phänotyp der TAM. Die Kenntnis des inflammatorischen Phänotyps von TAM im HCC ist von therapeutischem Interesse. Von Makrophagen sezernierte Zytokine, die in Prozessen der Angiogenese oder der Metastasierung relevant sind, sowie exprimierte Oberflächenstrukturen bieten möglicherweise neue Therapieansätze, um in die Progression eines HCC zu intervenieren.

## 6 Abstract

Macrophages are an important part of the leukocyte infiltrate in many tumors. They play a key role in the interaction between tumor cells and the tumoral stroma. Schematically, macrophages can be divided in proinflammatory M1-macrophages and anti-inflammatory M2-macrophages. The characteristics of tumor associated macrophages (TAM) are believed to resemble M2-macrophages. Concerning the current state of knowledge, TAM promote the process of angiogenesis, metastasis and invasion of tumor cells. The phenotype of TAM and their cytokine expression profile in human HCC has not been studied into great detail.

Accordingly, the first hypothesis of this dissertation is, that macrophages in HCC have a M2-phenotype. The second hypothesis implies that HCC tumor cells can induce this M2 phenotype in TAM. With reference to the first hypothesis, immunohistochemical analysis showed that TAM in human HCC express CD 163 and CD 204 (M2-markers). These positively stained macrophages were also detectable in the peritumoral stroma. In order to test the second hypothesis, macrophages were co-cultured with HCC cells separated by a semipermeable membrane. Quantitative PCR analysis showed a higher expression of CD 204, IL-8, IL-10, and MMP-9 (all M2-markers) in macrophages in co-culture compared to macrophages cultured alone. However, the co-culture experiments also induced a higher expression of IL-6, TNF- $\alpha$  and MHC-II (all M1-markers) in macrophages.

In summary, the TAM in human HCC express M2 markers, which are induced by contact to HCC tumor cells in macrophages. Supplementary to CD 204 (M2-marker), macrophages in the tumor context produce cytokines that are involved in the process of angiogenesis, metastasis and the invasion of tumor cells. With the expression of MHC-II, IL-6 and TNF $\alpha$  the macrophages in these experiments also have some M1-characteristics and consequently broaden the phenotype of TAM. Macrophages in HCCs expressing cytokines and other tumor promoting proteins (e.g. MMPs) could be a potential new therapeutic target to prevent the progression of HCC.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahmed M** (2015) Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. *World J Hepatol.* 7(11):1450–9.
- Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A** (2008) The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol.* 66(1):1–9.
- Avădănei E-R, Wierzbicki P M, Giușcă S-E, Grigoraș A, Amălinei C, Căruntu I-D** (2014) Macrophage profile in primary versus secondary liver tumors. *Folia Histochem Cytobiol.* 52(2):112–23.
- Balkwill F, Mantovani A** (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 357(9255):539–45.
- Bingle L, Brown N J, Lewis C E** (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 196(3):254–65.
- Biswas S K, Allavena P, Mantovani A** (2013) Tumor-associated macrophages: Functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol.* 35(5):585–600.
- Bosch F X, Ribes J, Díaz M, Cléries R** (2004) Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. *Gastroenterology.* 127(5):5–16.
- Bronkhorst I H G, Ly L V, Jordanova E S, Vrolijk J, Versluis M, Luyten G P M, Jager M J** (2011) Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 52(2):643–50.
- Bruix J, Sherman M** (2011) Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology.* 53(3):1020–1022.
- Bruix J, Sherman M, Llovet J M, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs A K, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rode J** (2001) Clinical Management of Hepatocellular Carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL Conference. 35:421–30.
- Budhu A, Wang X W** (2006) The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *J Leukoc Biol.* 80(December):1197–213.
- Capece D, Fischietti M, Verzella D, Gaggiano A, Ciccirelli G, Tessitore A, Zazzeroni F, Alesse E** (2013) The inflammatory microenvironment in hepatocellular carcinoma: A pivotal role for tumor-associated macrophages. *Biomed Res Int.* 2013:187204.
- Chang C, Liao J C, Kuo L** (1998) Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol Hear Circ Physiol.* 274:H342–H348.

