

Aus dem Institut für Molekulare Immunologie, Helmholtz Zentrum München  
komm. Direktor: Prof. Dr. med. Ralph Mocikat

# **Ein neuartiger humaner CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> myeloischer Zelltyp im klarzelligen Nierenzellkarzinom**

**Genexpressionsprofil, funktionelle Polarisierung und  
Einordnung im mononukleären Phagozytensystem**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von

**Dorothee Brech**

aus Mainz

2014

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuerin:	Prof. Dr. Elfriede Nößner
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann
Dekan:	Prof. Dr. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	11.05.2015

*Meinem Großvater Ernst*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
3.1	Das humane mononukleäre Phagozytensystem .....	6
3.1.1	Ontogenie .....	6
3.1.2	Zelltypen .....	8
3.1.2.1	Monozyten.....	8
3.1.2.2	Makrophagen .....	8
3.1.2.2.1	M1-Makrophagen.....	9
3.1.2.2.2	M2-Makrophagen.....	9
3.1.2.3	Dendritische Zellen .....	11
3.1.2.3.1	Klassische DC (cDC) .....	11
3.1.2.3.2	CD14 <sup>+</sup> inflammatorische DC .....	12
3.1.2.3.3	6-Sulfo LacNAc DC (sIaDC) .....	12
3.2	T-Zell-Aktivierung und Toleranzinduktion .....	13
3.3	Myeloische Zellen im Tumormilieu .....	15
3.4	Myeloische Zellen der Niere .....	16
3.4.1	Homöostatische und inflammatorische Bedingungen .....	16
3.4.2	Klarzelliges Nierenzellkarzinom .....	17
<b>4</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>20</b>
5.1	Geräte .....	20
5.2	Verbrauchsmaterial.....	21
5.3	Reagenzien und fertige Lösungen .....	21
5.4	Puffer- und Lösungen .....	22
5.5	Verbrauchsmedien und Zusätze .....	23
5.6	Medien.....	24
5.7	Zellen und Zelllinien.....	24
5.8	Blutproben .....	25
5.9	Tumorgewebe.....	25
5.10	Primäre und sekundäre Antikörper für die Durchflusszytometrie .....	27
5.11	Testkits .....	29
5.12	Software .....	29



<b>6</b>	<b>METHODEN</b>	<b>30</b>
6.1	Zellkultur	30
6.1.1	Allgemeine Bemerkungen	30
6.1.2	Auftauen der Zellen	30
6.1.3	Bestimmung der Zellzahl	30
6.1.4	Einfrieren von Zellen	31
6.1.5	Kultivierung von adhärenenten Zelllinien	31
6.1.6	Gewinnung von RCC-26-konditioniertem Medium (RCC-26-CM) für die Differenzierung von ercDC aus Monozyten	32
6.1.7	Arbeiten mit Vollblut und Geweben	32
6.1.7.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut	32
6.1.7.2	Positive Isolierung von Monozyten aus PBMC	32
6.1.7.3	In-vitro-Generierung von myeloischen Zelltypen aus Monozyten	33
6.1.7.4	Herstellung von Gewebe-Zellsuspensionen aus RCC-Gewebe	34
6.2	Funktionelle Versuche	35
6.2.1	Signal-3-Nachweisverfahren	35
6.2.2	Kokultur myeloischer Zellen mit allogenen naiven T-Zellen	35
6.2.2.1	T-Zell-Proliferation und Apoptoseinduktion	35
6.3	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	36
6.4	Durchflusszytometrie	36
6.4.1	Messprinzip	36
6.4.2	Markierung toter Zellen	37
6.4.3	Oberflächenfärbung	38
6.4.3.1	Zellsuspensionen	38
6.4.3.2	RCC-Gewebe-Zellsuspensionen	39
6.4.4	CFSE-Markierung zur Messung der T-Zell-Proliferation	40
6.4.5	Annexin V/PI-Färbung zur Detektion apoptotischer Zellen	40
6.4.6	Fluoreszenzmarkierung des intrazellulären Proteins Fascin	41
6.4.7	Messung der Proben und Auswertung der Daten	42
6.4.8	Zellsortierung	43
6.4.8.1	Prinzip	43
6.4.8.2	Sortierung von myeloischen Subpopulationen aus Blut und RCC-Gewebe-Zellsuspensionen	45
6.5	Molekularbiologische Methoden	46
6.5.1	RNA-Isolierung	46
6.5.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	47
6.5.3	Bestimmung der RNA-Integrität	47
6.5.4	Genexpressionsanalyse mit der Affymetrix GeneChip®-Technologie	49

---

6.5.4.1	Prinzip .....	49
6.5.4.2	Durchführung.....	50
6.5.4.2.1	Synthese, Amplifikation, Fragmentierung und Biotinmarkierung der cDNA .....	50
6.5.4.2.2	Hybridisierung und Fluoreszenzmarkierung .....	50
6.5.4.3	Auswertung der Daten .....	51
6.5.4.3.1	Qualitätskontrolle und Normalisierung der Daten .....	51
6.5.4.3.2	Verwendete Analysemethoden .....	52
6.6	Statistische Auswertung der In-vitro-Funktionsanalysen und Stripchart- Balkendiagramme.....	54
<b>7</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>55</b>
7.1	CD209 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> CD163 <sup>+</sup> myeloische Zellen im RCC.....	55
7.2	In-vitro-Modell zur Generierung von ercDC.....	57
7.3	Phänotypischer Vergleich der ercDC aus dem RCC mit den in vitro generierten ercDC .....	57
7.4	Funktionelle Charakteristika der ercDC.....	58
7.5	Genexpressionsanalyse.....	68
7.5.1	Sortierung von ercDC (CD209 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup> ) und MΦ (CD209 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup> ) aus RCC- Gewebe-Zellsuspensionen.....	68
7.5.2	Sortierung von CD1c <sup>+</sup> DC und slanDC aus dem Blut .....	69
7.5.3	Auswahl eines CD141 <sup>+</sup> DC-Transkriptomdatensatzes aus externen Datenbanken und Prüfung der aus PBMC sortierten CD1c <sup>+</sup> DC auf Zelltyp- assoziierte Gene.....	71
7.5.4	Verwandschaftsanalyse und charakteristisches Genexpressionsprofil der ercDC aus dem RCC .....	73
7.5.4.1	Markergene und differentiell exprimierte Gene .....	76
7.5.5	Vergleich der ercDC aus dem RCC mit in vitro generierten ercDC auf Transkriptebe.....	90
7.5.6	Positionierung der ercDC im MPS-Kontinuum mit Hilfe Makrophagen- und DC-assoziiierter Marker .....	98
7.5.6.1	Durchflusszytometrische Analyse der postulierten Marker zur Unterscheidung von Makrophagen und DC .....	100
7.5.6.2	Transkriptlevel der durchflusszytometrisch analysierten Marker .....	101
7.5.6.3	Anwendung der Makrophagen- und DC-Kerngenlisten .....	102
7.5.6.4	Makrophagen- und DC-assoziierte Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren.....	104
7.5.6.5	Einordnung der ercDC innerhalb der Makrophagen.....	106
7.5.6.5.1	Klassifizierung anhand M1- und M2-assoziiierter Gene .....	106

---

7.5.6.5.2	Klassifizierung nach homöostatischer Funktion.....	109
7.5.6.5.3	Expression von TAM-assoziierten Markern.....	113
7.5.7	Einfluss von Gewebemilieufaktoren auf das Genexpressionsprofil der ercDC aus dem RCC .....	119
<b>8</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>123</b>
8.1	Positionierung der ercDC aus dem RCC im Kontinuum des mononukleären Phagozytensystems.....	125
8.2	ErcDC besitzen ein gemischtes Funktionsprofil, welches Eigenschaften verschiedener Makrophagensubtypen vereint.....	126
8.3	Das RCC-Milieu prägt das Transkriptom der ercDC.....	128
8.4	ErcDC und Immunevasion .....	130
8.5	Ausblick und therapeutische Ansatzpunkte für eine Repolarisierung der ercDC ...	132
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>136</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>138</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>157</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>182</b>
	<b>PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>183</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....</b>	<b>184</b>

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Nierenzellkarzinom (RCC, engl.: renal cell carcinoma) zeichnet sich durch ein reichhaltiges Immunzellinfiltrat aus, das neben T- und NK-Zellen auch dendritische Zellen (DC, engl.: dendritic cells) und Makrophagen (MΦ) enthält. Dennoch bleibt die Tumorkontrolle aus. Offensichtlich werden die antitumoralen Funktionen der Immunzellen durch den Tumor supprimiert. DC und MΦ sind zentrale Regulatoren der Immunantwort und können je nach Differenzierungsstatus und funktioneller Polarisierung sowohl Immunität als auch Toleranz induzieren. Sie sind ein optimales Ziel, um die antitumorale Immunantwort zu modulieren. Wir fanden einen myeloischen Zelltyp im RCC-Gewebe, der entgegen klassischer Vorstellung DC (CD209/DC-SIGN)- und MΦ-Marker (CD14, CD163) koexprimiert. Aufgrund der Anreicherung im RCC-Tumor gegenüber dem tumorfreien Nierenparenchym nannten wir ihn „enriched-in-renal-carcinoma DC“ (ercDC). Dieser Zelltyp konnte in vitro, durch Behandlung von Monozyten mit einer Kombination RCC-sezernierter Faktoren (IL-6, CXCL8/IL-8, VEGF), hergestellt werden. Er wurde als „DC“ bezeichnet, weil sowohl die in vitro generierten als auch die aus dem RCC stammenden ercDC T-Zell-aktivierende Kostimulations- und MHC-Moleküle (engl.: major histocompatibility complex) exprimierten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in vitro generierte ercDC trotz der Expression T-Zell-aktivierender Marker naive T-Zellen kaum zur Proliferation stimulierten und bei Stimulation mit CD40-Ligand kein IL-12 sezernierten. Auch das für die Ausbildung der immunologischen Synapse wichtige Fascin wurde im Vergleich zu klassischen DC (cDC) sehr viel geringer exprimiert. Aufgrund dieser Unterschiede und bestärkt durch die aktuelle Diskussion über ein mögliches Kontinuum der Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS), wurde eine globale Genexpressionsanalyse durchgeführt. Durch den Vergleich des ercDC-Transkriptoms mit dem verschiedener myeloischer Zellen aus dem Blut und nicht-lymphatischen Geweben konnte ein charakteristisches Marker- und Signaturgenprofil erstellt werden, welches die ercDC einerseits von den vergleichend analysierten Zelltypen deutlich abgrenzte, aber andererseits auch die Ähnlichkeit zu einem inflammatorischen MΦ-Subtyp aus dem Ascites von Ovarialkarzinompatienten aufzeigte. Das Transkriptom der ercDC und inflammatorischen Ascites-MΦ zeigte eine Prägung durch dieselben Aktivierungsstimuli (Glucocorticoide, PGE<sub>2</sub>, TNF, Palmitinsäure (PA, engl.: palmitic acid), TLR2-Liganden), so dass anzunehmen ist, dass sie einem ähnlichen Gewebemilieu ausgesetzt waren.

Die Genexpressionsanalyse, insbesondere die Analyse von DC- und MΦ-Kerngenen sowie DC/MΦ-spezifischer Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren, ergab, dass sich die ercDC, entgegen der ursprünglichen Annahme, im Kontinuum des MPS eher auf der Seite der MΦ positionieren. Innerhalb der MΦ-Gruppe zeichneten sie sich sowohl durch M1-

als auch durch M2-Eigenschaften aus und exprimierten Gene, die für gewebemodulierende MΦ typisch sind. Die ercDC sind somit ein Mischtyp, der Eigenschaften mehrerer MΦ-Subtypen vereint. Auch aus dem Markergenprofil konnten sowohl proinflammatorische, immunstimulierende als auch antiinflammatorische, immunsuppressive Funktionen abgeleitet werden. Darüber hinaus kennzeichnete die ercDC ein proangiogenes und invasives Genexpressionsprofil, welches für protumorale tumorassoziierte MΦ (TAM) typisch ist. Zu diesem Profil gehörte auch *VSIG4*, das für einen koinhibitorischen, T-Zell-Toleranz-induzierenden Rezeptor kodiert. *VSIG4* könnte ursächlich für die geringe T-Zell-Stimulationsfähigkeit der ercDC sein und ist ein vielversprechender Kandidat für therapeutische Ansätze mit dem Ziel der ercDC-Repolarisierung zu einem immunkompetenten Zelltyp.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die in vitro generierten ercDC den aus dem RCC stammenden ercDC sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene ähnlich sind. Die gute Vergleichbarkeit der in vitro generierten Zellen mit den Ex-vivo-ercDC erlaubt nun weiterführende, umfassendere Funktionsanalysen, die aufgrund der begrenzten Anzahl der ercDC aus dem RCC nur mit einem In-vitro-Surrogat möglich sind.

## 2 SUMMARY

Renal cell carcinoma (RCC) has a prominent immune cell infiltrate consisting of T cells, natural killer (NK) cells, dendritic cells (DCs) and macrophages (MΦ). Nevertheless, tumor control is not achieved which indicates immunosuppression within the tumor milieu. DCs and MΦ are central regulators of immune responses with the capacity to induce immunity or tolerance depending on their differentiation state and functional polarization. Thus, targeting this cell population constitutes an effective mean for tumors to shift the immune response toward immunosuppression. We identified a myeloid cell type in RCC tissue that co-expresses, contrary to general assumption, DC (CD209/DC-SIGN) and MΦ markers (CD14, CD163). Based on the predominance of this cell type in RCC tissue compared to tumor-free areas of the tumor-bearing kidney they were referred to as “enriched-in-renal-carcinoma DCs” (ercDCs). The phenotype of these ercDCs could be reiterated *in vitro* when treating monocytes with a combination of RCC-derived factors (IL-6, CXCL8/IL-8, VEGF). They were designated as DC because both, the *in vitro* generated and the ercDCs isolated from RCC tissue, expressed costimulatory and MHC molecules (major histocompatibility complex).

In the present work it was demonstrated, that *in vitro* generated ercDCs induced proliferation of naive T cells poorly and did not secrete IL-12 after stimulation with CD40 ligand. In addition, they expressed fascin weakly in comparison to classical DCs (cDCs), which is essential for the formation of the immunological synapse. Based on these differences and encouraged by current discussions stating that the mononuclear phagocyte system is rather a continuum of cells than consists of distinct cell types, a global gene expression analysis was conducted. The comparison of the ercDC transcriptome with those of different myeloid cells of the blood and non-lymphoid tissues identified a characteristic marker gene and signature gene profile, which, on the one hand, clearly distinguished ercDC from the other cell types analyzed, but, on the other hand, revealed a strong resemblance to an inflammatory MΦ subtype from the ascites of ovarian cancer patients. The transcriptome of both cell types was affected by the same activating stimuli (glucocorticoids, PGE<sub>2</sub>, TNF, palmitic acid (PA), TLR2-ligands), suggesting that they may have been exposed to a similar tissue milieu.

The gene expression analysis, in particular the analysis of DC and MΦ core genes as well as transcription factors and growth factor receptors specific for DCs and MΦ, respectively, revealed that ercDCs, contrary to the original assumption, should rather be designated as MΦ than DC within the continuum of the mononuclear phagocyte system (MPS). Among MΦ, they displayed characteristics of M1-MΦ as well as M2-MΦ and, in addition, expressed genes associated with MΦ involved in tissue modulation. Thus, ercDCs seem to be a mixed cell type displaying characteristics of several MΦ subtypes. Accordingly, the marker gene profile of ercDCs included genes associated with proinflammatory, immunostimulatory but

also genes with anti-inflammatory, immunoinhibitory functions. Furthermore, ercDCs exhibited a proangiogenic and invasive gene expression profile characteristic for tumor associated macrophages (TAMs). Among this profile was the gene *VSIG4*, which encodes a co-inhibitory receptor involved in T cell tolerance. *VSIG4* could be responsible for the weak T cell stimulatory capacity of ercDCs and is, therefore, a promising therapeutic target for the repolarization of ercDCs into an immunocompetent cell type.

Furthermore, the results demonstrated similarity between the in vitro generated ercDCs and the ercDCs from RCC tissue at transcript and protein level. Based on this resemblance, in vitro generated ercDCs may now be utilized in more extensive functional studies, which can only be conducted meaningfully with an in vitro surrogate due to the limited availability of ercDC from RCC tissue.

### 3 EINLEITUNG

Das Immunsystem ist ein komplexes System aus Organen, Zellen und löslichen Faktoren, dessen wichtigste Aufgabe die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Bestandteilen ist. Es schützt den Körper somit vor eindringenden Krankheitserregern und sorgt gleichzeitig dafür, dass keine Immunreaktion gegen natürliche körpereigene Komponenten stattfindet. Neben Pathogenen stellen auch krankhaft veränderte körpereigene Zellen eine Gefahr dar, so wie dies bei der Tumorentstehung der Fall ist.

Das zelluläre Immunsystem unterteilt sich in eine angeborene und erworbene (adaptive) Immunabwehr. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen dendritische Zellen (DC), Makrophagen (MΦ), Monozyten, Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese Zelltypen erkennen eindringende Pathogene über spezielle Rezeptoren, sogenannte PRR (engl.: pattern recognition receptor), die bestimmte Strukturen, die PAMP (engl.: pathogen associated molecular pattern), auf den Pathogenen wahrnehmen<sup>1</sup>. Als Folge davon kommt es zur Aktivierung der Zellen, die daraufhin u.a. Zytokine und Chemokine sezernieren und andere Zellen des Immunsystems anlocken, um die inflammatorische Immunantwort voranzutreiben. Die Hauptfunktion der zu den Lymphozyten gehörenden NK-Zellen ist das Abtöten von infizierten und entarteten Zellen.

Zeitlich verzögert zum angeborenen Immunsystem kommt das adaptive Immunsystem zum Zuge, welches erregerspezifisch ist und ein langlebiges, antigenspezifisches Gedächtnis ausbildet. Die wichtigsten Immunzellen des adaptiven Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten. Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind per se „naiv“ und benötigen einen Antigenerstkontakt um Effektorfunktion zu erlangen. T-Zellen besitzen zur Antigenerkennung einen sogenannten T-Zell-Rezeptor (TCR, engl.: T cell receptor), der auf MHC-Molekülen präsentierte Antigene mit Hilfe der Korezeptoren CD4 bzw. CD8 erkennt. Dementsprechend unterscheidet man CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen (CTL, engl.: cytotoxic T lymphocytes). CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen erkennen Peptide über MHC-II-Moleküle, die von antigenpräsentierenden Zellen (APC, engl.: antigen presenting cell) exprimiert werden. Es gibt verschiedene Subpopulationen der T-Helferzellen. Abhängig von der MHC/Peptid-TCR-Bindungsstärke und dem Zytokinmilieu entstehen T<sub>H</sub>1-, T<sub>H</sub>2-, T<sub>H</sub>3-, T<sub>H</sub>9-, T<sub>H</sub>17- und T<sub>FH</sub>-Zellen (follikuläre T-Helferzellen). Aus der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Linie können auch regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) hervorgehen, deren Hauptaufgabe es ist, unerwünschte Immunantworten zu verhindern, überschießende inflammatorische Immunantworten abzuschwächen und darüber die Balance zwischen Immunität und Toleranz zu wahren. Die CD8<sup>+</sup> CTL sind an der Zerstörung von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen beteiligt. Sie erkennen auf MHC-I-Molekülen präsentierte Antigene, die von allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert werden.



### 3.1 Das humane mononukleäre Phagozytensystem

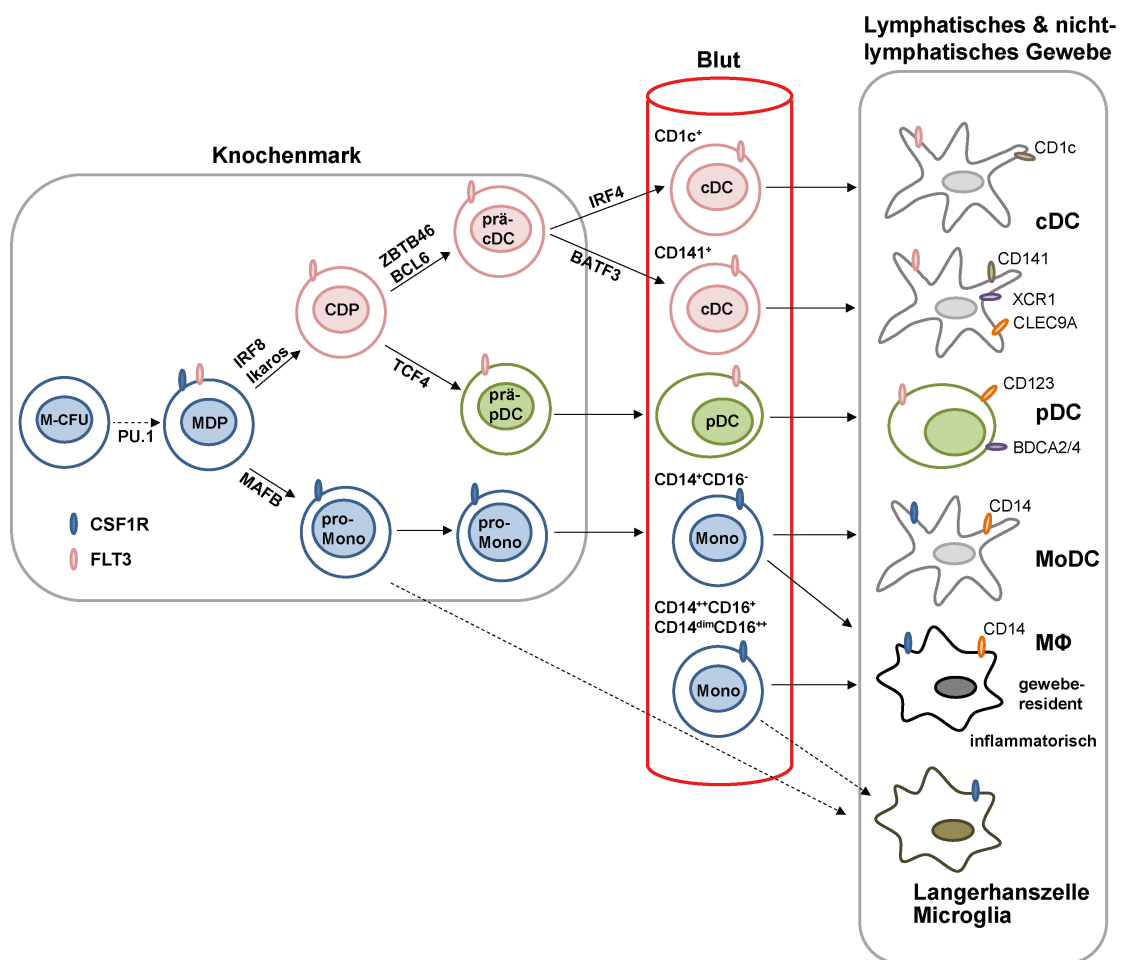
Das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) umfasst eine Gruppe von Zellen des angeborenen Immunsystems, die von einer myeloischen hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks abstammt. Hierzu gehören im Blut zirkulierende Monozyten, die im Gewebe zu MΦ differenzieren, sowie die DC<sup>2,3</sup>. Die Gruppe zeichnet sich durch ein hohes Maß an Heterogenität in Bezug auf Phänotyp, Funktion und Homöostase aus.

Die Erstbeschreibung der DC geht auf Ralph Steinman zurück, der eine DC als eine Zelle mit typischen bäumchenartigen Ausläufern beschrieb, die die Fähigkeit besitzt nach dem Kontakt mit inflammatorischen Stimuli zu reifen, in die T-Zell-Zone der Lymphknoten zu migrieren und dort mittels Antigenpräsentation eine antigenspezifische T-Zell-Antwort zu induzieren<sup>4,5</sup>. Im murinen System, aber auch im humanen System, wurden DC lange Zeit durch die Expression des Markers CD11c identifiziert und von den MΦ unterschieden<sup>6,7</sup>. Im humanen System wurde außerdem oft CD209/DC-SIGN zur Identifizierung von interstitiellen gewebeständigen DC und CD14 zur Identifizierung von MΦ verwendet<sup>8,9,10</sup>. Funktionell wurden MΦ ursprünglich als stark phagozytierende Zellen definiert, die bei Stimulierung ROS (engl.: reactive oxygen species) und NO (engl.: nitric oxide) bilden<sup>11</sup>. Diese „einfachen“ Kriterien zur Unterscheidung müssen jedoch überdacht werden, da die Grenzen zwischen den einzelnen myeloischen Zelltypen zunehmend verschwimmen<sup>2,6,12</sup>. Mittlerweile ist bekannt, dass auch humane und murine MΦ CD11c<sup>+</sup> sein können und es gibt inflammatorische DC, die CD14 exprimieren<sup>6,13</sup>. Eine entscheidende Rolle für die Differenzierung und Funktion der myeloischen Zellen scheinen das umgebende Gewebemilieu und die darin enthaltenen löslichen Faktoren zu spielen<sup>10,12,14</sup>. In den letzten Jahren rückten daher umfassende Transkriptom- und Proteom-basierte Analysen in den Fokus, welche die Klassifizierung der myeloischen Zellen basierend auf dem durch das Milieu geprägten Genexpressionsprofil verbessern sollen.

#### 3.1.1 Ontogenie

Myeloische Zellen stammen von CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen, den M-CFU (engl.: myeloid colony-forming units), des Knochenmarks ab. M-CFU differenzieren zu einem gemeinsamen myeloischen Vorläufer, dem CMP (engl.: common myeloid progenitor), welcher sich dann zu einer Monozyten/MΦ- und DC-Vorläuferzelle (MDP, engl.: macrophage-DC progenitor) entwickelt (Abbildung 3-1). Die Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>hi</sup>CD115<sup>+</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup> MDP reifen dann entweder zu einer pro-Monozyten-Vorläuferzelle oder DC-Vorläuferzelle (CDP, engl.: common DC progenitor, Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>lo</sup>CD115<sup>+</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>) aus. Die konstitutive Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 ist für die Differenzierung der M-CFU zur MDP essentiell und setzt sich dann in der gesamten DC-Linie fort. Die Transkriptionsfaktoren IRF8 und Ikaros sowie der Wachstumsfaktorrezeptor FLT3 (engl.: Fms-like tyrosine kinase 3)

steuern die Differenzierung der MDP zur CDP<sup>15</sup>. Die CDP entwickelt sich, abhängig von den Transkriptionsfaktoren, zu einer prä-cDC (engl.: classical DC) oder prä-pDC (plasmazytoide DC). Für die Entwicklung der prä-cDC sind die Transkriptionsfaktoren ZBTB46 und BCL6 essentiell<sup>15,16</sup>, für die CD123<sup>+</sup>BDCA2<sup>+</sup>BDCA4<sup>+</sup> pDC ist der Transkriptionsfaktor TCF4/E2-2 der Masterregulator<sup>17</sup>. Aus den prä-cDC entwickeln sich zwei Subtypen klassischer DC, die CD1c<sup>+</sup> DC und die CD141<sup>+</sup> DC. Die Differenzierung von CD1c<sup>+</sup> DC wird insbesondere durch den Transkriptionsfaktor IRF4 gesteuert, die Entwicklung der prä-cDC zu CD141<sup>+</sup> DC, die u.a. durch die Expression von XCR1 und CLEC9A gekennzeichnet sind, durch BATF3<sup>15,18</sup>. Aus der pro-Monozyten-Vorläuferzelle entwickeln sich drei verschiedene Subtypen im Blut zirkulierender Monozyten, die sich in der Expression von CD14 und CD16 unterscheiden (siehe auch Abschnitt 3.1.2.1, Seite 8). Diese wandern bei Entzündungsvorgängen in die Gewebe und reifen zu inflammatorischen MΦ oder migratorischen DC (MoDC, engl.: monocyte-derived DC) aus<sup>19</sup>. Die Monozyten-MΦ-Zelllinie zeichnet sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors MAFB und des Wachstumsfaktorrezeptors CSF1R aus<sup>11</sup>. Langerhanszellen und Microglia können sich vermutlich sowohl aus im Blut vorkommenden Monozyten als auch aus einer Monozyten-Vorläuferzelle im Knochenmark entwickeln<sup>20,21</sup>.



**Abbildung 3-1: Entwicklung humaner DC und Makrophagen.** Erklärung siehe Text in Abschnitt 3.1.1. Modifiziert nach Tsunetsugu-Yukota et al.<sup>19</sup>. Durchgezogener Pfeil: direkte Verbindung; gestrichelter Pfeil: indirekte Verbindung; Mono: Monozyt

### 3.1.2 Zelltypen

#### 3.1.2.1 Monozyten

Es gibt drei, im Blut zirkulierende, humane Monozyten-Subtypen. Klassische  $CD14^{++}CD16^{-}$ , intermediäre  $CD14^{++}CD16^{+}$  und nicht-klassische  $CD14^{dim}CD16^{++}$  Monozyten<sup>22</sup>. Die klassischen Monozyten machen 80-90% der im Blut vorkommenden Monozyten aus. Sie exprimieren CCR2, CD64/FcγRI und wenig CX<sub>3</sub>CR1. Sie zeichnen sich durch eine hohe phagozytotische Aktivität und bakterizide Eigenschaften, z.B. die Sezernierung von ROS, aus. Bei Stimulierung mit LPS sezernieren sie IL-10, aber auch proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF-α<sup>22</sup>. Bei Entzündungsvorgängen können die klassischen Monozyten im Gewebe entweder zu  $CD14^{+}$  inflammatorischen DC oder zu inflammatorischen MΦ differenzieren<sup>19</sup>. Entscheidend für die Differenzierung ist das Gewebemilieu, insbesondere die darin enthaltenen Zytokine<sup>23,24</sup>. Die beiden  $CD16$ -positiven Monozyten-Subtypen exprimieren viel CX<sub>3</sub>CR1, aber nur wenig CCR2. Intermediäre  $CD14^{++}CD16^{+}$  Monozyten exprimieren die Fc-Rezeptoren CD64/FcγRI und CD32/FcγRII, besitzen phagozytotische Aktivität und sezernieren proinflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-6 und IL-1α<sup>22</sup>. Es wird vermutet, dass die intermediären Monozyten eine Übergangspopulation darstellen, die Eigenschaften klassischer und nicht-klassischer Populationen vereint. Die nicht-klassischen  $CD14^{dim}CD16^{++}$  Monozyten exprimieren die beiden zuvor genannten Fc-Rezeptoren nicht, sind wenig phagozytotisch und produzieren kein ROS. Sie können sowohl antiinflammatorische (z.B. IL-1Ra (IL-1-Rezeptor-Antagonist)) als auch proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-6, TNF-α) sezernieren<sup>22</sup>.

#### 3.1.2.2 Makrophagen

MΦ sind eine sehr heterogene Zellgruppe, die in fast allen Geweben des Körpers vorkommt<sup>10</sup>. Sie entwickeln sich aus Monozyten, die aus dem Blut einwandern, können sich aber auch aus im Gewebe vorkommenden Vorläuferzellen generieren. Das Gewebe, sowie die darin enthaltenen Zellen und löslichen Faktoren (u.a. M-CSF (engl.: macrophage colony-stimulating factor) und GM-CSF (engl.: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)), entscheiden über die Funktion und den Phänotyp der MΦ<sup>14</sup>. Hauptaufgaben der MΦ sind die Beseitigung von Pathogenen und toten Zellen mittels Phagozytose sowie die Aufrechterhaltung der Gewebemilieu. Nach Pathogenkontakt sezernieren MΦ diverse Zytokine und Chemokine, wobei die Art und Menge der freigesetzten Mediatoren den weiteren Verlauf der Immunantwort entscheidend beeinflusst. Proinflammatorische Zytokine, wie IL-1β und TNF-α, erhöhen die Durchlässigkeit des lokalen Endothels für zelluläre und lösliche Faktoren. Chemokine, wie RANTES/CCL5, tragen zusätzlich zur Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der Entzündung bei. Angelehnt an die bei T-Zellen vorkommende T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Nomenklatur, wurden MΦ bisher in zwei verschiedene Subklassen eingeteilt, die

klassischen M1-MΦ und die alternativ aktivierten M2-MΦ<sup>25</sup>. Diese strikte Einteilung ist jedoch v.a. für geweberesidente MΦ nicht mehr haltbar, da deren Diversität und Funktion stark von dem jeweiligen Gewebe und den dort vorzufindenden mikroanatomischen Nischen abhängt<sup>14,25</sup>. Vielmehr scheint ein Kontinuum der MΦ zu existieren, in dem die M1- bzw. M2-MΦ die beiden Extrema darstellen<sup>26</sup>. Zu den geweberesidenten MΦ zählen zum Beispiel die Langerhanszellen (Haut), alveolare MΦ (Lunge), intestinale MΦ (Darm), uterine MΦ (Uterus) und renale MΦ (Niere). Bisher wurden sie v.a. aufgrund ihrer wichtigen Rolle in der Gewebekomöostase und Wundheilung als M2-ähnlich klassifiziert<sup>14</sup>. Allerdings spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der Initiation der inflammatorischen Immunantwort, u.a. durch die Expression von PRR und die Sezernierung proinflammatorischer Chemo- und Zytokine<sup>14</sup>. Wahrscheinlich stellen die meisten geweberesidenten MΦ einen individuellen Zelltyp dar, der Eigenschaften von M1- und M2-MΦ vereint. Die Eigenschaften beider MΦ-Subpopulationen sind somit immer noch präsent und werden in den nachfolgenden beiden Kapiteln erläutert.

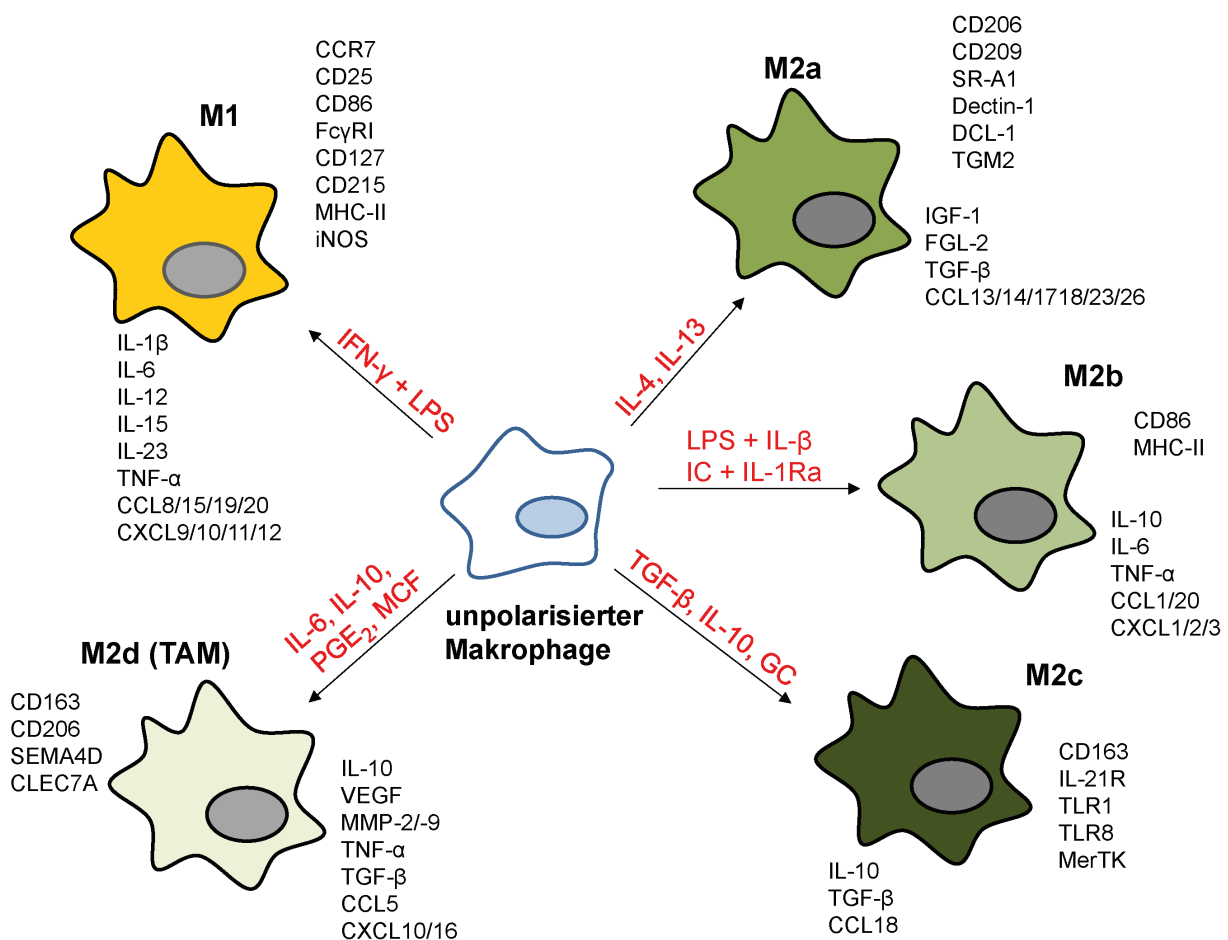
#### **3.1.2.2.1 M1-Makrophagen**

LPS und IFN-γ polarisieren, vermittelt durch die Transkriptionsfaktoren STAT1 und IRF5, die Differenzierung der MΦ zum klassisch aktivierten M1-Phänotyp<sup>27</sup>. M1-MΦ produzieren große Mengen antimikrobieller Effektormoleküle, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffzwischenprodukte (z.B. NO), die der direkten Abtötung von Pathogenen dienen. Außerdem zeichnen sie sich durch die Expression von CCR7, CD86 und MHC-II-Molekülen aus. Sie können Pathogenantigene auf MHC-II-Molekülen präsentieren und gleichzeitig proinflammatorische Mediatoren (IL-1β, IL-12, TNF-α, IL-23, IP-10/CXCL10 und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)/CCL2) sezernieren. Dadurch wird die Induktion einer inflammatorischen T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>17-Immunantwort begünstigt<sup>28</sup>.

#### **3.1.2.2.2 M2-Makrophagen**

Die alternativ aktivierten M2-MΦ sind eine sehr heterogene Zellpopulation, deren Differenzierung überwiegend durch den Transkriptionsfaktor STAT6 bestimmt wird<sup>27</sup>. Es gibt mindestens 3 Subpopulationen, M2a-, M2b- und M2c-MΦ<sup>26</sup> (Abbildung 3-2). Erst kürzlich wurden die im Tumor vorkommenden MΦ, die TAM (tumorassoziierte Makrophagen), als M2d-Subtyp in die Reihe mit aufgenommen<sup>29</sup>. M2a-MΦ, die u.a. durch die Expression von CD206/MRC1 (Mannose-Rezeptor, C-Typ 1) und CD209/DC-SIGN gekennzeichnet sind, werden durch Exposition mit IL-4 oder IL-13 induziert, M2b durch Immunkomplexe (IC, engl.: immune complexes) in Kombination mit IL-1Ra oder einer Kombination von LPS und IL-1β. M2b-MΦ sezernieren viel antiinflammatorisches IL-10, aber auch proinflammatorisches TNF-α. CD163<sup>+</sup> M2c-MΦ entwickeln sich nach Kontakt mit IL-10, TGF-β und Glucocorticoiden

(GC). Sie exprimieren viele Scavenger- und Mannose-Rezeptoren sowie TLR (engl.: Toll like receptor), welche die Phagozytose fördern. M2d-MΦ werden u.a. durch IL-6 und PGE<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub>) induziert. Sie sezernieren viel IL-10, wenig IL-12 und gewebeomodulierende MMP. Alle Subtypen unterstützen durch die Sezernierung einer Vielzahl an Zytokinen und Chemokinen die Effektorfunktion von T<sub>H</sub>2 T-Zellen und die Rekrutierung von Immunzellen. Darüber hinaus spielen M2-MΦ eine große Rolle bei der Abschwächung von Entzündungsreaktionen, u.a. durch Sezernierung von IL-10, und bei der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase<sup>26</sup>.



**Abbildung 3-2: Polarisierungssignale und Charakteristika humaner M1- und M2-Makrophagen.**

Unpolarisierte MΦ differenzieren abhängig von den äußeren Stimuli in verschiedene Subtypen, die durch ein charakteristisches Oberflächenmarker- und Chemokin/Zytokin-Profil gekennzeichnet sind. Der klassische M1-Phänotyp wird durch IFN-γ und LPS induziert und fördert u.a. durch Sezernierung von IL-12 und IL-23 die T<sub>H</sub>1-Antwort. M2-MΦ unterstützen antiinflammatorische Prozesse und sind für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase wichtig. Sie werden basierend auf aktivierenden Stimuli, Oberflächenmolekülen und dem Chemokin/Zytokinprofil in 4 verschiedene Subtypen (M2a bis M2d) unterteilt, die überwiegend antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, aber auch proinflammatorische Zytokine wie IL-6 (M2b) sezernieren. Auch die tumorassoziierten Makrophagen (TAM) werden zu den M2-MΦ (M2d) gezählt. Angelehnt an die MΦ-Polarisierung von bilegend.com („macrophage polarization: M1 vs M2“). MCF: Makrophagen-chemotaktischer Faktor

### 3.1.2.3 Dendritische Zellen

DC gehören zusammen mit den MΦ und B-Zellen zu den sogenannten „professionellen“ APC des Immunsystems. Sie zeichnen sich durch einzigartige Eigenschaften aus, die es ihnen ermöglichen, eine effektive und spezifische Immunantwort gegen Pathogene und pathogenveränderte körpereigene Strukturen einzuleiten. Sie kommen in fast allen peripheren Geweben des Körpers vor, wo sie fortlaufend ihre Umgebung analysieren, indem sie extrazelluläre Bestandteile durch Phagozytose aufnehmen, prozessieren und als Peptide auf ihrer Oberfläche im MHC-Kontext präsentieren. Da über diese die zum adaptiven Immunsystem gehörenden T-Zellen aktiviert werden können, werden DC auch als Verbindungsglied zwischen dem adaptiven und dem angeborenen Immunsystem angesehen. Des Weiteren können DC Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen induzieren und spielen eine entscheidende Rolle für die Gewebekomöostase. Phänotypisch sind DC durch die Expression des MHC-II-Moleküls HLA-DR (humanes Leukozyten-Antigen, Klasse II) und das Fehlen der „lineage“-Marker CD3, CD19/20 und CD14 gekennzeichnet<sup>30</sup>. Sie sind keine homogene Population, sondern lassen sich entsprechend ihres Ursprungs, des Differenzierungsstadiums, der Funktionen und der migratorischen Eigenschaften in Subgruppen unterteilen. Im humanen System sind die im Blut vorkommenden DC recht gut beschrieben<sup>31</sup>. Sie sind die Vorläufer von den in Geweben und lymphatischen Organen vorkommenden DC. Im Blut enthalten sind zwei verschiedene unreife DC-Subtypen, die CD11c<sup>+</sup> cDC und die CD11c<sup>-</sup> pDC. Die pDC können von cDC durch die Expression der Oberflächenmarker BDCA2/CD303 (engl.: blood dendritic cell antigen 2), BDCA4/CD304 und IL-3R/CD123 unterschieden werden<sup>32</sup>. Mit Hilfe der Rezeptoren TLR7 und TLR9 können pDC virale und mikrobielle Strukturen erkennen und Typ-I-Interferone sezernieren, welche die virale Proteinsynthese hemmen und andere Immunzellen, u.a. T-Zellen, aktivieren.

#### 3.1.2.3.1 Klassische DC (cDC)

Es gibt zwei verschiedene Subtypen von cDC, die CD1c<sup>+</sup>CD209<sup>+/-</sup> DC und die CD141<sup>+</sup> DC. CD1c<sup>+</sup> DC sind die heterogenste Population humaner myeloischer DC im Blut, lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben. Für die Differenzierung der CD1c<sup>+</sup> DC ist der Transkriptionsfaktor IRF4 essentiell<sup>33</sup>. Im Gewebe vorkommende CD1c<sup>+</sup> DC besitzen einen aktivierteren Phänotyp als ihre CD1c<sup>+</sup> Gegenstücke im Blut. Sie exprimieren Kostimulationsmoleküle, regulieren die „Homing“-Rezeptoren CD162 und CD62L herunter und gleichzeitig CCR7 hoch. Im Lymphknoten befinden sich migratorische CD1c<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> DC in engem Kontakt mit T-Zellen. Sie exprimieren viele Lektine, TLR und andere PRR, die die Antigenaufnahme, den Transport und die Präsentation fördern. CD1c<sup>+</sup> DC können naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen effektiv stimulieren, besitzen jedoch ein geringeres Potential zur Antigenkreuzpräsentation (Stimulation CD8<sup>+</sup> T-Zellen) im Vergleich zu CD141<sup>+</sup> DC<sup>34</sup>. Sie

sezernieren TNF- $\alpha$ , CXCL8/IL-8 und IL-10 und bei TLR-Stimulation viel IL-12p70<sup>35</sup>. Die CD11b<sup>+</sup> DC der Maus sind ebenfalls sehr heterogen und können eine aktivierende T-Zell-Antwort induzieren. Sie könnten den humanen CD1c<sup>+</sup> DC homolog sein<sup>36</sup>.

CD141<sup>+</sup> DC machen 10% der humanen cDC im Blut aus. Ihre Entwicklung wird durch die Transkriptionsfaktoren BATF3 und IRF8 gesteuert<sup>37,38</sup>. Sie exprimieren CD11c weniger stark als CD1c<sup>+</sup> DC und sind durch die Koexpression von CADM1, CLEC9A, TLR3 und XCR1 gekennzeichnet<sup>39</sup>. CD141<sup>+</sup> DC sind Bestandteil der residenten DC der Lymphknoten, Tonsille, Milz sowie des Knochenmarks und kommen auch in nicht-lymphatischen Geweben wie der Haut, Lunge und Leber vor. Sie können nach Antigenaufnahme im peripheren Gewebe in den Lymphknoten wandern und sehr effektiv durch Kreuzpräsentation CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren<sup>34</sup>. Außerdem nehmen sie nekrotische und tote Zellen durch den Rezeptor CLEC9A auf und können virale RNA durch TLR3 wahrnehmen<sup>40,41</sup>. Sie sezernieren TNF- $\alpha$ , IP-10/CXCL10, IFN- $\lambda$ , IFN- $\beta$  und IL-12p70. CD141<sup>+</sup> DC sind sehr wahrscheinlich homolog zu den murinen migratorischen CD8<sup>+</sup>CLEC9A<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> DC, die ebenfalls sehr gute Fähigkeiten zur Kreuzpräsentation besitzen<sup>34</sup>.

### 3.1.2.3.2 CD14<sup>+</sup> inflammatorische DC

Bei Entzündungsreaktionen und anderen pathologischen Reaktionen verändert sich die Zusammensetzung des Immunzellinfiltrats der Gewebe drastisch. Die im Blut zirkulierenden CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> klassischen Monozyten sind möglicherweise die Vorläufer der inflammatorischen CD14<sup>+</sup> DC (MoDC) im entzündlichen Gewebe<sup>19</sup>. CD14<sup>+</sup> DC sind positiv für CD11c und CD11b und exprimieren sowohl DC (CD1a, CD1c, Sirp $\alpha$ )- als auch M $\Phi$ -Marker (CD206/MRC1, MS4A2/Fc $\epsilon$ RI), aber kein CD16/Fc $\gamma$ RIII und CD209/DC-SIGN<sup>42,43</sup>. Wie cDC exprimieren auch sie CCR7 und können in den Lymphknoten migrieren. Beschrieben wurden inflammatorische DC erstmals im Kontext der T<sub>H</sub>2- vermittelten atopischen Dermatitis als inflammatorische dendritische epidermale Zellen (IDEC, engl.: inflammatory dendritic epidermal cells)<sup>44</sup> und im Rahmen der Psoriasis als TNF- $\alpha$  und iNOS (engl.: inducible nitric oxide synthase) produzierende DC (TipDC)<sup>45</sup>.

### 3.1.2.3.3 6-Sulfo LacNAc DC (sIaDC)

Die 6-Sulfo LacNAc (sIa/M-DC8) DC sind die größte DC-Population im Blut (0,6% - 2% innerhalb der PBMC), kommen aber auch in peripheren Geweben vor<sup>46</sup>. Sie zeichnen sich durch die Expression von 6-Sulfo LacNAc (sIa), eine O-verknüpfte Kohlenhydratmodifizierung des Glykoproteins PSGL-1 (engl.: P-selectin glycoprotein ligand-1), aus und wurden daran angelehnt als sIaDC bezeichnet. Außerdem sind sie durch das phänotypische Profil CD1c<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD14<sup>dim/-</sup>C5aR<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> gekennzeichnet. Bei

Aktivierung sezernieren sie viel IL-12p70, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und induzieren eine effektive primäre T-Zell-Antwort<sup>46</sup>. Sie vermitteln auch ADCC (engl.: antibody-dependent cellular cytotoxicity) und können die Zytokinsekretion der NK-Zellen stimulieren<sup>47</sup>. Da slanDC viele phänotypische Gemeinsamkeiten mit den nicht-klassischen CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>++</sup> Monozyten haben, wird auch eine Einordnung als Monozyten-Subtyp diskutiert<sup>48,49</sup>.

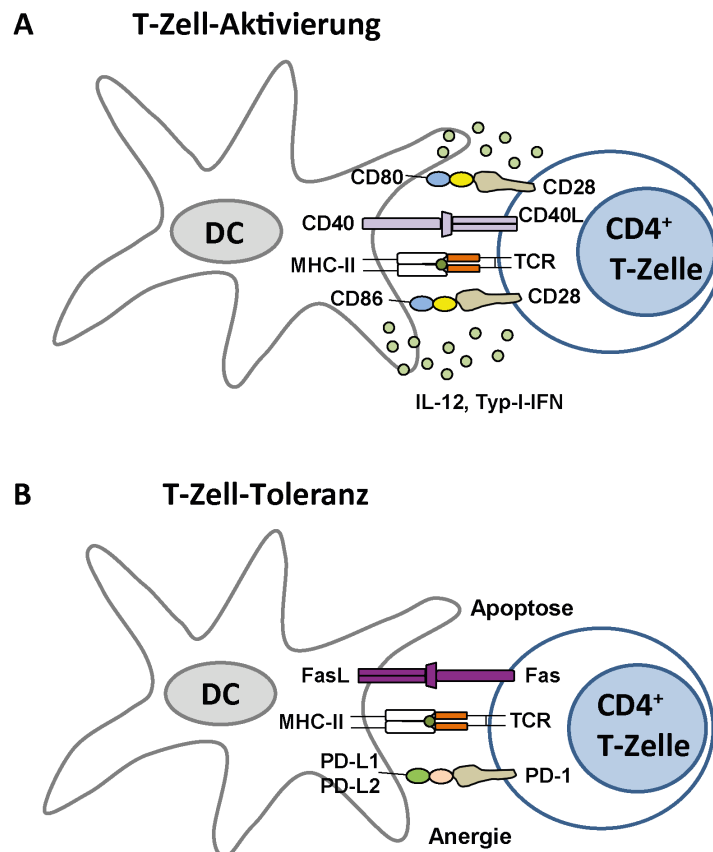
### 3.2 T-Zell-Aktivierung und Toleranzinduktion

Unreife DC wandern unter homöostatischen Bedingungen durch periphere Gewebe und nehmen dabei kontinuierlich Partikel aus der Umgebung auf. Einerseits dient dies der schnellen Erkennung pathogener Strukturen, andererseits erkennen und prozessieren sie körpereigene Antigene, z.B. apoptotische Zellen, und erhalten damit die Selbsttoleranz.

Während einer Entzündungsreaktion kommen unreife DC in Kontakt mit verschiedenen antigenen Strukturen, wie z.B. LPS, Mannoseresten oder viralen Strukturen und durchlaufen dabei einen Reifungsprozess. Kostimulatorische Marker (CD80, CD86, CD40) werden verstärkt exprimiert und auch MHC-I- und MHC-II-Moleküle hochreguliert. Gleichzeitig wird die phagozytotische Aktivität verringert und die Antigenprozessierung gesteigert. Um mit naiven T-Zellen in Kontakt zu treten, muss die DC von den peripheren Geweben in die T-Zell-Zone der Lymphknoten wandern. Im Rahmen des Reifungsprozesses wird die Expression von Chemokinrezeptoren, Adhäsionsmolekülen und zytoskelettalen Proteinen modifiziert, die eine Migration ermöglichen. Auch die Sezernierung von Chemokinen verändert sich. Es werden verstärkt Chemokine produziert, welche die T-Zell-Anlockung und -Polarisierung unterstützen. Haben DC die T-Zell-Areale der Lymphknoten erreicht, kommt es bei Interaktion der T-Zellen mit antigenbeladenen DC zur Ausbildung der sogenannten immunologischen Synapse. Der Kontakt der beiden Zelltypen wird durch Adhäsionsmoleküle vermittelt, die durch konzertierte Bewegungen des Aktin-Zytoskeletts in das Zentrum der DC:T-Zell-Kontaktzone transportiert werden. Ist der Kontakt vermittelt, kommt es zur Bindung des peptidbeladenen MHC-I- bzw. MHC-II- Moleküls an den TCR der CD8<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Signal 1). Dieses Signal alleine reicht allerdings nicht aus, um eine T-Zelle vollständig zu aktivieren und deren Proliferation zu induzieren. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 (Signal 2) und die Sezernierung aktivierender Zytokine (Signal 3) durch die DC sind ebenfalls erforderlich (Abbildung 3-3A). IL-12 ist das wichtigste aktivierende Zytokin, es induziert die Differenzierung und Proliferation von T<sub>H</sub>1-Zellen<sup>50</sup> und aktiviert CD8<sup>+</sup> CTL, die, u.a. durch Sekretion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , eine starke Immunantwort bewirken können<sup>51,52</sup>. Antiinflammatorisches IL-10, der natürliche Gegenspieler von IL-12, inhibiert dagegen die Aktivierung der T-Zellen und verhindert überschießende proinflammatorische Immunantworten<sup>53,54</sup>. Der Kontakt mit der DC resultiert aber nicht immer in einer Aktivierung der T-Zelle. Werden körpereigene Antigene präsentiert,



so kommt es normalerweise nicht zur Aktivierung der T-Zelle, sondern zur Induktion von Toleranz. Dies trägt zur Gewebemöostase und der Stilllegung autoreaktiver T-Zellen bei. Das Fehlen kostimulatorischer Moleküle und die Expression inhibitorischer Moleküle (z.B. PD-L1, PD-L2) auf DC induziert anergische T-Zellen, die in einem funktionell inaktiven Zustand verweilen<sup>55,56</sup> (Abbildung 3-3B). DC können auch, z.B. durch Bindung von FasL an Fas, die Apoptose autoreaktiver, aktivierter T-Zellen induzieren<sup>57</sup> und darüber die periphere Toleranz aufrechterhalten.



**Abbildung 3-3: T-Zell-Aktivierung und Toleranzinduktion. A)** Für die Aktivierung naiver T-Zellen durch DC sind drei Signale notwendig: die Bindung von peptidbeladenen MHC-Molekülen (hier: MHC-II-Molekül) an den TCR (Signal 1), Kostimulation durch CD80, CD86 und CD40 (Signal 2) und die Sekretion aktivierender Zytokine, v.a. IL-12 (Signal 3). **B)** Zur Bewahrung der Gewebemöostase und der Eliminierung autoreaktiver T-Zellen ist die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz wichtig. Das Fehlen kostimulatorischer Moleküle und die Expression inhibitorischer Moleküle (z.B. PD-L1 und PD-L2) können T-Zell-Anergie auslösen. Dabei entstehen funktionell inaktive T-Zellen. Auch die Induktion von Apoptose in T-Zellen durch Interaktion von Fas und FasL ist ein effektiver Mechanismus zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz.

### 3.3 Myeloische Zellen im Tumormilieu

Tumoren erfahren einen kontinuierlichen Influx von myeloischen Zellen, die, u.a. durch Förderung der Angiogenese und des Stromaumbaus, die Tumorprogression positiv beeinflussen können. Der Tumor sezerniert außerdem Chemokine (z.B. CCL2), Zytokine (z.B. IL-10, VEGF (engl: vascular endothelial growth factor)) und andere Mediatoren (z.B. PGE<sub>2</sub>), welche die Myelopoese, Akkumulation und die Differenzierung protumoraler myeloischer Zellen begünstigen<sup>58,59,60</sup>.

Die am besten beschriebenen myeloischen Zellen im Tumor sind die TAM und die myeloischen Suppressorzellen (MDSC, engl.: myeloid-derived suppressor cells)<sup>61,62,63</sup>. Über DC ist dagegen weniger bekannt. Die MDSC sind eine heterogene Zellpopulation, bestehend aus myeloischen Vorläuferzellen und ausdifferenzierten unreifen myeloischen Zellen (Granulozyten, DC, MΦ). Im murinen System sind MDSC durch die Expression von Gr-1 und CD11b gekennzeichnet<sup>64</sup>, im humanen System gibt es bisher keine eindeutigen Marker. Meistens sind die MDSC in humanen Tumoren als unreife lin<sup>-/low</sup>CD33<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD15<sup>+/-</sup>CD14<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup> Zellen mit einer starken Expression von ARG1 (Arginase-1) beschrieben<sup>62,65</sup>. Es gibt Hinweise, dass sich im Laufe der Tumorprogression der Differenzierungszustand der myeloischen Zellen ändert, von einem zunächst immunaktivierenden hin zu einem immunsupprimierenden Phänotyp<sup>28,66,67</sup>. Die TAM üben dann M2-ähnliche Funktionen aus, sie sezernieren verstärkt proangiogene Faktoren (z.B. VEGF und IL-8/CXCL8), Matrixmetalloproteinasen (MMP), Kollagene und antiinflammatorisches IL-10<sup>68,69</sup>. MDSC können Teile des Tumorstromas bzw. des Endothels bilden und tragen durch Sekretion von VEGF und MMP-9 zum Tumorwachstum und der Vaskularisierung bei<sup>62</sup>. Die inhibitorischen Effekte der MDSC werden u.a. durch iNOS und ARG1 vermittelt. MDSC supprimieren die Aktivierung und Proliferation von autologen T-Zellen sowie die zytotoxische Funktion und IFN-γ-Sekretion von NK-Zellen<sup>62,70</sup>. Gleichzeitig fördern sie die Differenzierung von IL-10-sezernierenden T<sub>reg</sub>.

Im Zusammenhang mit DC sind v.a. tolerogene DC beschrieben, die IL-10 sezernieren und die Expression von CD25/IL-2Rα und IDO1 (Indolamin-2,3-Dioxygenase 1) hochregulieren<sup>71</sup>. Tolerogene DC sind auch durch die Herabregulierung von Kostimulationsmolekülen, die reduzierte Sekretion proinflammatorischer Zytokine und einer schwachen Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation gekennzeichnet<sup>71,72</sup>. Verursacht wird dies durch antiinflammatorische Faktoren wie GC, IL-10 und PGE<sub>2</sub>, die durch Tumorzellen sezerniert werden<sup>73,74,75</sup>. Auch migrationsdefiziente DC sind in Tumorgewebe beschrieben<sup>76</sup>. Die verstärkte Aufnahme von Lipiden im Tumormilieu und deren intrazelluläre Akkumulation blockiert die Expression von CCR7, so dass die DC nicht mehr aus dem Tumorgewebe migrieren können. Dies hat zur Folge, dass DC keine tumorantigenspezifischen T-Zellen im Lymphknoten aktivieren können und der Tumor nicht effektiv bekämpft werden kann.

### 3.4 Myeloische Zellen der Niere

#### 3.4.1 Homöostatische und inflammatorische Bedingungen

Die Niere ist fortlaufend mit pathogenen und toxischen Fremdstoffen, aber auch ungefährlichen Nahrungs- und Selbstantigenen konfrontiert, weshalb die Aufrechterhaltung einer Balance zwischen Immunität und Toleranz essentiell ist. Die myeloischen Zellen der Niere spielen dabei eine wichtige Rolle. Im homöostatischen Zustand kommen in der Niere viele verschiedene DC- und MΦ-Subtypen vor. Sie werden unter dem Begriff renale mononukleäre Phagozyten (rMoPh) zusammengefasst und koexprimieren sowohl im murinen als auch im humanen System DC- und MΦ-Marker<sup>77</sup>. Für murine DC ist beschrieben, dass sie ein dichtes Netzwerk im renalen Interstitium bilden und durch die Interaktion des Rezeptors CX<sub>3</sub>CR1 mit dem Liganden CX<sub>3</sub>CL1 in das Gewebe rekrutiert werden<sup>78</sup>. MΦ kommen v.a. in der Nähe oder innerhalb der Glomeruli vor<sup>8</sup>.

Mittlerweile sind im murinen System 5 verschiedene rMoPh-Populationen beschrieben, die sich nicht nur in der Expression von Oberflächenmarkern unterscheiden, sondern auch unterschiedliche Funktionen ausüben<sup>79</sup>. Der häufigste humane rMoPh-Phänotyp unter homöostatischen Bedingungen ist durch das Markerprofil CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>CD1c<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD209<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>CD207<sup>-</sup> gekennzeichnet<sup>77</sup>. Die rMoPh überwachen unter homöostatischen Bedingungen kontinuierlich das Gewebe und sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz gegenüber Selbstantigenen beteiligt. Pathogene, apoptotische Zellen, Immunglobuline und Komplementkomponenten werden effektiv erkannt und beseitigt. Dies trägt zur Zytoprotektion des Gewebes bei. Ein weiterer wichtiger Mechanismus für den Schutz des renalen Gewebes ist die IL-10-Sekretion der rMoPh<sup>77</sup>. Das renale Tubulusepithel gilt aufgrund der gewebe protektierenden, toleranzinduzierenden Bedingungen als immunprivilegiert.

Bei Entzündungsreaktionen der Niere nimmt die Anzahl und die Plastizität der rMoPh stark zu, MHC-Moleküle und kostimulierende Moleküle werden hochreguliert sowie proinflammatorische Zytokine und Chemokine sezerniert<sup>77,80,81</sup>. Es werden verstärkt proinflammatorische Monozyten rekrutiert, die dann zu klassischen M1-MΦ oder inflammatorischen DC differenzieren. Für die rMoPh sind aber nicht nur proinflammatorische sondern auch antiinflammatorische Funktionen im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen der Niere beschrieben<sup>82</sup>. Scholz et al.<sup>83</sup> zeigten in einem Mausmodell der akuten nephrotoxischen Nephritis, dass CD11c<sup>+</sup> DC bei der Interaktion mit infiltrierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Sezernierung des renoprotektiven, antiinflammatorischen IL-10 bewirken und damit überschießende Immunreaktionen unterdrücken. Dagegen üben DC bei chronischen Entzündungen der Niere oft proinflammatorische Funktionen aus, die den Krankheitsverlauf verschlimmern. Für das Mausmodell des Lupus-Nephritis ist beschrieben, dass DC durch die Sekretion von IL-12 ein proinflammatorisches Milieu schaffen und durch die verstärkte

Sekretion von Chemokinen gewebeschädigende aktivierte T-Zellen anlocken<sup>84</sup>. Aktivierte renale MΦ können das Nierenparenchym auch direkt schädigen, z.B. durch die Produktion von ROS, IL-1β, NO oder TNF-α, wie dies beispielsweise bei der Glomerulonephritis der Fall ist<sup>85</sup>. In einem Mausmodell zur renalen Ischämie konnte dagegen gezeigt werden, dass beim Abklingen der Entzündung meistens die antiinflammatorischen, M2-ähnlichen MΦ überwiegen, die zur Geweberegeneration, z.B. des Tubulusepithels, beitragen<sup>86</sup>.

### 3.4.2 Klarzelliges Nierenzellkarzinom

Das klarzellige Nierenzellkarzinom (RCC) ist der am häufigsten auftretende Nierentumor und wird, wie das maligne Melanom, als immunogener Tumor eingestuft. Diese Einschätzung basiert auf der klinischen Beobachtung von spontanen Remissionen sowie der starken Tumordinfiltration durch Leukozyten<sup>87</sup>. Das relativ gute Ansprechen auf Immuntherapien lässt auf eine reaktivierbare, antitumorale Immunantwort schließen<sup>88</sup>. Galon et al.<sup>89</sup> analysierten das Infiltrat des kolorektalen Karzinoms und stellten fest, dass das Ausmaß des T-Zell-Infiltrats ein prognostisch guter Marker für das Überleben ist. Dies bestätigte sich mittlerweile für verschiedene Tumorstadien. Überraschend verhält sich das RCC anders. Hier korrelierte ein ausgeprägtes Leukozyteninfiltrat mit einer negativen Prognose<sup>90,91</sup>. Offensichtlich spielen neben der Anzahl der infiltrierenden Immunzellen auch Parameter wie deren Funktionalität und die Kommunikation verschiedener Immunzellpopulationen eine entscheidende Rolle.

Das Immunzellinfiltrat des RCC besteht aus T-Zellen, NK-Zellen, myeloischen Zellen (MΦ, DC, Granulozyten) und wenigen B-Zellen<sup>90,91,92</sup>. Die infiltrierenden T-Zellen sind bisher am besten charakterisiert<sup>89,92</sup>. Zahlenmäßig überwiegen die zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber den CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen. Mit Hilfe funktioneller Analysen konnte gezeigt werden, dass einige infiltrierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen tumorspezifische Antigene erkennen und antigenexprimierende Tumorzellen in vitro lysieren können<sup>93,94</sup>. Es ist daher anzunehmen, dass das lokale Tumormikromilieu die Immunzellen daran hindert, die tumorabstoßenden Funktionen auszuführen.

Die Rolle der myeloischen Zellen im RCC ist noch nicht so gut erforscht, tendenziell scheinen DC und MΦ eher immunsuppressiv und mit einer schlechten Prognose assoziiert zu sein<sup>91,95,96,97</sup>. Daurkin et al.<sup>95</sup> zeigten, dass MΦ, die humanes RCC-Gewebe infiltrieren, immunsuppressives IL-10 sezernieren und durch CCL2 weitere potentiell protumorale MΦ anlocken. In In-vitro-Versuchen induzierten diese MΦ die Expression von FOXP3 (engl.: forkhead box P3) und CTLA4 in T-Zellen. Renale TAM können das Tumorstadium auch auf direktem Weg, durch die Produktion des proliferationsfördernden TNF-α, begünstigen<sup>97</sup>. Des Weiteren ist beschrieben, dass CD11c<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> DC, die das RCC infiltrieren, CD80 und CD86 nicht hochregulieren, Antigen nicht effektiv prozessieren und als Folge davon T-Zellen

eher tolerogenisieren als aktivieren<sup>96</sup>. Frisch aus dem Tumor isolierte DC waren dagegen in der Lage allogene T-Zellen zu stimulieren. Dementsprechend scheint das Tumormilieu die stimulatorische Kapazität der DC zu unterdrücken. Vermutlich wird deren Funktion u.a. durch IL-6, VEGF, TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> beeinträchtigt, für die beschrieben ist, dass sie im RCC angereichert sind<sup>98,99,100</sup>.

## 4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Wir haben in humanen Geweben des klarzelligen RCC einen myeloischen Zelltyp beschrieben, der die M $\Phi$ -Marker CD14 und CD163 sowie den DC-Marker CD209/DC-SIGN koexprimiert<sup>101</sup>. Außerdem zeigten wir, dass dieser Zelltyp Kostimulations- und MHC-II-Moleküle exprimiert. Der Zelltyp war im tumorbefallenen Bereich der Niere im Vergleich zum tumorfreien Bereich (NKC, engl.: nontumor kidney cortices) stark angereichert, weshalb wir ihn als „enriched-in-renal-carcinoma DC“ (ercDC) bezeichneten<sup>101</sup>. Wir wählten den Begriff „DC“ u.a. aufgrund der Expression von Kostimulations- und MHC-Molekülen und der Fähigkeit der in vitro generierten ercDC mittels Kreuzpräsentation CTL zu aktivieren. Auch Literaturdaten, die zeigten, dass renale DC, die DC- und M $\Phi$ -Marker koexprimieren, ein dichtes Netzwerk im Tubulointerstitium ausbilden<sup>78</sup>, und die Tatsache, dass sich das RCC aus dem proximalen Tubulusepithel entwickelt<sup>102</sup>, trugen zu der Entscheidung bei, die CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> myeloischen Zellen als DC zu klassifizieren. Wir beobachteten, dass Tumoren des fortgeschrittenen Stadiums eine größere Anzahl von ercDC im Vergleich zu Tumoren im Anfangsstadium besaßen<sup>101</sup>. Des Weiteren korrelierte ein hoher Anteil an ercDC mit einer verringerten Menge an CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen.

Mit zunehmenden Hinweisen, dass das MPS ein Kontinuum verschiedener DC- und M $\Phi$ -Subtypen darstellt<sup>6,12</sup> und somit die Unterscheidung von DC und M $\Phi$  aufgrund spezifischer Oberflächenmarker überholt scheint, stellten wir uns die Frage, ob die Einordnung der ercDC als „DC“ noch angebracht ist. Ein Ziel dieser Arbeit war es, den tumorbedingten Differenzierungszustand der ercDC aus dem RCC zu charakterisieren und mögliche milieubedingte Ursachen für die funktionelle Polarisierung zu finden. Darüber hinaus sollten die ercDC innerhalb des MPS positioniert werden und die Verwandtschaft mit anderen myeloischen Zelltypen bestimmt werden. Ein weiteres Ziel war es, Alleinstellungsmerkmale der ercDC, beispielsweise durch die Erstellung eines individuellen Genexpressionsprofils, zu definieren und das Funktionsprofil zu konkretisieren. Weiterhin wurde die Vergleichbarkeit eines in vitro generierten ercDC-Zelltyps mit den Ex-vivo-ercDC evaluiert. Dies ist wichtig, da v.a. umfassendere Funktionsanalysen aufgrund der geringen Zellzahl nicht mit Ex-vivo-ercDC durchgeführt werden können und deshalb ein Surrogat-Zelltyp, wie z.B. die in vitro generierten ercDC, notwendig ist.

## 5 MATERIAL

### 5.1 Geräte

**Tabelle 5-1: Verwendete Geräte**

Bezeichnung	Hersteller
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
BD FACSAria™ Illu	Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes (USA)
Bestrahlungsanlage HWM-D-200, (Strahlungsquelle: 137 Caesium)	GammaCell 40, Ottawa (Kanada)
Brutschrank Hera Cell 240	Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer LSR II	BD, Franklin Lakes (USA)
ELISA-Waschgerät	Nunc, Wiesbaden
Eppendorf „Centrifuge“ 5417 R	Eppendorf, Hamburg
GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara (USA)
Heizblock BT 130-2	HLC Biotech, Bovenden
Hybridisierungssofen 640	Affymetrix, Santa Clara (USA)
Lichtmikroskop (Leica DMLS)	Leica Microsystems, Wetzlar
MACS Multistand (quadro MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetseparator, SPRIPlate Super Magnet Plate	Beckman Coulter, Brea (USA)
Mehrkanalpipette	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem	Merck Millipore, Billerica (USA)
NanoDrop-ND-1000-Spektrophotometer	Peqlap Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	GLW, Würzburg
Pipettus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Schüttelgerät horizontal	Ingenieurbüro CAT, Staufen
Rotator	VWR international, Westchester (USA)
SpeedVac Univapo 150 ECH	Montreal Biotech, Montreal (Kanada)
Spektrophotometer sunrise	Tecan Group AG, Männedorf (Schweiz)
Sterilbank	BDK, Sonnenbrühl-Genkingen
Stickstofftank	Messer Griesheim, Krefeld
Thermocycler PTC-200	MJ Research, St. Bruno (Kanada)
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze
Mikrozentrifuge Biofuge Pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge Megafuge 2.0/2.0 R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

## 5.2 Verbrauchsmaterial

**Tabelle 5-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Hersteller
Butterfly (Ecoflo)	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Deckgläschen	IDL, Nidderau
Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster (Österreich)
ELISA-Platten	Greiner bio-one, Kremsmünster (Österreich)
FACS-Röhrchen (groß, 5 ml mit Deckel, Polypropylen)	BD, Franklin Lakes, USA
FACS-Röhrchen (klein, 1,5 ml, Polypropylen)	Greiner bio-one, Kremsmünster (Österreich)
Kryoröhrchen (1 ml, 1,5 ml (RNase frei))	Nunc, Wiesbaden
MACS Separation Columns, 25 LS	Miltenyi, Biotec, Bergisch Gladbach
Mehrlochplatten, Flach- und Rundboden (6-, 24-, 96-Loch)	Nunc, Wiesbaden
Pasteurpipetten, Glas	Peske OHG, Aindling
Pipettenspitzen	Eppendorf/Gilson, Zentrallager Helmholtz-Zentrum, Neuherberg
QIAshredder	QIAGEN, Venlo (Niederlande)
Reagenzröhrchen (15/50 ml)	BD, Franklin Lakes (USA)
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg
„Safe-Lock tubes“ (1,5 ml, RNase frei)	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle	Aesculap AG, Tuttlingen
Spritzen 5 ml, 50 ml	BD, Franklin Lakes (USA)
Zellschaber S (24 cm)	TPP, Trasadingen (Schweiz)
Zellschaber mini	LEAP Biosciences Corp., Palo Alto (USA)
Zellsieb Cellstrainer, 70/100 µm	BD, Franklin Lakes (USA)
Zellkulturflaschen (75/175 cm <sup>2</sup> )	Greiner bio-one, Kremsmünster (Österreich)

## 5.3 Reagenzien und fertige Lösungen

**Tabelle 5-3: Verwendete Reagenzien und fertige Lösungen**

Bezeichnung	Hersteller
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)	Sigma-Aldrich, St.Louis (USA)
β-Mercaptoethanol	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, St.Louis (USA)
CD14/CD19/CD56 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CompBeads (anti-Maus/anti-Ratte Ig, κ; FCS)	BD, Franklin Lakes (USA)
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt



Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	Sigma Aldrich, St.Louis (USA)
Natriumcarbonat, -hydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Orthophosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Polysorbat-20 (Tween 20)	Sigma Aldrich, St.Louis (USA)
Propidiumjodid (PI)	Sigma Aldrich, St.Louis (USA)
Saponin	Sigma Aldrich, St.Louis (USA)

## 5.4 Puffer- und Lösungen

Tabelle 5-4: Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile
<b>ELISA-Blockierungspuffer</b>	PBS 10% FCS
<b>ELISA-Coatingpuffer</b>	0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5: 8,4 g NaHCO <sub>3</sub> 3,56 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ad 1 L Milipore-Wasser
<b>ELISA- Waschpuffer</b>	PBS + 0,05% Tween 20
<b>FACS-Azid-Puffer</b>	PBS + 2 mM EDTA + 0,1% Natriumazid + 2% FCS
<b>MACS-Puffer</b>	PBS + 2 mM EDTA + 0,5% FCS
<b>Paraformaldehydlösung</b>	PBS + 1% PFA
<b>PBS-EDTA-Puffer für RCC-Gewebe-Zellsuspensionen</b>	PBS + 2 mM EDTA
<b>Saponinlösung</b>	PBS + 0,1% bzw. + 0,35% Saponin + 2% HS
<b>Trypsin-EDTA-Lösung (2x)</b>	PBS + 20% 10x Trypsin-EDTA

## 5.5 Verbrauchsmedien und Zusätze

**Tabelle 5-5: Verwendete Verbrauchsmedien und Zusätze**

Bezeichnung	Hersteller
AIM-V	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
DNase I	Roche, Basel (Schweiz)
DNase I, Typ IV	Sigma Aldrich, St.Louis (USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma Aldrich, St.Louis (USA)
Ficoll® (Biocoll, Dichte 1,077 g/ml)	Biochrom AG, Berlin
Fötale Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Carlsbad (USA)
HBSS (10x) ohne CaCl <sub>2</sub> /MgCl <sub>2</sub>	Life Technologies, Carlsbad (USA)
HBSS (1x) mit 1,26 mM CaCl <sub>2</sub> /0,5 mM MgCl <sub>2</sub>	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Heparin 2500 IE	Essex Pharma GmbH, München
Hepes	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Humanserum (verschiedener gesunder Spender)	IMI, Helmholtz Zentrum München
Ibidi Einfriermedium classic, serumfrei	Ibidi, Planegg/Martinsried
Kollagenase, Typ IA	Sigma Aldrich, St.Louis (USA)
L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Lipopolysaccharid (LPS) E.coli	Sigma Aldrich, St.Louis (USA)
MoDC-Differenzierungsmedium (enthält IL-4, GM-CSF)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Natriumpyruvat	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Penicillin/Streptomycin (100x)	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Life Technologies, Carlsbad (USA)
rhu GM-CSF	PromoKine, Heidelberg
rhu IFN-γ (Imukin®)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
rhu IL-4	PromoKine, Heidelberg
rhu M-CSF	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Trypanblau	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Trypsin-EDTA (10x)	Life Technologies, Carlsbad (USA)
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin

## 5.6 Medien

Tabelle 5-6: Verwendete Medien

Bezeichnung	Bestandteile
<b>RPMI-Basismedium</b>	RPMI 1640 + 2 mM L-Glutamin + 1 mM Natriumpyruvat + 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren
<b>LCL-Medium</b> (Kultur von L929-CD40L-Zellen)	RPMI-Basismedium + 10% FCS
<b>RCC-Medium</b> (Kultur von RCC-26-Zellen)	RPMI-Basismedium + 12% FCS
<b>AIM-V-Medium</b> (Kultur von myeloischen Zellen)	AIM-V (serumfrei) + 2 mM L-Glutamin
<b>Verdaumedium zur Gewinnung der RCC-Gewebe-Zellsuspension</b>	RPMI 1640 + 0,1% BSA + 1 x Penicillin/Streptomycin + 10 mM Hepes + Kollagenase, Typ IA, 218 U/ml + DNase I, Typ IV, 435 U/ml
<b>Einfriermedium für eukaryotische Zellen</b>	RPMI-Basismedium 20% DMSO

## 5.7 Zellen und Zelllinien

Tabelle 5-7: Verwendete Zellen und Zelllinien. Weiterführende Informationen zu den in vitro generierten myeloischen Zellen sind in Tabelle 6-1 (Seite 33) der Methoden zu finden.

Bezeichnung	Charakteristika	Kulturmedium	Herkunft
ercDC	durch Behandlung von Monozyten gesunder Spender mit RCC-26-CM (siehe Abschnitt 6.1.6) differenziert	AIM-V-Medium (3% HS) bzw. VLE-Medium (6% HS) mit jeweils 25 % RCC-26-CM	im Labor generiert
GM-CSF-Makrophagen	aus Monozyten von gesunden Spendern differenziert	AIM-V-Medium (1% HS) + GM-CSF	im Labor generiert
Klassische DC (cDC)	aus Monozyten von gesunden Spendern differenziert	MoDC-Diff.-Medium bzw. AIM-V-Medium (1% HS) + IL-4 + GM-CSF	im Labor generiert
L929-CD40L	Maus-Fibroblastenzelllinie, stabil transfiziert mit humanem CD40L, adhärent	LCL-Medium	P. Garrone (1995)

M1-Makrophagen	aus Monozyten von gesunden Spendern differenziert	AIM-V-Medium (1% HS) + M-CSF + 24 h LPS u. IFN- $\gamma$	im Labor generiert
M2-Makrophagen	aus Monozyten von gesunden Spendern differenziert	AIM-V-Medium (1% HS)+ M-CSF + 24 h IL-4	im Labor generiert
Myeloische Zellen aus RCC-Gewebe-Zellsuspension	Gewebe-Zellsuspension bestehend aus Tumorzellen, TiL (tumorinfiltrierende Lymphozyten), DC, M $\Phi$ , Granulozyten und Zelltrümmern (entstanden durch die mechanische Zerkleinerung und den enzymatischen Verdau)	nicht kultiviert (siehe 6.1.7.4)	Patienten der Urologischen Klinik Dr. Castringius, Planegg; Urologische Klinik und Poliklinik des Klinikums Großhadern; Klinik und Poliklinik für Urologie, TU Dresden
PBL (engl.: peripheral blood lymphocytes)	CD14-depletierte PBMC (mittels CD14-MACS Beads, siehe 6.1.7.2)	Kokulturen mit APC (siehe 6.2.2)	gesunde Spender
PBMC (engl.: peripheral blood mononuclear cells)	isoliert aus Vollblutproben (siehe 6.1.7.1)	nicht kultiviert	gesunde Spender
RCC-26	humane Nierenzellkarzinomzelllinie, HLA-A2-positiv, adhären	RCC-Medium	IMI, Helmholtz Zentrum München

## 5.8 Blutproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Vollblutproben wurden von gesunden Spendern zur Verfügung gestellt. Die Abnahme erfolgte von einer zur Blutabnahme berechtigten Person. Die Zustimmung der Spender und der lokalen Ethikkommission lag vor.

## 5.9 Tumorgewebe

Die analysierten Tumorgewebe wurden von der Urologischen Klinik Dr. Castringius in Planegg und der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Großhadern zur Verfügung gestellt. Zwei der Tumoren (DD1 und DD2) wurden von der Arbeitsgruppe Schmitz aus Dresden erhalten, die ihre Tumorproben von der Klinik und Poliklinik für Urologie der Technischen Universität Dresden beziehen. Die Tumoren waren Nierenzellkarzinome des klarzelligen Typs.

**Tabelle 5-8: Verwendete RCC-Gewebe für die Herstellung der RCC-Gewebe-Zellsuspensionen.**  
Aufgeführt sind die Patient-ID des Tumorgewebes, die TNM-Klassifikation sowie der Durchmesser des Tumors.

Patient-ID Tumorgewebe	TNM-Klassifikation <sup>1</sup>	Tumordurchmesser
DD1*	----	----
DD2*	----	----
RCC34	pT3b pN0 G3	6 cm
RCC35	pT3b pN2 G3-4	9 cm
RCC42	pT3b pN0 G3	7 cm
RCC43	pT3b pNX G2	13 cm
RCC50	pT3b pN1 G2	7 cm
RCC52	pT1b pNX G3	6,2 cm
RCC57	pT1b pNX G2	4,5 cm
RCC59	pT1b pNX G2	5,9 cm
RCC61	pT1b pNX G2	5,5 cm
RCC63	pT3a pNX G3	9,7 cm
RCC66*	pT3a pN0 M1 G3	7 cm
RCC69	pT3a pN0 G2	6,5 cm
RCC71	pT3a pN0 G2	4,5 cm
RCC73	pT3a pN0 G2	----
RCC74*	pT1a pN0 G1	4,0 cm
RCC78	pT2a pN0 G2	7,3 cm
RCC84	pT1a pNX G2	3 cm
RCC86	pT1a pNX G2	3,5 cm
RCC88	pT1b pN0 G2	6,8 cm
RCC89*	pT3a pNX G2	5,6 cm
RCC91*	rpT3a pNX G3	6,5 cm
RCC94*	pT1b pN0 G2	6,2 cm
RCC96	pT3a pNX G2	6,1 cm
RCC97*	pT2b pN0 G2	10,5 cm

<sup>1</sup> Klassifikation und Stadiengruppierung der Tumoren nach den Richtlinien der Union International Contre le Cancer (UICC); T: Größe des Primärtumors; N: Status des Lymphknotenbefalls, Lymphknotenmetastasen; M: Fernmetastasen (nur angegeben wenn eine Fernmetastase zur Untersuchung vorlag); G: Differenzierungsgrad des Tumorgewebes (G1 = gut differenziert bis G4 = wenig differenziert); p: pathologische Klassifikation, postoperative histologische Klassifikation; r = Rezidiv; X = keine Aussage möglich; \* für die Genexpressionsanalyse sortierte RCC

## 5.10 Primäre und sekundäre Antikörper für die Durchflusszytometrie

**Tabelle 5-9: Für die Durchflusszytometrie verwendete Primär- und Sekundärantikörper.** In lila ist der eingesetzte Sekundärantikörper markiert.

Spezifität	Markierung	Spezies/ Isotyp	Klon	Hersteller	Zytometer LSR II/ FACSAria IIlu <sup>+</sup>	Färb- ung
Annexin V	FITC	Maus IgG1, κ	VAA-33	Biosource	1:20	OF
CD11c	APC	Maus IgG1, κ	B-ly6	BD	1:25/1:5 <sup>+</sup>	OF
CD11c	FITC	Maus IgG1, κ	3.9	eBioscience	1:20	OF
CD11c	PE	Maus IgG1, κ	B-ly6	BD	1:25/1:7 <sup>+</sup>	OF
CD14	PB	Maus IgG2a, κ	M5E2	BD	1:25	OF
CD14	PerCP- Cy5.5	Maus IgG1, κ	61D3	eBioscience	1:10/1:5 <sup>+</sup>	OF
CD19	A700	Maus IgG1, κ	H1B 19	Biolegend	1:25	OF
CD19	PB	Maus IgG1, κ	HD37	Dako	1:17 <sup>+</sup>	OF
CD1c	FITC	Maus IgG2a, κ	AD5-8E7	Miltenyi Biotec	1:10	OF
CD1c	PE-Cy7	Maus IgG1, κ	L161	Biolegend	1:10 <sup>+</sup>	OF
CD209	APC	Maus IgG2a, κ	DCN46	BD	1:10	OF
CD209	PE	Maus IgG2b, κ	DCN46	BD	1:10/1:4 <sup>+</sup>	OF
CD24	PE	Maus IgG1, κ	SN3 A5- 2H10	eBiosciences	1:10	OF
PD-L1	FITC	Maus IgG1, κ	M1H1	BD	1:5	OF
CD3	PB	Maus IgG1, κ	UCHT1	BD	1:20/1:5 <sup>+</sup>	OF
CD4	APC-A780	Maus IgG1, κ	RPA-T4	eBioscience	1:20	OF
CD40	FITC	Maus IgG1, κ	5C3	BD	1:10	OF
CD45	PE-Cy7	Maus IgG1, κ	HI30	BD	1:50/1:20 <sup>+</sup>	OF
CD48	FITC	Maus IgG1, κ	J4.57	Beckman Coulter	1:25	OF
ICAM-1	PE	Maus IgG1, κ	HA58	BD	1:10	OF
CD56	APC	Maus IgG1, κ	N901	Beckman Coulter	1:20/1:17 <sup>+</sup>	OF
CD64	FITC	Maus IgG1, κ	22	Beckman Coulter	1: 10	OF
CD8	PB	Maus IgG1, κ	RPA-T8	BD	1:25	OF
Fascin	Unmarkiert	Maus IgG1, κ	55K-2	Santa Cruz Biotechnology	1:500	IZ
HLA-DR/ MHC-II	FITC	Maus IgG2a, κ	L243	BD	1:25	OF

ILT4	PE	Ratte IgG2a, κ	42D1	Beckman Coulter	1:17	OF
Isotyp	Unmarkiert	Maus IgG1, κ	MOPC21	BD	1:500	IZ
Isotyp	A700	Maus IgG1, κ	MOPC21	BD	*	OF
Isotyp	APC	Maus IgG1, κ	11711	R&D Systems	*	OF
Isotyp	APC	Maus IgG2a, κ	HOPC 1F/12	Jackson	*	OF
Isotyp	FITC	Maus IgG1, κ	MOPC21	BD	*	OF
Isotyp	FITC	Maus IgG2a, κ	G155-178	BD	*	OF
Isotyp	FITC	Maus IgM	IS5-20C4	Miltenyi Biotec	*	OF
Isotyp	PE	Maus IgG1	MOPC21	BD	*	OF
Isotyp	PE	Maus IgG2b, κ	MPC-11	Biolegend	*	OF
Isotyp	PE	Ratte IgG2a, κ	R35-95	BD	*	OF
Isotyp	PE-Cy7	Maus IgG1, κ	MOPC21	BD	*	OF
LFA-1	FITC	Maus IgG1, κ	MEM-25	Immunotools	1:17	OF
Maus IgG1	A488	Ziege	poly-klonal	Life Technologies	1:500	IZ
MerTK	APC	Maus IgG1, κ	125518	R&D Systems	1:5	OF
slan	FITC	Maus IgM	DD-1	Miltenyi Biotec	1:5/1:3 <sup>+</sup>	OF

<sup>+</sup> Die Konzentrationen der Antikörper für die Färbung der zu sortierenden RCC-Gewebe-Zellsuspensionen wurden an die Gesamtzellzahl und die Anzahl lebender/toter Zellen angepasst (siehe Abschnitt 6.4.3.2, Seite 39); \* Die Konzentrationen der Isotypkontrollen wurde an den jeweils eingesetzten spezifischen Antikörper angepasst; OF: Oberflächenfärbung; IZ: intrazelluläre Färbung

## 5.11 Testkits

**Tabelle 5-10: Verwendete Testkits**

Bezeichnung	Hersteller
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
Annexin V Apoptosis Detection Kit	eBioscience, San Diego (USA)
Encore® Biotin Module Kit	NuGen Technologies, San Carlos (USA)
GeneChip® Hybridisation, Wash, and Stain Kit	Affymetrix, Santa Clara (USA)
Human IL-10 BD OptEIA™ ELISA Set	BD, Franklin Lakes (USA)
Human IL-12 (p70) BD OptEIA™ ELISA Set	BD, Franklin Lakes (USA)
LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit	Life Technologies, Carlsbad (USA)
MinElute Reaction Cleanup Kit	QIAGEN, Venlo (Niederlande)
Ovation® PicoSL WTA System V2 Kit	NuGen Technologies, San Carlos (USA)
RNeasy Micro Kit	QIAGEN, Venlo (Niederlande)
Vybrant® CFDA-SE Cell Tracer Kit	Life Technologies, Carlsbad (USA)

## 5.12 Software

**Tabelle 5-11: Verwendete Software**

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe, San Jose (USA)
Adobe Photoshop	Adobe, San Jose (USA)
BD FACSDiva™	BD, Franklin Lakes (USA)
Endnote X7.0.2	Thomson Reuters, New York (USA)
FlowJo	TreeStar Inc., Ashland (USA)
GeneChip® Command Console®	Affymetrix, Santa Clara (USA)
GeneMANIA	Universität Toronto, Toronto (Kanada)
Graph Pad Prism 6	Graphpad Software, La Jolla (USA)
GSEA	Broad Institute, Cambridge (USA)
InnateDB Software	EMBL, Adelaide (Australien)
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond (USA)
Microsoft Power Point 2010	Microsoft, Redmond (USA)
R/Bioconductor	Fred Hutch Research Center, Seattle (USA)



## 6 METHODEN

### 6.1 Zellkultur

#### 6.1.1 Allgemeine Bemerkungen

Alle Arbeiten wurden mit sterilem Material, Lösungen und Medien bei sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 6,5% CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchte von 95%. Wenn nicht anders angegeben wurden die Zentrifugationen bei 1500 rpm für 5 min mit der Megafuge 2.0 R von Heraeus durchgeführt.

#### 6.1.2 Auftauen der Zellen

Das Einfrierröhrchen mit der gefrorenen Zellsuspension wurde rasch bei 37°C unter Schütteln erwärmt, bis ca. 2/3 der Zellsuspension aufgetaut war. Daraufhin wurden zügig 2 ml FCS hinzugegeben und die gesamte Lösung in ein 15-ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert und das Zellpellet im gewünschten Medium aufgenommen.

#### 6.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde der Zellsuspension ein Aliquot entnommen und mit Trypanblau im gewünschten Verhältnis gemischt. Bei der Blutaufreinigung sowie der Gewinnung der RCC-Gewebe-Zellsuspensionen wurde für das Zählen der Zellen zusätzlich 3% Essigsäure zugesetzt, da diese die Erythrozyten platzen lässt und das Zählen erleichtert. Die Farbstoff-Zellsuspension wurde in den Zwischenraum der Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Trypanblau dringt nur in tote, nicht aber in lebende Zellen ein. Tote Zellen zeichnen sich daher durch einen bläulichen Schimmer aus. Unter dem Lichtmikroskop wurde nachfolgend die Anzahl der ungefärbten Zellen in vier Großquadraten, die aus jeweils 16 Kleinquadraten bestehen, bestimmt. Nach Ermittlung der Zellzahl erfolgte die Berechnung der Gesamtzellzahl anhand folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{mittlere Zellzahl der 4 Großquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Dies entspricht beispielsweise bei einem Verdünnungsfaktor von 1:10 und dem Kammerfaktor von 10<sup>4</sup> einer Multiplikation der gezählten Zellen mit dem Faktor 10<sup>5</sup>. Die Gesamtzellzahl berechnet sich aus dem Wert pro ml multipliziert mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension.

### **6.1.4 Einfrieren von Zellen**

Für das Einfrieren der Zellen wurde die Gefrierschutzsubstanz Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. Diese diffundiert durch die Zellmembran und erniedrigt den Wassergehalt in der Zelle, der sonst durch die Ausdehnung beim Einfrieren die Zelle schädigen würde. Da DMSO für stoffwechselintakte Zellen toxisch ist, wurden alle Arbeitsschritte zügig auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert und der Kulturüberstand abgesaugt. Im Anschluss wurde das Zellsediment in 500 µl kühlem FCS gelöst und in ein Kryoröhrchen überführt. Das gleiche Volumen von kühlem 20%igem DMSO wurde dann langsam zur Zellsuspension gegeben. Zum Pellet der RCC-Gewebe-Zellsuspensionen wurde 1 ml des Ibidi-Einfriermediums, das ebenfalls DMSO enthält, zugegeben. Anschließend wurden die Röhrchen in Zellstoff verpackt und bei -80°C eingefroren. Nach wenigen Tagen wurden die Zellen zur Kryokonservierung auf Trockeneis in Tanks mit flüssigem Stickstoff (-196°C) überführt.

### **6.1.5 Kultivierung von adhärenenten Zelllinien**

Adhärenent wachsende Zellen wurden in liegenden Zellkulturflaschen mit Filterdeckel kultiviert. Je nach Größe der Zellkulturflasche (T75 mit 75 cm<sup>2</sup> oder T175 mit 175 cm<sup>2</sup> Adhärenzfläche) erfolgte die Kultivierung in 10 ml bzw. 25 ml des für die Zellen jeweils optimalen Kulturmediums. Das Kulturmedium musste alle drei bis vier Tage aufgrund des Nährstoffmangels durch frisches Medium ersetzt werden. Bei 80 - 100%iger Konfluenz wurden die Zellen reduziert, um ein Überwachsen zu verhindern. Dazu wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 5 – 10 ml PBS gewaschen, um verbliebene Medienreste sowie tote, nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Nachfolgend wurden 1 ml (T75) bzw. 2 ml (T175) Trypsin-EDTA-Lösung zu den Zellen gegeben und für ca. 2 - 5 min inkubiert. Die Zellkulturflasche wurde dabei immer wieder leicht geschwenkt, um die Trypsin-EDTA-Lösung gleichmäßig zu verteilen. Durch das Trypsin werden die Bindeproteine zwischen Zelle und Substrat proteolytisch gespalten und durch EDTA die für die Salzbrücken zwischen Zelle und Substrat notwendigen zweiwertigen Kationen, vor allem Kalziumionen, komplexiert. Sobald mikroskopisch zu erkennen war, dass sich alle Zellen vollständig abgelöst hatten, wurde frisches Zellkulturmedium hinzugegeben. Das im Kulturmedium enthaltene FCS bewirkt eine Inaktivierung des Trypsins und stoppt die Reaktion. Anschließend wurde das gewünschte Volumen der Zellsuspension aus der Kulturflasche entnommen und die Zellen in Experimenten eingesetzt oder verworfen. Den verbliebenen Zellen in der Kulturflasche wurde frisches Medium zugegeben und die Kultivierung fortgesetzt.

### **6.1.6 Gewinnung von RCC-26-konditioniertem Medium (RCC-26-CM) für die Differenzierung von ercDC aus Monozyten**

Für die In-vitro-Differenzierung von ercDC aus CD14<sup>+</sup> Monozyten (siehe Abschnitt 6.1.7.3) wurde Kulturüberstand der Tumorzelllinie RCC-26 eingesetzt (RCC-26-CM, engl.: renal cell carcinoma-26 conditioned medium). Zur Gewinnung wurden  $2 \times 10^6$  RCC-26-Zellen in 10 ml AIM-V-Medium in einer T75-Zellkulturflasche über 10 Tage kultiviert und im Anschluss der Überstand geerntet. Dieser wurde 10 min bei 2000 rpm zentrifugiert, steril filtriert (0,2 µm) und bei -20°C eingefroren.

### **6.1.7 Arbeiten mit Vollblut und Geweben**

Alle Arbeitsschritte wurden zügig durchgeführt. Zur Aufarbeitung wurden Einmalpipetten aus Plastik verwendet, um eine Voraktivierung der Zellen zu vermeiden.

#### **6.1.7.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut**

Die mononukleären Zellen (PBMC) wurden aus venösem Blut gesunder Spender isoliert. Für die Blutabnahme wurden 50-ml-Spritzen mit 1000 U Heparin (100 µl pro Spritze) versehen, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern. Das Blut wurde nach Abnahme mit demselben Volumen von RPMI-Basismedium gemischt und 35 ml davon auf 15 ml Ficoll® in einem 50-ml-Röhrchen überschichtet. Durch eine Dichtegradientenzentrifugation (2000 rpm, 20 min, ohne Bremse) wurden die Bestandteile des Blutes voneinander getrennt. Erythrozyten und Granulozyten sinken dabei in die Ficollschicht ab, während sich in der Interphase die PBMC sammeln. Die Thrombozyten befinden sich in dem darüberliegenden Plasma-Mediumgemisch. Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen, in ein 50-ml-Röhrchen überführt, 1:1 mit RPMI-Basismedium gemischt und bei 1900 rpm für 12 min zentrifugiert (Waschschritt zur Entfernung des Ficolls). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in eiskaltem MACS-Puffer aufgenommen, die Zellsuspension durch ein Zellsieb (Porengröße: 100 µm) filtriert und die Zellzahl bestimmt. Die Ausbeute lag, spenderabhängig, zwischen  $15 \times 10^7$  und  $30 \times 10^7$  Zellen pro 100 ml Vollblut.

#### **6.1.7.2 Positive Isolierung von Monozyten aus PBMC**

Die Isolierung der Monozyten aus PBMC erfolgte mittels der MACS-Technologie (engl.: magnetic cell sorting). Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Monozyten wurden durch CD14 Microbeads, entsprechend dem von Miltenyi Biotec angegebenen Protokoll, positiv selektioniert. Entgegen den dortigen Angaben wurde das Zellpellet in 10 µl statt 20 µl CD14 Microbeads/ $10^7$  Zellen aufgenommen. Die CD14<sup>+</sup> Monozyten wurden nach

der Elution zu verschiedenen myeloischen Zelltypen differenziert (Abschnitt 6.1.7.3) bzw. für die Genexpressionsanalyse eingefroren. Das gesondert aufgefangene Eluat der CD14-negativen PBMC-Fraktion (=PBL) wurde portionsweise eingefroren. Die Ausbeute von Monozyten betrug, spenderabhängig, zwischen 5-20% der PBMC, bei einer Zellzahl von  $15 \times 10^6$  bis  $30 \times 10^6$  Monozyten pro 100 ml Vollblut.

### 6.1.7.3 In-vitro-Generierung von myeloischen Zelltypen aus Monozyten

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 6-Loch-Flachbodenplatten. Zur Generierung der ercDC wurden  $7 \times 10^6$  CD14<sup>+</sup> Monozyten in 3 ml AIM-V-Medium (3% HS) bzw. 3 ml VLE-Medium (6% HS) mit 1 ml RCC-26-CM (siehe Abschnitt 6.1.6) pro Vertiefung kultiviert (Tabelle 6-1). Die cDC wurden entweder durch Aussaat von  $5 \times 10^6$  CD14<sup>+</sup> Monozyten in 5 ml MoDC-Differenzierungsmedium pro Vertiefung generiert oder klassisch durch Kultivierung in 4 ml AIM-V-Medium (1% HS) supplementiert mit 80 ng/ml GM-CSF und 80 ng/ml rhu IL-4. Für die Differenzierung der CD14<sup>+</sup> Monozyten zu unpolarisierten M-CSF-MΦ wurden pro Vertiefung  $5 \times 10^6$  CD14<sup>+</sup> Zellen in 4 ml AIM-V-Medium (1% HS) ausgesät und 50 ng/ml rhu M-CSF zugesetzt. Am Tag 7 wurden die M-CSF-MΦ, entsprechend Martinez et al.<sup>103</sup>, für 18 h mit 20 ng/ml rhu IFN-γ und 100 ng/ml LPS zu M1-MΦ bzw. mit 20 ng/ml rhu IL-4 zu M2-MΦ polarisiert. GM-CSF-MΦ wurden durch Zugabe von 80 ng/ml rhu GM-CSF differenziert. Die Zellzahl und das Volumen wurden entsprechend der M1- und M2-MΦ-Generierung gewählt. Das RCC-26-CM und die Zytokine M-CSF, GM-CSF und IL-4 wurden am Tag der Aussaat und erneut am Tag 2 und Tag 5 der Kultivierung zugegeben. Das MoDC-Differenzierungsmedium wurde nur am Tag 3 ein zweites Mal zugesetzt. Die ercDC und cDC wurden am Tag 7 geerntet, GM-CSF-MΦ, M1- und M2-MΦ am Tag 8.

**Tabelle 6-1: In-vitro-Generierung verschiedener Subtypen myeloischer Zellen aus CD14<sup>+</sup> Monozyten.** Alle Zelltypen wurden auch für die Genexpressionsanalyse (siehe Tabelle 7-5, Seite 91) verwendet.