- Chantrain C F, Shimada H, Jodele S, Groshen S, Ye W, Shalinsky D R, Werb Z, Coussens L M, DeClerck Y A** (2004) Stromal Matrix Metalloproteinase-9 Regulates the Vascular Architecture in Neuroblastoma by Promoting Pericyte Recruitment. *Cancer Res.* 64(5):1675–86.
- Cook J, Hagemann T** (2013) Tumour-associated macrophages and cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 13(4):595–601.
- Coscia M, Quaglino E, Iezzi M, Curcio C, Pantaleoni F, Riganti C, Holen I, Mönkkönen H, Boccadoro M, Forni G, Musiani P, Bosia A, Cavallo F, Massaia M** (2010) Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *J Cell Mol Med.* 14(12):2803–15.
- Davila J A, Morgan R O, Shaib Y, McGlynn K A, El-Serag H B** (2004) Hepatitis C infection and the increasing incidence of hepatocellular carcinoma: A population-based study. *Gastroenterology.* 127(5):1372–80.
- Degos F, Christidis C, Ganne-Carrie N, Farmachidi J P, Degott C, Guettier C, Trinchet J C, Beaugrand M, Chevret S** (2000) Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. *Gut.* 47(1):131–6.
- Dinapoli M R, Calderon C L, Lopez D M** (1996) The Altered Tumoricidal Capacity of Macrophages Isolated from Tumor-bearing Mice Is Related to Reduced Expression of the Inducible Nitric Oxide Synthase Gene. *J Exp Med.* 183(April):1323–9.
- Ding T, Xu J, Wang F, Shi M, Zhang Y, Li S-P, Zheng L** (2009) High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection. *Hum Pathol.* 40(3):381–9.
- Eljaszewicz A, Wiese M, Helmin-Basa A, Jankowski M, Gackowska L, Kubiszewska I, Kaszewski W, Michalkiewicz J, Zegarski W** (2013) Collaborating with the enemy: Function of macrophages in the development of neoplastic disease. *Mediators Inflamm.* 2013:831387.
- El-Serag H B** (2011) Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 365(12):1118–27.
- El-Serag H B** (2012) Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 142(6):1264–73.
- El-Serag H B, Rudolph K L** (2007) Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 132(7):2557–76.
- Farazi P, DePinho R** (2006) Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer.* 6(9):674–87.
- Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F** (2004) Hepatocellular Carcinoma in Cirrhosis: Incidence and Risk Factors. *Gastroenterology.* 127:35–50.

- Ferenci P, Fried M, Labrecque D, Bruix J, Sherman M, Omata M, Heathcote J, Piratsivuth T, Kew M, Otegbayo J a., Zheng S S, Sarin S, Hamid S, Modawi S B, Fleig W, Fedail S, Thomson A, Khan A, Malfertheiner P, Lau G, Carillo F J, Krabshuis J, Le Mair A** (2010) World gastroenterology organisation global guideline. hepatocellular carcinoma (HCC): A global perspective. *J Gastrointest Liver Dis.* 19(3):311–7.
- Galdiero M R, Bonavita E, Barajon I, Garlanda C, Mantovani A, Jaillon S** (2013) Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology.* 218(11):1402–10.
- Goodman Z D, Terracciano L M, Wee A** (2012) *Tumours and tumour-like lesions of the liver.* In: *MacSween's Pathology of the Liver.* Burt A, Portmann B C, Ferrell L D (Hrg.). Sixth Edition. Elsevier Ltd. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto. 773-795.
- Gordon S, Martinez F O** (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 32(5):593–604.
- Hagemann T, Robinson S C, Schulz M, Trümper L, Balkwill F R, Binder C** (2004) Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis.* 25(8):1543–9.
- Hanahan D, Folkman J** (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 86(3):353–64.
- Harnois D M, Gores G J, Ludwig J, Steers J L, LaRusso N F, Wiesner R H** (1997) Are patients with cirrhotic stage primary sclerosing cholangitis at risk for the development of hepatocellular cancer? *J Hepatol.* 27(3):512–6.
- Helm O, Held-Feindt J, Grage-Griebenow E, Reiling N, Ungefroren H, Vogel I, Krüger U, Becker T, Ebsen M, Röcken C, Kabelitz D, Schäfer H, Sebens S** (2014) Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int J Cancer.* 135(4):843–61.
- Hirohashi S, Ishak K G, Kojiro M, Wanless I R, Theise N D, Tsukuma H, Blum H E, Deugnier Y, Laurent Puig P, Fischer H P, Sakamoto M** (2000) *Hepatocellular carcinoma.* In: *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.* Hamilton S R, Aaltonen L A (Hrg). IARC Press. Lyon. 159-172.
- Hua J, Muschel R J** (1996) Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system. *Cancer Res.* 56(22):5279–5284.
- Janossy L, Zalutnai A, Lapis K** (1986) Quantitative light microscopic study on the distribution of Kupffer cells during chemical hepatocarcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis.* 7(8):1365–69.