Zelltyp	Kultivierungszeit (Tage)	Tag 2	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 8
<b>cDC</b>						
Klassisch	7	IL-4, GM-CSF	----	IL-4, GM-CSF	Ernten	----
MoDC-Diff.medium	7	----	Med.	----	Ernten	----
<b>ercDC</b>	7	RCC-26-CM	----	RCC-26-CM	Ernten	----
<b>GM-CSF-MΦ</b>	8	GM-CSF	----	GM-CSF	----	Ernten
<b>M1-MΦ</b>	8	M-CSF	----	M-CSF	IFN-γ, LPS*	Ernten
<b>M2-MΦ</b>	8	M-CSF	----	M-CSF	IL-4*	Ernten

\* Polarisierung entsprechend Martinez et al.<sup>103</sup>

#### 6.1.7.4 Herstellung von Gewebe-Zellsuspensionen aus RCC-Gewebe

Das Probenmaterial für die Untersuchung der myeloischen Zellen wurde aus Tumorgeweben von Patienten mit klarzelligem RCC gewonnen. Diese erhielten in der Klinik eine (Teil-) Nephrektomie. Ein Teil des Tumorgewebes wurde für die Forschung zur Verfügung gestellt. Die Gewebestücke wurden im Labor sofort verarbeitet und besaßen im Durchschnitt eine Größe von 4 cm x 2 cm x 1,5 cm. Da die Gewebe auch histologisch untersucht werden sollten, wurde von jedem ein kleiner Teil in Alufolie verpackt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingelagert. Das restliche Gewebe wurde weiterverarbeitet. Hierfür wurde das Gewebe zuerst in eine Petrischale gegeben und mit Skalpell und Schere in sehr kleine Stücke geschnitten. Das Gewebe wies am Ende der Bearbeitung meist eine breiige Konsistenz auf. Durch die Zugabe von HBSS (engl.: Hank's Balanced Salt Solution,  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltig) wurde das Austrocknen des Gewebes verhindert. Anschließend wurde der Gewebebrei mit einem sterilen Löffel in ein 50-ml-Reagenzröhrchen überführt, wobei pro Röhrchen ein maximales Volumen von 5 ml Gewebebrei eingesetzt wurde. Im Durchschnitt lag das Volumen bei 2 – 5 ml. Da in den Experimenten nur Leukozyten untersucht werden sollten, die ins Gewebe ausgewandert waren, wurden die Leukozyten, die sich in den Blutgefäßen des Gewebes befanden, über mehrere Waschschriffe ausgewaschen. Hierzu wurden 20 – 30 ml HBSS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltig) zum Gewebebrei zugegeben und anschließend 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Zellen wurde in ein neues Röhrchen gegeben und separat auf Eis aufbewahrt. Dieser Waschschriff wurde so oft wiederholt bis der Überstand klar war, d.h. keine oder nur sehr wenige Erythrozyten enthielt. Der durch diese Waschschriffe erhaltene Überstand enthielt Zellen, die nicht ins Tumorgewebe eingewandert waren. Diese Zellen werden als tumorzirkulierende Leukozyten bezeichnet. Die tumorinfiltrierenden Leukozyten wurden anschließend durch Verdau mit 0,19 mg/ml DNase I, Typ IV (435 U/ml) und 0,5 mg/ml Kollagenase, Typ IA (218 U/ml), aus dem Gewebesediment herausgelöst. Dazu wurde 6 ml Verdaumedium pro 1 ml Sediment zugesetzt, gut gemischt und anschließend 30 min bei Raumtemperatur auf einem Rotator inkubiert. Es schloss sich eine Zentrifugation an. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und dem Sediment 20 – 30 ml HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und pro 1 ml Sedimentvolumen 6 ml HBSS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) mit 5 mM EDTA zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Rotator und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Röhrchen transferiert und dem Sediment 20 – 30 ml HBSS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltig) zugegeben. Es wurde wieder zentrifugiert, der Überstand abgenommen und der zweite Verdauschriff, analog dem ersten Verdauschriff, durchgeführt. Nach einer weiteren Zentrifugation und der Separierung des Überstandes wurde das Gewebehomogenat in eine Petrischale gegeben und mit einer kleineren Petrischale ausgedrückt. Die

Petrischalenoberfläche wurde mit HBSS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltig) abgespült und die Gewebezellsuspension in ein neues Röhrchen überführt. Es folgte eine Filtration durch ein Zellsieb (Porengröße: 70  $\mu\text{m}$ ). Anschließend wurden alle im Laufe des Gewebeverdaus entstandenen Überstände vereinigt und bei 1500 rpm für 10 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen gezählt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass nur die kleineren Zellen (Leukozyten) gezählt werden, die großen Zellen (Tumorzellen) wurden weitgehend ausgeschlossen. Die Ausbeute betrug  $2 - 100 \times 10^6$  Leukozyten.

## **6.2 Funktionelle Versuche**

### **6.2.1 Signal-3-Nachweisverfahren**

Dieser von Zobywalsky et al.<sup>104</sup> beschriebene Funktionstest dient der Ermittlung der Zytokinsekretion einer DC bei T-Zell-Kontakt (Signal-3). Als T-Zell-Surrogat fungierte die Maus-Fibroblastenzelllinie L929-CD40L, die mit humanem CD40L (CD40-Ligand/CD154) transfiziert wurde. CD40L interagiert mit dem CD40-Rezeptor auf myeloischen Zellen und induziert u.a. die Sekretion von IL-12p70. Um die Proliferation der L929-CD40L-Zellen zu verhindern, wurden diese durch Cäsium-Bestrahlung (100 Gy) inaktiviert und anschließend 48 h in einer 96-Loch-Rundbodenplatte ( $5 \times 10^4$  Zellen in 100  $\mu\text{l}$  LCL-Medium) kultiviert. Das Medium wurde nach diesem Zeitraum abgenommen und je Vertiefung  $2 \times 10^4$  myeloische Zellen in 200  $\mu\text{l}$  AIM-V-Medium (1 - 3% HS) bzw. VLE-Medium (3 - 6% HS) zugegeben. Als Kontrollen dienten allein kultivierte myeloische Zellen bzw. L929-CD40L-Zellen. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (2000 rpm, 10 min), der Überstand für die Zytokinbestimmung abgenommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

### **6.2.2 Kokultur myeloischer Zellen mit allogenen naiven T-Zellen**

#### **6.2.2.1 T-Zell-Proliferation und Apoptoseinduktion**

Die Fähigkeit der myeloischen Zellen zur Stimulation der Proliferation und Apoptose von T-Zellen wurde in einer allogenen Kokultur gemessen. Dafür wurden  $3 \times 10^5$  PBL eines HLA-A2-negativen Spenders im Verhältnis 10:1 mit myeloischen Zellen eines HLA-A2-positiven Spenders gemischt und in 200  $\mu\text{l}$  AIM-V-Medium (7,5% HS) in einer 96-Loch-Rundbodenplatte für 5 Tage kokultiviert. Pro Kokultur wurden 4 Replikate angesetzt und allein kultivierte, gefärbte und ungefärbte PBL als Kontrolle verwendet. Die Proliferation wurde durch Anfärbung der PBL mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE (engl.: Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) gemessen (siehe Abschnitt 6.4.4, Seite 40). Zur durchflusszytometrischen Detektion apoptotischer Zellen wurde das „Annexin V Apoptosis Detection Kit“ verwendet (siehe Abschnitt 6.4.5, Seite 40).

### 6.3 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Der ELISA (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay) bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren mit dem verschiedene Substanzen, wie z.B. Proteine (Zytokine, Chemokine), Viren oder Hormone, in Suspensionen nachgewiesen werden können. Das Prinzip besteht darin, dass die zu untersuchende Substanz (hier: Zytokin) über einen am Plattenboden haftenden spezifischen „Capture“-Antikörper gebunden und angereichert wird. Durch die Zugabe eines zweiten, gegen das Zytokin gerichteten, biotinylierten Detektions-Antikörpers sowie des Enzyms Streptavidin-HRP (engl.: horse radish peroxidase) bildet sich das sogenannte Antikörper-Antigen-Antikörper-Sandwich. Da die Antikörper an das gleiche Antigen (hier: Zytokin) binden, ist es wichtig, dass beide Antikörper unterschiedliche Epitope erkennen, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Im Anschluss wird ein adäquates Substrat zugegeben, das von HRP in ein farbiges Reaktionsprodukt umgesetzt wird. Als Substrat diente eine Kombination von Wasserstoffperoxid und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Lösliches TMB wird in Gegenwart von Peroxidase und Wasserstoffperoxid zu einem blauen Chromogen umgesetzt. Nach der Zugabe von Phosphorsäure zum Abstoppen der Reaktion schlägt die Farbe der Lösung durch eine chemische Reaktion in einen gelben Farbton um, dessen Intensität als optische Dichte am ELISA-Messgerät (Spektrophotometer sunrise) bei 450 nm photometrisch quantifiziert werden kann. Die Signalstärke verhält sich dabei in einem gewissen Bereich proportional zur Konzentration der nachzuweisenden Substanz. Die Substanzkonzentration wird anhand einer Standardkurve mit definierten Konzentrationen ermittelt. Der Nachweis der Zytokine IL-12p70 und IL-10 wurde entsprechend dem von BD vorgegebenen Protokoll durchgeführt.

### 6.4 Durchflusszytometrie

#### 6.4.1 Messprinzip

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker bzw. intrazellulären Komponenten zu identifizieren. Die Zellen werden dafür mit monoklonalen fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert. Bei der Analyse im Durchflusszytometer wird die Zellsuspension durch eine Kapillare gezogen, so dass ein Strom einzelner Zellen entsteht, der von einem Laserstrahl erfasst wird. Über die Vorwärtsstreuung (FSC, engl.: forward scatter) kann die Größe und über die Seitwärtsstreuung (SSC, engl.: side scatter) die Granularität der Zelle bestimmt werden. Gleichzeitig regt der Laser die Fluorochrome der Antikörper an, deren emittiertes Licht dann durch einen Photonendetektor (PMT, engl.: photomultiplier tube) registriert wird. Jeder Fluoreszenzfarbstoff absorbiert Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches (Absorptionsspektrum). Die Anzahl der emittierten Photonen ist proportional zur Menge der Fluorochrome, dementsprechend auch zur Menge der mit den Antikörpern markierten

Moleküle. Jedes Photon, das durch den PMT registriert wird, erzeugt einen definierten elektrischen Strom, der gemessen und als Datei gespeichert wird. Vor dem PMT angebrachte Filter schränken das Spektrum der Wellenlängen, das den Detektor erreicht, ein und schirmen somit den jeweils für den Farbstoff spezifischen Kanal vor dem Emissionslicht anderer Fluorochrome ab.

In dieser Arbeit wurde für alle Messungen, die nicht mit einer Sortierung der Zellen verbunden waren, das Durchflusszytometer LSR II verwendet. Es besitzt vier verschiedene Laser, so dass bis zu 18 verschiedene Fluoreszenzen gleichzeitig gemessen werden können (siehe Tabelle 6-4, Seite 44): einen UV-Laser (Wellenlänge 355 nm), einen violetten Laser (Wellenlänge 405 nm), einen blauen Laser (Wellenlänge 488 nm) und einen roten Laser (Wellenlänge 633 nm). Auf die Laser abgestimmt sind Filter, die ein gleichzeitiges Messen der Emissionen verschiedener Fluorochrome erlauben. Dennoch muss bei der Zusammenstellung der Fluorochromkombinationen darauf geachtet werden, dass sich die Emissionen so gering wie möglich überlagern. Zur Kompensation verschiedener Emissionen sind sogenannte Kompensationsbeads („CompBeads“) nötig, mit denen die Überlappung einzelner Emissionen festgelegt und korrigiert werden kann. Mit Hilfe der separat gefärbten Kompensationsbeads wird im Vorfeld definiert, welche Fluoreszenzintensitäten als positiv oder negativ gelten. Eine solche Kompensationsfärbung muss für jeden Fluoreszenzkanal durchgeführt werden.

#### **6.4.2 Markierung toter Zellen**

Tote Zellen haben eine gewisse Eigenstrahlung und können Antikörper unspezifisch binden. Da dies zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann, ist die Unterscheidung toter und lebender Zellen essentiell. Wurde eine Oberflächenfärbung durchgeführt, so wurden zusätzlich zu den Antikörpern entweder 1-3 µl „near-IR fluorescence reactive dye“-Lebend/Tot-Farbstoff zur Zellsuspension gegeben oder kurz vor der Messung 10 µg/ml Propidiumjodid (PI) zupipettiert. Der fixierbare Lebend/Tot-Farbstoff „near-IR fluorescence reactive dye“ dringt in tote Zellen ein, verbindet sich dort mit freien Aminen und bewirkt eine Anfärbung der Zellen, so dass diese durch die starke Fluoreszenz von den lebenden Zellen unterschieden werden können. Der Farbstoff kann aufgrund seiner Fixierbarkeit und der Stabilität bei Permeabilisierung auch für intrazelluläre Färbungen eingesetzt werden. PI dagegen ist nicht fixierbar und für intrazelluläre Färbungen ungeeignet. Es ist nicht membranpermeabel und färbt deshalb intakte Zellen nicht an. Es interkaliert jedoch in die DNA von toten Zellen, da diese Membrandefekte aufweisen. Für die Markierung toter Zellen bei der intrazellulären Färbung von Fascin (siehe Abschnitt 6.4.6, Seite 41) wurde der fixierbare Lebend/Tot-Farbstoff 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD) eingesetzt. Dafür wurden die Zellen bei der Oberflächenfärbung zusätzlich mit 10 µg/ml 7-AAD behandelt. 7-AAD



dringt tote Zellen ein und interkaliert irreversibel in die DNA, so dass es bei der Permeabilisierung, die zum Nachweis des intrazellulären Fascins notwendig war, nicht ausgewaschen wurde.

### **6.4.3 Oberflächenfärbung**

Wenn nicht anders angegeben, wurde in den nachfolgenden Unterkapiteln und in den Abschnitten 6.4.4 bis 6.4.6 bei allen Waschschritten für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert (Megafuge 2.0, Heraeus).

#### **6.4.3.1 Zellsuspensionen**

Für die Oberflächenfärbung wurden  $5 \times 10^4$  -  $2 \times 10^5$  Zellen verwendet. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5-ml-FACS-Röhrchen gegeben und mit 500 µl eiskaltem FACS-Azid-Puffer gewaschen. Hierfür wurde der Puffer zu den Zellen gegeben und diese anschließend zentrifugiert. Danach wurde der Überstand auf 50 µl abgesaugt und die Färbung mit den Antikörpern durchgeführt. Jeder Antikörper wurde in einer zuvor ausgetesteten Menge dazugegeben (siehe Tabelle 5-9, Seite 27). Die Proben wurden mit dem Vortexer gemischt und für 25 min abgedunkelt bei 4 °C inkubiert (eingesetzte Antikörperkombinationen siehe Tabelle 6-2). Es schloss sich ein Waschschriff mit 500 µl FACS-Azid-Puffer an. Der Überstand wurde für die Messung auf 100 µl abgesaugt. Kurz vor der Messung wurde PI (10 µg/ml) zugegeben. Für die Auswertung der Daten war es nötig, einzeln gefärbte Proben mitzuführen, um später eine Kompensationsmatrix erstellen zu können, anhand der die Spektralüberlappungen der einzelnen Fluorochrome herausgerechnet werden können. Dazu wurden Kompensationsbeads mit jeweils einem der verwendeten Antikörper gefärbt. 70 µl FACS-Azid-Puffer wurden in 1,5-ml-FACS-Röhrchen vorgelegt und jeweils 15 µl der gut aufgeschüttelten positiven und negativen Beads dazu pipettiert. Die positiven Beads sind mit einem Antikörper versehen, welcher die Kappa-Leichtkette der fluorochrommarkierten Antikörper erkennt und bindet. Die negativen Beads sind ausschließlich mit FCS (engl.: fetal calf serum) beschichtet und können folglich die Antikörper der Suspension nicht binden. Zu den Beads wurde jeweils 1 µl des Antikörpers pipettiert, für 25 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert, einmal mit FACS-Azid-Puffer gewaschen und der Überstand auf 100 µl abgesaugt. Die Mischung von positiven und negativen Beads erzeugt am Gerät zwei Fluoreszenzausschläge, wobei die Intensität der negativen Beads dem Fehlen einer spezifischen Fluoreszenz entspricht und die positiven Beads der Intensität einer positiven Fluoreszenz entsprechen. So kann bei den gefärbten Proteinen zwischen negativen und positiven Zellen unterschieden werden sowie die spektrale Überlappung verschiedener Fluorochrome elektronisch verrechnet, d.h. kompensiert, werden.

### 6.4.3.2 RCC-Gewebe-Zellsuspensionen

Für die Oberflächenfärbung der RCC-Gewebe-Zellsuspensionen wurden  $2 \times 10^5 - 8 \times 10^5$  Zellen verwendet. Diese wurden zuvor unter dem Mikroskop als potentielle Leukozyten innerhalb der Gewebe-Zellsuspension bestimmt. Die Gewebe-Zellsuspension wurde in ein 5-ml-FACS-Röhrchen überführt, mit 500 µl PBS-EDTA-Puffer versetzt und zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vollständig entfernt und das Zellpellet in 30 µl PBS-EDTA-Puffer aufgenommen. Die zugegebene Antikörpermenge wurde individuell angepasst. Hierbei wurden sowohl die Anzahl lebender Leukozyten, die Gesamtanzahl lebender Zellen sowie die Gesamtanzahl toter Zellen berücksichtigt. Die eingesetzten Antikörpermengen können Abschnitt 5.10 (Seite 27) entnommen werden, die Antikörperkombinationen Tabelle 6-2. Zusammen mit dem entsprechenden Volumen der Antikörper wurde, je nach Zellzahl, 1 - 3 µl des Lebend/tot-Farbstoffs „near-IR fluorescence reactive dye“ zugegeben. Es folgte eine 25-minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln, danach wurde mit 500 µl PBS-EDTA-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet je nach Größe und Zellzahl in 0,4 – 1 ml PBS-EDTA-Puffer aufgenommen. Um störende größere Gewebepartikel zu entfernen, wurde die Gewebe-Zellsuspension durch ein Zellsieb (Porengröße: 70 µm) filtriert. Danach schloss sich eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 200 U/ml DNase I an, um eine Verstopfung des Durchflussszytometers durch DNA-Fäden und darin verklumpte Zellen zu verhindern. Die Proben wurden entweder am LSR II-Durchflussszytometer analysiert oder am FACSAria IIIu sortiert (siehe Abschnitt 6.4.8.2, Seite 45).

**Tabelle 6-2: Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Analyse myeloischer Zellen innerhalb von Zellsuspensionen und RCC-Gewebe-Zellsuspensionen.** Die Antikörper für die Auswahl der myeloischen Zellen bzw. die Abgrenzung nicht-myeloischer Zellen (CD3) wurden durch Antikörper für analytische Marker (rechte Spalte, Oberflächenmarker) ergänzt. Die Kombinationen der Antikörper wurden so ausgewählt, dass keine Fluoreszenzüberschneidungen auftraten.

Analyse	Auswahl myeloischer Zellen	Oberflächenmarker
<b>analytische Durchflussszytometrie der myeloischen Zellen in RCC-Gewebe-Zellsuspensionen</b>	CD45 PeCy7 CD11c PE oder FITC oder APC CD14 PB oder PerCP-Cy5.5 CD209 APC oder PE CD3 PB oder PE-Cy7	CD40 FITC CD80 FITC CD86 PE HLA-DR FITC MerTK APC PD-L1 FITC
<b>analytische Durchflussszytometrie der in vitro generierten cDC und ercDC (Zellsuspensionen)</b>	CD14 PB oder PerCP-Cy5.5 CD209 APC oder PE	CD24 PE CD40 FITC CD48 FITC CD64 FITC CD80 FITC CD86 PE ICAM-1 PE ILT4 PE HLA-DR FITC LFA-1 FITC MerTK APC PD-L1 FITC

#### 6.4.4 CFSE-Markierung zur Messung der T-Zell-Proliferation

CFSE (engl.: Carboxyfluorescein succinimidyl ester) liegt außerhalb der Zelle als CFDA-SE vor. Dieses ist farblos und diffundiert passiv in das Zytoplasma der Zellen, wo die Acetatgruppen durch intrazelluläre Esterasen gespalten werden. Dadurch entsteht ein fluoreszierender, aminreaktiver Ester, das CFSE. Die Estergruppen des CFSE reagieren mit den Amingruppen intrazellulärer Proteine, in dessen Folge sich stabile, fluoreszierende Konjugate bilden, die das CFSE in der Zelle festhalten. Die CFSE-Protein-Konjugate werden bei der Zellteilung gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben. Mit jeder Zellteilung halbiert sich die Fluoreszenzintensität der Tochterzellen. Das Maß der Fluoreszenzabnahme erlaubt einen Rückschluss auf die Anzahl der Teilungen, die eine Zelle durchlaufen hat und ist damit ein Maß für die induzierte Proliferation der Zellpopulation. Für die Färbung der im Versuch eingesetzten PBL wurde das „Vybrant® CFDA-SE Cell Tracer Kit“ von Life Technologies benutzt. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit  $1 \mu\text{M}$  CFDA-SE (in PBS) versetzt, 8 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend die Reaktion mit einem der Färbelösung entsprechenden Volumen von FCS abgestoppt. Nach 2-minütigem Schwenken des Reagenzröhrchens wurde zweimal mit AIM-V-Medium (7,5% HS) gewaschen, die Zellen anschließend zwei Stunden in einer 24-Loch-Flachbodenplatte in AIM-V-Medium mit 7,5% HS ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) ruhen gelassen und dann für die Kokultur mit cDC bzw. ercDC verwendet. Die CFSE-Fluoreszenz der  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen wurde nach 5-tägiger Kokultur (siehe Abschnitt 6.2.2.1, Seite 35) am LSR II-Durchflusszytometer analysiert. Dafür wurde eine Oberflächenfärbung mit den in Tabelle 6-3 angegebenen Antikörpern durchgeführt.

#### 6.4.5 Annexin V/PI-Färbung zur Detektion apoptotischer Zellen

Der Farbstoff Annexin V bindet Phosphatidylserine, die in vitalen Zellen v.a. an der zytosolischen Seite der Plasmamembran vorkommen, bei apoptotischen und nekrotischen Zellen aber an die Oberfläche translozieren und dadurch angefärbt werden können. Durch Anfärbung mit Annexin V und PI können verschiedene Populationen unterschieden werden: vitale Annexin<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> (Ann<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>) Zellen, Ann<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> Zellen, die sich in der frühen Phase der Apoptose befinden, Ann<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> Zellen, die sich in der späten Apoptosephase oder in der Nekrose befinden sowie Ann<sup>-</sup>PI<sup>+</sup> Zellen, die beschädigt bzw. tot sind, was vermutlich nicht durch Apoptose verursacht wurde, da sie nicht Annexin<sup>+</sup> sind<sup>105</sup>.

Die PBL:cDC bzw. PBL:ercDC-Kokulturen (siehe Abschnitt 6.2.2.1, Seite 35) wurden nach 5 Tagen geerntet, zweimal mit  $500 \mu\text{l}$  FACS-Azid-Puffer gewaschen und eine Oberflächenfärbung der Zellen durchgeführt (Antikörperkombination siehe Tabelle 6-3). Die anschließende Färbung von Annexin V und PI wurde nach Protokoll des Herstellers (eBioscience) durchgeführt.

**Tabelle 6-3: Übersicht über die verwendeten Antikörper für die Detektion von CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der Kokulturen von PBL mit cDC bzw. ercDC (siehe Abschnitt 6.2.2.1).** Die Antikörper gegen CD19 und CD56 wurden zur Abgrenzung von B- und NK-Zellen verwendet.

Versuch	Ausschluss myeloischer Zellen	Auswahl CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen
<b>T-Zell-Proliferation</b>	CD209 PE	CD3 PE-Cy7 CD4 APC-A780 CD8 PB CD19 A700 CD56 APC CFSE
<b>Apoptoseinduktion</b>	CD209 PE	CD3 PE-Cy7 CD4 APC-A780 CD8 PB CD19 A700 CD56 APC Annexin V FITC

#### 6.4.6 Fluoreszenzmarkierung des intrazellulären Proteins Fascin

Die myeloischen Zellen ( $5 \times 10^5$  Zellen) wurden in ein 1,5-ml-FACS-Röhrchen überführt, mit 500 µl FACS-Azid-Puffer versetzt, zentrifugiert und der Überstand auf 50 µl abgesaugt. Es folgte die Zugabe des Lebend/Tot-Farbstoffs 7-AAD (10 µg/ml) und eine 20-minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen wurde 500 µl 1%iges PFA zugegeben, gut gemischt und 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen mit 500 µl FACS-Azid-Puffer folgte der erste Permeabilisierungsschritt mit 500 µl 80%igem Methanol für 10 min (4°C, Dunkelheit). Einem erneuten Waschschrift schloss sich ein zweistufiger Permeabilisierungsprozess mit je 500 µl 0,1%iger und 0,35%iger Saponinlösung an. Die Proben wurden jeweils nach Zugabe der Lösung zentrifugiert und auf 50 µl abgesaugt. Anschließend wurde die entsprechende Menge des unmarkierten, gegen Fascin gerichteten, Primärantikörpers (siehe Tabelle 5-9, Seite 27) zugegeben und für 25 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde wieder mit 0,1%iger und 0,35%iger Saponinlösung gewaschen und der mit A488 markierte anti-Maus-IgG1-Sekundärantikörper zu den Zellen gegeben. Es folgten eine 25-minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln und ein letzter Waschschrift mit 500 µl FACS-Azid-Puffer. Der Überstand wurde auf 100 µl abgesaugt und die Zellen am LSR II-Durchflussszytometer analysiert.

### 6.4.7 Messung der Proben und Auswertung der Daten

Vor der analytischen Messung der Proben am LSR II-Durchflusszytometer bzw. der Sortierung am FACSria IIIu (siehe Abschnitt 6.4.8) wurde mit Hilfe einer unmarkierten Probe zunächst die Position der zu untersuchenden Zellpopulation im FSC/SSC so optimiert, dass diese möglichst in der Mitte des FSC/SSC-Punktewolkendiagramms (Dot-Plot) lag. Anschließend wurde für jede Fluoreszenz die PMT-Einstellung der Laser so gewählt, dass negative Signale möglichst am Nullpunkt der x-Achse lagen und positive Fluoreszenzen möglichst weit rechts im Histogramm. Dazu wurden Proben verwendet, die mit einem nicht gegen die jeweilige Zielstruktur gerichteten Isotyp-Antikörper gefärbt wurden. Weil die Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome überlappen können, wie das z.B. bei FITC und PE der Fall ist, wurden positive und negative Kompensationbeads aufgenommen, um mit Hilfe der Auswertungssoftware „FlowJo“ eine Kompensation durchzuführen. Die zu untersuchende Zellpopulation wurde durch einen Auswahlrahmen im FSC/SSC-Punktewolkendiagramm ausgewählt und jeweils zwischen  $1 \times 10^4$  und  $2 \times 10^5$  Ereignissen innerhalb der lebenden Zellpopulation aufgenommen bzw. die Zellen am FACSria IIIu sortiert.

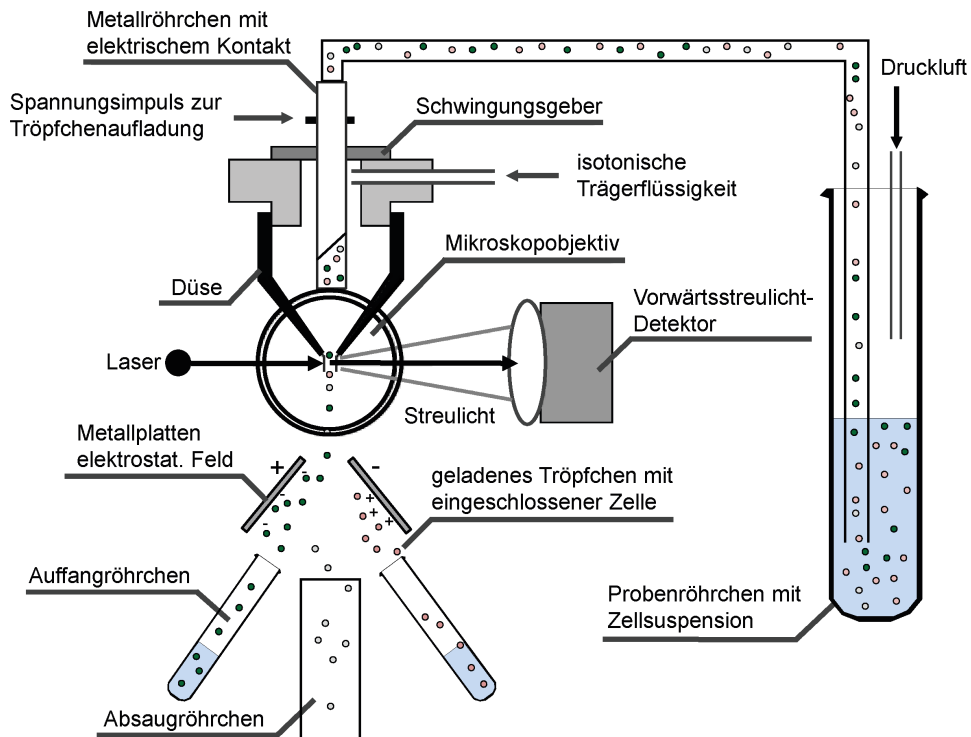
Die Auswertung erfolgte mit der Software „FlowJo“, die die aufgenommenen Fluoreszenzparameter auf verschiedene Weise darstellen kann. Im Histogramm wird die Häufigkeitsverteilung einer Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der Ereignisse dargestellt. Hiermit lässt sich zum einen eine positive Zellfraktion von der für den jeweiligen Marker negativen unterscheiden, und zum anderen kann die Fluoreszenzintensität erfasst werden, die proportional zur Expressionsstärke des Markers ist. In einem Punktewolkendiagramm können zwei verschiedene Fluoreszenzen gegenübergestellt werden. Hierbei wird in einem xy-Koordinatennetz jede Zelle als Punkt projiziert, wobei x die Fluoreszenz des ersten und y die Fluoreszenz des zweiten Parameters anzeigt. Dadurch kann der Prozentsatz von Zellen bestimmt werden, der positiv für jeweils einen, beide oder keinen der beiden Marker ist. Eine Abwandlung des Punktewolkendiagramms ist das Konturdiagramm, bei dem die Zelldichte durch Linien dargestellt wird, wobei bei hoher Zelldichte die Linien dichter zusammen und bei niedriger Zelldichte die Linien weiter auseinander liegen. In dieser Darstellung können Zellen, die außerhalb der Hauptpopulation liegen, als Punkte ergänzt werden.

## **6.4.8 Zellsortierung**

### **6.4.8.1 Prinzip**

Für die Sortierung der verschiedenen myeloischen Subpopulationen aus RCC-Gewebe-Zellsuspensionen und PBMC (siehe Abschnitt 7.5.1 und 7.5.2, Seite 68 bzw. 69) wurde das FACSaria IIIu Gerät verwendet. Die Funktionsweise entspricht im Wesentlichen der des LSR II-Durchflusssytometers. Die Laserkonfigurationen beider Geräte und die spektralen Eigenschaften der Fluorochrome sind in Tabelle 6-4 zusammengefasst.

Die zu analysierende Zellsuspension, welche die mit Antikörpern gefärbten Zellen enthält, wird mit Druckluft aus dem Probenröhrchen durch einen dünnen Schlauch und ein Metallröhrchen in eine Düse gepresst (Abbildung 6-1). Die Zellen treten dann aus dem Metallröhrchen in das Zentrum der Düse ein und aus der hier verwendeten 100 µm breiten Öffnung wieder aus. Von der Seite wird eine isotonische Trägerflüssigkeit zugeleitet. Innerhalb der Düse werden die Zellen sehr stark beschleunigt, wodurch sie einer starken Belastung ausgesetzt sind. Unmittelbar unter der Düsenöffnung trifft ein Laserstrahl den austretenden Flüssigkeitsstrahl, wodurch die Größe, Granularität und die fluoreszenzmarkierten Moleküle der Zellen erfasst werden. Nach der Detektion durch den Laser bewegen sich die Zellen zum Abrisspunkt, wo der Flüssigkeitsstrahl, stabilisiert durch einen piezoelektronischen Schwingungsgeber, in Tröpfchen aufbricht. Jeder Tropfen enthält normalerweise eine einzelne Zelle. Die Tropfen werden kurz vor dem Abreißen, entsprechend der zuvor festgelegten Sortierkriterien, mit unterschiedlichen Ladungen versehen. In der nachfolgenden Fallstrecke werden sie beim Durchqueren des elektrostatischen Feldes, welches von zwei geladenen Metallplatten erzeugt wird, entsprechend ihrer Ladung in unterschiedliche Richtungen abgelenkt und so in getrennten Auffangröhrchen gesammelt. Es gibt verschiedene Sortiermodi mit unterschiedlicher Genauigkeit. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Sortierungen wurde entweder der „purity-“ oder der „single cell“-Modus verwendet. Ersterer ist sehr genau, zielt aber darauf ab, möglichst das Maximum der verfügbaren Zellen zu sortieren, manchmal zu Lasten der Zellvitalität. Der „single cell“-Modus gewährleistet eine noch präzisere Sortierung als der „purity“-Modus, da nur Zellen die in der Mitte des Tropfens liegen in die Auffanggefäße abgelenkt werden, so dass wirklich nur eine Zelle pro Tropfen sortiert wird. Nachteil ist eine geringere Zellausbeute.



**Abbildung 6-1: Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung.** Entnommen und modifiziert nach Kimmig, Dissertationsarbeit, 2003<sup>106</sup>.

**Tabelle 6-4: Fluoreszenzcharakteristika der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe, die Wellenlänge der Laser für die Anregung sowie die Filter für die Detektion am LSR II-Durchflusszytometer bzw. am FACSaria Illu Sortiergerät.**

Fluoreszenzfarbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Wellenlänge des Lasers LSR II; FACSaria Illu*	Filter LSR II; FACSaria Illu*
PB	401 nm	452 nm	405 nm <sup>1</sup> ,	450/50 nm; 450/40 nm
PerCP-Cy5.5	482 nm	695 nm	488 nm <sup>2</sup>	695/40 nm
Propidiumjodid (PI)	493 nm	619 nm	355 nm <sup>3</sup> ; 561 nm <sup>4</sup>	610/20 nm
FITC	494 nm	519 nm	488 nm	530/30 nm
A488	495 nm	519 nm	488 nm	530/30 nm
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD)	543 nm	655 nm	488 nm	695/40 nm
PE	564 nm	578 nm	488 nm; 561 nm	575/26 nm; 582/15 nm
PE-Cy7	564 nm	785 nm	488 nm; 561 nm	780/60 nm
APC-Cy7 (APC-A780)	650 nm	785 nm	633 nm <sup>5</sup>	780/60 nm
APC	650 nm	660 nm	633 nm	660/20 nm
A700	696 nm	719 nm	633 nm	730/45 nm
Near-IR fluorescence reactive dye	750 nm	775 nm	633 nm	780/60 nm

<sup>1</sup> violetter Laser, <sup>2</sup> blauer Laser, <sup>3</sup> UV-Laser, <sup>4</sup> grün-gelber Laser beim FACSaria Illu, <sup>5</sup> roter Laser

\* nur bei Abweichung von den Bedingungen am LSR II gesondert aufgeführt

### 6.4.8.2 Sortierung von myeloischen Subpopulationen aus Blut und RCC-Gewebe-Zellsuspensionen

Die PBMC bzw. die RCC-Gewebe-Zellsuspensionen wurden mit spezifischen Kombinationen fluoreszenzmarkierter Antikörper gefärbt (Tabelle 6-5) und die Zellen anschließend am FACS Aria IIIu sortiert. Die Auswahlstrategie für die myeloischen Zelltypen ist in Abschnitt 7.5.1 bzw. 7.5.2 (Seite 68 und 69) des Ergebnisteils gezeigt. Die Oberflächenfärbung für die Sortierung der CD11c<sup>+</sup> DC und slanDC aus den PBMC wurde analog der Färbung für Gewebe-Zellsuspensionen (siehe Abschnitt 6.4.3.2, Seite 39) mit 10 – 13 x 10<sup>6</sup> Zellen in 50 µl pro Ansatz durchgeführt. Zuvor wurden die B-Zellen und NK-Zellen durch positive Selektion von CD19 und CD56 mittels MACS-Microbeads aus den PBMC entfernt. Die Durchführung erfolgte analog der Separation von Monozyten mittels CD14 Microbeads (siehe Abschnitt 6.1.7.2, Seite 32).

**Tabelle 6-5: Übersicht über die verwendeten Antikörper zur Auswahl myeloischer Zellen innerhalb der PBMC und RCC-Gewebe-Zellsuspensionen für die Sortierung am FACS Aria IIIu.** CD45 wurde zur Abgrenzung von CD45-negativen Tumorzellen verwendet, CD3, CD19 und CD56 zum Ausschluss der T-, B- und NK-Zellen.

Analyse	Auswahl CD11c <sup>+</sup> myeloischer Zellen	Auswahl myeloischer Subtypen innerhalb der CD11c <sup>+</sup> Zellen
<b>Sortierung der CD11c<sup>+</sup> DC und slanDC aus PBMC</b>	CD11c PE CD3 PB CD19 PB CD56 APC	CD11c PE-Cy7 slan FITC
<b>Sortierung myeloischer Zellen aus RCC-Gewebe-Zellsuspensionen</b>	CD45 PE-Cy7 CD11c APC CD3 PB	CD209 PE CD14 PerCP-Cy5.5 slan FITC

Für die Sortierung wurde eine Düse mit einer 100 µm breiten Öffnung verwendet, eine durchschnittliche Sortiergeschwindigkeit von 4000 Ereignissen/s eingestellt und die Sortiermodi „single cell“ bzw. „purity“ ausgewählt. Der „purity“-Modus wurde bei sehr geringen Zellzahlen verwendet, da sonst keine für die Genexpressionsanalyse ausreichende Zellzahl sortiert werden konnte. Die Zellen wurden in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße (RNase-frei) sortiert, die jeweils 250 µl des Puffers RLT (Lysepuffer aus RNeasy Micro Kit), versetzt mit β-Mercaptoethanol (143 mM), enthielten. Die Auffanggefäße wurden während der Sortierung nicht gekühlt, da sonst die Salze des Lysepuffers ausfallen. Während der Sortierung wurden die Zellen immer wieder im Puffer resuspendiert, um eine vollständige Lyse zu gewährleisten. Außerdem wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis von RLT-Puffer zur Geräteflüssigkeit, welche die sortierten Zellen enthielt, im Auffanggefäß stets mindestens 3:1 war. Dies gewährleistete die vollständige Aktivität des Lysepuffers. Falls genügend Zellen vorhanden waren, wurde ein Teil der Zellen jeder Fraktion in AIM-V-



Medium (10% HS) sortiert und die Reinheit der sortierten Zellen durch eine Reanalyse am FACS Aria IIIu überprüft. Diese lag zwischen 98% und 100%. Die lysierten Zellen wurden mit Hilfe des QIAshredders von QIAGEN nach Protokoll homogenisiert und anschließend bei -80° gelagert. Eine Übersicht über die sortierten Zelltypen, deren Bezeichnung für die Genexpressionsanalyse, das Markerprofil, die Integrität der RNA (RIN-Werte) und die Anzahl der sortierten Zellen der Replikate können Tabelle 7-1 auf Seite 71 im Ergebnisteil entnommen werden.

## **6.5 Molekularbiologische Methoden**

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden mit sterilen, RNase-freien Materialien und Substanzen durchgeführt. Der Microarray und dessen Analyse wurden in Zusammenarbeit mit Martin Irmeler und Anke Bettenbrock vom Institut für Experimentelle Genetik des Helmholtz Zentrums München sowie Tobias Straub von der Bioinformatischen Core Unit des Adolf-Butenandt-Instituts der LMU durchgeführt.

### **6.5.1 RNA-Isolierung**

Die Gesamt-RNA der in vitro generierten sowie der aus den Gewebe-Zellsuspensionen und PBMC isolierten myeloischen Zellen (Ex-vivo-Zellen) wurde mit Hilfe des RNeasy Micro Kits der Firma QIAGEN isoliert. Die Zentrifugationsschritte wurden mit einer Eppendorfzentrifuge (Eppendorf „Centrifuge 5417R“) durchgeführt.

Von den in vitro generierten Zellen wurden je  $5 \times 10^5$  Zellen als trockenes Pellet bei -80°C eingefroren. Die eiskalten Pellets wurden im ersten Schritt mit 350 µl RLT-Puffer (Lysepuffer) versehen, gemischt und zur Homogenisierung auf die QIAshredder Säule gegeben. Nach einer 2-minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm wurde das Lysat 1:1 mit 70% Ethanol gemischt und dann auf die „MinElute“-Säule überführt. Die Ex-vivo-Zellen wurden am FACS Aria IIIu direkt in RLT-Puffer, der  $\beta$ -Mercaptoethanol enthielt, sortiert, mit dem QIAshredder homogenisiert und anschließend bei -80°C eingefroren (Zellzahlen in Tabelle 7-1, Seite 71). Zur Weiterverwendung wurden die Lysate für 15 min bei 37°C im Heizblock aufgetaut, 1:1 mit 70% Ethanol gemischt und wie die in vitro generierten Zellen auf die „MinElute“ Säule überführt. Alle nachfolgenden Schritte wurden nach Protokoll des Handbuchs von QIAGEN durchgeführt. Die RNA wurde dabei in 12 µl RNase-freiem Wasser eluiert, das Endvolumen des Eluats betrug 10 µl. Die Konzentration wurde am NanoDrop-ND-1000-Spektrophotometer bestimmt. Die RNA wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C im Gefrierschrank gelagert.

### 6.5.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Gesamt-RNA wurde mit dem NanoDrop-ND-1000-Spektrophotometer durchgeführt. Für die Messung sind bereits 1 µl RNA ausreichend. Die RNA-Konzentration wird durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260}$ ), dem Absorptionsmaximum der RNA, bestimmt. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht dabei 40 µg ssRNA/ml (engl.: single stranded RNA). Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$c(\mu\text{g RNA/ml}) = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

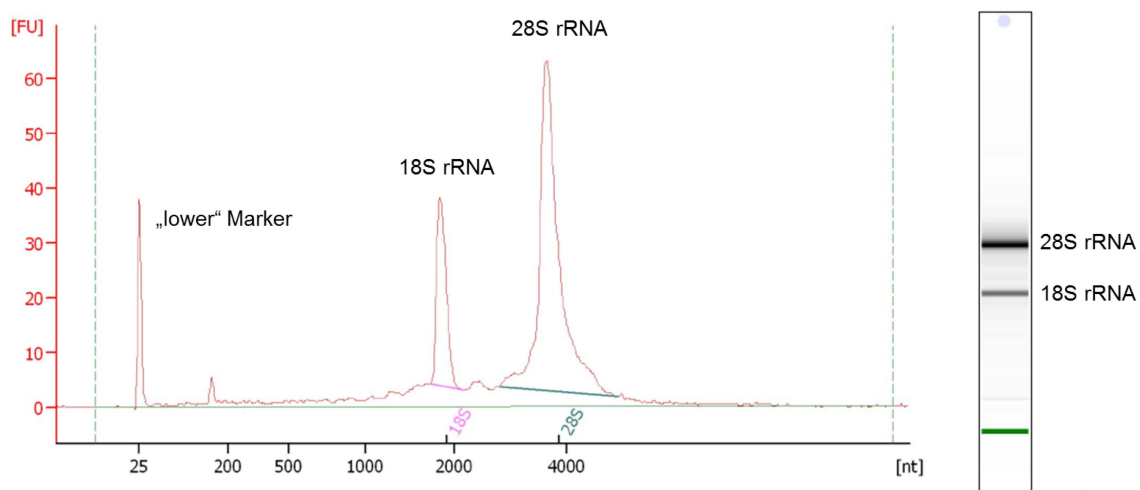
Das Absorptionsspektrum von 220 nm bis 350 nm kann außerdem graphisch dargestellt werden. In diesem Wellenlängenbereich können auch Lösungsmittel- und Proteinverunreinigungen sowie Salzkontaminationen der isolierten RNA detektiert werden. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) zur Absorption bei 280 nm ( $OD_{280}$ , Proteine) gibt die Reinheit der RNA an. Ein Wert von 2,0 spricht für eine reine, nicht kontaminierte RNA. Bei den Ex-vivo-Zellen wurde das Absorptionsspektrum durch erhöhte Salzkonzentrationen und die daraus resultierende starke Absorption bei 230 nm gestört. Die gemessenen RNA-Konzentrationen beruhten hauptsächlich auf den bei 230 nm detektierten Salzen und nicht auf der Absorption der RNA bei 260 nm. In diesem Fall wurden die am Agilent 2100 Bioanalyzer (siehe nachfolgender Abschnitt) bestimmten Konzentrationen verwendet.

### 6.5.3 Bestimmung der RNA-Integrität

Die Integrität der isolierten Gesamt-RNA wurde mit dem Agilent RNA 6000 Pico Kit am Agilent 2100 Bioanalyzer ermittelt. Mit Hilfe des Gerätes können, basierend auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese, bis zu 11 RNA-Proben gleichzeitig hinsichtlich der Größe, Konzentration und Integrität analysiert werden. Der Chip besitzt neben den 11 Vertiefungen für die Proben weitere Vertiefungen für ein mit Fluoreszenzfarbstoff versehenes Gel, eine Konditionierungslösung und für einen externen Standard. Im Glas des Chips sind Mikrokanäle eingebaut, die eine Verbindung der einzelnen Vertiefungen ermöglichen. Bei der Vorbereitung des Chips wird ein fluoreszenzmarkiertes Gel zugegeben, so dass der Chip einen geschlossenen elektrischen Kreis darstellt. Danach werden die Proben und der externe Standard in die Vertiefungen des Chips pipettiert. Sie bewegen sich über die Mikrokanäle im elektrischen Feld fort, werden automatisch in eine Trennkapillare weitergeleitet und dort entsprechend ihrer Fragmentgröße durch einen Molekularsiebeffekt aufgetrennt. Kleine Fragmente laufen dabei schneller als große Fragmente. Die im Gel enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren in die RNA und werden dann durch einen Laser und einen Fluoreszenzdetektor registriert. Ein „lower“ Marker wird zusätzlich in jeder

Probe mitgeföhren, um Daten des externen Standards mit den Proben vergleichen zu können und „Drift“ Effekte zu verhindern.

Das Gerät generiert aus den Daten sowohl ein Elektropherogramm als auch gelähnliche Bandengrafiken (Abbildung 6-2). Der externe Standard, der sogenannte RNA 6000 Pico Marker, dient als Referenz für die Datenanalyse und ermöglicht die Quantifizierung der RNA. Der Marker enthält 6 RNA-Fragmente mit bekannten Konzentrationen, deren Größe zwischen 0,2 bis 6 kb liegt (nicht gezeigt). Die Software vergleicht die Fläche unter den einzelnen Probenausschlägen mit denen der Markerfragmente und kann darüber die Konzentration und die ribosomalen RNA-Ausschläge erkennen. Die RNA-Integrität kann zum einen über das Verhältnis der 18S zur 28S rRNA („rRNA ratio“) bestimmt werden, wobei ein Wert von 2,0 ein optimaler Wert ist. Bei Degradation der RNA nimmt das Verhältnis ab. Ein genauerer und standardisierter Wert ist die sogenannte „RNA integrity number“ (RIN), welche das gesamte Elektropherogramm für die Berechnung der Integrität berücksichtigt. Ein RIN-Wert von 1 bedeutet, dass die RNA komplett degradiert oder die RNA-Konzentration zu gering für die Messung ist, eine RIN von 10 zeigt nicht degradierte RNA bester Qualität an.



**Abbildung 6-2: Elektropherogramm und Gelbanden einer am Agilent 2100 Bioanalyzer gemessenen Probe.** Der „lower“ Marker ist ein interner Standard, der die Verbindung der Proben-  
daten mit dem externen Standard ermöglicht. Die RNA-Konzentration wird durch Vergleich der Fläche  
unter den Ausschlägen des externen Standards mit der Summe der Ausschläge der Proben ermittelt.  
Der „lower“ Marker wird dabei nicht berücksichtigt. Durch das Verhältnis der 18S rRNA zu 28S rRNA  
Ausschläge kann das rRNA-Verhältnis („rRNA ratio“) berechnet werden, welches eine Aussage zur  
RNA-Integrität zulässt. Die RNA-Integrität wird aber i.d.R. über die standardisierte RIN (engl.: RNA  
integrity number), die das gesamte Elektropherogramm berücksichtigt, bestimmt.

Die Vorbereitung des Chips und Messung der Proben wurde gemäß Protokoll des Agilent RNA 6000 Pico Kits durchgeführt. Der externe Standard (Marker) wurde vor dem Gebrauch hitzedenaturiert (70°C) und in Aliquots bei -80°C aufbewahrt. Die Proben wurden für die Messung auf eine Konzentration von 2 ng/μl RNA eingestellt. Da bei den Proben der Ex-vivo-Zellen eine starke Salzkontamination vorlag und die am NanoDrop-ND-1000-Spektrophotometer berechneten Konzentrationen dadurch verfälscht wurden, wurden von

diesen Proben pauschal 1-2 µl mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 2,5 µl verdünnt. Für die Genexpressionsanalyse wurden Proben mit einem RIN-Wert > 5,6 verwendet, wobei die meisten Proben RIN-Werte zwischen 6 und 9 besaßen (siehe Tabelle 7-1 (Seite 71) und Tabelle 7-5 (Seite 91) im Ergebnisteil).

## **6.5.4 Genexpressionsanalyse mit der Affymetrix GeneChip®-Technologie**

### **6.5.4.1 Prinzip**

Die GeneChip®-Technologie von Affymetrix ermöglicht umfangreiche Genexpressionsstudien bei denen mehrere tausend Gene gleichzeitig analysiert werden können. Bei der Herstellung der Arrays werden auf einem Glasträger, der in winzige Zellen unterteilt ist, Oligonukleotide definierter Sequenz synthetisiert, die als Sonden („Probes“) zur Detektion fluoreszenzmarkierter Nukleinsäuren dienen. Die zu untersuchende cDNA hybridisiert dabei durch komplementäre Basenpaarung mit den Oligonukleotiden. Die Expression der Gene kann dann durch die Messung der Fluoreszenz detektiert werden. Die Analysen wurden unter Verwendung der Chipserie „Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST“ durchgeführt. Dieser Chip umfasst rund 765000 Probesets, die 29000 Gene des Menschen detektieren können. Pro Gen werden im Durchschnitt 26 Sonden eingesetzt, die verschiedene Bereiche des Gens erkennen.

Voraussetzung für die Anwendung der Affymetrix GeneChip®-Technologie ist die Umschreibung der RNA in cDNA. Diese wurde mit Hilfe eines Kits von NuGen durchgeführt (Abschnitt 6.5.4.2.1). Die cDNA wurde anschließend amplifiziert, fragmentiert und mit Biotin markiert. Im nächsten Schritt wurde sie auf den Affymetrix GeneChip® hybridisiert und fluoreszenzmarkiert (Abschnitt 6.5.4.2.2).

### **6.5.4.2 Durchführung**

#### **6.5.4.2.1 Synthese, Amplifikation, Fragmentierung und Biotinmarkierung der cDNA**

Die extrahierte Gesamt-RNA wurde mit dem „Ovation® PicoSL WTA System V2“ in Kombination mit dem „Encore® Biotin Module“ von NuGen gemäß Protokoll in cDNA umgeschrieben, amplifiziert, fragmentiert und mit Biotin markiert. Es wurden für jeden in vitro generierten Zelltyp 3 Replika-Pools, bestehend aus jeweils 5 verschiedenen Spendern, hergestellt und von jedem Pool 30 ng RNA für die cDNA-Synthese und Amplifikation verwendet (siehe Tabelle 7-5 (Seite 91) im Ergebnisteil). Die RNA von den aus RCC-Gewebe-Zellsuspensionen und PBMC sortierten Zelltypen wurde nicht gepoolt, so dass patienten- bzw. spenderindividuelle Replikate vorlagen. Von jedem Replikat wurden je nach Konzentration der Probe 0,5 – 15 ng RNA eingesetzt. Die cDNA wurde mit dem „MinElute Reaction Cleanup Kit“ gemäß Protokoll (mit der Mikrozentrifuge „Biofuge Pico“) aufgereinigt.

Die Reinheit und Konzentration der cDNA wurde am NanoDrop-ND-1000-Spektrophotometer bestimmt. Die Konzentrationen lagen zwischen 160 und 405 ng/µl. Das Volumen wurde mit einer Speedvac eingengt, um die Proben aufzukonzentrieren. Da die cDNA mit dem „Ovation® PicoSL WTA System V2“ synthetisiert und amplifiziert wurde, war es erforderlich, für die Fragmentierung und Markierung der cDNA jeweils die Hälfte der im „Encore® Biotin Module“ Handbuch angegebenen Volumina einzusetzen. Pro Probe wurden 12,5 µl cDNA, entspricht 2,5 µg cDNA, verwendet.