- Koch A E, Polverini P J, Kunkel S L, Harlow L A, DiPietro L A, Elnor V M, Elnor S G, Strieter R M** (1992) Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 258(5089):1798–801.
- Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M** (2008) Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol*. 216:15–24.
- Kong L-Q, Zhu X-D, Xu H-X, Zhang J-B, Lu L, Wang W-Q, Zhang Q-B, Wu W-Z, Wang L, Fan J, Tang Z-Y, Sun H-C** (2013) The clinical significance of the CD163+ and CD68+ macrophages in patients with hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 8(3):e59771.
- Kuang D-M, Peng C, Zhao Q, Wu Y, Chen M-S, Zheng L** (2010) Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma promote expansion of memory T helper 17 cells. *Hepatology*. 51(1):154–64.
- Kuang D-M, Wu Y, Chen N, Cheng J, Zhuang S-M, Zheng L** (2007) Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes. *Blood*. 110(2):587–95.
- Kuang D-M, Zhao Q, Wu Y, Peng C, Wang J, Xu Z, Yin X-Y, Zheng L** (2011) Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 54(5):948–55.
- Kurahara H, Shinchi H, Mataka Y, Maemura K, Noma H, Kubo F, Sakoda M, Ueno S, Natsugoe S, Takao S** (2011) Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res*. 167(2):e211–9.
- Lapis K, Zalatnai A, Timár F, Thorgeirsson U P** (1995) Quantitative evaluation of lysozyme- and CD68-positive Kupffer cells in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinomas in monkeys. *Carcinogenesis*. 16(12):3083–5.
- Lau S, Guan X** (2005) Cytogenetic and molecular genetic alterations in hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacol Sin*. 26(6):659–665.
- Lau S K, Chu P G, Weiss L M** (2004) CD163: A Specific Marker of Macrophages in Paraffin-Embedded Tissue Samples. *Am J Clin Pathol*. 122(5):794–801.
- Lewis C E, Pollard J W** (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 66(2):605–12.
- Liu K, He X, Lei X-Z, Zhao L-S, Tang H, Liu L, Lei B-J** (2003) Pathomorphological study on location and distribution of Kupffer cells in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 9(9):1946–9.
- Llovet J M, Burroughs A, Bruix J** (2003) Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 362(9399):1907–17.

- Llovet J M, Ducreux M, Lencioni R, Di Bisceglie A M, Galle P R, Dufour J F, Greten T F, Raymond E, Roskams T, Baere T, Ducreux M, Mazzaferro V, Bernadi M, Bruix J, Colombo M, Zhu A** (2012) EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 56(4):908–43.
- Lodato F, Mazzella G, Festi D, Azzaroli F, Colecchia A, Roda E** (2006) Hepatocellular carcinoma prevention: a worldwide emergence between the opulence of developed countries and the economic constraints of developing nations. *World J Gastroenterol.* 12(45):7239–49.
- Luo Y, Zhou H, Krueger J, Kaplan C, Lee S H, Dolman C, Markowitz D, Wu W, Liu C, Reisfeld R A, Xiang R** (2006) Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J Clin Invest.* 116(8):2132–41.
- Mancuso A** (2013) Management of hepatocellular carcinoma: Enlightening the gray zones. *World J Hepatol.* 5(6):302–10.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A** (2004) Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur J Cancer.* 40(11):1660–7.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F** (2008) Cancer-related inflammation. *Nature.* 454(7203):436–44.
- Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L** (1992) The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today.* 13(7):265–70.
- Mantovani A, Sica A** (2010) Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol.* 22(2):231–7.
- Mantovani A, Sica A, Locati M** (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunity.* 23(4):344–6.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M** (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25(12):677–86.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A** (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23(11):549–55.
- McGlynn K A, Tsao L, Hsing A W, Devesa S S, Fraumeni J F** (2001) International trends and patterns of primary liver cancer. *Int J Cancer.* 94(2):290–6.
- Mills C D, Kincaid K, Alt J M, Heilman M J, Hill A M** (2000) M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 164(12):6166–73.
- Modolell M, Corraliza I M, Link F, Soler G, Eichmann K** (1995) Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol.* 25(4):1101–4.