#### **6.5.4.2.2 Hybridisierung und Fluoreszenzmarkierung**

Die Hybridisierung und Fluoreszenzmarkierung wurde nach dem Protokoll des „GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit“ von Affymetrix durchgeführt. Dabei wurden die durch das „Encore® Biotin Module“ Handbuch empfohlenen Volumina für den Hybridisierungscocktail beachtet (Tabelle 6-6). Er bestand aus 85 µl Mastermix und 25 µl biotinmarkierter cDNA (23 ng/µl). 90 µl des Hybridisierungscocktails wurden durch eine kleine Öffnung auf den Affymetrix GeneChip® Human Gene ST 1.0 Array gegeben. Die Arrays wurden bei 45°C und 60 rpm im Hybridisierungssofen für 17 h inkubiert. Für das Waschen und Färben der Arrays wurde die „Fluidics Station 450“ in Kombination mit der „Affymetrix GeneChip® Command Console Software“ benutzt. Die Waschschrte wurden mit dem „Fluidics script FS450\_0007“ durchgeführt. Vor dem Scanschritt wurden überschüssige Flüssigkeiten von der Arrayoberfläche entfernt und auf die beiden im Array vorhandenen Öffnungen sogenannte „Touch Spots“ angebracht, die das Auslaufen der Flüssigkeit verhindern. Anschließend wurde der Array gescannt und die Genexpression (Transkriptlevel) als Fluoreszenzintensitäten mittels der Sonden erfasst. Die Daten wurden als sogenannte „cel

Files“ gespeichert und konnten dann mit spezieller Auswertesoftware bearbeitet werden (Abschnitt 6.5.4.3).

**Tabelle 6-6: Komponenten des Hybridisierungscocktails für den Affymetrix GeneChip®.**  
Entnommen aus dem Handbuch des Encore® Biotin Module Kits.

Komponente	Volumen pro Array	Finale Konzentration
Kontroll-Oligonukleotide B2 (3 nM)	1,9 µl	50 pM
20x Eukaryotische Hybridisierungskontrollen (bioB, bioC, bioD, cre)	5,5 µl	1,5; 5; 25; 100 pM
2x Hybridisierungspuffer	55 µl	1x
100% DMSO	11 µl	10%
Nuklease-freies Wasser	11,6 µl	N/A
biotinmarkierte cDNA	25 µl	
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>110 µl</b>	
<b>Volumen für Array</b>	<b>90 µl</b>	

N/A: not available

### 6.5.4.3 Auswertung der Daten

Die Microarray-Rohdaten wurden mit Hilfe des Statistikpakets „R/Bioconductor“ (bioconductor.org) prozessiert und analysiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Prozeduren mit den vorgegebenen Parametern aufgerufen.

#### 6.5.4.3.1 Qualitätskontrolle und Normalisierung der Daten

Für selbst erhobene Daten wurde eine initiale Qualitätskontrolle durchgeführt. Ausreißer konnten mit der Bioconductor-Erweiterung „arrayQualityMetrics“ detektiert werden. Insbesondere die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten als auch die Array-spezifischen MA-Graphen (M: „log ratio“; A: „mean average“) ließen bei keinem Array auf Probleme schließen, so dass letztendlich alle selbst angefertigten Arrays in die Analyse eingingen.

Expressionswerte für alle Arrays (interne und externe) wurden mit der RMA-Prozedur (engl.: Robust Multi-Array Average) innerhalb der entsprechenden Studiengruppen (In-vitro- und Ex-vivo-Datensätze bzw. verschiedene externe Datensätze) ermittelt. Diese beinhaltete auch eine Quantilennormalisierung zwischen den Arrays. Technische Kontrollprobesets wie auch Probesets, deren Werte zwischen den Arrays nicht variierten (Varianz = 0), wurden vor weiteren Analysen entfernt. Für den Fall, dass mehrere Probesets einem Gen zugeteilt waren, wurde nur jenes Probeset behalten, welches über die verschiedenen Arrays einer Studiengruppe die stärkste Variation zeigte.

Für Metaanalysen, in die Expressionswerte verschiedener Studiengruppen eingingen, wurden die Expressionwerte nach RMA-Normalisierung innerhalb der Gruppe mit der COMBAT-Methode<sup>107</sup> (library „inSilicoMerging“) angeglichen, um „Batch“-spezifische Effekte zu eliminieren. Hierfür wurden die Probesets über ihre assoziierte Entrez ID miteinander gepaart. Nur diejenigen Expressionsinformationen, die über ihre Entrez ID in allen Studiengruppen der jeweiligen Metaanalyse zu finden waren, wurden in weiterführenden Analysen verwendet. Ausgenommen in den Stripchart-Balkendiagrammen, wurden in den weiterführenden Analysen nur die Gene eingeschlossen, die robuste Expressionswerte im Sinne einer tatsächlichen Expression zeigten. Als sogenannte „informative Gene“ wurden die 50% der Gene deklariert, deren Varianz über die Arrays am größten war.

#### **6.5.4.3.2 Verwendete Analysemethoden**

##### **Dendrogramme:**

Aus den Expressionswerten der Gene der Arrays eines Zelltyps wurde der Median gebildet. Der euklidische Abstand zwischen verschiedenen Zelltypen wurde bestimmt und durch hierarchische Clusteranalyse mit „complete-linkage“ sortiert.

##### **Heatmaps:**

Aus den Expressionswerten der Gene der Arrays eines Zelltyps wurde der Median gebildet. Falls nicht anders ausgewiesen, wurden die Expressionswerte eines Gens über die dargestellten Zelltypen standardisiert (Mittelwert 0, Standardabweichung 1, Z-Score). Das Clustering von Genen und Zelltypen erfolgte wie unter „Dendrogramme“ aufgeführt.

##### **Bestimmung der Markergene:**

Von den Genen aller Arrays der eingeschlossenen Zelltypen wurden zunächst die „nearest shrunk centroids“ bestimmt. Hierfür wurde die Funktion „pamr.train“ des R-Pakets „pamr“ mit voreingestellten Parametern verwendet. Der erhaltene Klassifikator wurde einer Kreuzvalidierung unterzogen (Funktion „pamr.cv“ mit voreingestellten Parametern). Der Grenzwert wurde so bestimmt, dass eine Fehlklassifikationsrate von weniger als 20% resultierte und eine möglichst geringe Anzahl von ercDC\_RCC-Markergenen erhalten wurde.

##### **Bestimmung der differentiell exprimierten Gene:**

Die Expressionswerte der Arrays von ercDC\_RCC & infMΦ\_ascOvCa wurden auf differenzielle Genexpression gegenüber allen anderen Zelltypen getestet. Hierfür wurde ein lineares Modell erstellt, mit dem durch empirische Bayes-Moderierung des Standardfehlers gegen einen gemeinsamen Wert eine moderierte T-Statistik berechnet wurde (Paket „limma“). Die Korrektur für multiples Testen wurde mit der Methode nach Benjamini &

Hochberg durchgeführt. Gene mit einem korrigierten p-Wert  $< 0,05$  wurden als differenziell exprimiert kategorisiert.

**GO-Term-Anreicherungsanalyse:**

Hypergeometrische p-Werte für An- und Abreicherung differenziell exprimierter Gene in GO-Kategorien der Gruppe „Biologischer Prozess“ wurden mit der Funktion „hyperGTest“ aus dem Bioconductor-Paket „GOstats“ berechnet. Der Test erfolgte mit den informativen Genen als Hintergrund (universe) mit einem p-Wert-Grenzwert von 0,001.

**InnateDB-Signalweganalyse:**

Die Anreicherung der differentiell exprimierten Gene innerhalb der Gensets (Signalwege) wurde mit den Standardeinstellungen der InnateDB Software<sup>108</sup>, dem empfohlenen Algorithmus (mit hypergeometrischer Statistik) und der p-Wert-Korrektur nach Benjamini & Hochberg ermittelt. Informative Gene dienten als Hintergrund.

**Gene Set Enrichment-Analyse (GSEA):**

Die GSEA (engl.: Gene Set Enrichment Analysis) wurde mit dem GSEA 1.0 R-Skript des Broad Institutes mit den vorgegebenen Parametern erstellt<sup>109</sup>. Die Gensets entsprachen den Datenbanken des Broad Institutes in der Version 4.0.

**GeneMANIA-Netzwerkanalyse:**

Die funktionelle Netzwerkanalyse mit der GeneMANIA Software<sup>110</sup> wurde basierend auf den ercDC\_RCC-Markergenen mit den vom System vorgegebenen Standardeinstellungen (Assoziationsdaten, automatische Netzwerk-Gewichtungsmethode, Anzeige verwandter Gene) durchgeführt.

**Modul-Eigengen-Korrelationsanalyse:**

Aus den Expressionswerten der Gene der Arrays eines Zelltyps wurde der Median gebildet. Mit Hilfe der Funktion „moduleEigengenes“ des R-Pakets „WGCNA“<sup>111</sup> wurden für die in Xue et al.<sup>112</sup> beschriebenen Module die Eigengen-Werte der Gene berechnet und gegen die in der Analyse verwendeten Zelltypen korreliert (Korrelation nach Pearson).



## **6.6 Statistische Auswertung der In-vitro-Funktionsanalysen und Stripchart-Balkendiagramme**

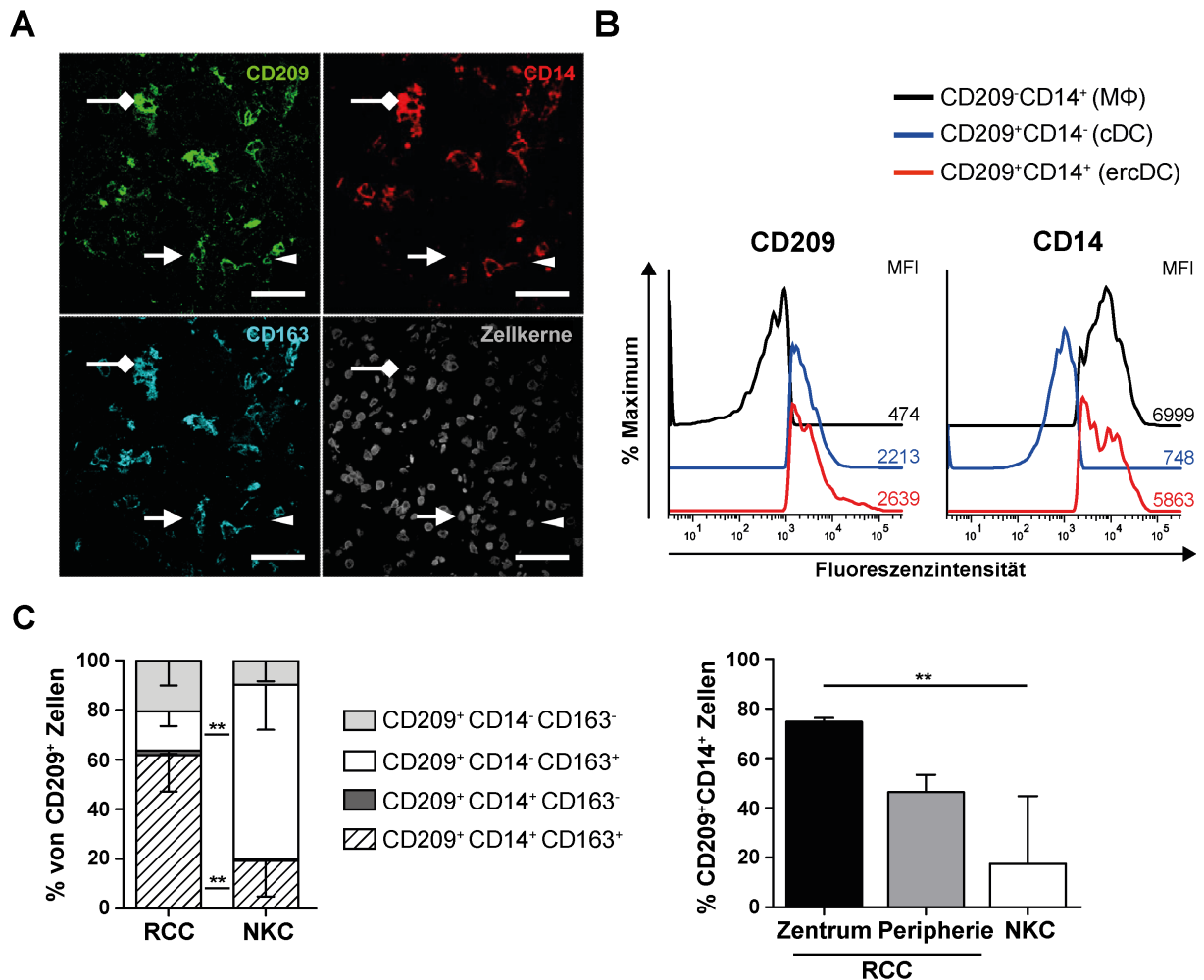
Die statistischen Berechnungen der Signifikanzwerte in den einzelnen Experimenten wurden mit Hilfe des Programms „GraphPad Prism 6“ durchgeführt. Die Signifikanzen zu den Genexpressionswerten in den Stripchart-Balkendiagrammen wurden basierend auf den normalverteilten log<sub>2</sub>-Expressionswerten und nicht den linearen Expressionswerten berechnet, da die log<sub>2</sub>-Expressionswerte bei parametrischen statistischen Tests (wie z.B. dem t-Test) eine bessere statistische Aussagekraft haben. Das Signifikanzniveau wurde mit \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) bzw. \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) gekennzeichnet. Nicht-signifikante Unterschiede wurden als „ns“ (nicht signifikant) markiert. Bei den In-vitro-Funktionsanalysen wurde mit Hilfe des D’Agostino-Pearson Omnibus Tests kontrolliert, ob eine Normalverteilung der Proben vorliegt. Beim Vorliegen einer Normalverteilung (= parametrische Tests) wurde beim Vergleich von zwei gepaarten Proben der gepaarte „Student’s t-Test“ (zweiseitig) verwendet. Bei nicht gepaarten Proben wurde der „Welch’s t-Test“ (zweiseitig) angewandt. Lag keine Normalverteilung vor (= nicht-parametrische Tests), wurde der „Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Test“ (zweiseitig) für gepaarte Proben durchgeführt. Für den Vergleich von mehr als zwei gepaarten Stichproben, die nicht normalverteilt waren (Apoptoseinduktion, Abbildung 7-8 (Seite 66)), wurde der nicht-parametrische Friedman Test angewandt.

## 7 ERGEBNISSE

### 7.1 CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> myeloische Zellen im RCC

Mit dem Ziel, das myeloische Infiltrat im RCC zu beschreiben, wurden Multiparameter-Immunfluoreszenzfärbungen von klarzelligen RCC-Geweben durchgeführt (siehe Figel, Brech et al.<sup>101</sup>). CD209/DC-SIGN wurde als Marker für interstitielle DC ausgewählt, da es für die Antigenprozessierung und die Stimulation von T-Zellen essentiell ist<sup>113</sup>. CD209/DC-SIGN ist im humanen System auch als Marker für kreuzpräsentierende DC beschrieben<sup>114</sup>. Zur Identifizierung der MΦ wurde CD14 verwendet<sup>115</sup>. Zusätzlich wurde der Scavenger-Rezeptor CD163 gefärbt, welcher von geweberesidenten MΦ und im Blut zirkulierenden DC-Subtypen exprimiert wird<sup>116,117</sup>. CD163 spielt u.a. bei inflammatorischen Reaktionen, wie sie für das RCC beschrieben sind<sup>95</sup>, eine Rolle. Bei der Auswertung der 3-Farben-Färbung zeigte sich überraschend, dass der überwiegende Teil der CD209<sup>+</sup> Zellen, die als DC vermutet wurden, auch die Marker CD14 und CD163 koexprimierte (Abbildung 7-1A)<sup>101</sup>. Die gleichzeitige Expression von CD209/DC-SIGN und CD14 wurde mittels FACS-Analyse bestätigt, wobei hierzu RCC-Gewebe-Zellsuspensionen verwendet wurden (Abbildung 7-1B). Dabei konnte weiterführend zur histologischen Analyse gezeigt werden, dass CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Zellen diese Marker jeweils vergleichbar oder stärker exprimieren als die entsprechenden einfachpositiven CD209<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> DC bzw. CD209<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> MΦ.

Der tripelpositive CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> Zelltyp stellte im RCC die größte Subpopulation der CD209<sup>+</sup> Zellen dar (Mittelwert (MW) 62%) (Abbildung 7-1C, links). Um festzustellen, ob die Koexpression der Marker durch den Tumor bedingt ist, wurden korrespondierende, tumorfreie Bereiche der tumortragenden Niere (NKC, engl.: nontumor kidney cortices) derselben Patienten analysiert. Es zeigte sich, dass der tripelpositive Zelltyp im NKC seltener vorkam (MW 19%). Aufgrund ihrer Anreicherung im RCC bezeichneten wir die CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> Zellen als „enriched-in-renal-carcinoma“ DC (ercDC). Einige Gewebeproben deckten den Übergangsbereich von Tumor und NKC ab. Das erlaubte zusätzlich zu den Proben aus dem Tumorzentrum bzw. dem NKC eine Quantifizierung der ercDC im Randbereich des Tumors an der Grenze zur Pseudokapsel (RCC-Peripherie, siehe Abbildung 11-1 im Anhang, Seite 157). Es zeigte sich, dass ercDC im Zentrum des Tumors am häufigsten vorkamen (Median 75%) und graduell in der Anzahl von der Tumorperipherie (Median 46%) zum NKC (Median 18%) abnahmen (Abbildung 7-1C, rechts)<sup>101</sup>.



**Abbildung 7-1: Myeloische Zelltypen im RCC.** **A)** Konfokalmikroskopische Aufnahme eines 3-fach gefärbten RCC-Gewebes (Vergrößerung: 630x, Skala = 50µm). Die Fluoreszenzkanäle für CD209 (grün), CD14 (rot), CD163 (blau) und Zellkerne (grau) sind getrennt dargestellt. Pfeilspitze: CD209-einfachpositive Zellen (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD163<sup>-</sup>), Pfeil mit dreieckiger Spitze: CD209<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD163<sup>+</sup> Zellen, Pfeil mit viereckiger Spitze: CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> Zellen (ercDC). MΦ (CD14<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup>) sind in diesem Ausschnitt nicht zu sehen. Die Aufnahme ist eine Vereinigung der Bilder aus 3 optischen Z-Ebenen mit einem Abstand von jeweils 0,8 µm. **B)** Durchflusszytometrische Analyse von CD209 und CD14 auf CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> (MΦ, schwarz), CD209<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>(cDC, blau) und CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> (ercDC, rot) Zellen. Dazu wurden RCC-Gewebe-Zellsuspensionen (siehe Abschnitt 6.1.7.4) mit der in Tabelle 6-2 angegebenen Antikörperkombination gefärbt. Die Zahlen sind die mediane Fluoreszenzintensität (MFI). **C)** Quantifizierte CD209<sup>+</sup> Zelltypen in den 3-fach gefärbten Geweben. Der Tumor wurde in zwei verschiedene Regionen, das Tumorzentrum und die Tumorperipherie, eingeteilt (siehe Abbildung 11-1 im Anhang). Das linke Diagramm zeigt die prozentuale Verteilung der verschiedenen CD209<sup>+</sup> Subtypen im RCC-Zentrum und NKC (n = 7). Das rechte Diagramm zeigt den prozentualen Anteil von CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Zellen im RCC-Zentrum (n = 11), RCC-Peripherie (n = 6) und NKC (n = 8). Weitere Informationen in Figel, Brech et al.<sup>101</sup>

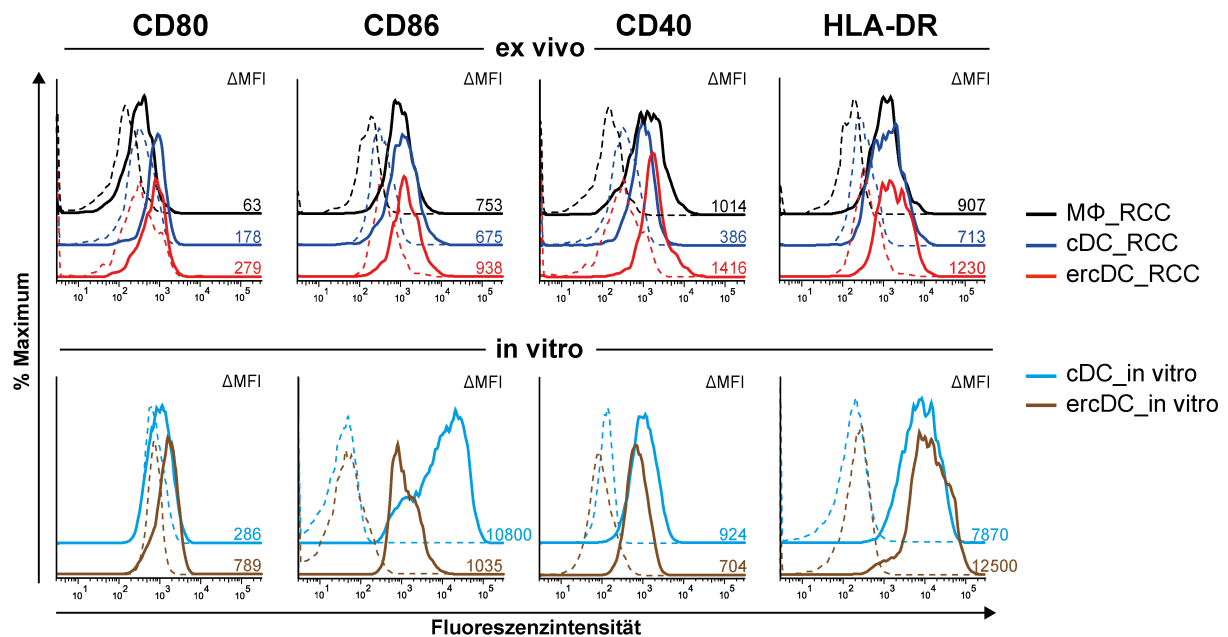
## 7.2 In-vitro-Modell zur Generierung von ercDC

Aus der Beobachtung, dass der Anteil der CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> ercDC abhängig von der Geweberegion variierte, schlossen wir, dass eventuell regionale und insbesondere tumorassoziierte Faktoren die Koexpression der Marker induzierte. Daher testeten wir in einem In-vitro-Modell den Einfluss der von Tumorzellen produzierten Faktoren auf die Differenzierung myeloischer Zellen. Da beschrieben ist, dass die im Gewebe und insbesondere die in der Niere vorkommenden DC aus Monozyten hervorgehen<sup>118</sup>, wurden Monozyten aus dem Blut gesunder Spender isoliert und mit RCC-26-konditioniertem Medium (RCC-26-CM), welches lösliche Tumorfaktoren enthielt, inkubiert. Die anschließende FACS-Analyse zeigte, dass der ercDC-Phänotyp mit der Koexpression von CD209/DC-SIGN, CD14 und CD163 durch das RCC-26-CM induziert wurde (Figel, Brech et al.<sup>101</sup>). Eine genauere Analyse der im konditionierten Medium enthaltenen Zytokine und Chemokine (Bioplex) ergab, dass nur bei gleichzeitiger Anwesenheit der Zytokine IL-6, CXCL8/IL-8 und VEGF der komplette Phänotyp mit der Koexpression von CD209/DC-SIGN, CD14 und CD163 induziert wurde<sup>101</sup>.

Zur Abgrenzung der in vitro generierten ercDC von den im RCC-Gewebe vorkommenden ercDC werden von nun an die Bezeichnungen „ercDC\_in vitro“ bzw. „ercDC\_RCC“ verwendet. Parallel dazu werden die durch Behandlung der Monozyten mit IL-4 und GM-CSF in vitro generierten cDC als „cDC\_in vitro“ bezeichnet.

## 7.3 Phänotypischer Vergleich der ercDC aus dem RCC mit den in vitro generierten ercDC

Um die Vergleichbarkeit der in vitro generierten ercDC mit den ercDC\_RCC weitergehend zu analysieren, wurde die Anwesenheit mehrerer, v.a. mit DC-Funktion assoziierter Oberflächenmarker durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 7-2, Seite 58). CD80 konnte sowohl auf ercDC\_RCC (Abbildung 7-2 oben, ex vivo, rotes Histogramm) als auch auf ercDC\_in vitro (Abbildung 7-2 unten, in vitro, braunes Histogramm) im Vergleich zu den parallel analysierten cDC bzw. MΦ in größerer Menge detektiert werden. Auch weitere Kostimulationsmoleküle, CD86 und CD40 sowie das MHC-II-Molekül HLA-DR waren auf den ercDC\_RCC deutlich vorhanden, mit Intensitäten, die jeweils höher waren als die der cDC\_RCC (Abbildung 7-2 oben, ex vivo, dunkelblaues Histogramm) und MΦ\_RCC (Abbildung 7-2 oben, ex vivo, schwarzes Histogramm) aus demselben Gewebe. Auch diese Marker, bis auf CD86, wurden auf den entsprechenden in vitro generierten ercDC mindestens genauso stark exprimiert wie auf cDC\_in vitro (Abbildung 7-2 unten, in vitro, hellblaues Histogramm).



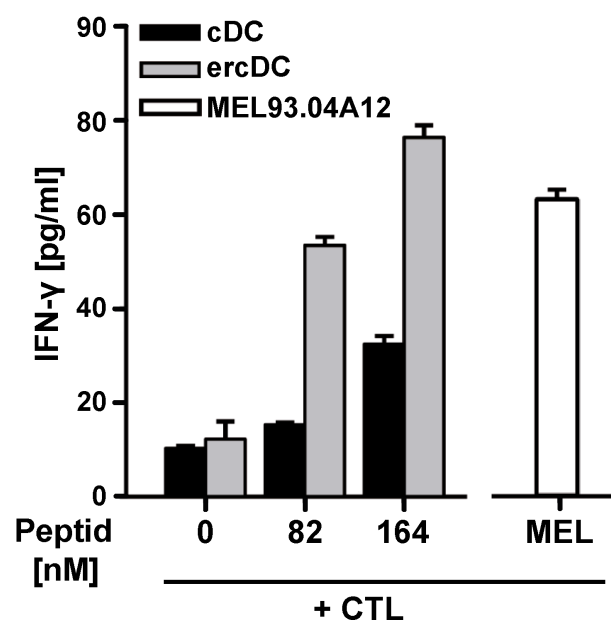
**Abbildung 7-2: Durchflusszytometrische Analyse von Kostimulationsmolekülen und dem MHC-II-Molekül HLA-DR auf myeloischen Zelltypen aus dem RCC-Gewebe und in vitro generierten myeloischen Zelltypen.** Fluoreszenzintensitäten der Kostimulationsmoleküle CD80, CD86 und CD40 sowie von HLA-DR auf den innerhalb der RCC-Gewebe-Zellsuspension elektronisch ausgewählten Ex-vivo-Zelltypen CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> MΦ\_RCC (schwarz), CD209<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> cDC\_RCC (dunkelblau), CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> ercDC\_RCC (rot) und den in vitro generierten cDC (hellblau) und ercDC (braun). Jeweils in derselben Farbe, jedoch mit gestrichelter Linie, sind die Histogramme der zugehörigen Isotypkontrollen gezeigt. Die Zahlen sind die Differenz der MFI (mediane Fluoreszenzintensität) zwischen dem spezifischen Antikörper und dem jeweiligen Isotyp-Antikörper (ΔMFI). Gezeigt ist jeweils ein exemplarisches Beispiel. Anzahl der Experimente: ex vivo: n(CD80) = 5; n(CD86) = 5; n(CD40) = 8; n(HLA-DR) = 10; in vitro: n(CD80) = 6; n(CD86) = 5; n(CD40) = 6; n(HLA-DR) = 10

Die Expression von Kostimulationsmolekülen und HLA-DR auf ercDC bestärkte die Verwandtschaft der ercDC zu den DC. Die gleichzeitige Anwesenheit von CD14 und CD163 wies allerdings auch auf MΦ-Eigenschaften hin. Insgesamt passten diese ersten Beobachtungen zu der aufkommenden Diskussion, dass DC und MΦ möglicherweise keine scharf abgrenzbaren Populationen sind, sondern eher unterschiedliche Polarisationsformen innerhalb des Kontinuums des mononukleären Phagozytensystems (MPS)<sup>6,12</sup>.

#### 7.4 Funktionelle Charakteristika der ercDC

Da nach den phänotypischen Analysen unklar blieb, ob ercDC eher den DC oder den MΦ zuzuordnen sind, wurden mit Hilfe der in vitro generierten ercDC verschiedene DC-Funktionen abgefragt. Die ercDC aus dem RCC konnten aufgrund geringer Zellzahlen nicht für Funktionsversuche verwendet werden. Klassischerweise werden DC bislang durch ihre hohe Potenz zur Antigenpräsentation und die Stimulation naiver T-Zellen sowie durch die Fähigkeit zur Aktivierung CD8<sup>+</sup> CTL durch Antigenkruzpräsentation von den MΦ unterschieden<sup>6,12,119</sup>.

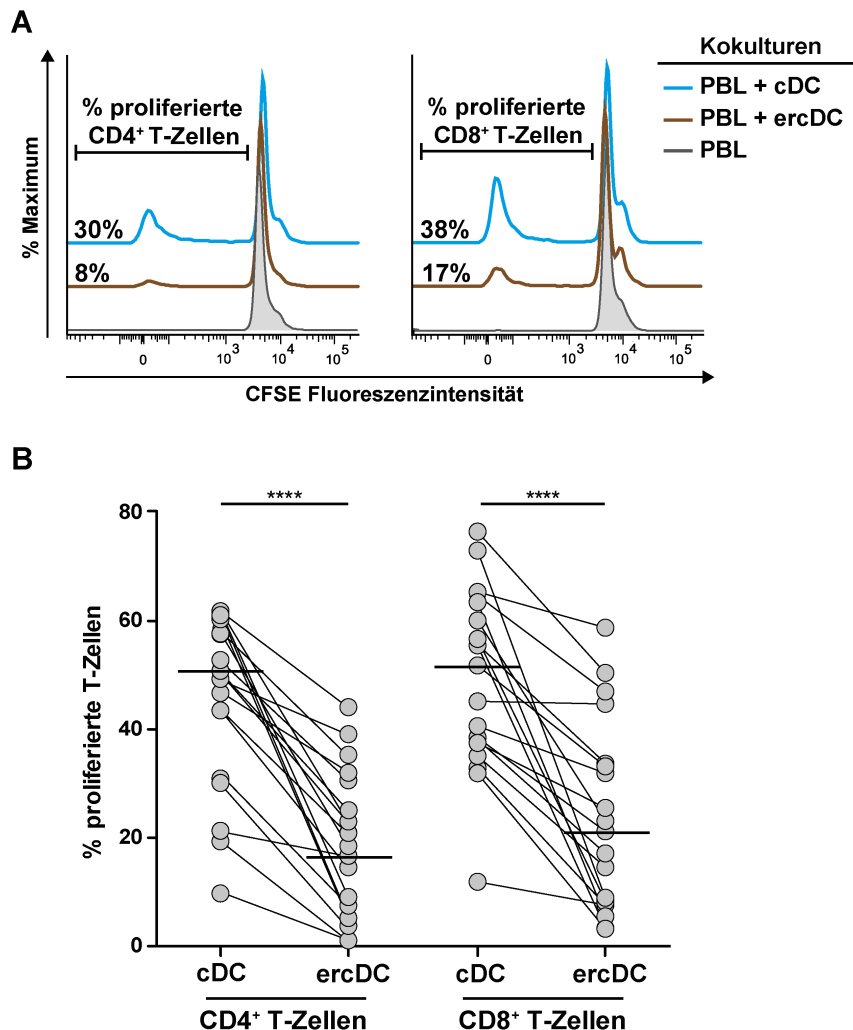
Die Kapazität der in vitro generierten cDC und ercDC zur Kreuzpräsentation von Antigenen auf MHC-I-Molekülen wurde mit Hilfe eines etablierten Systems, das aus HLA-A2 restringierten MART (engl.: melanoma antigen recognized by T cells)-spezifischen CTL (CTL-A42) und einem N-terminal verlängerten pep70-MART-Peptid bestand, getestet (siehe Figel, Brech et al.<sup>101</sup>). Die Aufnahme und Prozessierung des verlängerten Peptids durch die DC ist Voraussetzung für die Epitopräsentation und T-Zell-Stimulation. Nach der Erkennung des Epitops sezernieren die aktivierten CTL IFN- $\gamma$ . Die Messung des IFN- $\gamma$  zeigte, dass ercDC sogar eine stärkere Aktivierung der CTL-MART induzierten als cDC (Abbildung 7-3). Offensichtlich konnten ercDC die für cDC charakteristische Funktion der Antigenkreuzpräsentation ausüben.



**Abbildung 7-3: IFN- $\gamma$ -Sekretion durch MART-spezifische CTL bei Kokultur mit pep70-MART inkubierten cDC und ercDC.** Die cDC bzw. ercDC wurden für 1 h mit den angegebenen Konzentrationen des MART-Peptids inkubiert und anschließend für 24 h mit MART-spezifischen CTL (CTL-A42) kokultiviert. Durch die Bestimmung der Konzentration des T-Effektor-Zytokins IFN- $\gamma$  in den Kokulturüberständen mittels ELISA konnte die Effektivität der Kreuzpräsentation gemessen werden. Kokulturen von CTL-A42 mit der Melanomzelllinie MEL 93.04A12, die natürlicherweise das MART-Peptid auf HLA-A2 präsentiert, dienten als Positivkontrolle. Die Balken zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung von zwei Replikaten. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. Weitere Informationen in Figel, Brech et al.<sup>101</sup>

Weiterführend wurde getestet, ob ercDC T-Zell-Proliferation induzieren können. Hierfür wurde eine allogene T-Zell-Stimulation durchgeführt. In vitro generierte ercDC bzw. cDC wurden mit allogenen, CFSE-gefärbten PBL im Verhältnis 1:10 kokultiviert. Nach 5 Tagen wurde die Konzentration des CFSE-Farbstoffs in CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Wie in Abbildung 7-4 (Seite 60) zu sehen, wurden sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen von ercDC schlechter zur Proliferation angeregt als von cDC. Im Median proliferierten in Kokulturen mit ercDC nur 17% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und 21% der

CD8<sup>+</sup> T-Zellen, während es in Kokulturen mit cDC bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen 51% und den CD8<sup>+</sup> T-Zellen 52% waren (Abbildung 7-4B).



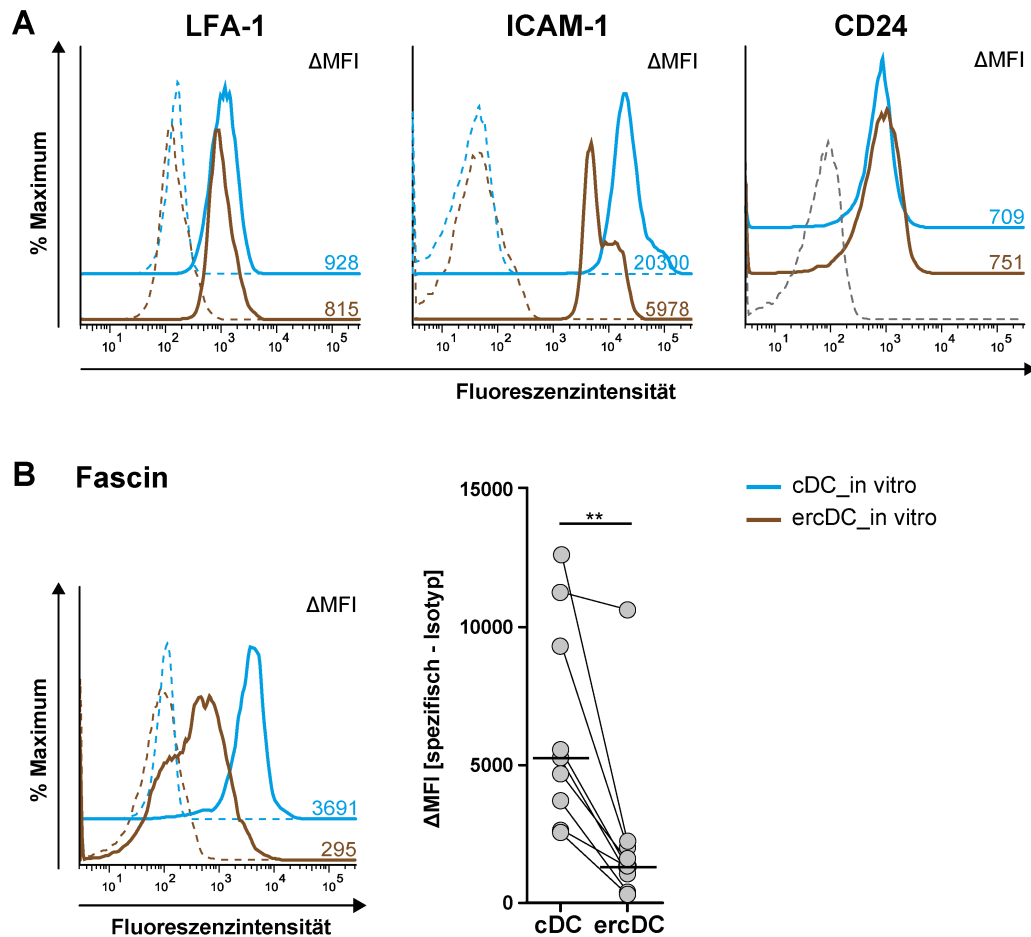
**Abbildung 7-4: Proliferation allogener naiver CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit in vitro generierten cDC und ercDC.** Die cDC bzw. ercDC wurden für 5 Tage mit CFSE-markierten allogenen PBL im Verhältnis 1:10 kokultiviert und anschließend die CFSE-Fluoreszenz der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. **A)** CFSE-Histogramme eines repräsentativen Experiments von insgesamt 19. Innerhalb der CD3<sup>+</sup> Population wurden die CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausgewählt. Die schwach CFSE-positive Population entspricht den proliferierten Zellen. PBL, die ohne APC kultiviert wurden, dienten als Kontrolle. **B)** Zusammenfassende Darstellung aller Experimente. Ein Symbol entspricht einem Experiment, die jeweils zusammengehörenden Experimente sind durch eine Linie verbunden. Die horizontale Linie ist der Median. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des gepaarten Student's t-Test bestimmt.

Als Ursachen für die schwache Kapazität der ercDC T-Zellen zur Proliferation anzuregen, wurden folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen: i) die Abwesenheit von T-Zell-aktivierenden Molekülen, MHC-Molekülen und Adhäsionsmolekülen, ii) die Präsenz inhibitorischer Moleküle, iii) das Fehlen aktivierender Zytokine und/oder die gleichzeitige Anwesenheit inhibitorischer Zytokine, iv) die Induktion von T-Zell-Apoptose. Wie bereits gezeigt (siehe Abbildung 7-2, Seite 58), exprimierten die in vitro generierten ercDC kostimulatorische Moleküle und das MHC-II-Molekül HLA-DR, so dass deren Mangel als

Ursache unwahrscheinlich erschien. Für die T-Zell-Stimulation ist die stabile Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen der DC und der T-Zelle eine wichtige Voraussetzung. Integrine und Integrinbindeproteine, wie LFA-1 und ICAM-1, spielen bei der Zelladhäsion eine wichtige Rolle<sup>120</sup>. Auch Glykoproteine, beispielsweise CD24, können den Zellkontakt vermitteln. CD24 bindet an P-Selektin auf T-Zellen und wirkt kostimulatorisch<sup>33</sup>. Askew et al.<sup>121</sup> beobachteten, dass die Inhibition von CD24 zu einer drastischen Reduktion der Proliferation naiver T-Zellen führt. Dies verdeutlicht die Relevanz dieses Moleküls für die T-Zell-Stimulation.

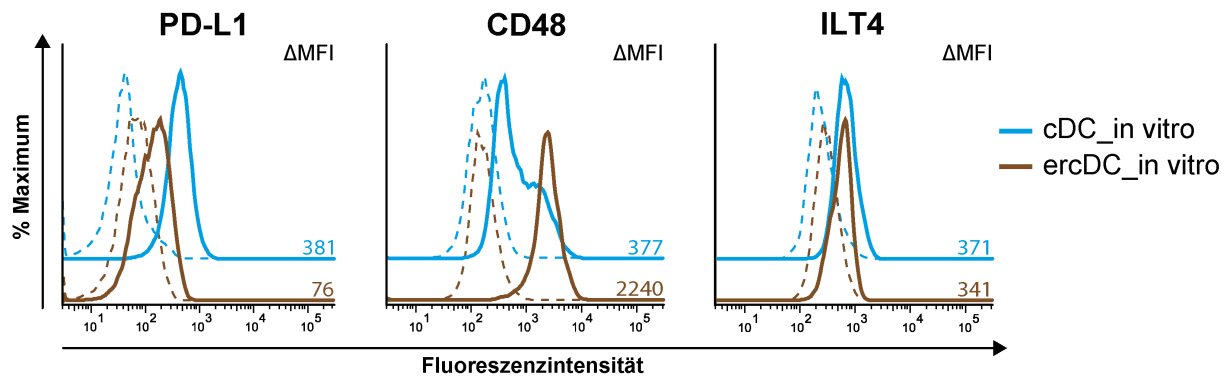
Die FACS-Analysen ergaben, dass ercDC LFA-1 und CD24 in vergleichbarer Stärke exprimierten wie cDC (Abbildung 7-5A, Seite 62). ICAM-1 wurde von beiden Zelltypen stark exprimiert, von ercDC etwas schwächer. Das Aktin-bündelnde Protein Fascin stabilisiert den APC:T-Zell-Kontakt und fördert dadurch die T-Zell-Proliferation<sup>122</sup>. In Abbildung 7-5B ist auf der linken Seite ein repräsentatives Beispiel der durchflusszytometrischen Bestimmung des intrazellulären Fascins in cDC und ercDC gezeigt, rechts davon sind alle Experimente zusammengefasst. Es ist deutlich zu sehen, dass ercDC wesentlich weniger intrazelluläres Fascin exprimierten als cDC. Die schwache Expression von Fascin, nicht aber ein Fehlen von Adhäsionsmolekülen könnten zu der schwachen T-Zell-Stimulationsfähigkeit der ercDC beitragen.





**Abbildung 7-5: Durchflusszytometrische Analyse von Adhäsionsmolekülen und Fascin in vitro generierter cDC und ercDC.** **A)** Fluoreszenzintensitäten des Integrins LFA-1, des Integrinbindeproteins ICAM-1 sowie des Glycoproteins CD24 auf cDC\_in vitro (hellblau) bzw. ercDC\_in vitro (braun). Jeweils in derselben Farbe, jedoch mit gestrichelter Linie, sind die Histogramme der zugehörigen Isotypkontrollen gezeigt. Bei der Färbung von CD24 wurde die Maus Fibroblastenzelllinie L929-CD40L als Kontrolle verwendet (grau gestrichelte Linie). Die Zahlen in A und B geben die Differenz der MFI (mediane Fluoreszenzintensität) zwischen dem spezifischen und dem jeweiligen Isotyp-Antikörper (gestrichelte Linie) an ( $\Delta$ MFI). **B)** Links: Histogramm eines repräsentativen Experiments von insgesamt 9 (links), das die Fluoreszenzintensitäten des intrazellulären Proteins Fascin in cDC\_in vitro (hellblau) bzw. ercDC\_in vitro (braun) zeigt sowie die Zusammenfassung aller Experimente (rechts). Die horizontale Linie ist der Median. Ein Symbol entspricht einem Experiment. Die jeweils zusammengehörenden Experimente sind durch eine Linie verbunden. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Tests ermittelt.

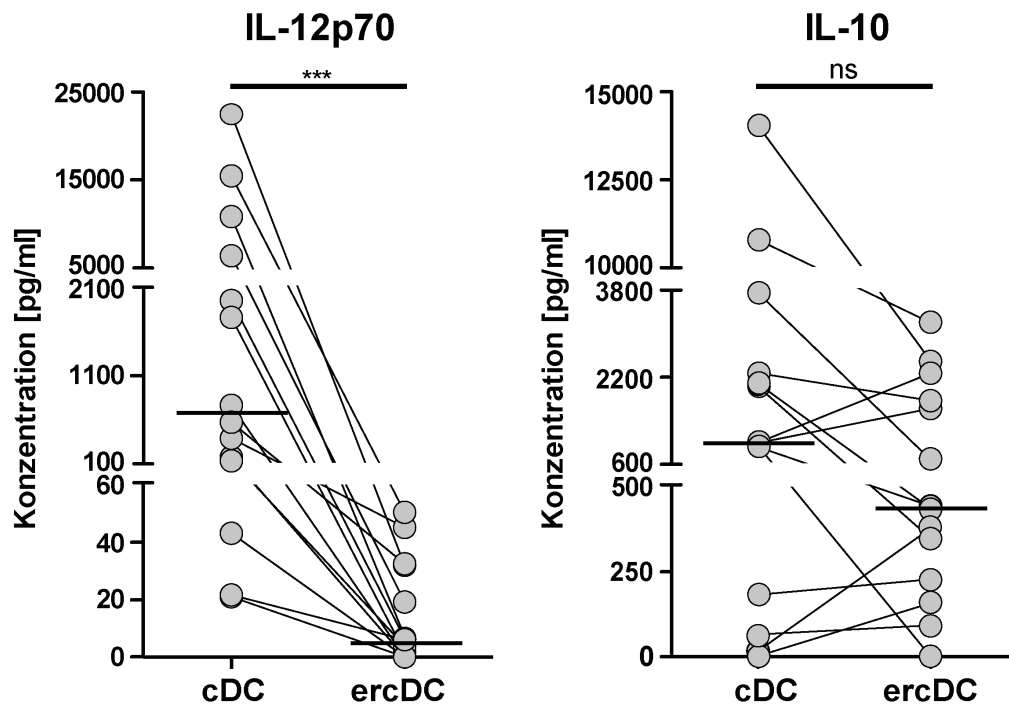
Weiterhin wurde die Expression der inhibitorischen Moleküle PD-L1, CD48 und ILT4 durchflusszytometrisch untersucht. Die Interaktion des koinhibitorischen Proteins PD-L1 mit PD-1 blockiert die Proliferation und Zytokinproduktion von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen<sup>123</sup>. CD48 bindet an den inhibitorischen Liganden 2B4, der von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen exprimiert wird<sup>124,125</sup>. ILT4 ist ein charakteristischer Marker tolerogener DC, die T-Zellen anergisieren und T<sub>reg</sub> induzieren<sup>126</sup>. Die ercDC besaßen weniger PD-L1, mehr CD48 und gleich viel ILT4 im Vergleich zu cDC (Abbildung 7-6, Seite 63).



**Abbildung 7-6: Durchflusszytometrische Analyse von inhibitorischen Molekülen auf in vitro generierten cDC und ercDC.** Fluoreszenzintensitäten der Marker PD-L1, CD48 und ILT4 auf cDC\_in vitro (hellblau) und ercDC\_in vitro (braun). Jeweils in derselben Farbe, jedoch mit gestrichelter Linie, sind die Histogramme der zugehörigen Isotypkontrollen gezeigt. Die Zahlen geben die Differenz der MFI (mediane Fluoreszenzintensität) zwischen dem spezifischen und dem jeweiligen Isotyp-Antikörper (gestrichelte Linie) an ( $\Delta$ MFI).

Um die Frage nach dem möglichen Fehlen aktivierender bzw. der Präsenz inhibierender Zytokine zu klären, wurde mit Hilfe eines sogenannten Signal-3-Versuchs<sup>104</sup> die stimulierte Sekretion des bioaktiven IL-12p70 sowie IL-10 untersucht.

IL-12 induziert die Differenzierung naiver T-Zellen zu IFN- $\gamma$ -produzierenden T<sub>H</sub>1-Zellen und unterstützt die zytotoxische Aktivität von CTL und NK-Zellen<sup>50,51,52</sup>. IL-10 ist der natürliche Gegenspieler des proinflammatorischen IL-12. Es wirkt antiinflammatorisch und dient dazu selbstzerstörende, überschießende Immunantworten einzudämmen<sup>53</sup>. Zur Analyse der Zytokine wurden ercDC bzw. cDC mit der Mausfibroblastenzelllinie L929-CD40L, die stabil humanes CD40L exprimiert, kokultiviert. Über CD40L wird ein T-Zell-Kontakt stimuliert. Wie in Abbildung 7-7 (Seite 64) zu sehen, sezernierten ercDC signifikant weniger IL-12p70 im Vergleich zu cDC. Bei IL-10 gab es keinen signifikanten Unterschied, ercDC sezernierten tendentiell etwas weniger IL-10 als cDC.

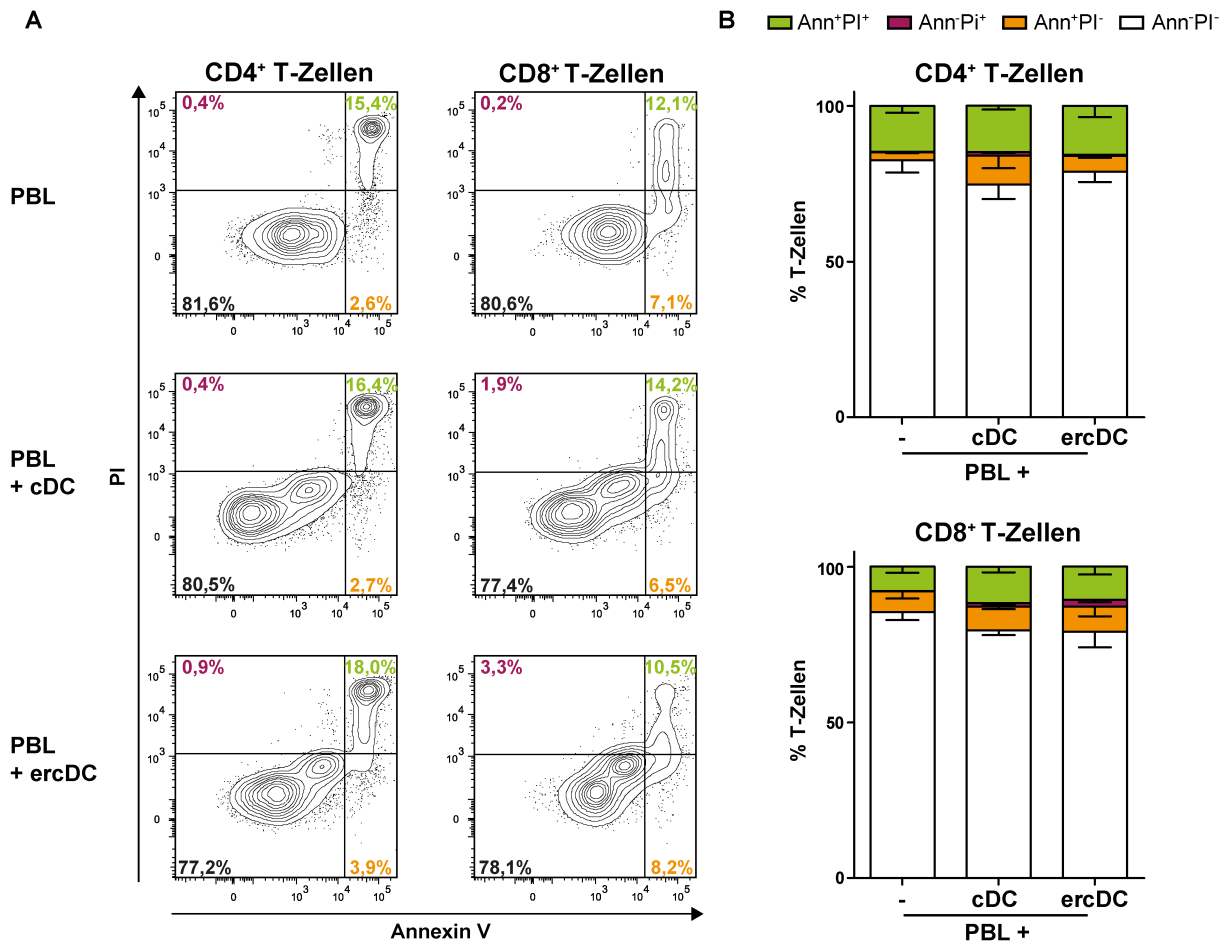


**Abbildung 7-7: IL-12p70- und IL-10-Sekretion von in vitro generierten cDC und ercDC nach Stimulation mit CD40L.** Die cDC und ercDC wurden für 24 h in einem Verhältnis von 1:2,5 mit L929-CD40L-Zellen kokultiviert und danach die Zytokinkonzentrationen in den Überständen mittels ELISA gemessen. Ein Symbol entspricht einem Experiment, die zusammengehörenden Experimente sind durch Linien verbunden. Die horizontale Linie ist der Median. Als Kontrolle dienten unstimulierte, ohne L929-CD40L-Zellen kultivierte APC. Deren Zytokinkonzentrationen (IL-12p70: 0-18,5 pg/ml; IL-10: 0-19,6 pg/ml) wurden von den jeweiligen stimulierten Proben abgezogen. n = 14. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Wilcoxon-matched-pairs-signed-rank-Tests ermittelt.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die geringe IL-12p70-Sekretion der ercDC dazu beiträgt, dass T-Zellen nicht optimal zur Proliferation angeregt werden. Im Rahmen einer Masterarbeit wurde getestet, ob die Supplementation der T-Zell-Stimulationskokulturen mit rhIL-12 bzw. die Blockade von IL-10 und TGF- $\beta$  die T-Zell-Proliferation verbessert (Radich, Masterarbeit, 2012<sup>127</sup>). Es zeigte sich, dass durch Zugabe von rhIL-12 zu den ercDC:T-Zell-Kokulturen die T-Zell-Proliferation gesteigert werden konnte (CD4<sup>+</sup> T-Zellen Verdopplung, CD8<sup>+</sup> T-Zellen Verdreifachung der Proliferation bei 1000 pg/ml rhIL-12), allerdings nicht auf das durch cDC induzierte Niveau. Die Blockade von IL-10 und TGF- $\beta$  konnte die Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen verdoppeln, bewirkte jedoch keine Steigerung der Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dies legte nahe, dass ein Mangel von IL-12p70 zwar eine wichtige Rolle zu spielen scheint, allerdings nicht der alleinige Auslöser für die schwache T-Zell-Proliferationsinduktion der ercDC ist.

Abschließend wurde auch getestet, ob die Induktion von T-Zell-Apoptose eine Erklärung für die schlechte T-Zell-Proliferation sein könnte. MDSC beispielsweise inhibieren T-Zellen, indem sie deren Apoptose induzieren<sup>128</sup>. Ob T-Zell-Apoptose in Kokulturen mit ercDC auftrat, wurde durch Anfärbung der T-Zellen mit den Farbstoffen Annexin V und PI nach 5-tägiger Kokultur und anschließender durchflusszytometrischer Messung geklärt. Mit Hilfe der beiden Farbstoffe konnten vier verschiedene T-Zell-Populationen unterschieden werden: vitale

Annexin<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> (Ann<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>) Zellen, Ann<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> Zellen, die sich in der frühen Phase der Apoptose befinden, Ann<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> Zellen, die sich in der späten Apoptosephase oder in der Nekrose befinden sowie Ann<sup>-</sup>PI<sup>+</sup> die beschädigt bzw. tot sind, was vermutlich nicht durch Apoptose verursacht wurde, da sie nicht Annexin<sup>+</sup> sind<sup>105</sup>. Abbildung 7-8A (Seite 66) zeigt ein exemplarisches Beispiel einer durchflusszytometrischen Messung, in Abbildung 7-8B sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst. In Kokulturen von PBL mit ercDC wurde ein mit cDC vergleichbarer Anteil von Ann<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> Zellen (Zahlen in oberem rechten Quadranten, grün) beobachtet. Es konnte im Mittel kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Test nach Friedman, Abbildung 7-8B). T-Zellen im frühen Stadium der Apoptose (Ann<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>, rechter unterer Quadrant, orange) kamen wesentlich weniger häufig vor, wiederum ohne Unterschied zwischen Kokulturen mit cDC bzw. ercDC. Beschädigte oder tote Zellen (Ann<sup>-</sup>PI<sup>+</sup>) wurden in beiden Kokulturen fast nicht beobachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass ercDC bei T-Zell-Kontakt nicht mehr Apoptose induzierten als cDC und daher Apoptose als Ursache für die schlechte T-Zell-Proliferation nicht wahrscheinlich erscheint.



**Abbildung 7-8: Untersuchung der Apoptose von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Kokultivation mit allogenen in vitro generierten cDC und ercDC.** Die cDC und ercDC wurden für 5 Tage im Verhältnis 1:10 mit allogenen PBL kokultiviert. Danach wurden durch Anfärbung mit Annexin V und PI die Stadien der Apoptose durchflusszytometrisch detektiert. **A)** Exemplarische Konturdiagramme der CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> bzw. CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Darstellung der Fluoreszenz von Annexin V auf der x-Achse und der von PI auf der y-Achse. Vier Populationen können unterschieden werden: Ann<sup>-</sup>PI<sup>-</sup> Zellen (vital, unten links), Ann<sup>+</sup>PI<sup>-</sup> Zellen (frühe Apoptose, unten rechts), Ann<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> Zellen (späte Apoptose bzw. Nekrose, oben rechts) und Ann<sup>-</sup>PI<sup>+</sup> Zellen (beschädigte bzw. tote Zellen, oben links). Die Zahlen geben den Prozentsatz der Zellen in dem entsprechenden Quadranten an. Die Grenzsetzung für die Positivität von PI und Annexin V wurde anhand nicht kokultivierter PBL festgelegt. **B)** Zusammenfassung von 3 Einzelexperimenten. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) für die angegebenen Populationen. Der statistische Vergleich zwischen den Kokulturen der PBL mit cDC bzw. ercDC für die Ann<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> Population (grün) wurde mit dem Test nach Friedman durchgeführt und ergab keine Signifikanz.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse nahe, dass die geringe Kapazität der ercDC T-Zell-Proliferation zu stimulieren wahrscheinlich nicht auf das Fehlen an Kostimulations-, MHC-II- und Adhäsionsmolekülen oder schlechter Antigenkreuzpräsentation zurückzuführen ist. Auch die Apoptoseinduktion ist als Ursache unwahrscheinlich. Das inhibitorische Oberflächenmolekül CD48 wurde von ercDC verhältnismäßig stark exprimiert, möglicherweise trägt es zur schlechten T-Zell-Proliferation bei. Einen Teilbeitrag leistet die begrenzte Fähigkeit zur stimulierten IL-12p70-Sekretion und auch die schwache Expression des Fascins könnte eine Ursache sein. Jedoch blieb eine überzeugende Erklärung dieses ercDC-Mangels nach den In-vitro-Analysen offen.

Weil ercDC die Funktion naive T-Zellen zur Proliferation anzuregen nur sehr bedingt ausführen konnten und darüber hinaus auch ein Defekt in der chemokinvermittelten Migration festgestellt wurde (Mak'Anyengo, Masterarbeit, 2012<sup>129</sup>), stellte sich erneut die Frage nach der Zuordnung der ercDC zu „DC“ oder „MΦ“. Wir bezeichneten ercDC ursprünglich als „DC“, obwohl sie den MΦ-Marker CD14 exprimierten, da die ercDC des RCC wie auch die in vitro generierten ercDC Kostimulations- und MHC-II-Moleküle stark exprimierten und die für cDC charakteristische Kreuzpräsentation beherrschten (ercDC\_in vitro). Auch Literaturdaten, die zeigten, dass die Niere von einer Vielzahl interstitieller CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> DC durchzogen ist<sup>78</sup> und die Tatsache, dass auch unsere ercDC CX<sub>3</sub>CR1-positiv waren (nicht gezeigt), trugen zu dieser Entscheidung bei. Mit der zunehmenden Diskussion eines Kontinuums der Zellen des MPS anstelle eindeutig abgegrenzter Populationen stellte sich die Frage, welche Position die ercDC in diesem Kontinuum einnehmen würden. In Anlehnung an die publizierten Daten, die hauptsächlich auf Untersuchungen der myeloischen Zelltypen der Maus basieren, wurde eine globale Genexpressionsanalyse der ercDC aus dem RCC durchgeführt, mit dem Ziel, die Verwandtschaft der ercDC mit anderen myeloischen Zelltypen zu definieren, ein charakteristisches Genexpressionsprofil der ercDC zu erstellen und die funktionelle Polarisierung genauer zu beschreiben.

## 7.5 Genexpressionsanalyse

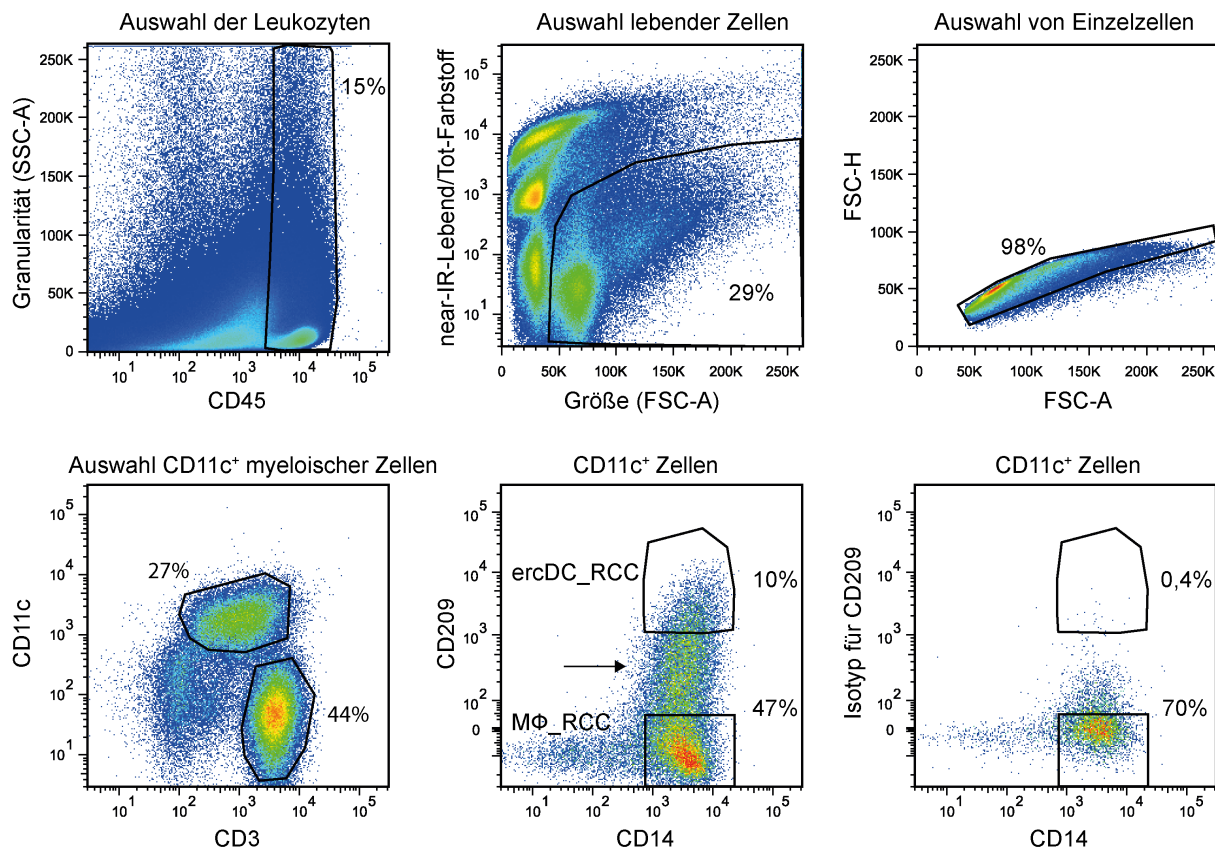
Für die Genexpressionsanalyse wurden ercDC (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) und MΦ (CD209<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>) aus Gewebesuspensionen des klarzelligen RCC sowie CD1c<sup>+</sup> DC und slanDC aus dem Blut gesunder Spender mit Hilfe des FACSAria IIIu sortiert. Zudem schloss die Analyse neben den in vitro generierten cDC und ercDC auch in vitro generierte M1-MΦ, M2-MΦ und GM-CSF-MΦ ein. Ebenfalls wurden aus dem Blut isolierte Monozyten analysiert, aus denen die verschiedenen In-vitro-Zelltypen differenziert wurden.

### 7.5.1 Sortierung von ercDC (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) und MΦ (CD209<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>) aus RCC-Gewebe-Zellsuspensionen

Die RCC-Gewebe-Zellsuspensionen wurden zunächst mit den in Tabelle 6-2 (siehe Methoden, Seite 39) angegebenen Antikörpern gefärbt. Die Leukozyten wurden anhand des Markers CD45 im CD45/SSC-Punktewolkendiagramm von den CD45<sup>-</sup> Tumorzellen abgegrenzt (Abbildung 7-9, Seite 69). Nach Auswahl der lebenden Zellen und Einzelzellen (Ausschluss von Dubletten) wurde das für das humane System als pan-myeloischer Marker geltende CD11c gegen den T-Zell-Marker CD3 dargestellt. In diesem Punktewolkendiagramm wurden die myeloischen CD11c<sup>+</sup> Zellen ausgewählt, deren durchschnittlicher Anteil innerhalb der lebenden Leukozyten zwischen 10% und 60% lag. Innerhalb der CD11c<sup>+</sup> Zellen wurden die ercDC und MΦ anhand der Marker CD14 und CD209/DC-SIGN voneinander unterschieden (Abbildung 7-9). Die Grenze für CD209-Positivität wurde anhand eines Isotyp-Antikörpers festgelegt, die CD14<sup>+</sup> Population wurde durch Abgleich mit CD14<sup>+</sup> Monozyten innerhalb von PBMC, die parallel untersucht wurden, ermittelt (nicht gezeigt). Der Anteil von CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> ercDC innerhalb der CD11c<sup>+</sup> Zellen lag durchschnittlich bei 9% (1-21%), der Anteil von CD209<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup> MΦ bei 66% (45-90%). Manchmal zeigte sich eine Mittelpopulation mit schwacher CD209-Intensität (siehe Pfeil in Abbildung 7-9), die nicht sortiert wurde. Wenn möglich, wurden die sortierten Populationen im FACSAria IIIu reanalysiert, um die Reinheit der Sortierung zu prüfen. Sie lag zwischen 98 und 100%. Die ercDC und MΦ konnten aus RCC-Gewebe-Zellsuspensionen von sechs verschiedenen Patienten erfolgreich sortiert werden. Die sortierten Zellzahlen und die RIN-Werte der RNA der einzelnen Replikate können Tabelle 7-1 (Seite 71) entnommen werden. Die aus dem RCC sortierten MΦ werden analog den ercDC im Folgenden als „MΦ\_RCC“ bezeichnet.

In den meisten RCC-Gewebe-Zellsuspensionen waren nur wenige CD209<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> cDC zu finden, obwohl diese bei Immunfluoreszenzfärbungen des Gewebes deutlich quantifiziert werden konnten (Abbildung 7-1, Seite 56). Daher fehlt leider diese sehr interessante Population in der Genexpressionsanalyse. Um eine DC-Population mit klassischen cDC-

Eigenschaften als Vergleich zu den ercDC und MΦ in der Genexpressionsanalyse zu haben, wurden CD1c<sup>+</sup> DC und slanDC aus dem Blut gesunder Spender sortiert (Abbildung 7-10).



**Abbildung 7-9: Auswahl der ercDC (CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) und Makrophagen (CD209<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>) innerhalb der RCC-Gewebe-Zellsuspensionen bei der Sortierung am FACSaria Illu.** Gezeigt ist das Auswahlschema für eine exemplarische RCC-Gewebe-Zellsuspension. Im ersten Schritt wurden die CD45<sup>+</sup> Leukozyten ausgewählt. Anschließend wurden die lebenden Zellen und Einzelzellen ausgewählt. Innerhalb dieser Population wurden die myeloischen, CD11c<sup>+</sup> Zellen eingegrenzt. Die ercDC konnten innerhalb der CD11c<sup>+</sup> Zellen durch die Koexpression von CD209 und CD14 von den CD14<sup>+</sup>CD209<sup>-</sup> MΦ unterschieden werden. CD209-Positivität wurde anhand des Isotyp-Antikörpers für CD209 definiert, CD14-Positivität durch Abgleich mit CD14<sup>+</sup> Monozyten innerhalb von parallel untersuchten PBMC festgelegt (nicht gezeigt). CD209<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> cDC waren nicht, oder nur in sehr geringer Anzahl vorhanden und konnten nicht sortiert werden.

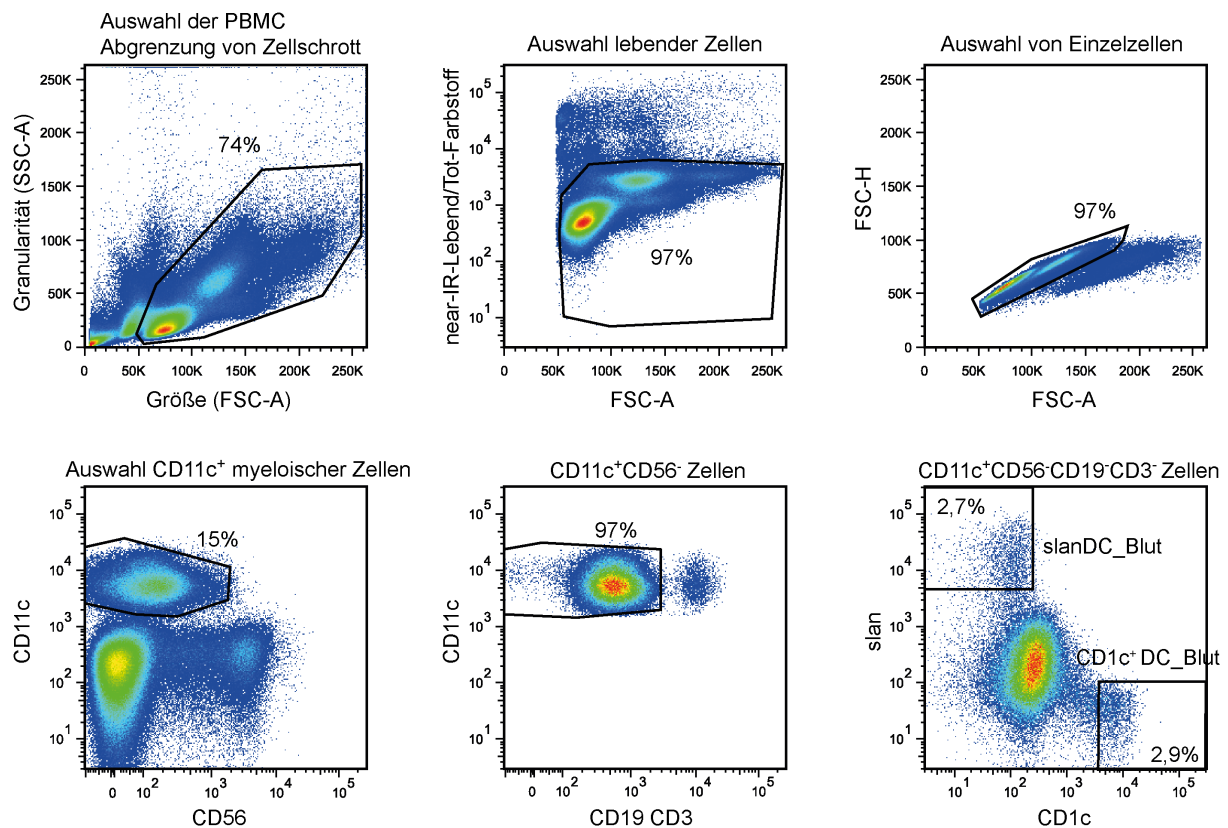
## 7.5.2 Sortierung von CD1c<sup>+</sup> DC und slanDC aus dem Blut

CD1c<sup>+</sup> DC und slanDC wurden aus PBMC dreier gesunder Spender sortiert. Zunächst wurde durch positive Selektion von CD19 und CD56 mittels magnetischer Beads ein Großteil der potentiell CD1c<sup>+</sup> B-Zellen und der NK-Zellen aus den PBMC entfernt. Die verbliebenen Zellen wurden für die anschließende FACS-basierte Sortierung mit der in Tabelle 6-5 (Methoden, Seite 45) angegebenen Antikörperkombination gefärbt.

Die Auswahlstrategie für die Sortierung der Zellen ist in Abbildung 7-10 (Seite 70) gezeigt. Nach der Abgrenzung von Zellschrott und der Auswahl lebender Zellen und Einzelzellen innerhalb der PBMC wurden durch Anfärbung von CD56, CD19 und CD3 verbliebene NK-



Zellen, B-Zellen und T-Zellen von den  $CD11c^+$  Zellen abgegrenzt. Die  $CD11c^+CD56^-CD19^-CD3^-$  Zellfraktion wurde zur Unterscheidung von  $CD1c^+$  DC und slanDC mit anti- $CD1c$  und anti-slant (M-DC8) Antikörpern angefärbt. Innerhalb der  $CD11c^+CD56^-CD19^-CD3^-$  Zellfraktion waren die  $CD1c^+$  DC mit einer Frequenz von 0,7-2,9% und die slanDC mit 2,7-10,1% vertreten. Die  $CD1c^+$  DC und slanDC werden im Folgenden als „ $CD1c^+$  DC\_Blut“ und „slanDC\_Blut“ bezeichnet.



**Abbildung 7-10: Auswahl der  $CD1c^+$  DC und slanDC innerhalb der PBMC gesunder Spender bei der Sortierung am FACSaria IIIu.** Gezeigt ist das Auswahlschema für einen der drei Spender. Zunächst wurden die PBMC im SSC/FSC-Punktewolkendiagramm ausgewählt und der Zellschrott abgegrenzt. Nach der Auswahl der lebenden Zellen und Einzelzellen wurden die  $CD11c^+$  Zellen gegen die  $CD56^+$  NK-Zellen aufgetragen. Die  $CD11c^+CD56^-$  Fraktion enthielt B- und T-Zellen. Im nächsten Schritt wurden potentiell  $CD11c^+CD1c^+$  B-Zellen sowie mögliche verbliebene T-Zellen innerhalb der  $CD11c^+CD56^-$  Fraktion durch Anfärbung von CD19 und CD3 abgegrenzt. Innerhalb der  $CD11c^+CD56^-CD19^-CD3^-$  Zellen wurden  $CD1c^+$  DC und slanDC durch die Marker slan (M-DC8) und  $CD1c$  unterschieden. Die Positivität für slan und  $CD1c$  wurde mit Hilfe von Isotyp-Antikörpern festgelegt (nicht gezeigt).

**Tabelle 7-1: Übersicht über die aus RCC-Gewebe-Zellsuspensionen und PBMC sortierten myeloischen Zelltypen sowie die durch Microbeads aus PBMC isolierten Monozyten.** Aufgeführt sind neben der Herkunft der Zelltypen auch deren Bezeichnung für die Genexpressionsanalyse, die Marker mit denen die Zellen im FACS-Gerät für die Sortierung ausgewählt wurden, die Bezeichnung der einzelnen Replikate, deren RNA RIN-Werte und sortierte Zellzahlen.

Zelltyp	Herkunft	Bezeichnung	Markerprofil	Replikate	RNA RIN	Sortierte Zellzahlen
<b>ercDC</b>	RCC	ercDC_RCC	CD11c <sup>+</sup> CD209 <sup>+</sup> CD14 <sup>+</sup>	RCC66	8,6	2,1 x 10 <sup>4</sup>
				RCC74	6,1	1,7 x 10 <sup>4</sup>
				RCC89	8,0	9,5 x 10 <sup>4</sup>
				RCC91	8,0	1,1 x 10 <sup>4</sup>
				RCC94	6,7	1,1 x 10 <sup>4</sup>
				DD2	5,6	0,7 x 10 <sup>4</sup>
<b>MΦ</b>	RCC	MΦ_RCC	CD11c <sup>+</sup> CD209 <sup>-</sup> CD14 <sup>+</sup>	RCC66	8,8	6,0 x 10 <sup>4</sup>
				RCC89	8,0	2,2 x 10 <sup>5</sup>
				RCC91	7,3	4,2 x 10 <sup>4</sup>
				RCC94	6,1	2,5 x 10 <sup>4</sup>
				DD1	7,8	0,5 x 10 <sup>4</sup>
				DD2	7,8	6,1 x 10 <sup>4</sup>
<b>CD1c<sup>+</sup> DC</b>	Blut	CD1c <sup>+</sup> DC_Blut	CD11c <sup>+</sup> CD1c <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	Spender 1	9,0	2,0 x 10 <sup>4</sup>
				Spender 2	7,4	1,2 x 10 <sup>4</sup>
				Spender 3	6,2	1,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>slanDC</b>	Blut	slanDC_Blut	CD11c <sup>+</sup> slan <sup>+</sup> CD19 <sup>-</sup>	Spender 1	7,6	1,5 x 10 <sup>4</sup>
				Spender 2	8,8	5,0 x 10 <sup>4</sup>
				Spender 3	8,6	2,7 x 10 <sup>4</sup>
<b>Monozyten*</b>	Blut	Mono_Blut	CD14 <sup>+</sup>	Sp. Pool 1	8,0	5,0 x 10 <sup>5</sup>
				Sp. Pool 2	8,6	5,0 x 10 <sup>5</sup>
				Sp. Pool 3	7,9	5,0 x 10 <sup>5</sup>

\* Die Monozyten wurden nicht durch FACS-basierte Sortierung gewonnen, sondern durch CD14 Microbeads aus den PBMC isoliert.

### 7.5.3 Auswahl eines CD141<sup>+</sup> DC-Transkriptomdatensatzes aus externen Datenbanken und Prüfung der aus PBMC sortierten CD1c<sup>+</sup> DC auf Zelltyp-assoziierte Gene

Neben den CD1c<sup>+</sup> DC und slanDC gibt es eine weitere DC-Population im Blut, die CD141<sup>+</sup> DC. Diese können CD8<sup>+</sup> T-Zellen sehr effektiv durch Kreuzpräsentation aktivieren und sezernieren bei Stimulation große Mengen IL-12<sup>34,37</sup>. Beide Funktionen wurden bei ercDC abgefragt, weshalb die CD141<sup>+</sup> DC zum Vergleich in die Genexpressionsanalyse eingeschlossen werden sollten. Da CD141<sup>+</sup> DC nicht selber sortiert worden waren, wurde ein geeigneter Transkriptomdatensatz aus externen Datenbanken selektiert. Datensätze für CD141<sup>+</sup> DC waren von Haniffa et al.<sup>130</sup>, Lindstedt et al.<sup>131</sup>, Yu et al.<sup>132</sup> und Segura et al.<sup>43</sup> auf der GEO (engl.: Gene Expression Omnibus) bzw. der „Array Express“ Homepage öffentlich verfügbar (Tabelle 7-2, Seite 72). Die genannten Studien beinhalteten auch Datensätze von CD1c<sup>+</sup> DC. Diese wurden verwendet, um die Vergleichbarkeit mit den sortierten CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut zu prüfen.

**Tabelle 7-2: Externe Transkriptomdatensätze für CD141<sup>+</sup> DC und CD1c<sup>+</sup> DC.** Aufgeführt sind die Bezugsquelle und Zugangsnummer des Datensatzes sowie die Bezeichnung und Anzahl der Replikate der jeweiligen Zelltypen.

Datensatz aus	Zugangsnummer	Bezeichnung	Anzahl Replikate
Haniffa et al. <sup>130</sup>	GSE35459	CD141 <sup>+</sup> DC	5
		CD1c <sup>+</sup> DC	6
Lindstedt et al. <sup>131</sup>	E-TABM-34	CD141 <sup>+</sup> DC	3
		CD1c <sup>+</sup> DC	3
Yu et al. <sup>132</sup>	GSE43184	CD141 <sup>+</sup> DC	3
		CD1c <sup>+</sup> DC	3
Segura et al. <sup>43</sup>	GSE40484	CD1c <sup>+</sup> DC	4

Die externen Transkriptomdaten wurden zusammen mit den eigenen Datensätzen der Mono\_Blut, slanDC\_Blut und CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut normalisiert und eine hierarchische Clusteranalyse basierend auf den informativen Genen durchgeführt, die das Ziel hatte, die Ähnlichkeit der verschiedenen CD1c<sup>+</sup> DC bzw. CD141<sup>+</sup> DC Datensätze zu ermitteln (siehe Abbildung 11-2 im Anhang, Seite 157). Mono\_Blut und slanDC\_Blut dienten als Kontrollen. Interessanterweise clusterten die externen Datensätze nicht nach Zelltyp, sondern, außer bei Lindstedt et al.<sup>131</sup>, nach Arbeitsgruppen. Offensichtlich ist dieser „Batch Faktor“, bedingt durch die unterschiedlichen Verfahrensweisen der Arbeitsgruppen, größer als die Zelltyp-bedingten Unterschiede. Unsere CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut (gelbe Markierung) clusterten mit CD1c<sup>+</sup> DC\_Segura (lila). Allerdings gab es bei Segura et al.<sup>43</sup> keine korrespondierenden CD141<sup>+</sup> DC, so dass nicht sicher ist, ob das Clustering wirklich aufgrund Zelltyp-spezifischer Ähnlichkeit erfolgte oder durch das Fehlen der korrespondierenden CD141<sup>+</sup> DC. Die Analysen wurden danach mit einem reduzierten Genset durchgeführt, welches nur die CD141<sup>+</sup> DC-Kerngene (Haniffa et al.<sup>130</sup>) bzw. die mit CD1c<sup>+</sup> DC assoziierten Gene (Haniffa et al.<sup>130</sup>, Segura et al.<sup>43</sup>) enthielt. In Abbildung 11-3 des Anhangs (Seite 158) ist die Expression der vier Kerngene der CD141<sup>+</sup> DC in den untersuchten Zelltypen vergleichend dargestellt. Die Kerngene sind *CADM1*, *TLR3* und *XCR1*, die an der Antigenkreuzpräsentation und Migration beteiligt sind, sowie das Gen *THBD*, welches für den Rezeptor CD141 kodiert<sup>130</sup>. *CLEC9A*, ebenfalls ein Kerngen, war auf den Arrays von Lindstedt nicht vorhanden und konnte deshalb nicht berücksichtigt werden. Der Vergleich zeigte, dass die CD141<sup>+</sup> DC von Lindstedt alle Kerngene am stärksten exprimierten (Abbildung 11-3A und B). Sie wurden deshalb für die vergleichende Genexpressionsanalyse mit unseren Datensätzen ausgewählt.

Die hierarchische Clusteranalyse basierend auf den 140 mit CD1c<sup>+</sup> DC assoziierten Genen zeigte, dass unsere CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut mit den CD1c<sup>+</sup> DC\_Segura in einem Cluster lagen (Abbildung 11-4A im Anhang, Seite 159). Die CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut exprimierten die Gene im Mittel am stärksten (Abbildung 11-4B). Sie wurden deshalb für die weitere vergleichende Analyse mit den ercDC benutzt und es wurde auf einen externen Datensatz für CD1c<sup>+</sup> DC verzichtet.

#### 7.5.4 Verwandtschaftsanalyse und charakteristisches Genexpressionsprofil der ercDC aus dem RCC

Weil sich die ercDC durch die Koexpression von DC- und MΦ-Markern ungewöhnlich darstellten, wurde versucht über einen Vergleich des Transkriptoms der ercDC mit den Transkriptomen anderer myeloischer Zelltypen eine Positionierung im MPS-Kontinuum zu erreichen und ein charakteristisches Genexpressionsprofil der ercDC zu erstellen. Zusätzlich zu unseren Datensätzen wurden externe Datensätze ausgewählt, wobei nur humane Datensätze verwendet wurden, um Probleme mit nicht-orthologen Genen zu vermeiden.

Neben den aus dem Blut stammenden CD141<sup>+</sup> DC von Lindstedt wurden myeloische Zelltypen aus verschiedenen nicht-lymphatischen Organen (Decidua, Darm, Lunge, Ascites von Ovarialkarzinompatienten) ausgewählt, wobei die Auswahl sowohl gesunde als auch pathologische Situationen umfasste. Die Informationen zu den ausgewählten Datensätzen und Zelltypen sind in Tabelle 7-3 (Seite 74) zusammengestellt. Der Datensatz der MΦ aus dem Ersttrimestergewebe der Decidua wurde ausgewählt, weil auch hier wie bei den ercDC die Koexpression von CD14 und CD209/DC-SIGN beschrieben war<sup>133</sup>. Die intrauterinen MΦ wurden anhand der CD11c-Expressionsstärke in CD11c<sup>HI</sup> MΦ und CD11c<sup>LO</sup> MΦ unterteilt, wobei sich erstere durch die Expression von Genen des Lipidmetabolismus und Inflammation auszeichneten und letztere v.a. Gene exprimierten, die mit dem Wachstum und dem Umbau des Gewebes assoziiert sind.

Die Datensätze der myeloischen Zellen aus dem Darm und der Lunge wurden ausgewählt, weil das Immunsystem beider Organe, wie das der Niere, für die Aufrechterhaltung der Balance zwischen Immunität und peripherer Toleranz essentiell ist<sup>134,135</sup>. Der in GEO hinterlegte Datensatz zu intestinalen myeloischen Zellen (Watchmaker et al.<sup>136</sup>) beinhaltete drei verschiedene DC-Subtypen aus der Lamina Propria, die anhand der Marker CD103 und Sirpα voneinander unterschieden wurden: 1) CD103<sup>+</sup>Sirpα<sup>-</sup> DC, die den CD141<sup>+</sup> DC aus dem Blut ähnlich sind und viele mit der Kreuzpräsentation assoziierte Marker exprimieren; 2) CD103<sup>+</sup>Sirpα<sup>+</sup> DC, beschrieben als den CD1c<sup>+</sup> DC aus dem Blut ähnlich, T<sub>H</sub>17-Zellen induzierend, CD209/DC-SIGN und tolerogene Gene exprimierend; 3) CD103<sup>-</sup>Sirpα<sup>+</sup> DC, die den MoDC (engl.: monocyte-derived DC) ähnlich sind und T<sub>H</sub>1-Zellen effektiv expandieren können. Von Shaykhiev et al.<sup>137</sup> waren Datensätze von alveolaren MΦ aus der Lunge von Rauchern, Nichtrauchern und COPD-Patienten hinterlegt, von Woodruff et al.<sup>138</sup> gab es Datensätze zu MΦ aus Asthma-Patienten, Rauchern und Nichtrauchern. Die publizierten Analysen lassen vermuten, dass entgegen den bisherigen Annahmen bei den MΦ von Rauchern und COPD-Patienten die M1-assoziierten proinflammatorischen Gene eher herabreguliert und die M2-assoziierten, regulatorischen Gene verstärkt exprimiert werden<sup>137</sup>. Auch scheinen sie analog zu den im Tumor vorkommenden MΦ viele Matrixmetalloproteinasen (MMP) zu sezernieren<sup>137,138</sup>.

Zu humanen myeloischen Zellen aus Tumoren gab es wenig Datenmaterial. Es gab lediglich einen Datensatz zu myeloischen Zellen aus einem soliden Tumor. Dies waren TAM aus gastrointestinalen stromalen Tumoren (GIST) von Cavnar et al.<sup>139</sup>. Für diese TAM wurde interessanterweise ein antitumoraler, proinflammatorischer, M1-ähnlicher Phänotyp beschrieben. Des Weiteren gab es einen Datensatz von myeloischen Zellen aus dem Ascites von Ovarialkarzinompatienten (Segura et al.<sup>43</sup>); die Zellen stammten also nicht wie die ercDC aus dem soliden Karzinom. Hierbei wurde zwischen inflammatorischen DC (infDC) und MΦ (infMΦ) unterschieden. Laut Literatur scheinen die infDC, ähnlich wie die ercDC, DC- und MΦ-Charakteristika zu besitzen, sie exprimierten ebenfalls CD14, nicht aber CD209/DC-SIGN auf der Oberfläche<sup>43</sup>. Dagegen zeigten die infMΦ funktionelle Parallelen zu den ercDC, indem sie bei Stimulation kein IL-12p70 sezernierten und nur eine schwache T-Zell-Proliferation induzieren konnten<sup>43</sup>.

**Tabelle 7-3: Informationen zu den externen humanen Datensätzen und Zelltypen, die für die vergleichende Genexpressionsanalyse verwendet wurden.** Aufgeführt sind die Bezugsquelle und Zugangsnummer des Datensatzes sowie die Herkunft, Bezeichnung, Anzahl der Replikate und die Eigenschaften der jeweiligen Zelltypen.

Datensatz aus	Zugangsnummer	Herkunft	Bezeichnung	Anzahl Replikate	Eigenschaft
Lindstedt et al. <sup>131</sup>	E-TABM-34	Blut	CD141 <sup>+</sup> DC	3	CTL-Aktivierung mittels Kreuzpräsentation, migratorisch, IL-12-Produktion
Houser et al. <sup>133</sup>	GSE22342	Decidua während Ersttrimester	CD11c <sup>HI</sup> MΦ	8	Antigenpräsentation, Lipidstoffwechsel
			CD11c <sup>LO</sup> MΦ	8	ECM-Modifizierung, Gewebewachstum
Watchmaker et al. <sup>136</sup>	GSE50380	Darm	CD103 <sup>+</sup> Sirpα <sup>-</sup> DC	3	exprimieren Kreuzpräsentationsmarker, T <sub>H</sub> 17-Zellen induzierend, ähnlich CD141 <sup>+</sup> DC
			CD103 <sup>+</sup> Sirpα <sup>+</sup> DC	5	T <sub>H</sub> 17-Zellen induzierend, tolerogen, CD209 <sup>+</sup> , ähnlich CD1c <sup>+</sup> DC
			CD103 <sup>+</sup> Sirpα <sup>+</sup> DC	3	T <sub>H</sub> 1-Aktivierung, ähnlich MoDC
Shaykhiev et al. <sup>137</sup> (S)	GSE13896	avLunge	MΦ_NR	24	Gewebehomöostase, Pathogenabwehr
			MΦ_R	34	Tendenz zu M2-Polarisierung
			MΦ_COPD	12	M2-Polarisierung
Woodruff et al. <sup>138</sup> (W)	GSE2125	avLunge	MΦ_NR	15	Gewebehomöostase, Pathogenabwehr
			MΦ_R	15	starke Expression von MMP
			MΦ_Asthma	15	ähnlich MΦ_NR
Cavnar et al. <sup>139</sup>	GSE51697	GIST	TAM_GIST*	12	proinflammatorischer, M1-ähnlicher Phänotyp

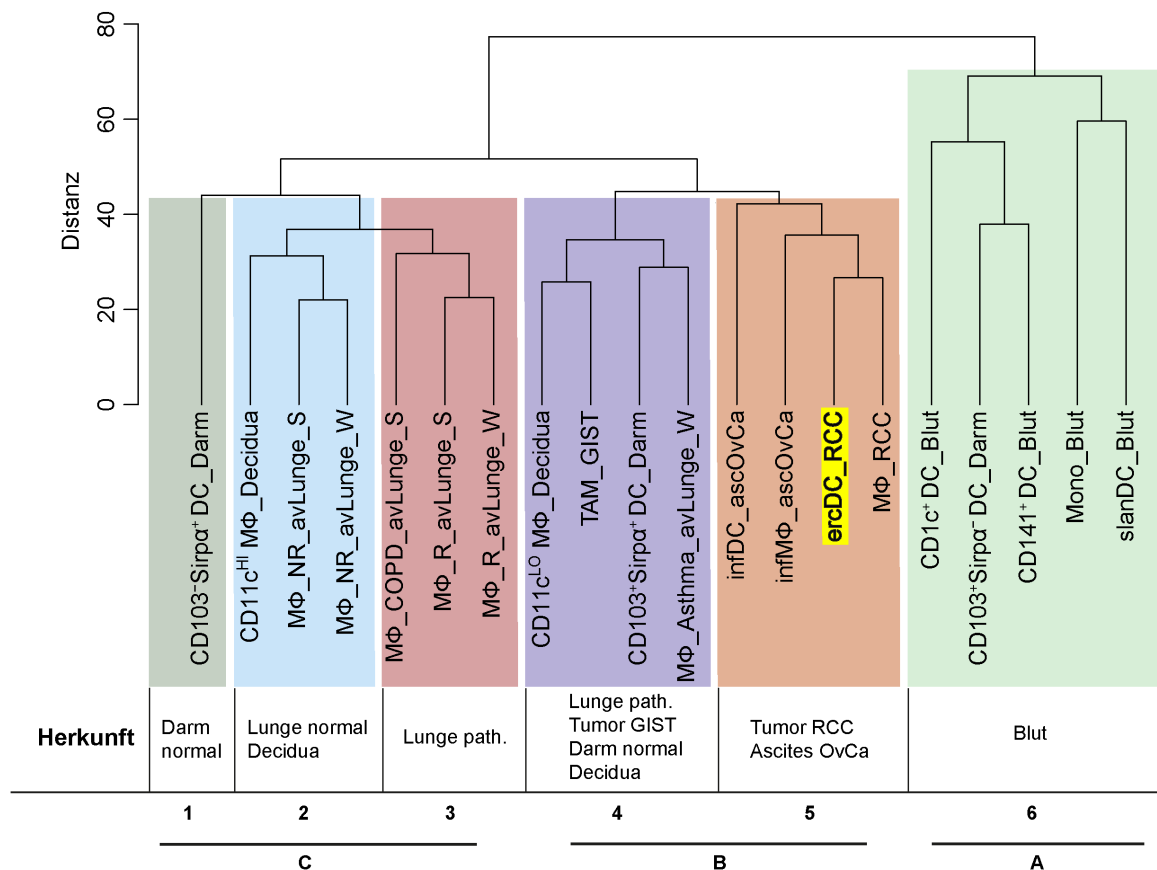
<b>Segura et al.</b> <sup>43</sup>	GSE40484	ascOvCa	infDC	5	induzieren T <sub>H</sub> 17-Zellen; Sirpα <sup>+</sup> CD209 <sup>-</sup> , ähnlich MoDC
			infMΦ	5	induzieren keine T <sub>H</sub> 17-Zellen, CD209 <sup>-</sup> , schlechte T-Zell-Stimulatoren, keine IL-12p70-Sekretion

\* TAM von unbehandelten, nicht-Imatinib-sensitiven Patienten

ascOvCa: Ascites von Ovarialkarzinompatienten (OvCa, engl.: ovarian cancer); avLunge: Alveolen der Lunge; COPD: engl.: chronic obstructive pulmonary disease; ECM: engl.: extracellular matrix; infDC: inflammatorische DC; infMΦ: inflammatorische Makrophagen; GIST: Gastrointestinaler Stromatumor MoDC: engl.: monocyte-derived DC; MMP: Matrixmetalloproteinase; NR: Nichtraucher; R: Raucher

Um die Ähnlichkeit der ercDC\_RCC mit den verschiedenen Zelltypen zu ermitteln, wurde zunächst eine hierarchische Clusteranalyse basierend auf den informativen Genen durchgeführt. Das resultierende Dendrogramm gliederte sich in drei Großcluster A, B und C (Abbildung 7-11, Seite 76). Großcluster A enthielt alle aus Blut isolierten myeloische Zelltypen sowie die CD103<sup>+</sup>Sirpα<sup>-</sup> DC\_Darm. Die letzteren bildeten ein Cluster mit CD141<sup>+</sup> DC\_Blut, mit denen sie laut Literatur auch einige Eigenschaften, v.a. die Expression von Markern die mit der Kreuzpräsentation assoziiert sind, teilen<sup>136</sup>. Die slanDC lagen in einem Cluster mit Monozyten. Dies unterstützt Literaturdaten, welche die slanDC als Subklasse der Monozyten vermuten<sup>31,48</sup>. CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut bildeten einen eigenen Ast innerhalb dieses Clusters. Die von Watchmaker et al.<sup>136</sup> beschriebene Ähnlichkeit zwischen CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut und CD103<sup>+</sup>Sirpα<sup>+</sup> DC\_Darm zeigte sich hier nicht.

Die ercDC\_RCC lagen in Großcluster B, und darin in Subcluster 5 zusammen mit den MΦ\_RCC sowie den infMΦ und infDC aus dem Ascites von Ovarialkarzinompatienten. In demselben Großcluster, aber einem anderen Subcluster, lagen die aus dem soliden Tumor stammenden TAM\_GIST zusammen mit den CD11c<sup>LO</sup> MΦ\_Decidua, den CD103<sup>+</sup>Sirpα<sup>+</sup> DC\_Darm und den MΦ\_Asthma\_avLunge\_W. Interessanterweise lagen die MΦ der Raucher, Nichtraucher und COPD-Patienten im Großcluster C, also nicht im selben Großcluster wie die von Asthma-Patienten. Im Subcluster 2 des Großclusters C lagen neben den alveolaren MΦ von Nichtrauchern (NR) auch die CD11c<sup>HI</sup> MΦ\_Decidua. Die von Watchmaker et al.<sup>136</sup> als MoDC-ähnlich beschriebenen CD103<sup>+</sup>Sirpα<sup>+</sup> DC\_Darm bildeten einen separaten Arm im Großcluster C.



**Abbildung 7-11: Hierarchisches Clustering der ercDC und Makrophagen aus dem RCC und verschiedener myeloischer Zelltypen aus dem Blut sowie aus nicht-lymphatischen Geweben unter normalen und pathologischen Bedingungen.** Die Zahlen unter der Tabelle geben die Subcluster an, die Großbuchstaben die diese umfassenden Großcluster. Die ercDC\_RCC sind gelb markiert. Normal: normale Bedingungen; path.: pathologische Bedingungen

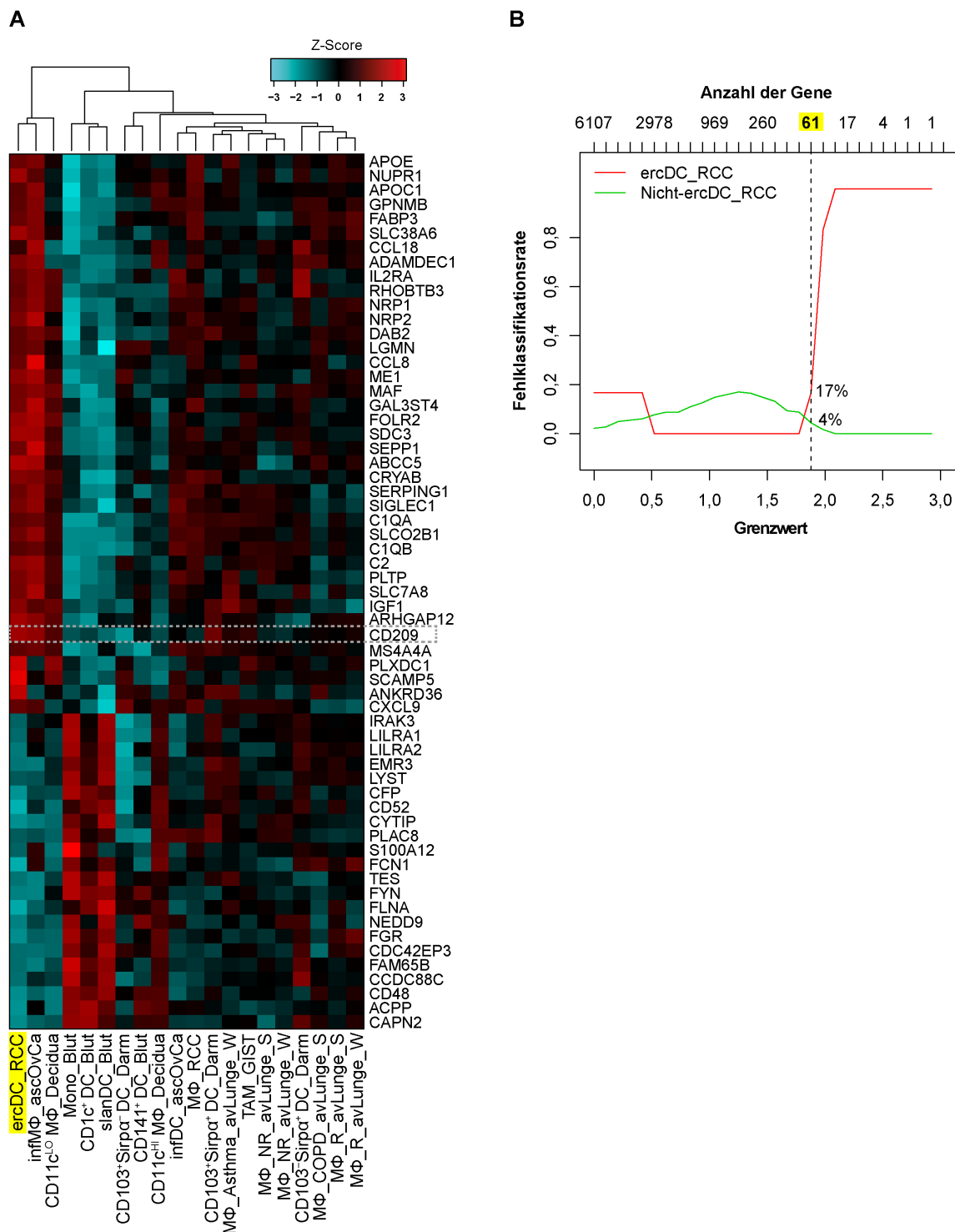
#### 7.5.4.1 Markergene und differentiell exprimierte Gene

In einem nächsten Schritt stellte sich die Frage, ob für die ercDC\_RCC ein charakteristisches Genexpressionsprofil erstellt werden kann das sie von anderen Zelltypen unterscheidet. Es wurde die Methode der „nearest shrunken centroids“<sup>140</sup> angewandt, weil beschrieben ist, dass damit ein Markergenprofil für einen Zelltyp ermittelt werden kann und andere Zelltypen durch Abgleich ihres Genexpressionsprofils mit diesem Profil klassifiziert werden können.