- Murdoch C, Giannoudis A, Lewis C E** (2004) Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*. 104(8):2224–34.
- Murdoch C, Muthana M, Coffelt S B, Lewis C E** (2008) The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 8(8):618–31.
- Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C, Mowat A, Weaver C T** (2012) *Janeway's Immunobiology*. 8th Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group. London, New York. 45, 69, 78, 80-81, 89, 101, 203, 217-218, 764, 767, 770, 774, 802, 820
- Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J** (1982) Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer Res*. 42:3858–63.
- Oikawa T, Ojima H, Yamasaki S, Takayama T, Hirohashi S, Sakamoto M** (2005) Multistep and multicentric development of hepatocellular carcinoma: histological analysis of 980 resected nodules. *J Hepatol*. 42(2):225–9.
- Okumoto K, Hattori E, Tamura K, Kiso S, Watanabe H, Saito K, Saito T** (2004) Possible contribution of circulating transforming growth factor- $\beta$ 1 to immunity and prognosis in unresectable hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 24:21–28.
- Paradis V** (2013) Histopathology of Hepatocellular Carcinoma. *Recent Results Cancer Res*. 190:21–33.
- Peng S, Deng H, Yang J, Xie P, Li C, Li H, Feng D** (2005) Significance and relationship between infiltrating inflammatory cell and tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma tissues. *World J Gastroenterol*. 11(41):6521–6524.
- Pollard J W** (2009) Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*. 9(4):259–70.
- Rogers T L, Holen I** (2011) Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *J Transl Med*. 9(1):177.
- Ruffell B, Affara N I, Coussens L M** (2012) Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol*. 33(3):119–26.
- Saito Y, Komohara Y, Niino D, Horlad H, Ohnishi K, Takeya H, Kawaguchi H, Shimizu H, Ohshima K, Takeya M** (2014) Role of CD204-Positive Tumor-Associated Macrophages in Adult T-Cell Leukemia / Lymphoma. *J Clin Exp Hematop*. 54(1):59–65.
- Shen Z, Seppänen H, Vainionpää S, Ye Y, Wang S, Mustonen H, Puolakkainen P** (2012) IL10, IL11, IL18 are differently expressed in CD14+ TAMs and play different role in regulating the invasion of gastric cancer cells under hypoxia. *Cytokine*. 59(2):352–7.

- Sherman M** (2005) Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. *Semin Liver Dis.* 25(2):143–54.
- Shirabe K, Mano Y, Muto J, Matono R, Motomura T, Toshima T, Takeishi K, Uchiyama H, Yoshizumi T, Taketomi A, Morita M, Tsujitani S, Sakaguchi Y, Maehara Y** (2012) Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma. *Surg Today.* 42(1):1–7.
- Sica A, Allavena P, Mantovani A** (2008) Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett.* 267(2):204–15.
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P** (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer.* 42(6):717–27.
- Solinas G, Germano G, Mantovani a, Allavena P** (2009) Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol.* 86(5):1065–73.
- Tanaka M, Nakashima O, Wada Y, Kage M, Kojiro M** (1996) Pathomorphological study of Kupffer cells in hepatocellular carcinoma and hyperplastic nodular lesions in the liver. *Hepatology.* 24(4):807–12.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K** (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 26(2):171–6.
- Uka K, Aikata H, Takaki S, Shirakawa H, Jeong S-C, Yamashina K, Hiramatsu A, Kodama H, Takahashi S, Chayama K** (2007) Clinical features and prognosis of patients with extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 13(3):414–20.
- Van Ginderachter J A, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P** (2006) Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology.* 211(6-8):487–501.
- Wei L-H, Kuo M-L, Chen C-A, Chou C-H, Lai K-B, Lee C-N, Hsieh C-Y** (2003) Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene.* 22(10):1517–1527.
- Zajac E, Schweighofer B, Kupriyanova T a, Juncker-Jensen A, Minder P, Quigley J P, Deryugina E I** (2013) Angiogenic capacity of M1- and M2-polarized macrophages is determined by the levels of TIMP-1 complexed with their secreted proMMP-9. *Blood.* 122(25):4054–67.