Zur Ermittlung der für ercDC\_RCC charakteristischen Markergene wurde das Genexpressionsprofil der ercDC\_RCC mit den Profilen aller anderen myeloischen Zelltypen (Nicht-ercDC\_RCC, Kontrollgruppe, Abbildung 7-12) verglichen. Der Grenzwert (Abbildung 7-12B, Seite 78) wurde so festgelegt, dass eine möglichst kleine Gruppe von Genen selektiert wird, die für ercDC\_RCC spezifische Expressionsmuster zeigt. Die Kreuzvalidierung des daraus abgeleiteten Klassifikationsmodells ergab eine Gruppe von 61 Genen bei einer akzeptablen niedrigen Fehlklassifikationsrate (< 20%, Abbildung 7-12B). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Zelltyp fälschlicherweise als ercDC\_RCC klassifiziert wird

betrug 4%. Mit 17%-iger Wahrscheinlichkeit würde ein ercDC-Zelltyp nicht als solcher erkannt und fälschlicherweise der Kontrollgruppe zugeordnet werden. Die ercDC\_RCC exprimierten 39 der Markergene im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker und 22 schwächer (Abbildung 7-12A). Zu den Markergenen gehörte u.a. *CD209/DC-SIGN*, das auf Proteinebene für die Abgrenzung der ercDC\_RCC von den  $CD209^+CD14^+$  MΦ bei der Sortierung verwendet wurde. Vergleichbare Transkriptlevel für *CD209/DC-SIGN* wurden bei infMΦ\_ascOvCa und  $CD11c^{LO}$  MΦ\_Decidua gefunden (Abbildung 7-12A). Diese beiden Zelltypen zeigten generell eine sehr starke Übereinstimmung mit den ercDC\_RCC-Markergenen. Die infMΦ\_ascOvCa bildeten mit den ercDC\_RCC ein gemeinsames Cluster und drei der fünf infMΦ\_ascOvCa-Replikate wurden durch das Programm als ercDC\_RCC klassifiziert. Auch ein Replikat der TAM\_GIST, die in der Summe aber keine große Übereinstimmung mit dem Genexpressionsmuster der ercDC\_RCC zeigten, wurde als ercDC\_RCC klassifiziert. Interessanterweise wurden die MΦ\_RCC, obwohl sie aus dem gleichen Gewebemilieu stammten wie die ercDC\_RCC, nicht als ercDC\_RCC klassifiziert, sondern lagen in einem separaten Cluster zusammen mit den infDC\_ascOvCa. Dies lässt vermuten, dass in einem Tumorgewebe zeitgleich mehrere Mikromilieus existieren, die zur Differenzierung unterschiedlicher myeloischer Zelltypen führen. Die slanDC\_Blut,  $CD1c^+$  DC\_Blut und Mono\_Blut zeigten ein zu den ercDC\_RCC komplett konträres Expressionsmuster der Markergene (Abbildung 7-12A).

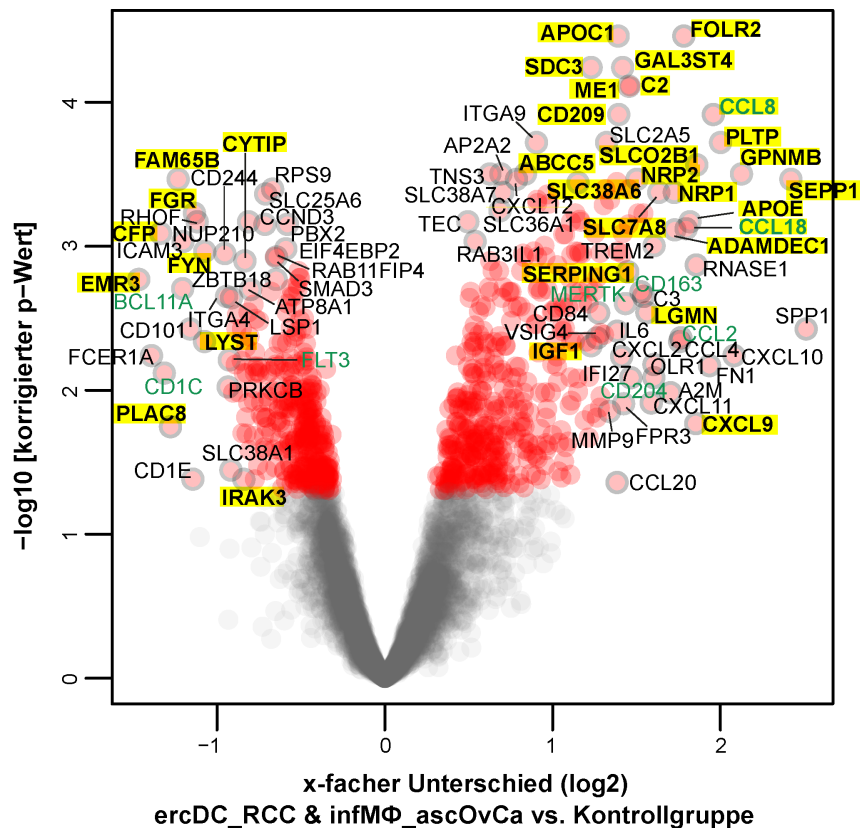




**Abbildung 7-12: Erstellung eines Markergenprofils für ercDC aus dem RCC mittels der „nearest shrunken centroids“ Methode nach Tibshirani et al.<sup>140</sup>** Die Expressionswerte des ercDC\_RCC-Datensatzes wurden zur Ermittlung der Markergene gegen die aller anderen Datensätze verglichen. **A)** Die relative Expression (Z-Score) der 61 ermittelten Markergene sowie das Clustering der Zelltypen wurde in einer Heatmap visualisiert. Gelb markiert sind ercDC\_RCC, welche mit den infMΦ\_ascOvCa und den CD11c<sup>LO</sup> MΦ\_Decidua in einem Cluster liegen. Gleichzeitig grau umrahmt ist exemplarisch das als Markergen identifizierte CD209, welches auf Proteinebene für die Sortierung der ercDC verwendet wurde. **B)** Diagramm zur Vergleichsprüfung (Kreuzvalidierung), welches den festgelegten Grenzwert, die kleinste Anzahl der für die Klassifizierung der ercDC nötigen Gene (gelbe Markierung), sowie die Fehlklassifizierungsrate der beiden Gruppen zeigt.

Um die *ercDC\_RCC* weiterführend zu beschreiben, wurden zusätzlich zu den Markergenen die von den *ercDC\_RCC* im Vergleich zu allen anderen Zelltypen differentiell exprimierte Gene ermittelt. Dabei wurde ein statistisches Verfahren angewandt und als „differentiell exprimiert“ solche Gene ermittelt, die mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  zwischen der Testgruppe und Kontrollgruppe unterschiedlich waren. Als Testgruppe wurden die *ercDC\_RCC* mit den *infMΦ\_ascOvCa* zusammengefasst, da sich ansonsten aufgrund der großen Ähnlichkeit der beiden Zelltypen nur zwei differentiell exprimierte Gene ergaben. Die Kontrollgruppe bestand aus allen anderen zum Vergleich verwendeten myeloischen Zelltypen (entsprechend Abbildung 7-12). Aus dieser Analyse ergaben sich 788 differentiell exprimierte Gene, 431 davon im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker, 357 schwächer exprimiert (siehe Tabelle 11-1 und Tabelle 11-2 im Anhang, Seite 160 und 167). Diese 788 Gene umfassende Gengruppe wurde als „*ercDC\_RCC*-Signaturgene“ bezeichnet. 54 der 61 Markergene (89%) wurden auch unter den *ercDC\_RCC*-Signaturgenen gefunden (siehe Tabelle 7-4, Seite 88).

Um das Ausmaß der Genexpressionsunterschiede (x-facher Unterschied, FC (engl.: Fold change)) zusammen mit der Signifikanz der Unterschiede beider Vergleichsgruppen zu visualisieren, wurde eine Volcano Plot Darstellung ausgewählt. Der Volcano Plot in Abbildung 7-13 (Seite 80) zeigt für alle informativen Gene den korrigierten p-Wert ( $-\log_{10}$ ) sowie die x-fache Veränderung der Genexpression ( $\log_2$ ) der *ercDC\_RCC* & *infMΦ\_ascOvCa*-Testgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Jedes Gen ist durch einen Punkt dargestellt, rote Punkte visualisieren die *ercDC\_RCC*-Signaturgene ( $p < 0,05$ ). Gene, die gegenüber der Kontrollgruppe besonders stark exprimiert und sehr signifikant sind, liegen rechts oben. Hier fanden sich viele der *ercDC\_RCC*-Markergene (Fettdruck, gelbe Markierung), z.B. *CD209/DC-SIGN*, *FOLR2*, *CCL8*, *GPNNB* und *SEPP1*. Zu den hochregulierten Genen zählten einige Gene, die bei der Funktion bzw. der Rekrutierung von MΦ eine Rolle spielen, wie *CD204/MSR1*, *MERTK*, *CD163*, *CCL2*, *CCL8* und *CCL18* (Abbildung 7-13, grüne Schrift). Gene, die im Vergleich zur Kontrollgruppe sehr signifikant und stark herabreguliert waren, befinden sich oben links in der Grafik. Dort liegen z.B. die Markergene *FAM65B*, *FGR* und *CFP*. Interessant ist außerdem, dass die Gene *BCL11A* und *FLT3* (grüne Schrift), die für einen DC-typischen Transkriptionsfaktor bzw. Wachstumsfaktorrezeptor kodieren, zu den signifikant herabregulierten Genen gehörten. Auch das von cDC exprimierte, für ein MHC-I-ähnliches Protein kodierende, Gen *CD1C* (grüne Schrift) wurde von *ercDC\_RCC* wesentlich geringer exprimiert als von der Kontrollgruppe.

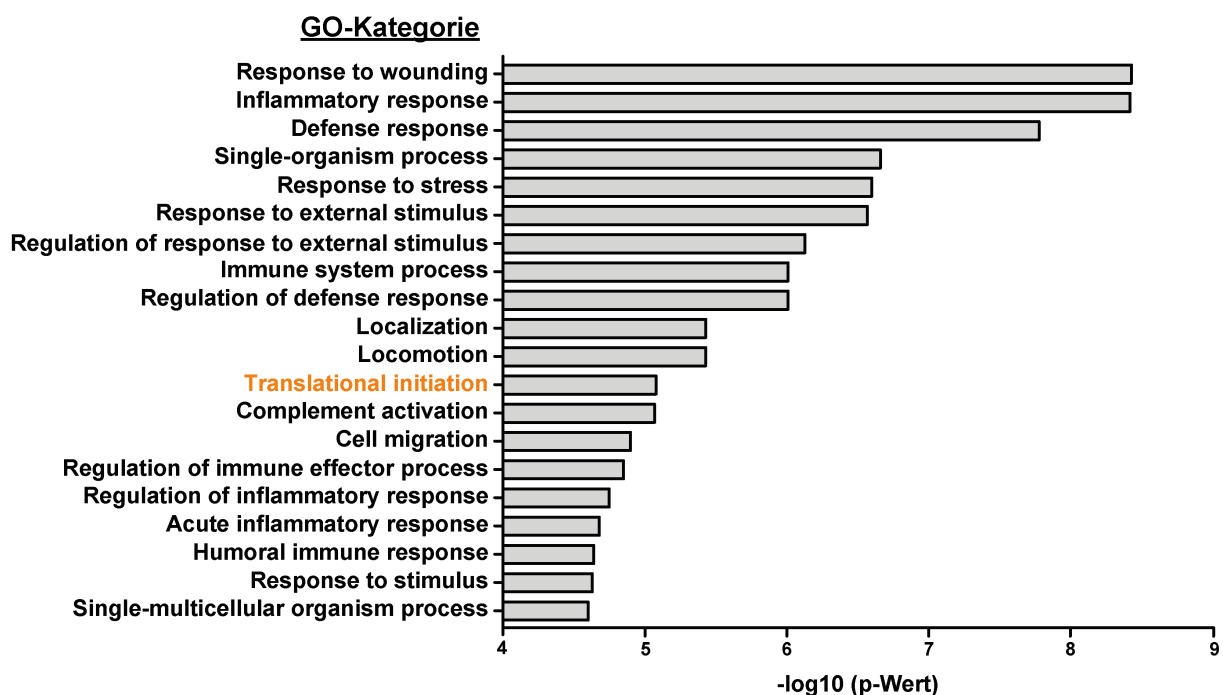


**Abbildung 7-13: Volcano Plot des Expressionsvergleichs der informativen Gene von *ercDC\_RCC* & *infMΦ\_ascOvCa* und der Kontrollgruppe.** Auf der x-Achse ist der x-fache Unterschied der Expression (log2) der informativen Gene zwischen den beiden Vergleichsgruppen aufgetragen. Die Y-Achse zeigt die Signifikanzen (korrigierte p-Werte als  $-\log_{10}$ ) der Unterschiede an. Als Kontrollgruppe für die Ermittlung der differentiell exprimierten Gene wurden alle in der Heatmap in Abbildung 7-12 aufgeführten Zelltypen außer den *ercDC\_RCC* und den *infMΦ\_ascOvCa* verwendet. In rot markiert sind die *ercDC\_RCC*-Signaturgene ( $p < 0,05$ , entspricht  $-\log_{10} p > 1,3$ ) innerhalb der informativen Gene. Punkte, denen ein Gensymbol zugewiesen wurde, sind grau umrandet. Gene, die zu den *ercDC\_RCC*-Markergenen gehören sind in Fettdruck und gelb unterlegt hervorgehoben. In grün sind Gene markiert, die im Text erwähnt werden.

Um einen Eindruck über die biologischen Prozesse zu erhalten, an denen die ercDC\_RCC-Signaturgene beteiligt sind, wurde eine GO-Term-Anreicherungsanalyse durchgeführt. Ziel dieser Analyse war es, festzustellen, ob eine signifikante Anreicherung der im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch- bzw. herabregulierten ercDC\_RCC-Signaturgene in bestimmten GO-Kategorien (GO-Terme) aus dem Bereich „Biologischer Prozess“ vorlag.

In Abbildung 7-14 (Seite 81) sind die Top 20 der signifikant ( $p < 0,001$ ) angereicherten Kategorien dargestellt. Unter diesen waren fast ausschließlich Kategorien, in denen gegenüber der Kontrollgruppe hochregulierte ercDC\_RCC-Signaturgene angereichert waren. Herabregulierte Gene waren nur in der Kategorie „Translational initiation“ (orange Schrift) angereichert. Die Kategorien der herabregulierten Gene waren insgesamt weniger signifikant und hauptsächlich Transkriptions- und Translationsprozessen zugeordnet. Die Kategorien mit der höchsten Signifikanz waren „Response to wounding“ und „Inflammatory response“. Die Anreicherung beider Kategorien ist vermutlich dadurch zu erklären, dass Tumoren auch als „never healing wound“ bezeichnet werden, da sie sich oft aus einem chronisch

inflammatorischen Milieu entwickeln und die beteiligten zellulären und biochemischen Prozesse auch bei der Wundheilung eine Rolle spielen<sup>141</sup>. Das RCC zeichnet sich in der Tat durch ein chronisch inflammatorisches Milieu aus<sup>142</sup>, das möglicherweise eine entsprechende Genexpression in den myeloischen Zellen bewirken kann. Renale MΦ sind auch im Normalgewebe an Wundheilungsprozessen beteiligt und tragen darüber zur Aufrechterhaltung der Gewebemöostase bei<sup>77,79</sup>. Die ercDC\_RCC scheinen auch für die Abwehr von Pathogenen gewappnet zu sein, da die Kategorie „Defense response“ nach den Kategorien „Response to wounding“ und „Inflammatory response“ folgte.



**Abbildung 7-14: Top 20 der signifikant angereicherten GO-Kategorien von hoch- bzw. herabregulierten ercDC\_RCC-Signaturgenen.** Die Signifikanz der GO-Kategorien ist auf der x-Achse angegeben (-log<sub>10</sub> (p-Wert)). Die einzige Kategorie der Top 20 in der die herabregulierten ercDC\_RCC-Signaturgene signifikant angereicht waren, „Translational initiation“, ist orange gekennzeichnet.

Der Einordnung der ercDC\_RCC-Signaturgene mittels der GO-Term-Anreicherungsanalyse folgte eine gezielte Analyse überrepräsentierter Signalwege, da dadurch Rückschlüsse auf die funktionelle Aktivität der Zellen möglich sind. Es wurden zwei verschiedene Analyseverfahren verwendet, einerseits basierend auf der InnateDB Plattform, andererseits die GSEA (engl.: Gene Set Enrichment Analysis). InnateDB konzentriert sich v.a. auf Signalwege, die mit der angeborenen Immunantwort assoziiert sind. Dabei dienen die Datenbanken „KEGG“, „BioCarta“, „Reactome“, „NetPath“, „INOH“ und „PID“ als Grundlage. Ein Signalweg ist überrepräsentiert, wenn von der für die Analyse ausgewählten Testengruppe mehr Gene in einem durch InnateDB definierten Genset (hier: Signalweg) vorkommen als per Zufall erwartet wird. Die Signalweganalyse wurde innerhalb der ercDC\_RCC-Signaturgene durchgeführt, alle anderen informativen Gene dienten als

Hintergrund. Die auf diese Weise ermittelten überrepräsentierten Signalwege (Top 20) sind in Tabelle 11-3 des Anhangs (Seite 174) aufgeführt. Einige der Signalwege, in denen die hochregulierten *ercDC\_RCC*-Signaturgene angereichert waren, sind mit dem Komplementsystem, Lipidmetabolismus und der Modulation der extrazellulären Matrix (Kollagene, Integrine) assoziiert. Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, dass ein deregulierter Lipidmetabolismus die Entwicklung des RCC begünstigt<sup>143</sup>. Auch kommt es bei vielen renalen inflammatorischen Erkrankungen zur Akkumulation von Immunkomplexen, die in einer starken Aktivierung des Komplements resultiert<sup>85,144</sup>. Die herabregulierten *ercDC\_RCC*-Signaturgene waren, wie auch bei der GO-Term-Anreicherungsanalyse, hauptsächlich in Signalwegen überrepräsentiert, die mit Translationsprozessen assoziiert sind.

Für die GSEA wurden im Gegensatz zu der GO-Term-Anreicherungsanalyse und der InnateDB basierten Analyse nicht nur *ercDC\_RCC*-Signaturgene, sondern alle informativen Gene der *ercDC\_RCC* & *infMΦ\_ascOvCa* und der Kontrollgruppe verwendet. Die Gensets (hier: Signalwege) wurden der auf der GSEA Homepage zur Verfügung gestellten Datenbank „MSigDB“ entnommen. Verwendet wurden die Gensets aus den Signalwegdatenbanken „KEGG“, „Reactome“ und „BioCarta“. Mit Hilfe des GSEA-Algorithmus wird getestet, ob in definierten Testgensets signifikante Unterschiede in der Expression zweier Vergleichsgruppen bestehen. Die Stärke der Genexpressionsunterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen innerhalb eines Testgensets wird durch den „enrichment score“ (ES) angezeigt (siehe Abbildung 11-5 im Anhang, Seite 175). Der normalisierte „enrichment score“ (NES) eignet sich für den Vergleich der Resultate verschiedener Gensets. Parallel mit dem NES wird auch ein p-Wert und eine FDR (engl.: false discovery rate) berechnet. Diese waren in unserem Fall meistens verhältnismäßig hoch ( $p > 0,05$ ;  $FDR > 0,25$ ), was bedeutet, dass die Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen nicht so groß waren. Zur Beurteilung der Genexpressionsunterschiede wurde der NES verwendet, da dieser unabhängig von Signifikanzgrenzen eine Aussage zulässt. In der Tabelle 11-5 im Anhang (Seite 175) sind, basierend auf den NES aller verwendeten Signalwegdatenbanken, die Top 20 der Gensets gezeigt, bei denen die *ercDC\_RCC* & *infMΦ\_ascOvCa*-Gruppe die stärkste Überexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte. Wie auch bei der InnateDB basierten Analyse waren einige Gensets mit dem Lipidmetabolismus und dem Komplement assoziiert, wie z.B. „Lipid digestion mobilization and transport“, bei der die *ercDC\_RCC*-Markergene *PLTP* und *APOE* zu den „leading edge“ Genen gehörten. „Leading edge“ Gene sind diejenigen Gene, die den größten Beitrag zum ES leisten (siehe Abbildung 11-5 im Anhang). Außerdem waren Gensets darunter, die an Prozessen der extrazellulären Matrix beteiligt sind, wie „Extracellular matrix organization“ und „ECM receptor interaction“. Auch das Genset „Systemic Lupus erythematosus“ befand sich unter den Top 20. Hier gehörten die in der Komplementkaskade involvierten *ercDC\_RCC*-Markergene *C2*, *C1QA* und *C1QB* zu den

„leading edge“ Genen. Wie bereits bei der InnateDB basierten Analyse und der GO-Term-Anreicherungsanalyse beobachtet, waren die Gensets, für welche die Kontrollgruppe eine starke Überexpression zeigte, hauptsächlich mit Transkriptions- und Translationsprozessen assoziiert. Sie sind in der Tabelle 11-5 (im Anhang) nicht aufgeführt.

Weiterführend stellte sich die Frage, in welches funktionelle Netzwerk sich die ercDC\_RCC-Signatur- bzw. Markergene eingliedern lassen. Hierfür wurde das Programm GeneMANIA verwendet, das einzelne Gene aufgrund funktioneller Gemeinsamkeiten miteinander verknüpft. Das sich ergebende Netzwerk kann durch funktionell verwandte Gene erweitert werden, die durch das System anhand der Anzahl der Assoziationen mit den vorgegebenen Genen berechnet werden. Die einzelnen Gene werden basierend auf physikalischen und genetischen Interaktionen, Signalwegen, Koexpression, Kolo-kalisation, Ähnlichkeit von Proteindomänen und vorhergesagten funktionellen Interaktionen zwischen Genen bzw. Proteinen miteinander verbunden. Für die Kalkulation des Netzwerkes wurden die ercDC\_RCC-Markergene verwendet, da die Anzahl der Signaturgene für das System zu groß war und das Netzwerk sonst unübersichtlich wäre. In Abbildung 7-15 (Seite 86) ist das Netzwerk der ercDC\_RCC-Markergene und verwandter Gene gezeigt. Die Gene stellen dabei die Knoten dar und die Linien die sie verbindenden Verknüpfungen. Jede Linienfarbe ist mit einer Assoziationsquelle verknüpft, wobei die meisten Gene aufgrund von Koexpressionsdaten (lila) verbunden wurden. Die Länge der Linien gibt an, wie nahe verwandt die Gene miteinander sind. Die schwarzen Knotenpunkte kennzeichnen die Markergene, graue die durch das System ermittelten verwandten Gene. Ein grauer Knotenpunkt ist umso größer, je häufiger und enger die Verbindungen mit den Markergenen sind. Unter den verwandten Genen fanden sich MΦ-assozierte Gene, wie *CD14*, *CD163*, *CD206/MRC1* und *CD16/FCGR3A*. Sie sind durch eine gelbe Umrahmung hervorgehoben. Auch die beiden ercDC\_RCC-Signaturgene, *VSIG4* und *HMOX1*, gehörten zu den verwandten Genen. Sie kodieren für immuninhibierende, proangiogene Proteinprodukte.

Um die bisher erarbeiteten Merkmale der ercDC\_RCC-Markergene und der verwandten Gene im Zusammenhang zu betrachten, wurden sie auf das Schema eines mononukleären Phagozyten übertragen (Abbildung 7-16, Seite 87). Dabei wurde die zelluläre Lokalisation berücksichtigt und die Gene funktionell gruppiert (farblich hinterlegte Bereiche und Nummerierung). Die Proteine sind mit den entsprechenden Gensymbolen dargestellt, um zu verdeutlichen, dass die Ergebnisse aus der Genexpressionsanalyse hervorgingen. Rote Schrift bedeutet Hochregulation, blaue Schrift Herabregulation in ercDC\_RCC gegenüber der Kontrollgruppe. Verwandte Gene sind durch (°) nach dem Gensymbol zu erkennen. Gene, die eine negative Auswirkung auf die zugeordnete Funktionsgruppe haben, sind mit (\*) gekennzeichnet. In grau markiert sind wichtige Interaktionspartner, die aber nicht zu den ercDC\_RCC-Markergenen gehören. Der Beitrag der einzelnen Gene zum Markergenprofil der ercDC\_RCC (Centroid Schrumpfung, Differenz zum Mittelwert) sowie die Signifikanzen

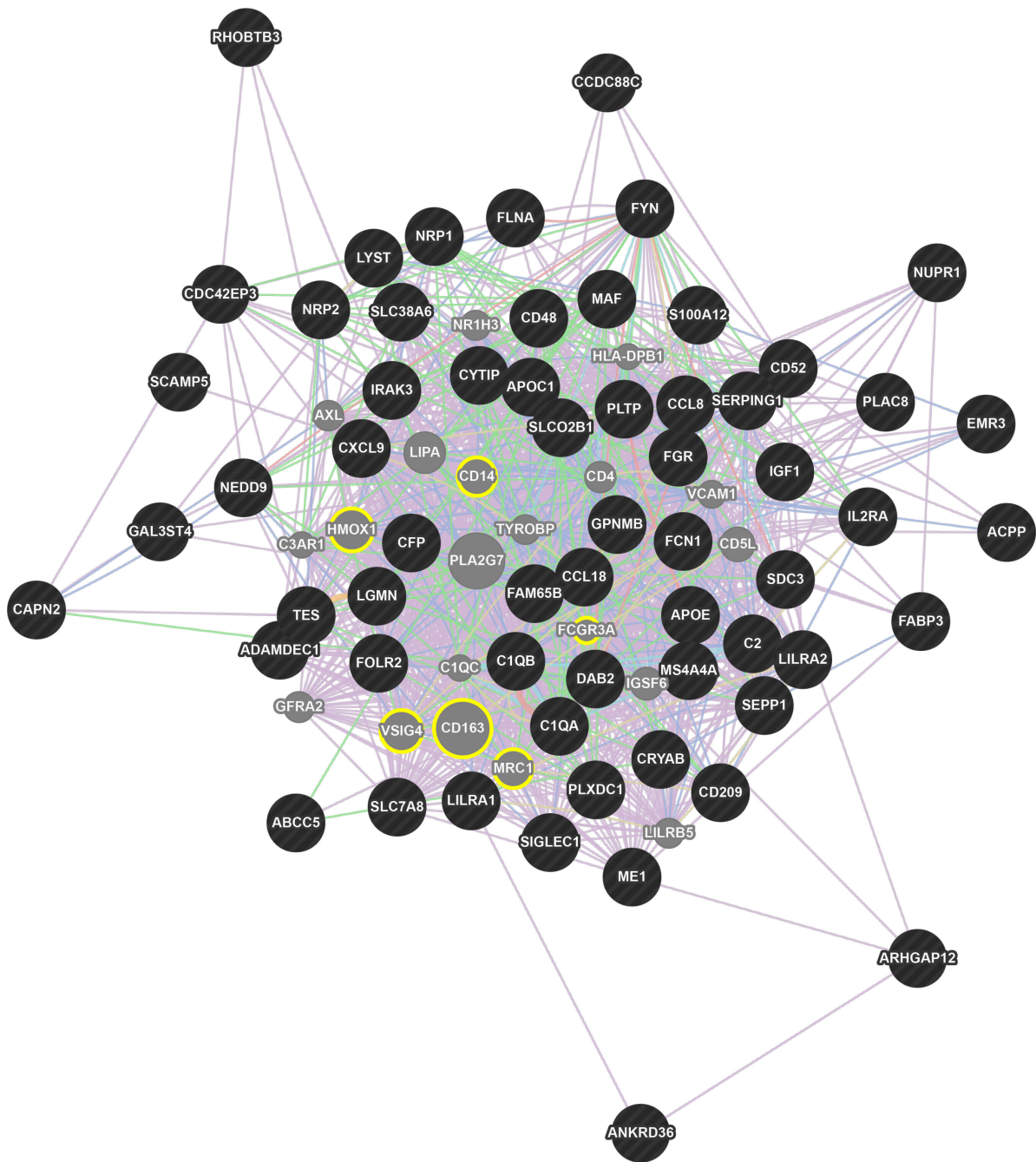
und x-fachen Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe sind zusätzlich in Tabelle 7-4 (Seite 88) aufgelistet. Insgesamt wurden die Markergene und verwandten Gene 13 Funktionsgruppen zugeordnet: ① Lipidmetabolismus, ② Komplementsystem, ③ Stressantwort, ④ Transkription, ⑤ Endozytose und Antigenpräsentation, ⑥ Transport, ⑦ Bakterizide Aktivität, ⑧ Zytoskelett und Migration, ⑨ Zelladhäsion, ⑩ Pro/antiinflammatorische Immunantwort, ⑪ Angiogenese und Tumordinvasion, ⑫ T-Zell-Stimulation, ⑬ T-Zell-Inhibition und Toleranz.

Wie bereits in der GO-Term-Anreicherungsanalyse, InnateDB basierten Analyse und der GSEA beobachtet, waren sehr viele Markergene mit dem Lipidmetabolismus ① und dem Komplementsystem ② assoziiert. Alle an der Lipidumsetzung beteiligten Gene waren im Vergleich zur Kontrollgruppe hochreguliert, einige besitzen zudem antiinflammatorische Eigenschaften, wie z.B. *APOE* und *PLTP*, beides Targetgene des Transkriptionsfaktors LXR- $\alpha$  (siehe Funktionsgruppe 4). Gene der Stressantwort (③; *HMOX1*, *SEPP1*, *NUPR1*) waren ebenfalls hochreguliert. Dies könnte durch das hypoxische und zytokinreiche inflammatorische Tumormilieu bedingt sein. So ist beschrieben, dass die Expression von *HMOX1* u.a. durch NO und proinflammatorische Zytokine induziert wird<sup>145</sup>. Auch der antiinflammatorische Hämoglobinrezeptor CD163, der von *ercDC\_RCC* exprimiert wird (siehe Abbildung 7-31B, Seite 116), kann die Expression von *HMOX1* bewirken<sup>146</sup>. *HMOX1* inhibiert proinflammatorische Signalwege in DC während die IL-10-Sekretion bewahrt wird<sup>147</sup>. Somit kann die bekannte IL-10-Sekretion und die schwache IL-12-Sekretion der *ercDC* über die auf Transkriptebene beobachtete Hochregulation von *HMOX1* erklärt werden. Auch die beobachtete Hochregulation der für Transkriptionsfaktoren kodierenden Gene *MAF* und *NR1H3/LXRA* ④ könnte zur Regulation von IL-10 und IL-12 beitragen. Beide haben eine antiinflammatorische Wirkung, *MAF* durch die Induktion von IL-10, LXR- $\alpha$  durch die Inhibition NF $\kappa$ B-induzierter proinflammatorischer Gene, wie z.B. IL-12<sup>148,149</sup>. Weiterhin stark vertreten waren Gene, die mit Funktionen der M $\Phi$  assoziiert sind, wie Endozytose und Antigenpräsentation ⑤, Transportvorgänge ⑥ und die Abtötung von Pathogenen (Bakterizide Aktivität ⑦). Unter den Markergenen waren auch viele Gene, die für zytoskelettale Proteine und Adhäsionsproteine kodieren (⑧, ⑨). Ein Teil davon (z.B. *S100A12*) ist mit proinflammatorischen Vorgängen assoziiert<sup>150</sup>. Interessanterweise waren unter den Markergenen aber auch solche, die mit antiinflammatorischen Funktionen assoziiert sind, *IRAK3* und *CRYAB* (⑩)<sup>151,152</sup> sowie beispielsweise *PLTP* und *GPMB*<sup>153,154</sup>. Die starke Präsenz von proinflammatorischen als auch antiinflammatorischen Gengruppen legt den Schluss nahe, dass *ercDC* einen myeloischen Mischtyp darstellen, der sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften vereint. Solche Mischformen sind für renale M $\Phi$  im Mausmodell der Lupus-Nephritis beschrieben<sup>155</sup>.

Die Hochregulation von Genen innerhalb der Funktionsgruppe Angiogenese und Tumorinvasion ⑪ passt gut zu der Abstammung der ercDC aus Tumorgewebe. Hervorzuheben sind z.B. die Gene *CCL8* und *CCL18*, deren Proteinprodukte bei der Rekrutierung von TAM eine Rolle spielen<sup>156</sup>. *NRP1* kodiert für einen wichtigen proangiogenen Rezeptor, der für einen kontinuierlichen Influx von protumoralen MΦ in den Tumor sorgt<sup>157</sup>. Auch *IGF1* und *NRP2* kodieren für proangiogene Faktoren, wobei für beide aber auch eine T-Zell-stimulierende Wirkung beschrieben ist<sup>158,159,160</sup> und sie daher auch zur Funktionsgruppe ⑫ gehören. Die Hochregulation von *CXCL9*, einem Gen, das für ein Chemokin mit primär antitumoralen Eigenschaften kodiert, passt zum bereits vorher beobachteten gemischten Bild der ercDC. Denn *CXCL9* ist angiostatisch und antiinvasiv<sup>161</sup> und bewirkt durch Bindung an CXCR3 die Rekrutierung von IFN-γ-produzierenden T<sub>H</sub>1-Zellen und CTL<sup>162,163</sup>. Diese Eigenschaften sind konsistent mit der beschriebenen reichlichen Präsenz von CXCR3<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen im RCC<sup>164</sup>. Das gemischte Bild der ercDC bestätigte sich weiterhin, da unter den Markergenen neben Genen, die mit T-Zell-stimulierenden Eigenschaften assoziiert sind auch viele Gene mit T-Zell-inhibitorischen Eigenschaften zu finden waren. Zu der Funktionsgruppe T-Zell-Inhibition ⑬ gehören u.a. *CD163*, *GPMB* und *VSIG4*, die in ercDC\_RCC hochreguliert waren. *VSIG4* ist in diesem Zusammenhang erwähnenswert, weil es für einen zur B7-Familie gehörenden Komplementrezeptor mit endozytotischen und koinhibitorischen Eigenschaften kodiert, der für die Aufrechterhaltung der T-Zell-Toleranz in peripheren Geweben wichtig ist<sup>165,166</sup>. Die Hochregulation könnte also am Tumor-„Immunescape“ mitbeteiligt sein. *VSIG4* induziert außerdem die Sezernierung von protumoralem IL-8 und MMP-9<sup>167</sup> und ist somit auf verschiedenen Ebenen tumorfördernd.

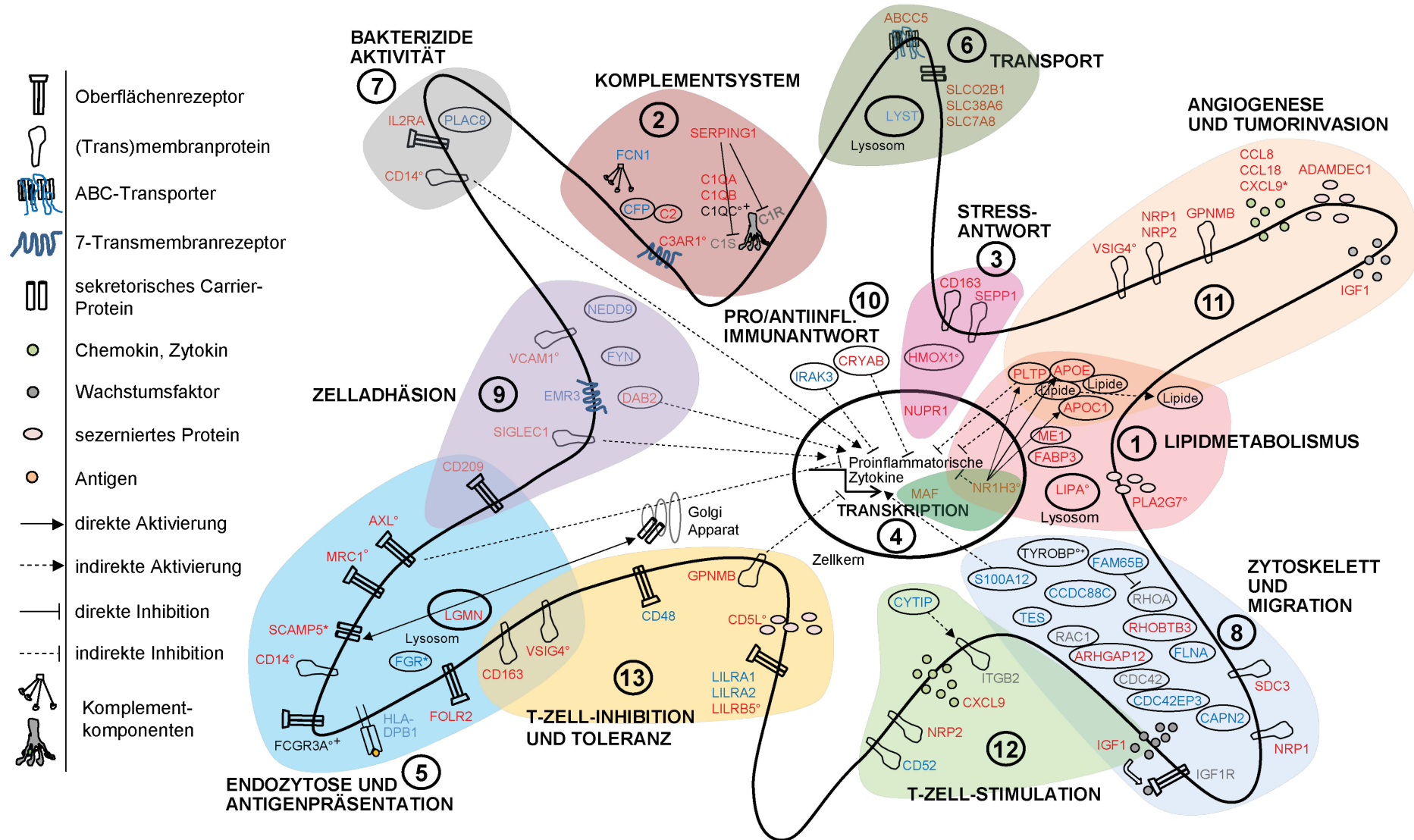
Zusammenfassend zeigte die Verwandtschaftsanalyse, dass die ercDC\_RCC den CD11c<sup>LO</sup> MΦ\_Decidua und insbesondere den infMΦ\_ascOvCa sehr ähnlich sind. Beide Zelltypen stimmten im Expressionsmuster der ercDC\_RCC-Markergene sehr stark mit den ercDC\_RCC überein. Bei den infMΦ\_ascOvCa war die Ähnlichkeit sogar so groß, dass sie als ercDC\_RCC klassifiziert wurden. Die anderen myeloischen Zelltypen aus den nicht-lymphatischen Geweben (inklusive TAM-GIST) und dem Blut unterschieden sich dagegen deutlich im Expressionsmuster von den ercDC\_RCC. Aus dem Markergenprofil lässt sich ableiten, dass die ercDC einen myeloischen Mischtyp darstellen, der pro- und antiinflammatorische sowie immunstimulierende und immuninhibierende Eigenschaften vereint. Weiterhin deutet die beobachtete Anreicherung von Genen, die mit Wundheilung, Inflammation, ECM-Modulierung, Lipidmetabolismus oder dem Komplementsystem assoziiert sind, darauf hin, dass das Transkriptom der ercDC\_RCC durch das Milieu des RCC geprägt ist, für das ein chronisch inflammatorisches Milieu, ein deregulierter Lipidmetabolismus und die Anreicherung von Komplementkomplexen beschrieben ist<sup>85,142,143,144</sup>.





Assoziationsdaten	Farbe	Beitrag (%)
Koexpression	lila	86,17
vorhergesagte Interaktion	grün	5,08
Kolokalisation	blau	5,07
physikalische Interaktion	grüngelb	2,54
Signalwege	rot	0,83
gemeinsame Proteindomänen	orange	0,28
genetische Interaktion	türkis	0,03

**Abbildung 7-15: Funktionelles Netzwerk der ercDC\_RCC-Markergene.** In schwarz sind die Markergene gekennzeichnet, in grau die durch das Programm GeneMANIA ermittelten verwandten Gene. Die Größe der grauen Knotenpunkte ist proportional zu der Anzahl und Nähe der Verbindungen mit den Markergenen. Die Assoziation der Gene wurde mit Hilfe verschiedener Assoziationsdaten (siehe Tabelle) ermittelt. Gene, die im Text diskutiert werden, sind gelb umrahmt.



**Abbildung 7-16: Funktion und Lokalisation der ercDC\_RCC-Markergene in mononukleären Phagozyten.** Die Gene wurden in 13 Funktionsgruppen (farbige Hinterlegung, Nummerierung) eingeteilt. Rot: Gene, die von ercDC\_RCC im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker exprimiert wurden; blau: herabregulierte Gene. Schwarz: nicht informatives, verwandtes Gen; grau: Gen, welches nicht zu den ercDC\_RCC-Markergenen oder verwandten Genen gehört, aber aufgrund direkter Protein-Protein Interaktion ergänzt wurde. ° verwandtes Gen nach GeneMANIA; + verwandtes Gen, zu dem keine Expressionswerte vorlagen; \* negative Auswirkung auf die angegebene Funktionsgruppe. Folgenden Genen konnte keine eindeutige Funktion in myeloischen Zellen zugeordnet werden: ANKRD36, MS4A4A, ACPP, GAL3ST4, IGSF6°, PLXDC1, CD4°, GRFA2° (siehe auch Tabelle 7-4).

**Tabelle 7-4: Fakten zur Expression und den Eigenschaften der ercDC\_RCC-Markergene sowie verwandter Gene.** Gezeigt ist der Beitrag der einzelnen Markergene zum charakteristischen Markergenprofil der ercDC\_RCC (Differenz zum MW, „nearest shrunken centroids“ Methode), die Signifikanz (p-Wert) und die x-fache Veränderung (FC = engl.: fold change) der Gene gegenüber der Kontrollgruppe. Außerdem ist der Zell(sub)typ angegeben mit dem die Gene assoziiert sind. Die p-Werte der Gene ohne signifikant differentielle Expression ( $p > 0,05$ ) sind grün unterlegt. Die Gene sind in den jeweiligen Funktionsgruppen entsprechend der p-Werte (aufsteigend) angeordnet.

Gensymbol/ alternat. Bez.	Differenz zum MW	p-Wert	FC	Weitere Funktionsgruppen	Assoziierter Zell(sub)typ
<b>LIPIDMETABOLISMUS ①</b>					
APOC1	0,083	0,00003	3,44	Angiogenese u. Tumorinvasion	M2-MΦ, TAM
ME1	0,140	0,00008	2,75		
PLTP	0,168	0,00019	4,00	pro/antiinfl. Immunantwort, Angiogenese u. Tumorinvasion	M2-MΦ, TAM
FABP3	0,014	0,00059	2,91		
APOE	0,040	0,00068	3,53	pro/antiinfl. Immunantwort, Angiogenese und Tumorinvasion	M2-MΦ, TAM
LIPA°		0,00459	1,62		M2-MΦ
PLA2G7°		0,10167	0,87		
<b>KOMPLEMENTSYSTEM ②</b>					
C2	0,141	0,00008	2,74		
C1QA	0,051	0,00081	2,67		
CFP	-0,282	0,00081	-2,53		
C1QB	0,018	0,00112	2,67		
SERPING1	0,048	0,00150	2,73		
C3AR1°		0,04161	1,90		
FCN1	-0,461	0,10462	-2,15		
C1QC°+					
<b>STRESSANTWORT ③</b>					
SEPP1	0,194	0,00034	5,35		M2-MΦ, TAM
NUPR1	0,142	0,00047	2,54		
HMOX1°		0,04047	1,60		
<b>TRANSKRIPTION ④</b>					
NR1H3/LXRA°		0,00083	2,09	Lipidmetabolismus, pro/antiinfl. Immunantwort	
MAF	0,003	0,00111	2,43		MΦ
<b>ENDOZYTOSE UND ANTIGENPRÄSENTATION ⑤</b>					
FOLR2	0,185	0,00003	2,62		M2-MΦ, TAM
CD209/DC-SIGN	0,292	0,00012	2,63	Zelladhäsion	(DC)
FGR*	-0,245	0,00059	-2,20		
SCAMP5	0,160	0,00149	1,56		MΦ
CD163°		0,00207	2,88	T-Zell-Inhibition und Toleranz, Stressantwort	M2-MΦ
LGMN	0,016	0,00288	2,95		
CD206/MRC1°		0,05368	1,98		MΦ
AXL°		0,10866	1,65	pro/antiinfl. Immunantwort	
HLA-DPB1°		0,96735	-1,01		
FCGR3A/CD16°+					MΦ
<b>TRANSPORT ⑥</b>					
SLCO2B1	0,099	0,00027	3,63		M2-MΦ
ABCC5	0,020	0,00031	1,79		M2-MΦ
SLC38A6	0,071	0,00036	2,22		M2-MΦ
SLC7A8	0,008	0,00042	3,10		MΦ
LYST	-0,013	0,00459	-2,11		
<b>BAKTERIZIDE AKTIVITÄT ⑦</b>					
IL2RA	0,100	0,00112	2,24		
PLAC8	-0,088	0,01792	-2,42		MΦ
CD14°		0,02409	1,96	pro/antiinfl. Immunantwort	MΦ
<b>ZYTOSKELETT UND MIGRATION ⑧</b>					
SDC3	0,121	0,00006	2,35		
FAM65B	-0,123	0,00034	-2,35		
RHOBTB3	0,030	0,00109	2,20		
ARHGAP12	0,042	0,00112	1,77		
TES	-0,006	0,00330	-1,21		

CCDC88C	-0,154	0,00760	-1,79		
CDC42EP3	-0,078	0,01040	-1,87		
CAPN2	-0,056	0,01213	-1,67		
FLNA	-0,037	0,01475	-1,67		
S100A12	-0,157	0,25430	-1,39	pro/antiinfl. Immunantwort	
TYROBP/DAP12 <sup>o+</sup>		NI			
<b>ZELLADHÄSION (9)</b>					
DAB2	0,031	0,00059	2,85	pro/antiinfl. Immunantwort	
SIGLEC1/CD169	0,073	0,00070	2,74	pro/antiinfl. Immunantwort	MΦ
FYN	-0,025	0,00109	-2,10		
EMR3	-0,071	0,00170	-2,76		
NEDD9	-0,018	0,00298	-1,84		
VCAM1 <sup>o</sup>		0,04716	1,64		
<b>PRO/ANTIINFL. IMMUNANTWORT (10)</b>					
CRYAB	0,050	0,00083	2,11		
IRAK3	-0,045	0,04155	-1,79		M2-MΦ
<b>ANGIOGENESE UND TUMORINVASION (11)</b>					
CCL8	0,086	0,00012	3,88		TAM
GPNMB	0,127	0,00031	4,36	pro/antiinfl. Immunantwort, T-Zell-Inhibition und Toleranz	TAM
NRP1	0,088	0,00042	3,31	Zytoskelett und Migration	
CCL18	0,080	0,00076	3,47	Zytoskelett und Migration	TAM
ADAMDEC1	0,026	0,00077	3,31		TAM
IGF1	0,259	0,00491	2,34	Zytoskelett u. Migration, T-Zell-Stimulation	
CXCL9*	0,011	0,01704	3,61	T-Zell-Stimulation	
<b>T-ZELL-STIMULATION (12)</b>					
NRP2	0,023	0,00034	2,83	Angiogenese u. Tumorinvasion	DC
CYTIP	-0,067	0,00126	-1,78		
CD52	-0,228	0,00683	-1,69		
<b>T-ZELL-INHIBITION (13)</b>					
LILRB5/CD85C <sup>o</sup>		0,00044	1,96		
CD48	-0,023	0,00375	-1,81		
VSIG4 <sup>o</sup>		0,00433	2,40	Endozytose u. Antigenpräsentation, Angiogenese u. Tumorinvasion	
LILRA2/ILT1	-0,058	0,05806	-1,65		
LILRA1/CD85I	-0,084	0,06103	-1,55		
CD5L <sup>o</sup>		0,78537	1,07		MΦ
<b>KEINE DEFINIERTE FUNKTION IN MYELOISCHEN ZELLEN</b>					
GAL3ST4	0,073	0,00006	2,67		
MS4A4A	0,024	0,00193	2,32		M2-MΦ
PLXDC1	0,200	0,05613	1,37		
ACPP	-0,040	0,10057	-1,30		
GFRA2 <sup>o</sup>		0,17368	1,29		
ANKRD36	0,038	0,19111	1,28		
IGSF6 <sup>o</sup>		0,39966	-1,24		MΦ
CD4 <sup>o</sup>		0,89129	1,36		

<sup>o</sup> verwandte Gene; \* verwandte Gene, zu denen keine Expressions- und p-Werte vorliegen, da sie auf einem der für die Analyse verwendeten Arrays nicht vorhanden waren bzw. nicht informativ waren (TYROBP); \* Gene mit negativer Auswirkung auf die jeweilige Funktionsgruppe; NI: nicht informativ

### **7.5.5 Vergleich der ercDC aus dem RCC mit in vitro generierten ercDC auf Transkriptebe**

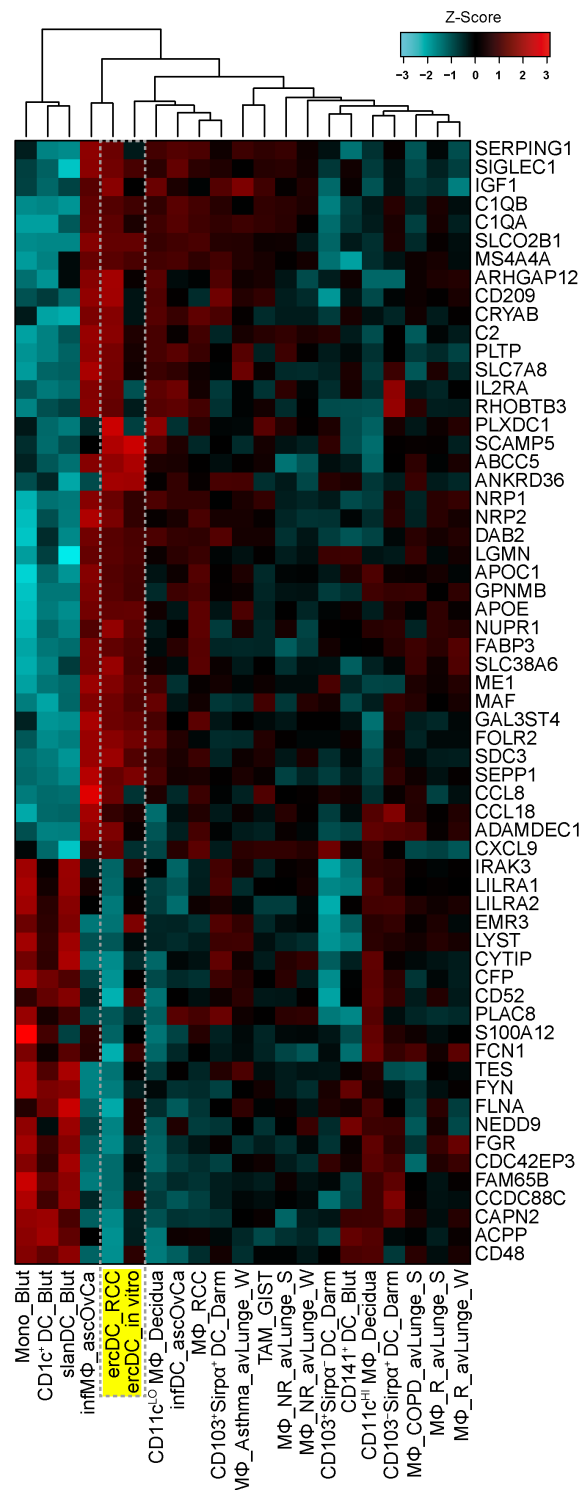
Die durchflusszytometrische Analyse der Kostimulationsmoleküle CD80, CD86 und CD40 sowie des MHC-II-Moleküls HLA-DR lieferte erste Hinweise, dass die in vitro generierten ercDC denen aus dem RCC-Gewebe ähnlich sein könnten. Mit den in vitro generierten Zellen können kontrollierte und umfangreiche Untersuchungen durchgeführt werden, weil sie gezielt unter definierten Bedingungen in relativ großer Menge hergestellt werden können. Dagegen sind ercDC aus dem RCC-Gewebe nur in limitierter Zellzahl verfügbar und aufgrund der Herkunft von Patientenmaterial heterogen. Es ist deshalb erstrebenswert, ein In-vitro-Modell zu entwickeln, das die In-vivo-Situation möglichst gut widerspiegelt. Um festzustellen inwieweit die in vitro generierten ercDC mit den ercDC aus dem RCC vergleichbar sind, wurde auch das Transkriptom der in vitro generierten ercDC untersucht. Vergleichend dazu wurden cDC (IL-4 plus GM-CSF) sowie M1- und M2-MΦ, die nach dem Protokoll von Martinez et al.<sup>103</sup> aus Monozyten generiert wurden, analysiert (Tabelle 7-5, Seite 91). Die Genexpressionsprofile der M1- und M2-MΦ wurden, wie von Murray et al.<sup>168</sup> kürzlich vorgeschlagen, als Referenzen verwendet. Außerdem wurden durch Behandlung der Monozyten mit GM-CSF MΦ generiert, die laut Literatur M1-ähnlich sein sollen<sup>169</sup>.