**Zhang W, Zhu X-D, Sun H-C, Xiong Y-Q, Zhuang P-Y, Xu H-X, Kong L-Q, Wang L, Wu W-Z, Tang Z-Y** (2010) Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects. *Clin Cancer Res.* 16(13):3420–30.

**Zhou Y, Wu J, Kucik D F, White N B, Redden D T, Szalai A J, Bullard D C, Edberg J C** (2013) Multiple lupus-associated ITGAM variants alter Mac-1 functions on neutrophils. *Arthritis Rheum.* 65(11):2907–16.

**Zhu X-D, Zhang J-B, Zhuang P-Y, Zhu H-G, Zhang W, Xiong Y-Q, Wu W-Z, Wang L, Tang Z-Y, Sun H-C** (2008) High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol.* 26(16):2707–16.

## 8 Publikationsliste

### Posterbeiträge:

HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS INDUCE AN ALTERNATIVE  
ACTIVATED PHENOTYPE IN TUMOUR-ASSOCIATED MACROPHAGES

C. Lühr, A. Quaas, M. Fahl, A.W. Lohse, J. Schrader Journal of Hepatology, 60, 1,  
S91 "EASL 2014"

INDUKTION EINES ALTERNATIVEN MAKROPHAGENPHÄNOTYPS DURCH DIE  
TUMORZELLEN IM HCC

CS Lühr, A Quaas, M Fahl, AW Lohse, J Schrader  
Zeitschrift für Gastroenterologie 2014; 52 - P\_4\_25  
"GASL 2014"

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mir beim praktischen Arbeiten im Labor und beim Verfassen meiner Dissertation zu jeder Zeit beigestanden haben und das Abschließen dieser Dissertation überhaupt erst möglich gemacht haben. Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Gisa Tiegs für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg „Entzündung und Regeneration“ bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Dr. Jörg Schrader für die Betreuung meiner Doktorarbeit und für die Möglichkeit, in seinem Labor die Versuche für dieses interessante und herausfordernde Projekt durchführen zu dürfen. Er stand mir jederzeit mit wertvollen Ratschlägen zur Seite und hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen. Das Bearbeiten dieses Projekts hat mein Studium sehr bereichert und mit Sicherheit auch die Wahl meiner Facharztausbildung beeinflusst.

Bei meinem Doktorvater PD Dr. rer. nat. Johannes Herkel möchte ich mich für die gute Betreuung bedanken. Außerdem gilt mein Dank Prof. Dr. Ansgar W. Lohse für die Möglichkeit der Promotion in seiner Klinik. Außerdem bedanke ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Alexander Quaas für die fachliche Unterstützung.

Großer Dank gebührt Martina Fahl für die hervorragende Einarbeitung in die Laborarbeit, in die „Welt der Zellkultur“ und für die freundschaftliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe. Mein Dank gilt auch Alexandra Rickert für die umfassende Einweisung in die Immunhistochemie. Ein großes Dankeschön an Corinna Rhotert für gute Ratschläge am Mikroskop und motivierende Worte beim Verfassen dieser Arbeit. Zudem gilt mein Dank allen anderen Mitarbeitern der I. Medizinischen Klinik für die Beantwortung vieler meiner Fragen.

Meinen Dank möchte ich auch meiner langjährigen Freundin Lena Schlesinger aussprechen, die mir viele Tipps zum wissenschaftlichen Schreiben gegeben hat und mich in jeder Phase meiner Dissertation unterstützt hat. An dieser Stelle möchte ich auch meinem Freund Raphael Dullin von ganzem Herzen für den privaten Rückhalt, die motivierende Worte und die große Hilfe im Kampf mit der Textverarbeitung danken. Nicht zuletzt möchte ich mich meinen Eltern und meinem Bruder für die liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen großen Dank aussprechen

## **10 Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.



## **11 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....