Jeder Zelltyp wurde aus Monozyten von 15 verschiedenen Spendern generiert, um einen möglichst guten biologischen Querschnitt zu erlangen. Von jedem Zelltyp pro Spender wurde die RNA gewonnen. Anschließend wurde die RNA des gleichen Zelltyps von jeweils 5 Spendern gepoolt, so dass drei biologische Replikate pro Zelltyp entstanden (Sp. Pool 1-3 in Tabelle 7-5). Diese Vorgehensweise wurde in Anlehnung an Literaturdaten durchgeführt und hatte zum Ziel, die biologische Variabilität der humanen Spender auszugleichen<sup>170</sup>. Die RNA-Qualität der vereinigten Proben wurde überprüft, die RIN-Werte waren gut, sie lagen zwischen 7,8 und 9,1. Die Informationen zu den in der Genexpressionsanalyse eingesetzten in vitro generierten Zellen sind in Tabelle 7-5 zusammengefasst.

**Tabelle 7-5: Übersicht über die in der Genexpressionsanalyse eingesetzten in vitro generierten Zelltypen.** Aufgeführt ist die Bezeichnung der Zellen für die Genexpressionsanalyse, die Kultivierungsbedingung für die Generierung aus Monozyten, die Bezeichnung der Replikate sowie deren RNA RIN-Werte.

Zelltyp	Bezeichnung	Kultivierungsbedingung	Replikate	RNA RIN
<b>cDC</b>	cDC_in vitro	IL-4, GM-CSF	Sp. Pool 1	8,3
			Sp. Pool 2	8,1
			Sp. Pool 3	8,8
<b>ercDC</b>	ercDC_in vitro	RCC-26-CM	Sp. Pool 1	7,8
			Sp. Pool 2	7,8
			Sp. Pool 3	8,1
<b>GM-CSF-MΦ</b>	GM-CSF-MΦ_in vitro	GM-CSF	Sp. Pool 1	9,6
			Sp. Pool 2	9,1
			Sp. Pool 3	8,9
<b>M1-MΦ</b>	M1-MΦ_in vitro	M-CSF, IFN-γ, LPS (nach Martinez et al. <sup>103</sup> )	Sp. Pool 1	8,2
			Sp. Pool 2	8,5
			Sp. Pool 3	8,7
<b>M2-MΦ</b>	M2-MΦ_in vitro	M-CSF, IL-4 (nach Martinez et al. <sup>103</sup> )	Sp. Pool 1	8,7
			Sp. Pool 2	8,8
			Sp. Pool 3	8,8

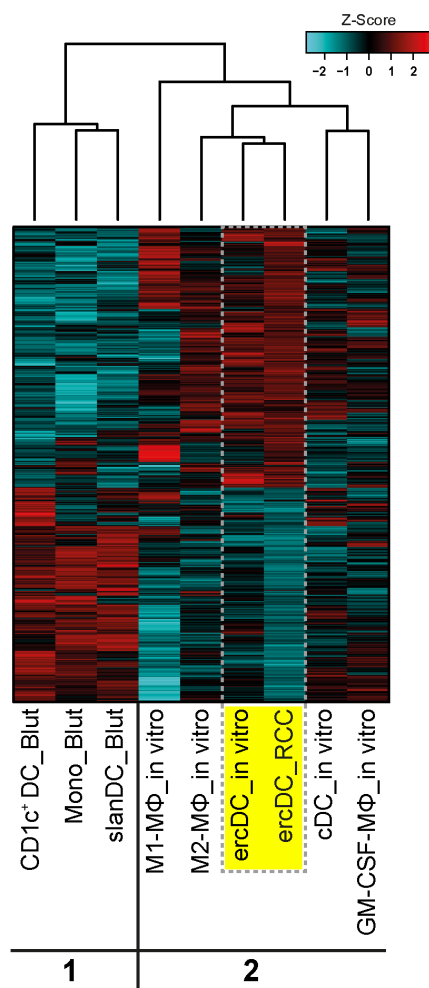
Um die Ähnlichkeit der ercDC\_in vitro mit den ercDC\_RCC zu bestimmen, wurde im ersten Schritt eine Klassifizierung mit Hilfe der „nearest shrunken centroids“ Methode durchgeführt. Die ercDC\_in vitro wurden anhand der 61 Markergene nicht als ercDC\_RCC klassifiziert. Die Visualisierung der Genexpressionsstärken der Markergene in einer Heatmap zeigte jedoch, dass das Genexpressionsmuster der ercDC\_in vitro mit dem der ercDC\_RCC über weite Bereiche übereinstimmte (Abbildung 7-17, Seite 92, grauer Rahmen und gelbe Markierung).



**Abbildung 7-17: Expression der ercDC\_RCC-Markergene in in vitro generierten ercDC.** Die Heatmap zeigt die relative Expression (Z-Score) der 61 Markergene und das Clustering der Zelltypen. Die ercDC\_RCC und ercDC\_in vitro sind gelb markiert und deren ähnliches Genexpressionsmuster durch einen grauen Rahmen gekennzeichnet.



In einem zweiten Schritt wurde geprüft, wie ähnlich die ercDC\_in vitro den ercDC\_RCC in der Expression der Signaturgene sind. Hierfür wurde die relative Expression der ercDC\_RCC-Signaturgene in einer komprimierten Heatmap dargestellt und die Zelltypen entsprechend geclustert (Abbildung 7-18). Für den Vergleich wurden zusätzlich zu den beiden ercDC-Typen auch die anderen in vitro generierten Zelltypen, cDC, M1-MΦ, M2-MΦ und GM-CSF-MΦ sowie die Monozyten, CD1c<sup>+</sup> DC und slanDC aus dem Blut verwendet. Die letzten drei Zelltypen gehörten der Kontrollgruppe bei der Ermittlung der ercDC\_RCC-Signaturgene an. Sie könnten daher potentiell eine zu den ercDC\_RCC gegensätzliche Genexpression zeigen und wurden als Kontrolle eingeschlossen. Das aus der hierarchischen Clusteranalyse resultierende Dendrogramm (Abbildung 7-18) gliederte die Zelltypen in zwei Großcluster, 1 und 2, wobei Großcluster 1 alle Zelltypen aus dem Blut umfasste und Großcluster 2 alle in vitro generierten Zelltypen sowie die ercDC\_RCC. Innerhalb des Großclusters 2 waren die ercDC\_in vitro den ercDC\_RCC am ähnlichsten (grauer Rahmen, gelbe Markierung), sie exprimierten viele der Signaturgene übereinstimmend. M2-MΦ\_in vitro lagen in einem zu den beiden ercDC-Typen benachbarten Arm. M1-MΦ\_in vitro bildeten einen eigenen, separaten Arm.

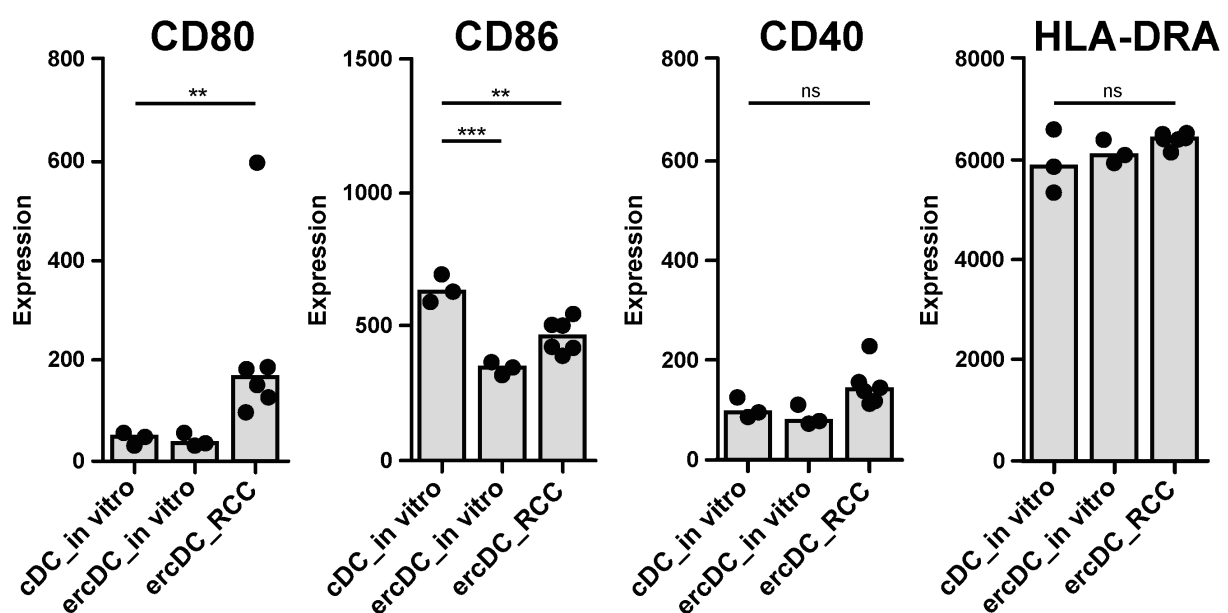


**Abbildung 7-18: Expression der ercDC\_RCC-Signaturgene in in vitro generierten ercDC.** Die Heatmap zeigt die relative Expression (Z-Score) der ercDC\_RCC-Signaturgene sowie das Clustering der Zelltypen. Die Zelltypen gruppierten sich in zwei Großcluster, 1 und 2. Die ercDC\_in vitro und ercDC\_RCC bildeten ein Subcluster (grauer Rahmen, gelbe Markierung).



Bei der durchflusszytometrischen Oberflächenanalyse hatten sich Parallelen in der Expression der Kostimulations- und MHC-II-Moleküle zwischen *ercDC\_in vitro* und *ercDC\_RCC* gezeigt. Dies wurde nun auch auf Transkriptebeine untersucht und dazu für jeden der analysierten Marker die linearen Expressionswerte in einem Stripchart-Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 7-19). Die *cDC\_in vitro* wurden zum Vergleich miteinbezogen.

Die Transkriptlevel von *CD80* waren bei *ercDC\_in vitro* und *cDC\_in vitro* vergleichbar, die *ercDC\_RCC* exprimierten signifikant mehr *CD80* als die beiden In-vitro-Zelltypen. *CD86* wurde von allen Zelltypen stärker exprimiert als *CD80*, bei *cDC\_in vitro* war das Transkriptlevel analog zur durchflusszytometrischen Analyse signifikant am höchsten. *CD40* wurde insgesamt von allen Zelltypen weniger stark transkribiert als *CD86*, wobei die Transkriptlevel bei den In-vitro-Zelltypen etwas niedriger waren als bei den *ercDC\_RCC*. Die Transkriptlevel von HLA-DR waren bei allen Zelltypen vergleichbar hoch (Abbildung 7-19). Zusammenfassend korrespondierten die Transkriptlevel gut mit dem FACS-basierten Proteinmuster. Es bestätigte sich, dass *ercDC\_in vitro* und auch *ercDC\_RCC* die aktivierenden Marker, mit Ausnahme von *CD86*, mindestens genauso stark exprimieren wie die *cDC\_in vitro*.

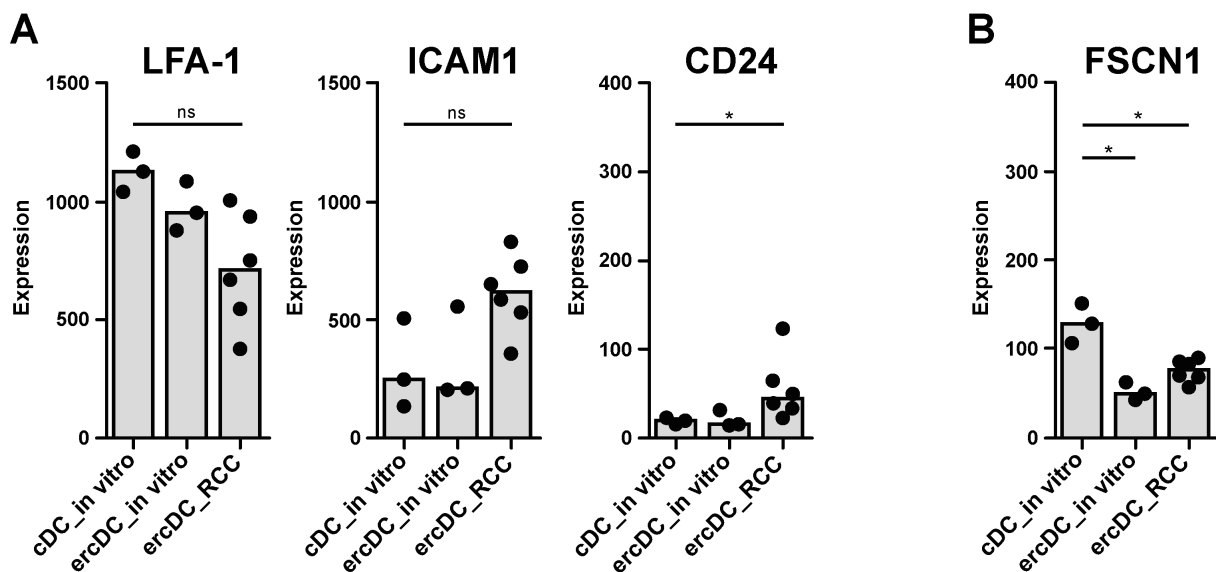


**Abbildung 7-19: Transkriptlevel der für Kostimulations- bzw. MHC-II-Moleküle kodieren Gene *CD80*, *CD86*, *CD40* und *HLA-DRA* in in vitro generierten und aus dem RCC-Gewebe gewonnen *ercDC*.** Gezeigt sind die normalisierten linearen Expressionswerte der Gene. Die Balken zeigen den Median an. Ein Symbol entspricht einem Replikat des jeweiligen Zelltyps. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des gepaarten Student's t-Test (*cDC\_in vitro* und *ercDC\_in vitro*) bzw. bei ungepaarten Proben (*cDC\_in vitro* und *ercDC\_RCC*) mit dem Welch's t-Test ermittelt.

Da *ercDC* im RCC-Gewebe häufig in engem Kontakt mit T-Zellen gefunden wurden<sup>101</sup>, ist anzunehmen, dass eine wechselseitige Beeinflussung stattfinden kann. Meine Daten zeigten, dass *ercDC\_in vitro* eine schlechte Kapazität zur T-Zell-Proliferationsstimulation

haben. In In-vitro-Analysen waren neben den Kostimulations- und MHC-Molekülen auch die Adhäsionsmoleküle LFA-1, ICAM-1 und CD24 sowie das Aktin-bündelnde Protein Fascin untersucht worden, um eine mögliche Ursache zu finden. Diese Moleküle wurden nun auch auf Transkriptebeine analysiert und dabei den ercDC\_RCC gegenüber gestellt (Abbildung 7-20A). Wie bereits die FACS-Daten gezeigt hatten, wurde *ITGB2/LFA-1* auch auf RNA-Ebene von cDC\_in vitro etwas stärker exprimiert als von ercDC\_in vitro. Die Transkriptlevel von *ICAM1* waren bei cDC\_in vitro und ercDC\_in vitro vergleichbar, entgegen der höheren Positivität bei cDC\_in vitro im FACS (siehe Abbildung 7-5, Seite 62). Die ercDC\_RCC exprimierten *ITGB2/LFA-1* schwächer und *ICAM1* stärker als die beiden In-vitro-Zelltypen. Die *CD24*-Transkriptlevel waren in allen Zelltypen niedrig, wobei die der cDC\_in vitro und ercDC\_in vitro ähnlich, und das der ercDC\_RCC etwas höher war (Abbildung 7-20A).

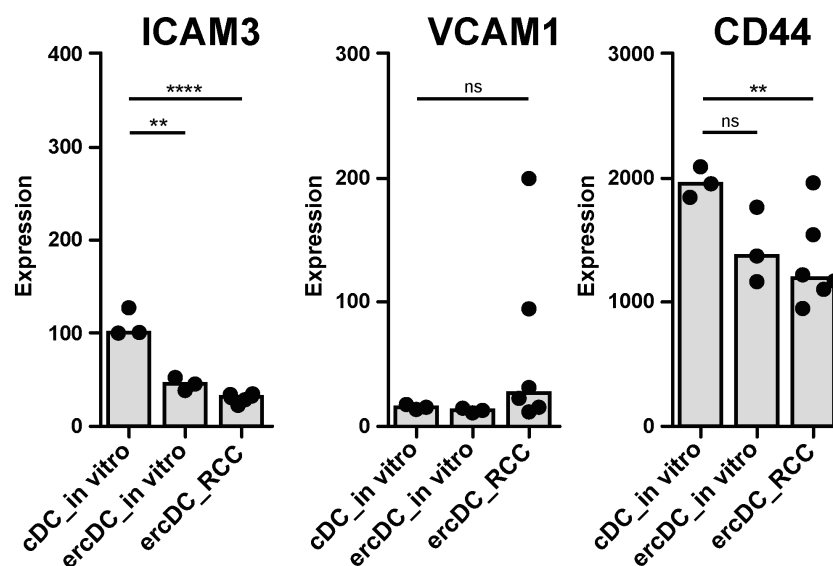
Das Transkriptlevel von Fascin (kodiert durch das Gen *FSCN1*) war bei ercDC\_in vitro signifikant niedriger als bei cDC\_in vitro (Abbildung 7-20B). Dies bestätigt den Befund auf Proteinebene (siehe Abbildung 7-5, Seite 62). Auch die ercDC\_RCC exprimierten signifikant weniger *FSCN1* als die cDC\_in vitro und sind somit in diesem Mangel mit den ercDC\_in vitro vergleichbar.



**Abbildung 7-20: Transkriptlevel der für Adhäsionsmoleküle kodierenden Gene *LFA-1*, *ICAM1* und *CD24* sowie des für Fascin kodierenden Gens *FSCN1* in in vitro generierten und aus RCC-Gewebe gewonnenen ercDC.** Gezeigt sind die normalisierten linearen Expressionswerte der für Integrine (*LFA-1*), Integrinbindeproteine (*ICAM1*) und Glykoproteine (*CD24*) (**A**) sowie zytoskelettale Fascin (*FSCN1*) (**B**) kodierenden Gene. Die Balken zeigen den Median an. Ein Symbol entspricht einem Replikat des jeweiligen Zelltyps. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des gepaarten Student's t-Test (cDC\_in vitro und ercDC\_in vitro) bzw. bei ungepaarten Proben (cDC\_in vitro und ercDC\_RCC) mit dem Welch's t-Test ermittelt.

Mit Hilfe der Transkriptomdaten wurde zusätzlich die Expression von *ICAM3*, *VCAM1* und *CD44* betrachtet (Abbildung 7-21, Seite 96), die in der durchflusszytometrischen Analyse nicht bestimmt worden waren, aber eine wichtige Rolle beim Kontakt und der Stimulation der

T-Zellen spielen. Das Transkriptlevel von *ICAM3* war bei cDC\_in vitro signifikant höher als bei den beiden ercDC-Typen, die vergleichbare Level besaßen. *VCAM1* wurde insgesamt vergleichsweise schwach exprimiert, wobei die cDC\_in vitro und die ercDC\_in vitro ähnlich viel und die ercDC\_RCC etwas mehr exprimierten. *CD44* kodiert, wie *CD24*, für ein Glykoprotein, das für die Stabilität der immunologischen Synapse und für die Induktion der T-Zell-Proliferation essentiell ist<sup>171</sup>. Es ist beschrieben, dass die gezielte Blockade von CD44 auf DC deren Kapazität zur T-Zell-Proliferation inhibiert und in T-Zell-Apoptose resultiert<sup>172</sup>. *CD44* wurde von allen Zelltypen verhältnismäßig stark exprimiert, von ercDC\_in vitro und ercDC\_RCC schwächer als von cDC\_in vitro.



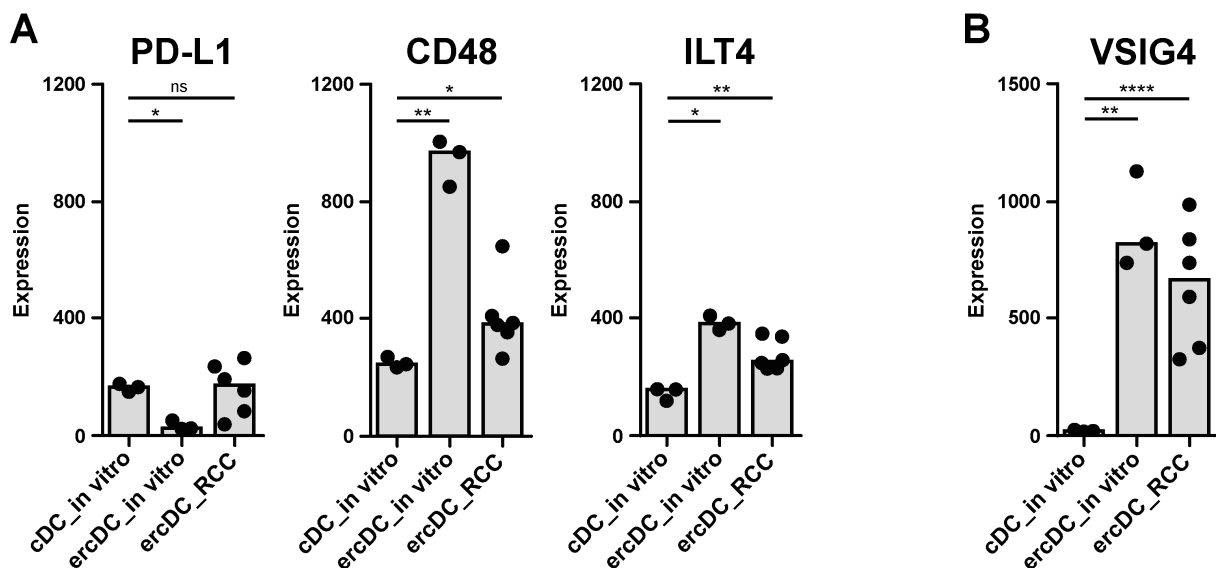
**Abbildung 7-21: Transkriptlevel der für Adhäsionsmoleküle kodierenden Gene *ICAM3*, *VCAM1* und *CD44* in in vitro generierten und aus RCC-Gewebe gewonnen ercDC.** Gezeigt sind die normalisierten linearen Expressionswerte der Gene. Die Balken zeigen den Median an. Ein Symbol entspricht einem Replikat des jeweiligen Zelltyps. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des gepaarten Student's t-Test (cDC\_in vitro und ercDC\_in vitro) bzw. bei ungepaarten Proben (cDC\_in vitro und ercDC\_RCC) mit dem Welch's t-Test ermittelt.

Es ist festzuhalten, dass sich die durchflusszytometrisch bestimmte Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle LFA-1, ICAM1 und CD24 auch auf Transkriptebeine bestätigte. Die ercDC\_in vitro und die ercDC\_RCC zeigten bei diesen Molekülen keine besonders großen Parallelen, während sie in den Transkriptleveln von *ICAM3*, *CD44* sowie *FSCN1* übereinstimmten. Beide ercDC-Typen exprimierten *ICAM3*, *CD44* und *FSCN1* weniger stark als die cDC\_in vitro.

Eine Auswahl inhibitorischer Moleküle, die potentiell für die schlechte T-Zell-Stimulationskapazität verantwortlich sein könnten, wurde bereits durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurde PD-L1 von ercDC\_in vitro schwächer, CD48 stärker und ILT4 genauso stark wie von cDC\_in vitro exprimiert (Abbildung 7-6, Seite 63). Für *PD-L1* und *CD48* bestätigten sich diese Beobachtungen auch auf Transkriptebeine (Abbildung 7-22A, Seite 97). *ILT4*-Transkript wurde im Gegensatz zur durchflusszytometrischen Analyse von

ercDC\_in vitro signifikant stärker als von cDC\_in vitro exprimiert. Ein Vergleich der ercDC\_in vitro mit den ercDC\_RCC zeigte, dass das *PD-L1*-Transkriptlevel der ercDC\_RCC höher war als das der ercDC\_in vitro, etwa so hoch wie das der cDC\_in vitro. *PD-L2* zeigte ein vergleichbares Expressionsmuster wie *PD-L1* (nicht gezeigt). Wie die ercDC\_in vitro hatten auch die ercDC\_RCC höhere Transkriptlevel von *CD48* und *ILT4* als die cDC\_in vitro.

Weiterführend wurde die Expression von *VSIG4* vergleichend analysiert, welches durch die Genexpressionsanalyse als Gen, das mit T-Zell-Inhibition assoziiert ist, auffiel. *VSIG4* wurde von beiden ercDC-Typen signifikant stärker exprimiert als von cDC\_in vitro, die nur eine sehr schwache Expression zeigten (Abbildung 7-22B).



**Abbildung 7-22: Transkriptlevel der für inhibitorische Oberflächenmoleküle kodierenden Gene *PD-L1*, *CD48*, *ILT4* und *VSIG4* in in vitro generierten und aus RCC-Gewebe gewonnenen ercDC.** Gezeigt sind die normalisierten linearen Expressionswerte der inhibitorischen Gene *PD-L1*, *CD48* und *ILT4*, deren Proteinexpression auch mittels FACS getestet wurde (**A**) sowie von *VSIG4* (**B**). Die Balken zeigen den Median an. Ein Symbol entspricht einem Replikat des jeweiligen Zelltyps. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des gepaarten Student's t-Test (cDC\_in vitro und ercDC\_in vitro) bzw. bei ungepaarten Proben (cDC\_in vitro und ercDC\_RCC) mit dem Welch's t-Test ermittelt.

Hinsichtlich der Fragestellung, inwieweit die ercDC\_in vitro mit den ercDC\_RCC vergleichbar sind und sich damit als Modellsystem für die ercDC\_RCC eignen, lässt sich festhalten, dass sich die durchflusszytometrisch ermittelte Ähnlichkeit der Protein-Expressionsmuster auch auf Transkriptebezug bestätigte. Die ercDC\_in vitro zeigten Parallelen in der Expression der ercDC\_RCC-Marker- und Signaturgene sowie Parallelen in der Expression von Oberflächenmarkern, insbesondere bei Kostimulationsmolekülen und HLA-DR, aber auch bei den Transkriptleveln von *ICAM3*, *CD44* und *FSCN1* sowie *ILT4* und *VSIG4*. Die im Vergleich zu cDC\_in vitro stark reduzierte Expression von *ICAM3*, *CD44* und *FSCN1* sowie die im Vergleich zu cDC\_in vitro stärkere Expression von *CD48*, *ILT4* und *VSIG4* könnte eine Ursache für die schwache T-Zell-Proliferationsinduktion der ercDC\_in vitro sein. Die Oberflächenexpression von *ICAM3*, *CD44* und *VSIG4* muss weiterführend

durchflusszytometrisch bestätigt werden. Aufgrund der übereinstimmenden Protein- bzw. Genexpression der *ercDC\_RCC* und *ercDC\_in vitro* kann vermutet werden, dass auch die *ercDC\_RCC* eine schlechte T-Zell-Stimulationsfähigkeit besitzen könnten.

### 7.5.6 Positionierung der *ercDC* im MPS-Kontinuum mit Hilfe Makrophagen- und DC-assoziiierter Marker

Anhand der Ergebnisse der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung konnten die *ercDC* weder eindeutig als DC noch als MΦ eingeordnet werden. Sie exprimierten den DC-Marker CD209/DC-SIGN zusammen mit den MΦ-Markern CD14 und CD163. Die Kostimulationsmoleküle CD80, CD86 und CD40, bisher eher DC-assoziierte Marker, exprimierten sie gut, ebenso HLA-DR. Während sie eine zentrale DC-Funktion, die Antigenkruzpräsentation, beherrschten, induzierten sie im Vergleich zu cDC nur eine schwache Proliferation naiver T-Zellen. Auf Transkriptebeine waren unter den *ercDC\_RCC*-Marker- und Signaturgenen viele MΦ-assoziierte Gene, wie *CD14*, *CD163*, *CD206/MRC1*, *SEPP1* und *CD16/FCGR3A*. Die Koexpression von bisher als MΦ- bzw. DC-assoziiert betrachteter Marker passt zur aktuellen Debatte, ob eine klare Abgrenzung von DC und MΦ, insbesondere in nicht-lymphatischen Geweben, überhaupt möglich ist, oder vielmehr ein Kontinuum myeloischer Zelltypen innerhalb des MPS existiert, deren Differenzierungsstatus sehr stark durch regionale Gewebemilieufaktoren bestimmt wird<sup>12</sup>. Im murinen System sind die Zelltypen des MPS-Kontinuums mittlerweile gut beschrieben<sup>173,174</sup>, während die Datenlage für humane Zelltypen noch spärlich ist.

Die Gruppe um Gwendalyn Randolph und Emmanuel Gautier sowie Jennifer Miller hat in Zusammenarbeit mit dem Konsortium des „Immunologischen Genom (ImmGen) Projektes“ eine umfassende Analyse der Genexpression und -regulation muriner DC und MΦ aus peripheren Geweben durchgeführt<sup>175,176</sup>. Aus dem Vergleich der Transkriptome verschiedener DC- und MΦ-Subtypen wurde eine Liste von 39 murinen MΦ-Kerngenen (Gautier et al.<sup>175</sup>) und 24 DC-Kerngenen (Miller et al.<sup>176</sup>) erstellt. Xue et al.<sup>112</sup> haben die murinen Listen erweitert, auf ihre humanen Daten angewendet und entsprechende Kerngenlisten für das humane System erstellt (Tabelle 7-6, Seite 99). Die humane MΦ-Kerngenliste umfasste 40 Gene, die DC-Kerngenliste 35 Gene. Sie teilten die Kerngene jeweils in drei Gruppen ein: Der ersten Gruppe gehörten Gene an, deren differentielle Expression zwischen MΦ und DC nicht nur im murinen, sondern auch im humanen System besteht. Gruppe zwei beinhaltete Gene, die bei Behandlung der MΦ bzw. DC mit spezifischen aktivierenden Stimuli nicht mehr differentiell exprimiert werden, und in der dritten Gruppe befanden sich Gene, die im humanen System nicht differentiell exprimiert wurden.

Xue et al. postulierten ferner, dass der Nachweis der Oberflächenmoleküle CD14, MerTK, CD64/FcγRI, CD32/FcγRII und CD13/ANPEP mittels Durchflusszytometrie geeignet ist, um MΦ von DC sowohl im humanen als auch im murinen System voneinander zu unterscheiden. CD14 ist ein MΦ-assoziierter PRR (engl.: pattern recognition receptor) mit hoher Spezifität für LPS<sup>177</sup>, MerTK ein Rezeptor für apoptotische Zellen, der v.a. von antiinflammatorischen M2c-MΦ exprimiert wird<sup>178</sup>. Der IgG-Rezeptor CD64/FcγRI wird hauptsächlich von M1-MΦ exprimiert, CD32/FcγRII von M2-MΦ<sup>179</sup>. CD13/ANPEP ist ein endozytischer Rezeptor, der insbesondere auf kreuzpräsentierenden DC zu finden ist<sup>180</sup>.

**Tabelle 7-6: Humane Makrophagen- und DC-Kerngene nach Xue et al.<sup>112</sup>.** Gezeigt ist jeweils das Gensymbol, die Angehörigkeit zum informativen Datensatz (Info.) und die Funktion des Proteins. lila: ercDC\_RCC-Signaturgen; Fettdruck: ercDC\_RCC-Markergen

MΦ-Kerngene			DC-Kerngene		
Gensymbol/ alternat. Bez.	Info.	Funktion Protein	Gensymbol/ alternat. Bez.	Info.	Funktion Protein
<b>Gruppe 1</b>			<b>Gruppe 1</b>		
CD14	ja	PRR für LPS	ADAM19	ja	Migration, Adhäsion
PLD3	ja	Phospholipase	CCR7	ja	Chemokinrezeptor
CAMK1	ja	Proteinkinase	TRAF1	ja	TNF-α Signaltransduktion
TBXAS1	ja	Monooxygenase	ZBTB46	nein	Transkriptionsfaktor
CD114/CSF3R	ja	CSF3-Rezeptor	GPR132	ja	oxFS-Rezeptor
PLD1	ja	Lysyl-Hydroxylase	CD13/ANPEP	ja	endozytot. Rezeptor
CTSD	ja	lysosomale Cysteinprotease	SLAMF7	ja	antiinflammatorisch
CD32/FCGR2A	ja	IgG-Rezeptor	RAB30	ja	Vesikeltransport
COMT	nein	Methyltransferase	RUNX3	ja	Transkriptionsfaktor
FGD4	ja	Aktin-Bindeprotein	<b>Gruppe 2</b>		
<b>Gruppe 2</b>			SPINT2	ja	Serinproteaseinhibitor
MERTK	ja	Rezeptortyrosinkinase	P2RY10	ja	GPR für Purin, Pyrimidin
PLA2G15	ja	Lysophospholipase	KMO	ja	Monooxygenase
CD64/FCGR1A	ja	IgG-Rezeptor	HLA-DQB2	nein	Antigenpräsentation
TLR7	ja	PRR für virale RNA	CIITA	ja	positiver Regulator von MHC-II- Molekülen
PECR	ja	Reduktase	GPR68	ja	pH-Homöostase
TSPAN14	ja	Signaltransduktion	FLT3	ja	Wachstumsfaktor- rezeptor
DRAM2	ja	Apoptoseinduktion	CD26/DPP4	ja	Serinexopeptidase
TLR4	ja	PRR für LPS	CBFA2T3	nein	Repression der Transkription
TPP1	ja	lysosomale Protease	BCL11A	ja	Transkriptionsfaktor
PCYOX1	ja	Oxidase	ASS1	ja	Argininosuccinat- synthase
DOK3	ja	Adaptorprotein	JAK2	ja	Signaltransduktion
TOM1	ja	Vesikeltransport	<b>Gruppe 3</b>		
BLVRB	ja	Oxidoreduktase	HLA-B	nein	Antigenpräsentation
MR1	ja	Antigenpräsentation	CD117/KIT	ja	MGF-Rezeptor
GLUL	ja	Glutaminsynthetase	HLA-DRB1	nein	Antigenpräsentation
ARSG	nein	lysosomale Sulfatase	TBC1D8	ja	GTPase Aktivator
MYO7A	ja	Aktin-Bindeprotein	CNN2	ja	Aktin-Bindeprotein

PTPLAD2	ja	FS-Dehydratase	BRI3BP	ja	p53-Stabilisator
<b>Gruppe 3</b>			GPR114	nein	Adhäsion
CD164	ja	Adhäsionsrezeptor	SEPT6	ja	GTPase
CTSL2	nein	lysosomale Cysteinproteinase	NAPSA	ja	Aspartatproteinase
FER	ja	Zelladhäsion	PSTPIP1	ja	WAS-Regulator
C10orf128	nein	nicht bekannt	HLA-DMB	ja	Antigenpräsentation
LAMP2	ja	lysosomales Protein	AMICA1	ja	Adhäsionsmolekül
TCN2	ja	Transportprotein	FGL2	ja	Prokoagulant
NLN	ja	Metalloproteinase	GPR82	ja	nicht bekannt
PLA2G4A	ja	Phospholipase			
SQRDL	ja	Sulfidreduktase			
SEPP1	ja	Antioxidans			
SLC48A1	ja	Hämtransport			
ABCA1	ja	Cholesteroltransport			

FS: Fettsäuren; GPR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; GTP: Guanosin-Triphosphat; MGF: engl.: mast cell growth factor; oxFS: oxidierte Fettsäuren; WAS: Wiskott-Aldrich Syndrom

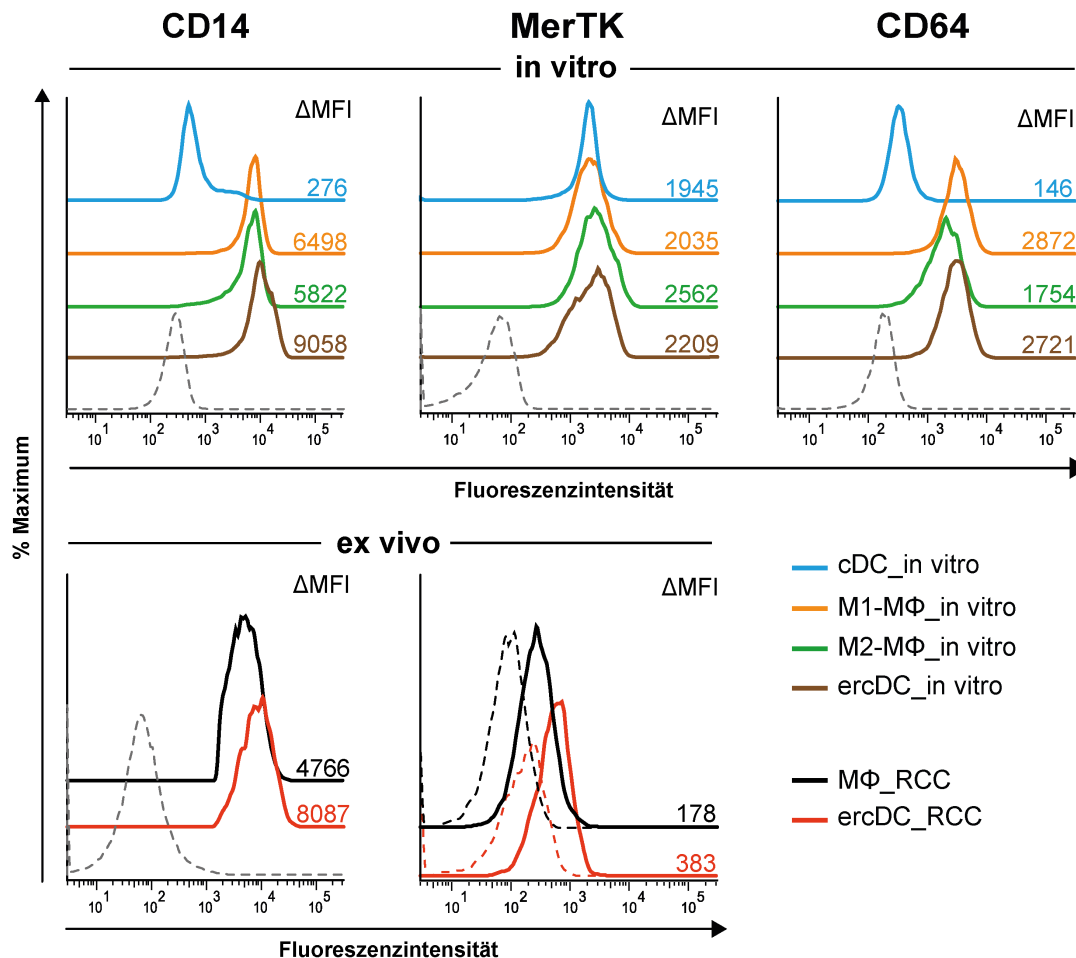
### 7.5.6.1 Durchflusszytometrische Analyse der postulierten Marker zur Unterscheidung von Makrophagen und DC

Die von Xue et al.<sup>112</sup> zur Unterscheidung von MΦ und DC postulierten Oberflächenmarker CD14, MerTK und CD64/FcγRI wurden auf den ercDC\_RCC (rote Linie), MΦ\_RCC (schwarze Linie), in vitro generierten ercDC (braune Linie) sowie cDC\_in vitro (blaue Linie), die als DC-Positivkontrolle verwendet wurden, getestet. M1-MΦ\_in vitro (orange Linie) und M2-MΦ\_in vitro (grüne Linie) dienten als MΦ-Positivkontrolle (Abbildung 7-23, Seite 101).

CD14 wurde von den MΦ-Positivkontrollen stark exprimiert, von cDC\_in vitro nur schwach. Die ercDC\_in vitro exprimierten CD14 sogar stärker als die MΦ-Positivkontrollen, ercDC\_RCC besaßen ebenfalls mehr CD14 als MΦ\_RCC (ΔMFI 8087 vs. 4766). CD14 war dementsprechend zur Unterscheidung von MΦ und DC geeignet. MerTK dagegen war auf allen in vitro generierten Zelltypen, auch den cDC\_in vitro, nachweisbar und unterschied somit nicht zwischen MΦ und DC. Von den beiden Ex-vivo-Zelltypen exprimierten ercDC\_RCC den Marker MerTK stärker als die MΦ\_RCC. CD64/FcγRI wurde von M1-MΦ\_in vitro (ΔMFI 2872) und M2-MΦ\_in vitro (ΔMFI 1754) stark exprimiert, von den cDC\_in vitro nur schwach (ΔMFI 146) und erwies sich somit zur Unterscheidung geeignet. Die ercDC\_in vitro exprimierten CD64/FcγRI sehr stark (ΔMFI 2721), vergleichbar mit M1\_MΦ\_in vitro. CD64/FcγRI wurde auf ercDC\_RCC und MΦ\_RCC nicht gemessen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Marker CD14 und CD64/FcγRI geeignet waren, um MΦ und DC im FACS zu unterscheiden. MerTK war dagegen nicht geeignet, weil es auch von cDC\_in vitro exprimiert wurde. Da ercDC\_in vitro und ercDC\_RCC CD14 und CD64/FcγRI exprimierten, würden sie nach diesem Kriterium als MΦ eingestuft werden.





**Abbildung 7-23: Durchflusszytometrische Analyse der von Xue et al.<sup>112</sup> postulierten Marker zur Unterscheidung von Makrophagen und DC.** Fluoreszenzintensitäten der Oberflächenmarker CD14, MerTK und CD64/FcγRI auf cDC\_in vitro (blaue Linie), M1-MΦ\_in vitro (orange Linie), M2-MΦ\_in vitro (grüne Linie), ercDC\_in vitro (braune Linie), MΦ\_RCC (graue Linie) und ercDC\_RCC (rote Linie). In grau gestrichelter Linie ist die Kontrolle, L929-CD40L-Zellen, dargestellt. Bei der Messung von MerTK auf Ex-vivo-Zellen wurde jeweils eine dem spezifischen Antikörper entsprechende Isotypkontrolle verwendet. Das Histogramm des Isotyp-Antikörpers ist in derselben Farbe, allerdings mit gestrichelter Linie dargestellt. Die Zahlen sind die Differenz der MFI (mediane Fluoreszenzintensität) zwischen dem spezifischen Antikörper und dem Isotyp-Antikörper ( $\Delta$ MFI). Gezeigt ist jeweils ein exemplarisches Beispiel. In vitro:  $n(\text{CD14}) = 15$ ;  $n(\text{MerTK}) = 4$ ;  $n(\text{CD64}) = 6$ ; ex vivo:  $n(\text{CD14}) = 26$ ;  $n(\text{MerTK}) = 1$

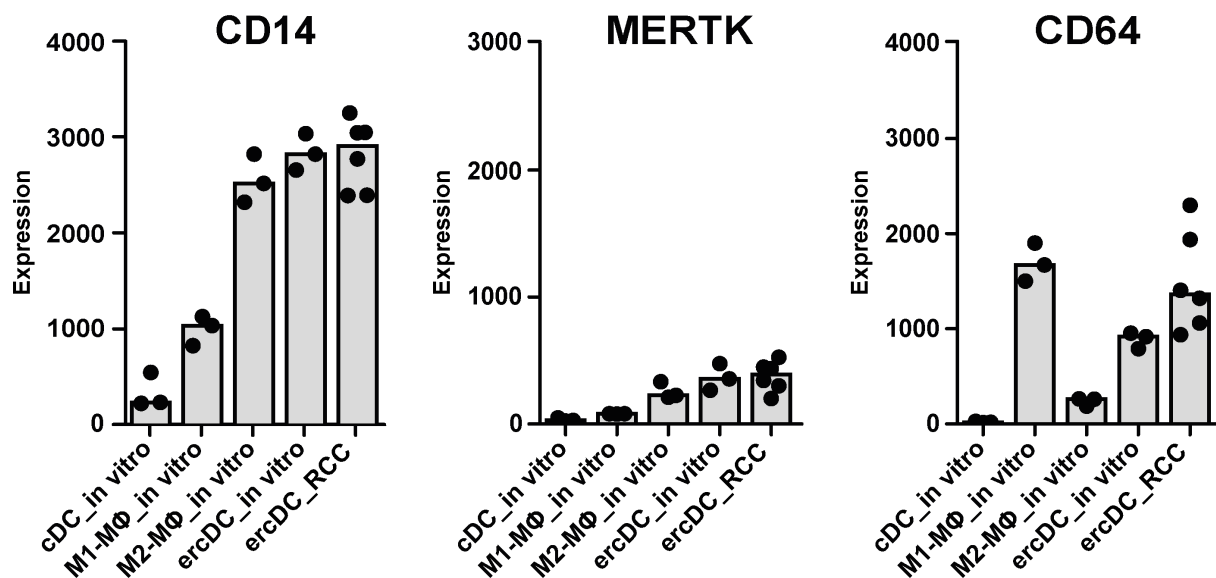
### 7.5.6.2 Transkriptlevel der durchflusszytometrisch analysierten Marker

Im nächsten Schritt wurde die Expression der durchflusszytometrisch analysierten Marker auf Transkriptebeine zwischen den In-vitro- und Ex-vivo-Zelltypen verglichen. In Abbildung 7-24 (Seite 102) sind die linearen Expressionswerte der Marker in einem Stripchart-Balkendiagramm dargestellt. *CD14* wurde, wie auch das Protein, von ercDC\_in vitro und ercDC\_RCC sowie den MΦ stark exprimiert, von cDC\_in vitro nur sehr schwach. Entgegen der FACS-Analyse wurde *MERTK*-Transkript von cDC\_in vitro nur schwach und von den MΦ-Positivkontrollen, insbesondere von den M2-MΦ\_in vitro, deutlich stärker exprimiert. Beide ercDC-Typen exprimierten *MERTK* sogar noch etwas stärker als die M2-MΦ\_in vitro. MerTK scheint zur Unterscheidung von MΦ und DC auf Transkriptebeine, nicht aber auf



Proteinebene geeignet zu sein. Die Transkriptlevel von *CD64/FCGR1A* waren, entsprechend der durchflusszytometrischen Analyse, bei den MΦ, insbesondere bei M1-MΦ\_in vitro, hoch und den cDC\_in vitro, niedrig (Abbildung 7-24). Beide ercDC-Typen exprimierten *CD64/FCGR1A* stark.

Insgesamt zeigte sich durch die Analysen, dass CD14 und CD64/FcγRI sowohl auf Protein- als auch auf Transkriptebeine als Unterscheidungsmarker für DC und MΦ geeignet sind. MerTK kann dagegen auf Proteinebene nicht zur Unterscheidung verwendet werden, weil cDC\_in vitro den Marker genauso stark auf der Oberfläche exprimierten wie ercDC\_in vitro und die MΦ. Die ercDC\_in vitro und ercDC\_RCC sollten basierend auf den Transkript- bzw. Proteinleveln von CD14 und CD64/FcγRI entgegen der derzeitigen Bezeichnung (Figel, Brech et al.<sup>101</sup>) als MΦ und nicht als DC eingeordnet werden.

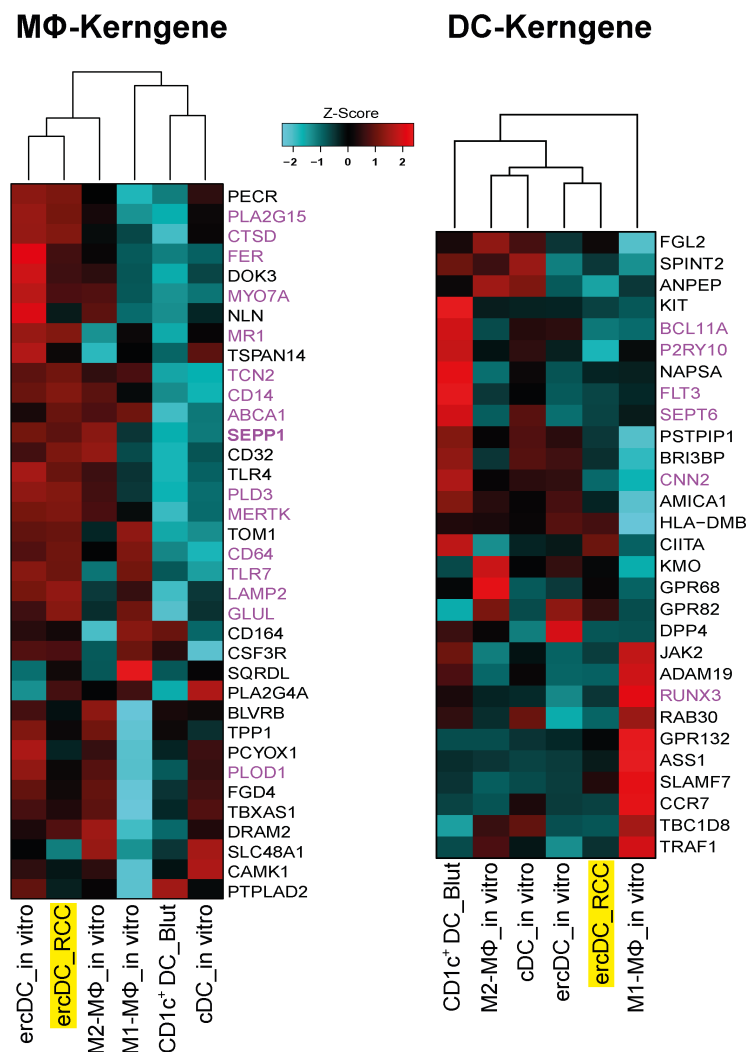


**Abbildung 7-24: Transkriptlevel der von Xue et al.<sup>112</sup> postulierten Marker zur Unterscheidung von Makrophagen und DC.** Gezeigt sind die normalisierten linearen Expressionswerte der Gene. Die Balken zeigen den Median an. Ein Symbol entspricht einem Replikat des jeweiligen Zelltyps.

### 7.5.6.3 Anwendung der Makrophagen- und DC-Kerngenlisten

Die MΦ- und DC-Kerngenlisten wurden auf die Datensätze ercDC\_RCC, ercDC\_in vitro und cDC\_in vitro angewandt. CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut und in vitro generierte M1-MΦ und M2-MΦ sollten jeweils DC- bzw. MΦ-spezifische Gene exprimieren und wurden deshalb als Kontrollen dazugenommen. Die Heatmap basierend auf den MΦ-Kerngenen (Abbildung 7-25, Seite 103, links) verdeutlicht, dass ercDC\_RCC (gelbe Markierung), ercDC\_in vitro und M2-MΦ\_in vitro sehr viel höhere Transkriptlevel der Gene hatten als CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut und cDC\_in vitro (Abbildung 7-25). Warum M1-MΦ\_in vitro einige Gene nur schwach exprimierten, ist nicht klar. Das Expressionsmuster der DC-Kerngene stellte sich etwas heterogen dar, was u.a.

darauf zurückzuführen ist, dass selbst die CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut nur einen Teil der DC-Kerngene stark exprimierten und die cDC\_in vitro sogar alle DC-Kerngene relativ schwach exprimierten (Abbildung 7-25, rechts). Deutlich zu sehen ist jedoch, dass ercDC\_RCC und ercDC\_in vitro die DC-Kerngene im Vergleich zu CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut deutlich schwächer exprimierten. Unter den MΦ- und DC-Kerngenen befanden sich viele Gene, die als ercDC\_RCC-Marker- und Signaturgene (Fettdruck bzw. lila) identifiziert worden waren. Interessanterweise gehörten alle in der MΦ-Kerngenliste vorkommenden Marker- und Signaturgene den gegenüber der Kontrollgruppe hochregulierten, alle in der DC-Kerngenliste vorkommenden den gegenüber der Kontrollgruppe herabregulierten Genen an (siehe Abbildung 7-12, Seite 78 und Tabelle 11-1 und Tabelle 11-2, Seite 160 und Seite 167 im Anhang). Insgesamt weisen diese Ergebnisse, wie bereits vorher die durchflusszytometrische Analyse, darauf hin, dass ercDC auf transkriptioneller Ebene eher mit MΦ als mit DC übereinstimmen.



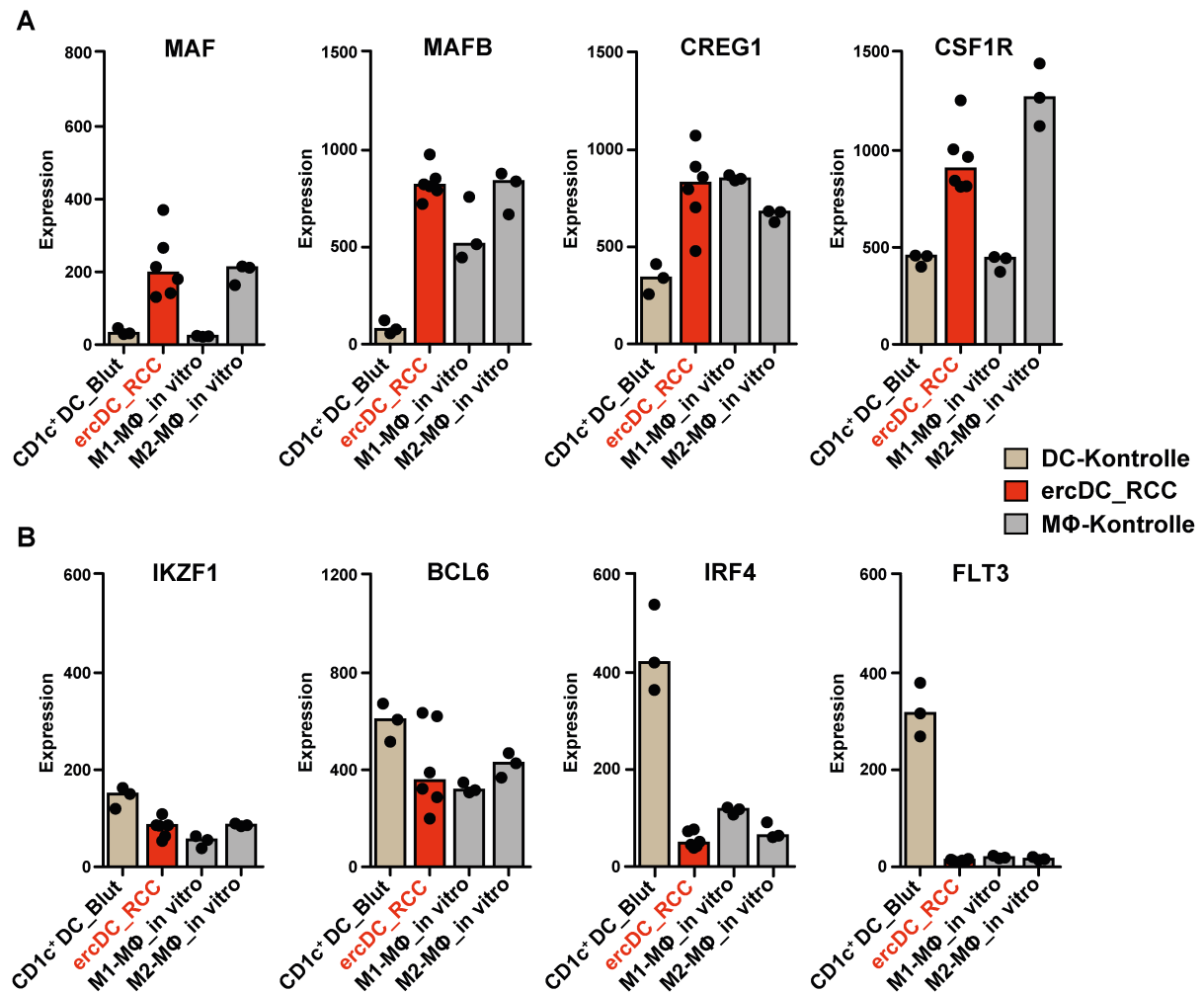
**Abbildung 7-25: Expression der publizierten humanen Makrophagen- und DC-Kerngene in ercDC aus dem RCC.** Neben ercDC\_RCC (gelb) und ercDC\_in vitro wurden in vitro generierte cDC, CD1c<sup>+</sup> DC aus dem Blut sowie in vitro generierte M1-MΦ und M2-MΦ als DC- bzw. MΦ-Positivkontrollen analysiert. Die Heatmaps zeigen die relative Expression (Z-Score) der durch Xue et al.<sup>112</sup> bestimmten humanen Orthologe zu den murinen MΦ- und DC-Kerngenen<sup>175,176</sup> sowie das Clustering der Zelltypen. Gene, die als ercDC\_RCC-Marker- und Signaturgene identifiziert worden waren, sind in Fettdruck bzw. lila gekennzeichnet.

#### 7.5.6.4 Makrophagen- und DC-assoziierte Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren

Um ein vertiefendes Bild zu bekommen, ob die ercDC eher den MΦ oder den DC zuzuordnen sind, wurde die Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren analysiert. Die Entwicklung der MΦ aus den MDP (engl.: macrophage-DC progenitor) wird insbesondere durch die Transkriptionsfaktoren MAFB, c-MAF (kodiert durch *MAF*), *EGR1* und *EGR2* initiiert sowie durch die Bindung von M-CSF an den Rezeptor CSF1R. Gautier et al.<sup>175</sup> postulierten, dass die Transkriptionsfaktoren C/EBP-α, *BACH1* und *CREG1* die Expression der MΦ-Kerngene regulieren. Die Differenzierung der MDP zu CDP (engl.: common DC progenitor) wird maßgeblich durch die Transkriptionsfaktoren Ikaros (kodiert durch *IKZF1*) und *IRF8* gesteuert. Aus den CDP differenzieren durch die Aktivität von *ZBTB46* und *BCL6* die prä-cDC. CD1c<sup>+</sup> DC zeichnen sich durch die Expression von *IRF4* aus, CD141<sup>+</sup> DC durch *BATF3*. Die Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 (kodiert durch *SPI1*) sowie des Wachstumsfaktorrezeptors *FLT3* ist ebenfalls charakteristisch für die DC-Linie.

In Abbildung 7-26 (Seite 105) ist eine Auswahl von Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren, angelehnt an Literaturdaten, insbesondere an Segura et al.<sup>43</sup> und Gautier et al.<sup>175</sup>, gezeigt. Als positive Kontrolle für MΦ wurden M1-MΦ\_in vitro und M2-MΦ\_in vitro, für DC CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut verwendet. In Abbildung 7-26A ist zu sehen, dass die Gene, die für MΦ-assoziierte Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren kodieren, von den MΦ-Kontrollen, insbesondere von den M2-MΦ\_in vitro, stark und von CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut schwach exprimiert wurden (Ausnahme M1-MΦ\_in vitro bei *MAF*). Die ercDC\_RCC exprimierten alle Gene in vergleichbarer Stärke wie die M2-MΦ\_in vitro. In Abbildung 7-26B ist die Expression der für DC-assoziierte Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren kodierenden Gene dargestellt. Diese wurden von CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut stark und von den MΦ schwach exprimiert. Die ercDC\_RCC zeigten eine den MΦ analoge, schwache Expression der Gene.

Die MΦ-assoziierten Gene *CEBPA* (kodiert C/EBP-α), *BACH1*, *EGR1*, *EGR2* sowie die DC-assoziierten Gene *SPI1*, *ZBTB46* und *IRF8* wurden von den MΦ- und DC-Kontrollzellen ähnlich stark exprimiert. *EGR2* wurde von CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut sogar stärker exprimiert als von den MΦ-Kontrollzellen und *IRF8* von den MΦ-Kontrollzellen stärker als von der DC-Kontrolle, CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut. Die Expressionsdaten waren folglich zur Einordnung der ercDC\_RCC nicht geeignet. Die Diagramme sind daher in Abbildung 7-26 nicht gezeigt, sie sind im Anhang, Abbildung 11-6 (Seite 176), aufgeführt.



**Abbildung 7-26: Transkriptlevel ausgewählter Makrophagen- und DC-assoziiierter Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren in ercDC aus dem RCC.** Gezeigt sind die normalisierten linearen Expressionswerte der Gene. **A)** Gene, die für MΦ-assoziierte Transkriptionsfaktoren und den Wachstumsfaktorrezeptor CSF1R kodieren. **B)** Gene, die für DC-assoziierte Transkriptionsfaktoren und den Wachstumsfaktorrezeptor FLT3 kodieren. Die ercDC\_RCC sind rot gekennzeichnet, die DC-Kontrollzelle, CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut, beige und die MΦ-Kontrollzellen grau. Der Balken zeigt den Median an, die Symbole die einzelnen Replikate eines Zelltyps. Die unterschiedliche Skalierung der Y-Achse ist zu beachten.

Die drei verschiedenen Ansätze zur Klassifizierung von MΦ und DC, die durchflusszytometrische Analyse, die Transkriptlevel der Kerngene sowie die Analyse von Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren, zeigten eine klare Tendenz, dass die ercDC\_RCC als MΦ eingeordnet werden sollten.

### 7.5.6.5 Einordnung der ercDC innerhalb der Makrophagen

#### 7.5.6.5.1 Klassifizierung anhand M1- und M2-assoziiierter Gene

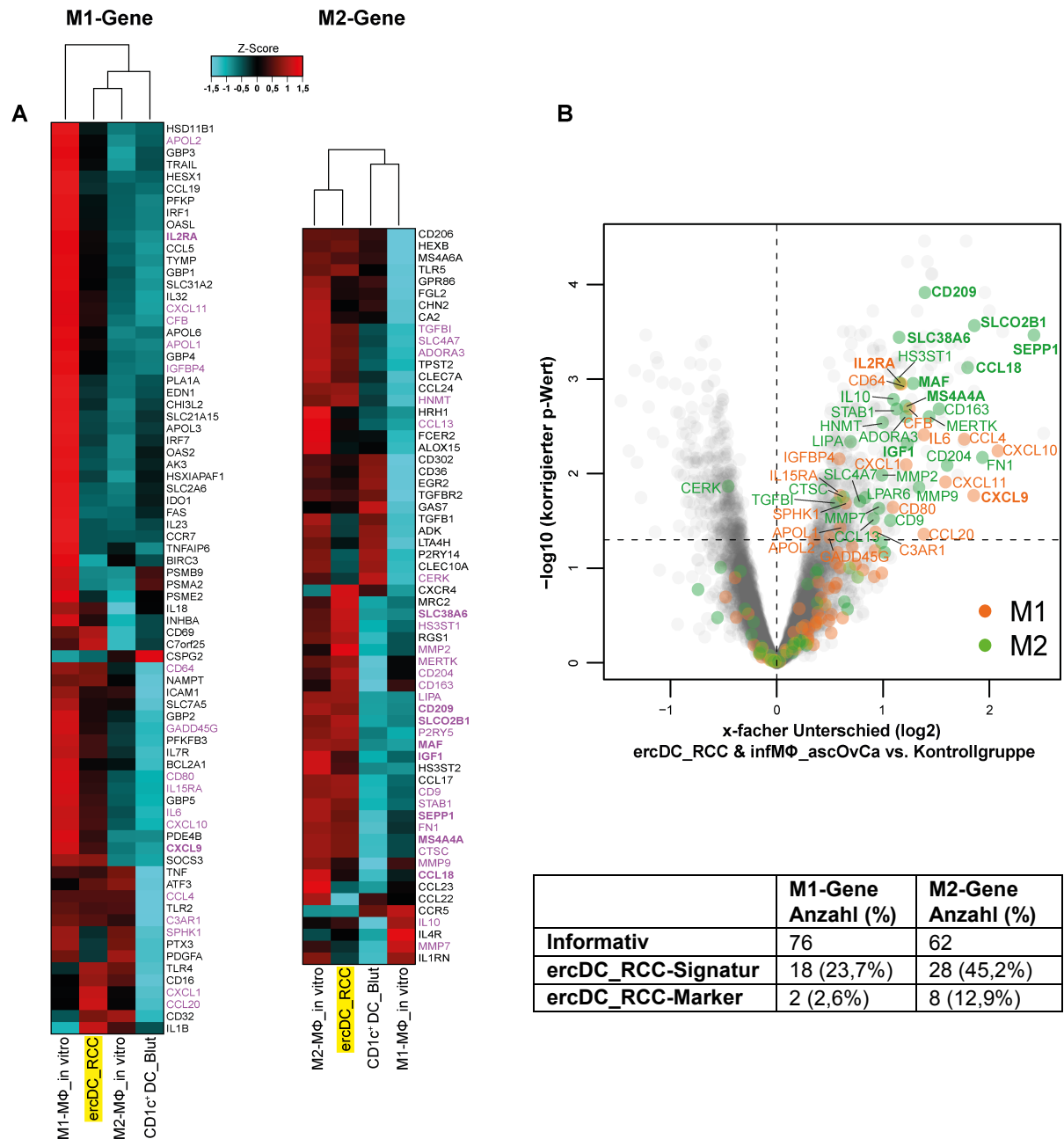
Nachdem bisherige Ergebnisse vermuten ließen, dass ercDC eher ein MΦ-Subtyp als ein DC-Subtyp sind, wurde nun näher untersucht, welcher Polarisierungsrichtung innerhalb der MΦ sie zugeordnet werden können. MΦ werden oft in zwei Kategorien, klassische, immunstimulatorische und alternativ aktivierte, immunregulatorische MΦ, eingeteilt. Immunstimulatorisch sind MΦ mit einem M1-Phänotyp, immunregulatorisch MΦ mit einem M2-Phänotyp. Verschiedene Publikationen verweisen auf bestimmte polarisierende Zytokine und die dadurch induzierte Genexpression<sup>26,103,133,137,181</sup>. Insbesondere aus drei Publikationen, Martinez et al.<sup>103</sup>, Shaykhiev et al.<sup>137</sup> und Houser et al.<sup>133</sup>, ließ sich eine M1- bzw. M2-assoziierte Genliste aufstellen, welche die in Tabelle 11-6 und Tabelle 11-7 (im Anhang, Seite 177 und Seite 179) aufgeführten Gene beinhaltete.

In Abbildung 7-27 (Seite 108) ist die relative Expression der M1- und M2-assoziierten Gene in ercDC\_RCC in einer Heatmap veranschaulicht. Als positive Kontrollzellen dienten in vitro generierte M1-MΦ bzw. M2-MΦ. CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut fungierten als Negativkontrolle. Die ercDC\_RCC zeigten mit beiden Profilen Übereinstimmung, mit der M2-assoziierten Genliste etwas mehr als mit der M1-assoziierten Genliste (Abbildung 7-27A). Dies äußerte sich auch in der größeren Anzahl von ercDC\_RCC-Marker- und Signaturgenen unter den M2-assoziierten Genen (12,9% vs. 2,6% und 45,2% vs. 23,7%, Abbildung 7-27B).

Neben der Heatmap wurde ein Volcano Plot erstellt (Abbildung 7-27B). Hier wurden zusätzlich die M1- und M2-assoziierten Gene innerhalb der informativen Gene, die sich aus dem Vergleich der ercDC\_RCC & infMΦ\_ascOvCa mit der Kontrollgruppe ergaben, markiert. Dadurch wird visualisiert, ob die M1- und M2-assoziierten Gene unter den gegenüber der Kontrollgruppe hoch- oder herabregulierten Genen zu finden sind. In Abbildung 7-27B ist der informative Datensatz grau dargestellt, die darin zu findenden M1- und M2-assoziierten Gene orange bzw. grün. Die x-Achse zeigt die x-fache Veränderung (log2) der Gene gegenüber der Kontrollgruppe an, die y-Achse die Signifikanz der Unterschiede (korrigierter p-Wert). Gene mit p-Werten < 0,05 (entspricht -log<sub>10</sub> 1,3 (gestrichelte Linie)) gehören zu den ercDC\_RCC-Signaturgenen (differenziell exprimierte Gene). Wie zu sehen, war die Mehrzahl der M1- als auch der M2-assoziierten Gene unter den hochregulierten Genen der Gruppe ercDC\_RCC & infMΦ\_ascOvCa zu finden. 18 der M1- und 28 der M2-assoziierten Gene gehörten zu den ercDC\_RCC-Signaturgenen; die fünf Gene mit der höchsten Signifikanz gehörten zum M2-Profil (*CD209/DC-SIGN*, *SLCO2B1*, *SLC38A6*, *SEPP1*, *CCL18*). Sie waren gleichzeitig Bestandteil der ercDC\_RCC-Markergene (Fettdruck). *MAF*, *MS4A4A* und *IGF1* sind weitere Markergene, die mit M2-MΦ assoziiert sind (für Funktionen der Markergene siehe Tabelle 7-4, Seite 88). Einige der zu den ercDC\_RCC-Signaturgenen gehörenden M2-assoziierten Gene kodieren für antiinflammatorische Zytokine (*IL10*),

Proteasen, die am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind (*MMP2*, *MMP7*, *MMP9*) oder Proteine mit proangiogener Wirkung (z.B. *IGF1*)<sup>182</sup>. Neben M2-assoziierten Genen gehörten auch M1-assoziierte Gene zu den ercDC\_RCC-Markergenen, z.B. *IL2RA* und *CXCL9*. Viele der differentiell exprimierten M1-assoziierten Gene kodieren für Zytokine und Chemokine (z.B. *IL6*, *CXCL1*, *CXCL10* oder *CCL4*).

Die Heatmaps und der Volcano Plot verdeutlichten, dass die ercDC\_RCC sowohl Merkmale von immunstimulatorischen M1- als auch von immunregulatorischen M2-MΦ besitzen. Auch die GSEA, in welcher die Genexpressionsunterschiede in den M1- bzw. M2-assoziierten Genlisten (Gensets) zwischen ercDC\_RCC & infMΦ\_ascOvCa und der Kontrollgruppe ermittelt wurden (nicht gezeigt), bestätigte dies. Hier zeigte sich weiterhin statistisch, dass bei der ercDC\_RCC & infMΦ\_ascOvCa-Gruppe eine stärkere Überexpression der M2-assoziierten Gene ( $p = 0,02$ ) im Vergleich zu den M1-assoziierten Genen ( $p = 0,09$ ) vorlag.



**Abbildung 7-27: Expression der M1- und M2-assoziierten Gene in ercDC aus dem RCC. A)** Die relative Expression (Z-Score) der M1- und M2-assoziierten Gene in ercDC\_RCC, in den Positiv- und Negativkontrollen M1-MΦ\_in vitro, M2-MΦ\_in vitro und CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut sowie das Clustering der Zelltypen ist in einer Heatmap veranschaulicht. In lila sind Gene gekennzeichnet, die auch zu den ercDC\_RCC-Signaturgenen zählen, in Fettdruck Gene, die zu den ercDC\_RCC-Markergenen gehören. **B)** Der Volcano Plot zeigt die M1- und M2-assoziierten Gene innerhalb der informativen Gene, die sich aus dem Vergleich der ercDC\_RCC & infMΦ\_ascOvCa mit der Kontrollgruppe ergaben. Auf der x-Achse ist der x-fache Unterschied der Expression (log2) der informativen Gene zwischen den beiden Vergleichsgruppen angezeigt. Auf der y-Achse ist die Signifikanz (korrigierter p-Wert) der Unterschiede aufgetragen. Die grauen Punkte im Hintergrund zeigen den informativen Datensatz an, in orange bzw. grün sind M1- bzw. M2-assoziierte Gene gekennzeichnet. In der Tabelle sind die Anzahl und der Prozentsatz der ercDC\_RCC-Signaturgene sowie der ercDC\_RCC-Markergene unter den informativen M1- und M2-assoziierten Genen angezeigt.

### 7.5.6.5.2 Klassifizierung nach homöostatischer Funktion

Neben der M1/M2-Klassifikation wird auch eine Einteilung der MΦ basierend auf drei verschiedenen homöostatischen Funktionen angewandt. So argumentieren Mosser et al.<sup>183</sup> für eine Einteilung in drei verschiedene MΦ-Subtypen basierend auf den Funktionen „Bakterizide Aktivität“, „Wundheilung“ und „Immunregulation“. Aus Mosser et al. wurde das charakteristische Markerprofil für diese Zelltypen entnommen (Tabelle 7-7) und nach Gustafsson et al.<sup>184</sup> ergänzt (grüne Markierung). Die Ergänzung betraf die Markerliste der wundheilungsassoziierten MΦ, die durch gewebeomodulierende Marker ergänzt wurde, sowie die Markerliste der regulatorischen MΦ, die durch immunmodulierende, supprimierende Marker erweitert wurde.

**Tabelle 7-7: Marker und funktionelle Charakteristika der drei Gewebemakrophagen-Subtypen.**  
Die Tabelle wurde aus Mosser et al.<sup>183</sup> entnommen und durch gewebeomodulierende Marker bzw. immunmodulierende, supprimierende Marker (grün) aus Gustafsson et al.<sup>184</sup> ergänzt.

Marker	Gensymbol/ alternat. Bez.	Funktion des Proteins
<b>Klassisch aktivierte, bakterizide MΦ</b>		
CCL15	CCL15*	chemotaktisch für MΦ, Lymphozyten und Eosinophile
CCL20	CCL20°	chemotaktisch für DC und T-Zellen
CXCL10	CXCL10	chemotaktisch für NK- und T-Zellen; bindet an CXCR3
CXCL11	CXCL11	chemotaktisch für NK- und T-Zellen; bindet an CXCR3
CXCL9	CXCL9	angiostatisch und antiinvasiv, T-Zell-stimulierend
IL-12	IL12A/B°	induziert T <sub>H</sub> 1-Entwicklung
iNOS	NOS2°	produziert NO und Citrullin aus Arginin, bakterizid
<b>Wundheilungsassoziierte, gewebeomodulierende MΦ</b>		
CCL17	CCL17	chemotaktisch für T-Zellen und MΦ
CCL18	CCL18	chemotaktisch für T-Zellen und myeloische Zellen
CCL22	CCL22	chemotaktisch für T <sub>H</sub> 2-Zellen und andere CCR4-exprimierende Zellen
DCIR	DCIR/CLEC4A	inhibitorischer, Lektin-ähnlicher Immunrezeptor
Factor XIII-A	F13A1	bindet Proteine der extrazellulären Matrix, trägt zur Wundheilung bei
IGF-1	IGF1	stimuliert Fibroblastenproliferation, proangiogen
IL-27Rα	IL27RA	inhibiert die proinflammatorische Zytokinproduktion
RELMα	FIZZ1	moduliert die extrazelluläre Matrix
Stabilin 1	STAB1	endozytotischer Rezeptor, steuert Lysosomensortierung
YM1	YM1	kein humanes Ortholog
BEX3	NGFRAP1	neuronaler Wachstumsfaktor
C1q, subunit A	C1QA	Komplementkomponente
C1q, subunit B	C1QB	Komplementkomponente
COL1A2	COL1A2	Kollagen, Strukturprotein
COL3A1	COL3A1	Kollagen, Strukturprotein
COL4A2	COL4A2	Kollagen, Strukturprotein
COL6A3	COL6A3	Kollagen, Strukturprotein
FN1	FN1	vermittelt Zelladhäsion
Gas6	GAS6	stimuliert Zellproliferation, bindet an MerTK
HIF-2α	EPAS1	durch Hypoxie induzierter Transkriptionsfaktor
Hsp27	HSPB1	stressinduziert, im Aktin-Zytoskelett involviert
ITGB5	ITGB5	vermittelt Zelladhäsion
MMP-9	MMP9	Matrixmetalloproteinase



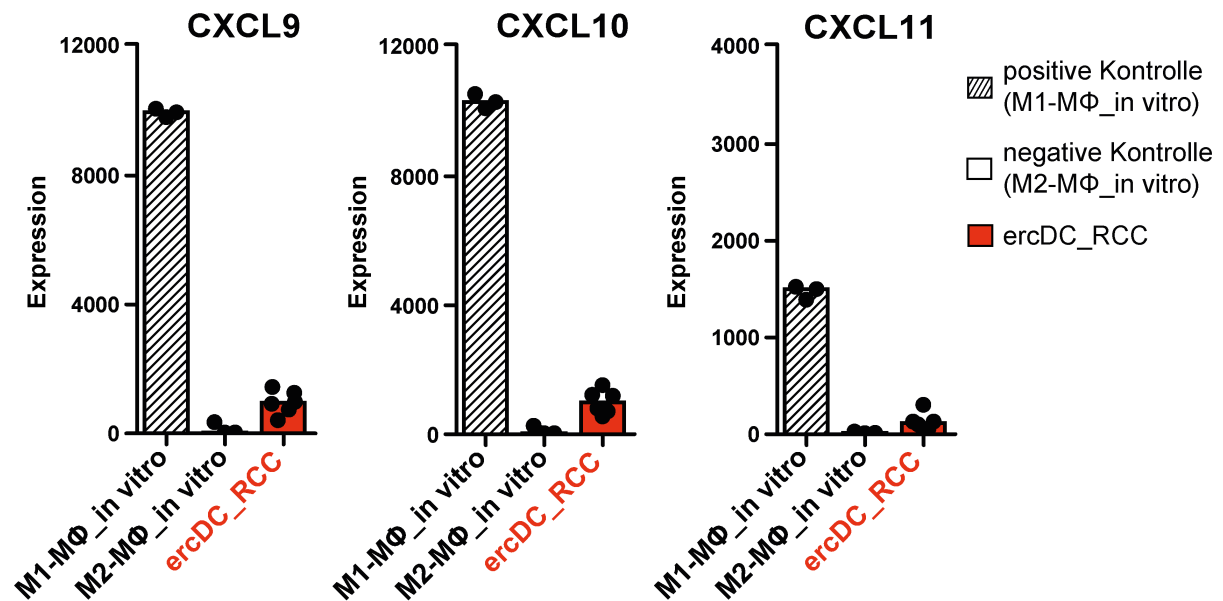
PADI4	PADI4	Enzym, vermittelt Inflammation
Protein S	PROS1	Plasmaprotein, inhibiert Blutgerinnung
S100-A4	S100A4	involviert in Invasion
SDC2	SDC2	vermittelt Zell-Matrix Kontakt
Serpin F1	SERPINF1	inhibiert Angiogenese
VCAN	VCAN	Matrixproteoglycan, involviert in Migration und Adhäsion
<b>Regulatorische, immunsupprimierende MΦ</b>		
CCL1	CCL1	chemotaktisch für Eosinophile und T <sub>H</sub> 2-Zellen; bindet CCR8
IL-10	IL10	antiinflammatorisches Zytokin
LIGHT	LIGHT/TNFSF14	kostimulatorisches Signal für T-Zellen durch Bindung an HVEM
SPHK1	SPHK1	katalisiert die Umwandlung von Sphingosin zu Sphingosin-1-phosphat
α2M	A2M	Proteaseinhibitor
CD9	CD9	negativer Regulator des TLR4-Signalweges
c-Maf	MAF	Transkriptionsfaktor, durch IL-10 induziert
DAB2	DAB2	inhibiert proinflammatorische Signalwege
CD209	CD209/DC-SIGN	Adhäsionsmolekül, Endozytose; durch IL-4 induziert
DPEP2	DPEP2	Metalloprotease, hydrolysiert Leukotriene D4 zu Leukotriene E4
IRAK3	IRAK3	negativer Regulator des TLR4-Signalweges
CD206	CD206/MRC1	Mannose-Rezeptor
PGDS	PGDS	Prostaglandin D2 Synthase
TNFRSF21	TNFRSF21	induziert Apoptose, inhibiert T-Zell-Antwort
TREM2	TREM2	inhibiert proinflammatorische Zytokinproduktion
VSIG4	VSIG4	Komplementrezeptor, T-Zell-inhibierend

\* Gen war auf einem der Arrays nicht vorhanden und konnte deshalb nicht analysiert werden; ° Gen wurde in den nachfolgenden Stripchart-Balkendiagrammen nicht berücksichtigt, da es entweder von allen Zelltypen sehr schwach oder von den jeweiligen positiven Kontrollzellen nicht stärker als von den negativen Kontrollzellen exprimiert wurde.

Es wurde getestet, ob *ercDC\_RCC* einem der drei Gewebemakrophagen-Subtypen zugeordnet werden können. Als positive Kontrollzellen für klassisch aktivierte, bakterizide MΦ wurden M1\_MΦ\_in vitro verwendet<sup>185</sup>. M2\_MΦ\_in vitro dienten hier als negative Kontrolle. Für die wundheilungsassoziierten, gewebemodulierenden und die regulatorischen, immunsupprimierenden MΦ waren M2\_MΦ\_in vitro die positive Kontrolle<sup>185,186</sup>. Die CD11c<sup>LO</sup> MΦ\_Decidua wurden zusätzlich als positive Kontrollzelle für die wundheilungsassoziierten, gewebemodulierenden MΦ verwendet, da sie von Houser et al.<sup>133</sup> als gewebemodulierend beschrieben wurden. M1\_MΦ\_in vitro fungierten für die beiden letzten MΦ-Subtypen als Negativkontrolle.

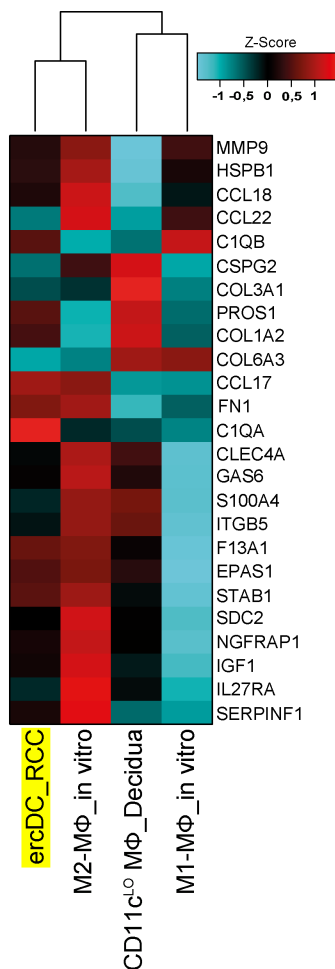
In Abbildung 7-28 (Seite 111) ist die Expression von drei Genen (*CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*), die für bakterizide MΦ charakteristisch sind, gezeigt. Die positive Kontrolle (M1\_MΦ\_in vitro) ist schraffiert und die negative Kontrolle (M2\_MΦ\_in vitro, nicht-bakterizid) weiß gekennzeichnet. Die *ercDC\_RCC* sind rot markiert. Wie erwartet, exprimierten M1\_MΦ\_in vitro diese Gene stark, während M2\_MΦ\_in vitro sie nur sehr schwach exprimierten. Die *ercDC\_RCC* besaßen im Vergleich zu M2\_MΦ\_in vitro etwas höhere Transkriptlevel, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Welch's t-Test). Bei allen drei Genen erreichten die *ercDC\_RCC* allerdings nicht die Expressionswerte der M1\_MΦ\_in

vitro. Gene, die von allen Zelltypen sehr schwach exprimiert wurden, bzw. bei denen die positive Kontrollzelle das Gen nicht stärker exprimierte als die negative Kontrollzelle, wurden für die Analyse nicht berücksichtigt. Sie sind in Tabelle 7-7 mit einem (°) gekennzeichnet.



**Abbildung 7-28: Transkriptlevel charakteristischer Gene bakterizider Makrophagen in ercDC aus dem RCC.** Gezeigt sind die normalisierten linearen Expressionswerte der Gene. Die ercDC\_RCC sind rot gekennzeichnet, die positive Kontrollzelle, M1-MΦ\_in vitro, schraffiert und die Negativkontrolle, M2-MΦ\_in vitro, weiß. Der Balken zeigt den Median an, die Symbole die einzelnen Replikate eines Zelltyps. Die unterschiedliche Skalierung der Y-Achse ist zu beachten. Die Signifikanz der Expressionsunterschiede zwischen ercDC\_RCC und M2-MΦ\_in vitro wurde mit Hilfe des Welch's t-Test für ungepaarte Proben ermittelt. Bei keinem der Gene konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden.

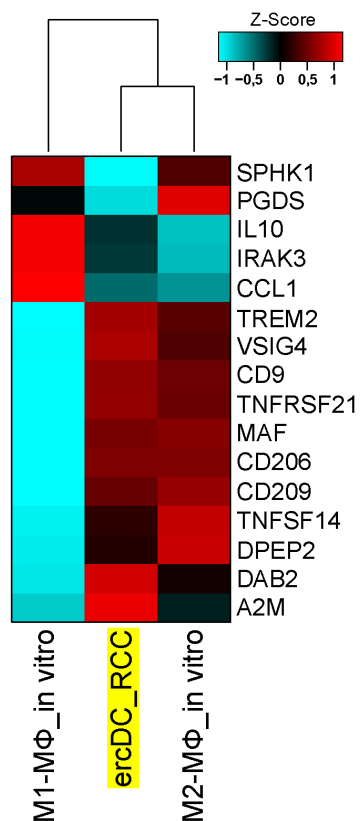
In Abbildung 7-29 (Seite 112) ist die relative Expression typischer Gene wundheilungsassoziierten, gewebe modulierenden MΦ in einer Heatmap dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass das Genexpressionsmuster der ercDC\_RCC (gelbe Markierung) mit dem der beiden Positivkontrollen, M2-MΦ\_in vitro und CD11c<sup>LO</sup> MΦ\_Decidua, stark übereinstimmt. Die bakteriziden M1-MΦ\_in vitro exprimierten die Gene in der Mehrzahl relativ schwach.



**Abbildung 7-29: Expression charakteristischer Gene wundheilungsassoziierter, gewebemodulierender Makrophagen.** Die Heatmap zeigt die relative Expression (Z-Score) der Gene sowie das Clustering der Zelltypen. Die ercDC\_RCC sind gelb markiert. Als positive Kontrollzellen fungierten M2-MΦ\_in vitro und CD11c<sup>LO</sup> MΦ\_Decidua, mit denen die ercDC\_RCC starke Übereinstimmung im Expressionsmuster zeigten. M1-MΦ\_in vitro dienten als Negativkontrolle.

Die relativ starke Expression der wundheilungsassozierten, gewebemodulierenden Gene in ercDC\_RCC bestätigt das Ergebnis der GO-Term-Anreicherungsanalyse, bei der die Kategorie „Response to wounding“ am signifikantesten war (siehe Abbildung 7-14, Seite 81).

Im nächsten Schritt wurde die Expression typischer Gene des regulatorischen, immunsupprimierenden Subtyps analysiert. Die als immunregulatorisch beschriebenen M2-MΦ\_in vitro wurden als Positivkontrolle verwendet<sup>185</sup>. In der Heatmap (Abbildung 7-30, Seite 113) ist deutlich zu sehen, dass die ercDC\_RCC (gelbe Markierung) starke Übereinstimmungen im Expressionsmuster mit den M2-MΦ\_in vitro zeigten und zu den als Negativkontrolle dienenden M1-MΦ\_in vitro, die ein separates Cluster bildeten, konträr waren.



**Abbildung 7-30: Expression charakteristischer Gene regulatorischer, immunsupprimierender Makrophagen.** Die Heatmap zeigt die relative Expression (Z-Score) der Gene sowie das Clustering der Zelltypen. Die ercDC\_RCC sind gelb markiert. Als positive Kontrollzellen fungierten M2-MΦ\_in vitro, mit denen die ercDC\_RCC ein gemeinsames Cluster bildeten. M1-MΦ\_in vitro fungierten als Negativkontrolle.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die ercDC\_RCC die wundheilungsassoziierten, gewebeomodulierenden sowie die regulatorischen, immunsupprimierenden Gene verhältnismäßig stark, analog den jeweiligen positiven Kontrollzellen, exprimierten. Aber auch Gene des bakteriziden Subtyps wurden exprimiert, stärker als sie von den nicht-bakteriziden M2-MΦ\_in vitro exprimiert wurden (siehe Abbildung 7-28, Seite 111). Die ercDC\_RCC stellen somit einen gemischten Zelltyp dar, der Charakteristika aller Gewebemakrophagen-Subtypen vereint.

### 7.5.6.5.3 Expression von TAM-assoziierten Markern

Die ercDC könnten ein TAM-Subtyp sein, weil sie im RCC-Gewebe deutlich häufiger vorkommen als im NKC. Unter den TAM sind verschiedene Polarisierungen möglich, da das Tumormilieu sowohl regional als auch über die Zeit stark unterschiedlich sein kann. So ist beschrieben, dass im heranwachsenden Tumor zunächst die antitumorale M1-Polarisierung überwiegt, im etablierten Tumor sollen dagegen in der Regel protumorale M2-polarisierte MΦ dominieren<sup>28</sup>. Beide Subtypen teilen die Expression einiger Marker, wie z.B. CD14 und CD68, unterscheiden sich aber beispielsweise in der Sekretion von Zytokinen und Matrixmetalloproteinasen<sup>115</sup>. Eine Subpopulation der im Tumor vorkommenden MΦ zeichnet sich durch die Expression des Angiopoetin-Rezeptors Tie2 (kodiert durch *TEK*) aus<sup>187,188</sup>. Tie2-exprimierende TAM (TEM) haben einen M2-ähnlichen Phänotyp und tragen maßgeblich zum sogenannten „angiogenen Switch“ des Tumors bei.

Heusinkveld et al.<sup>115</sup> stellten eine Markerliste für verschiedene humane TAM-Subpopulationen auf. Diese beinhaltet u.a. das Adhäsionsprotein CD68, das sehr häufig als Marker für MΦ in humanen Tumorgeweben eingesetzt wird<sup>189</sup>. CD68 wird oft in Kombination mit den Markern CD14, CD11b/ITGAM und HLA-DR für den TAM-Nachweis verwendet. Um TAM mit einem M2-Phänotyp zu detektieren, wird meistens eine Kombination der Marker CD163, CD206/MRC1, CD204/MSR1, MMP-2 und MMP-9 eingesetzt<sup>115</sup>. Auch der Folatezeptor FRb (kodiert durch *FOLR2*) gilt als M2-Marker<sup>190</sup>. CD163, CD206/MRC1 und CD204/MSR1 können allerdings auch von M1-MΦ exprimiert werden. Bisher sind keine Oberflächenmarker für die eindeutige Detektion von TAM mit einem M1-Phänotyp beschrieben. M1-MΦ werden vielmehr über ihre funktionelle Aktivität, die Produktion bakterizider Substanzen (NO, ROS) und die Sezernierung von IL-12, detektiert. Das NO-produzierende Enzym iNOS wird oft als Marker benutzt, da die Produktion von NO sehr kurzweilig ist und nur schwierig gemessen werden kann<sup>115</sup>. In Tabelle 7-8 sind die von Heusinkveld et al. vorgeschlagenen Marker, ergänzt durch Tie2, sowie deren Funktionen zusammengefasst.

**Tabelle 7-8: Marker zur Identifizierung humaner TAM-Subtypen.** Angelehnt an Heusinkveld et al.<sup>115</sup>. In blau markiert sind Marker, die Subtyp-spezifisch exprimiert werden.

Marker	Gensymbol/ alternat. Bez.	Funktion des Proteins	Expression		
			M1	M2	TEM*
CD68	CD68	Adhäsionsprotein	x	x	x
CD14	CD14	LPS-Korezeptor	x	x	x
CD163	CD163	Scavenger-Rezeptor	+/-	xx	x
CD206	CD206/MRC1	Mannose-Rezeptor	x	xx	x
MMP-2	MMP2	Matrixmetalloproteinase	-	x	x
MMP-9	MMP9	Matrixmetalloproteinase	-	x	x
HLA-DR	HLADRA	Antigenpräsentation	x	x	x
CD204	CD204/MSR1	Makrophagen Scavenger-Rezeptor 1	x	x	x
B7H4	B7H4	inhibitorisches Kostimulationsmolekül	-	x	k.l.
CD11b	CD11B/ITGAM	Adhäsionsprotein	x	x	x
FRb	FOLR2	Folatezeptor	-	x	x
STAT3	STAT3	Transkriptionsfaktor	-	x	k.l.
iNOS	NOS2	Stickstoffmonoxid-Synthase	x	-	-
IL-12p70, p35	IL12A	Interleukin-UE, T-Zell-Aktivierung	xx	-	-
IL-12p70, p40	IL12B	Interleukin-UE, T-Zell-Aktivierung	xx	-	-
IL-10	IL10	Interleukin, T-Zell-Inhibition	x	xx	xx
Tie2	TEK/TIE2	Tyrosinkinaserzeptor	-	-	x

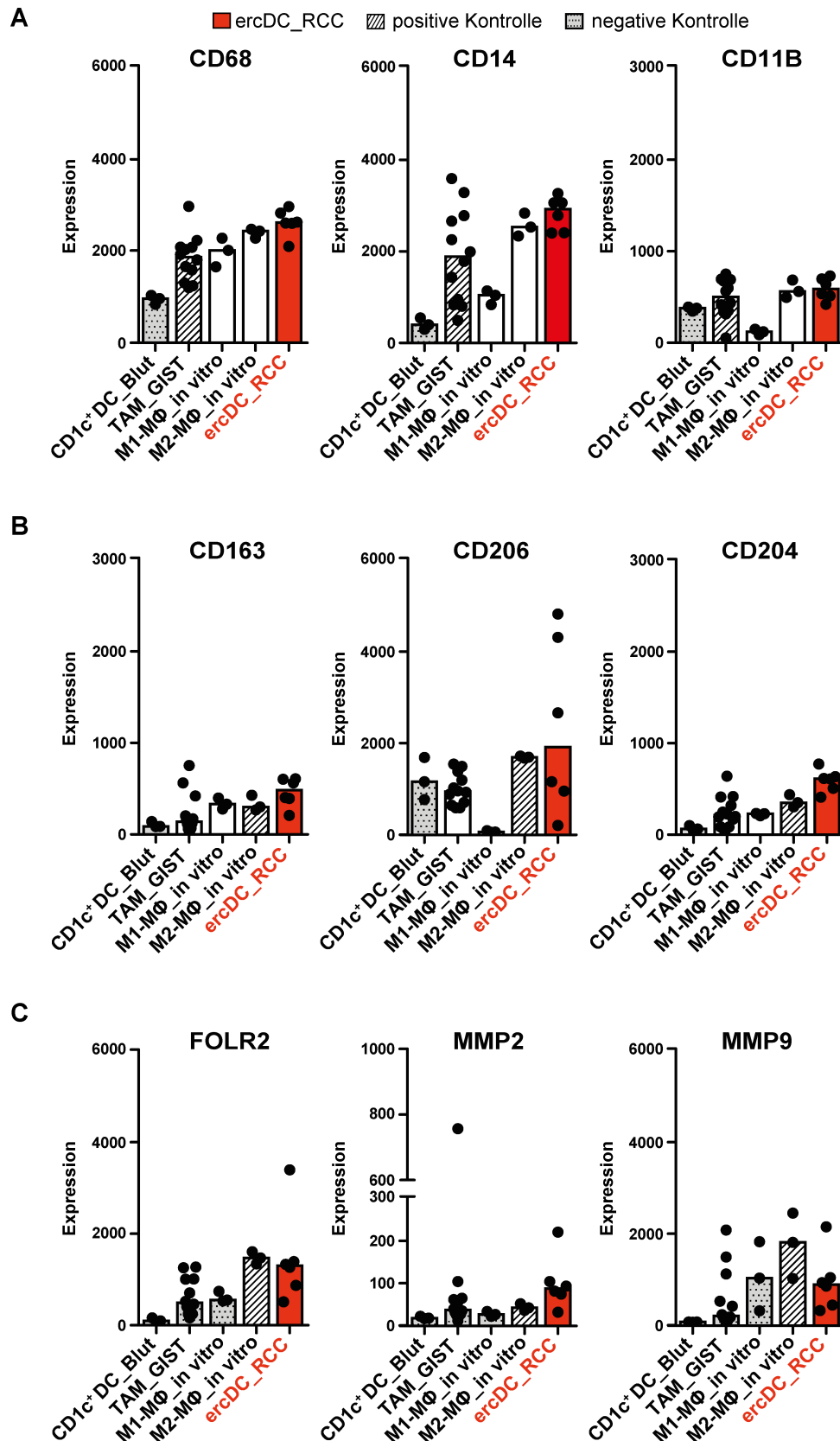
\* TEM sind M2-ähnlich und exprimieren viele der Marker analog den M2-polarisierten TAM. k.l.: keine Information vorhanden; +/-: kann exprimiert sein; x: exprimiert; xx: stark exprimiert; UE: Untereinheit

Um die Frage zu klären, ob ercDC\_RCC einen TAM-Phänotyp besitzen, wurde die Expression der diskutierten Marker auf Transkriptebeine überprüft. Die linearen Expressionswerte der Marker sind als Stripchart-Balkendiagramm in Abbildung 7-31 (Seite

116) dargestellt. Die von Cavnar et al.<sup>139</sup> beschriebenen TAM\_GIST wurden als positive Kontrolle für die allgemeinen TAM-Marker (Abbildung 7-31A) verwendet. Für Marker, die überwiegend von M2-MΦ, aber auch von M1-MΦ exprimiert werden können (Abbildung 7-31B), wurden die M2-MΦ\_in vitro als Positivkontrolle herangezogen, genauso wie für die M2-assoziierten TAM-Marker (Abbildung 7-31C). Die Positivkontrollen sind jeweils als schraffierter Balken, die Negativkontrollen jeweils als grau gepunkteter Balken dargestellt.

Die vergleichende Analyse der Expressionswerte ergab, dass ercDC\_RCC (roter Balken) die für allgemeine TAM-Marker kodierenden Gene *CD68*, *CD14* und *CD11B/ITGAM* sehr stark exprimierten, mindestens genauso stark wie die Positivkontrolle TAM\_GIST (Abbildung 7-31A). Auch die Gene *CD163*, *CD206/MRC1* und *CD204/MSR1* (Abbildung 7-31B) exprimierten sie stärker als TAM\_GIST und auch stärker als die Positivkontrolle M2-MΦ\_in vitro. Von den M2-assoziierten Genen *FOLR2*, *MMP2* und *MMP9* (Abbildung 7-31C) besaßen die ercDC\_RCC ebenfalls deutlich höhere Transkriptlevel als die TAM\_GIST. Die Transkriptlevel von *FOLR2* und *MMP2* waren vergleichbar bzw. höher als die der M2-Positivkontrolle (M2\_MΦ\_in vitro). Die *MMP9*-Transkriptlevel waren dagegen niedriger und mit M1-MΦ\_in vitro vergleichbar.

Die M1-assoziierten Gene *IL12A*, *IL12B* und *NOS2*, das M2-assoziierte Gen *B7H4* und das von TEM exprimierte *TEK* wurden von allen Zelltypen nur sehr schwach exprimiert. Diese Marker sind deshalb nicht gezeigt. Die M2-assoziierten Gene *STAT3* (engl.: signal transducer and activator of transcription 3) und *IL10* sind ebenfalls nicht gezeigt, weil sie entgegen der Erwartung von M1-MΦ\_in vitro, nicht jedoch von den als Positivkontrolle verwendeten M2-MΦ\_in vitro, am stärksten exprimiert wurden.

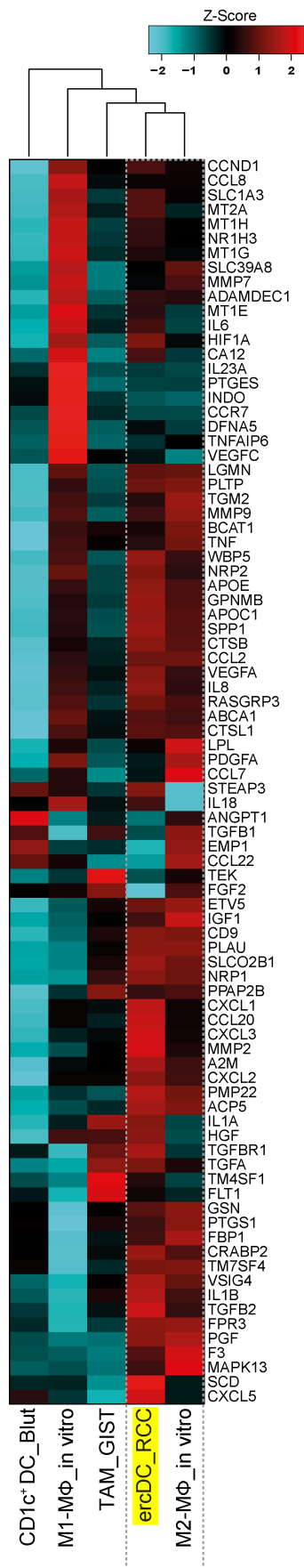


**Abbildung 7-31: Transkriptlevel von Markern, die zur Identifizierung humaner TAM verwendet werden.** Gezeigt sind die normalisierten linearen Expressionswerte der Gene. **A)** Allgemeine TAM-Marker unabhängig von der Polarisierung. **B)** Marker, die überwiegend von M2-polarisierten TAM exprimiert werden, aber auch von M1-polarisierten TAM exprimiert werden können. **C)** Marker, die zur Identifizierung von M2-polarisierten TAM verwendet werden. Die ercDC\_RCC sind rot gekennzeichnet, die positiven Kontrollen schraffiert, die negativen Kontrollen grau gepunktet. Der Balken zeigt den Median an, die Symbole die einzelnen Replikate eines Zelltyps. Die unterschiedliche Skalierung der Y-Achse ist zu beachten.

Die starke Expression der M2-assoziierten TAM-Marker in ercDC\_RCC deutet darauf hin, dass ercDC\_RCC protumorale Funktionen besitzen könnten. Unter den ercDC\_RCC-Marker- und Signaturgenen waren mehrere Gene hochreguliert, die eine Rolle in der Angiogenese und Invasion spielen (siehe Funktionsgruppe 11 in Abbildung 7-16, Seite 87). Wang et al.<sup>191</sup> definierten eine Gruppe von 72 Genen als „invasive Signatur“. Diese Gruppe wurde für die Analyse der ercDC\_RCC durch proangiogene Faktoren aus der Literatur (Genset „angiogenesis“ der MSigDB Datenbank von der GSEA Homepage und Marker von qiagen.com) ergänzt, so dass das proangiogene und invasive Genset insgesamt 101 Gene umfasste. Es wurde nun getestet, wie stark die ercDC\_RCC diese Gene im Vergleich zu den in vitro generierten M1- und M2-MΦ und den antitumoralen TAM\_GIST exprimieren. CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut wurden als vermutete nicht-proangiogene Probe mitgeführt.

Abbildung 7-32 (Seite 118) zeigt die relative Expression der Gene in den genannten Zelltypen. Die ercDC\_RCC (gelb) stimmten am stärksten mit den M2-MΦ\_in vitro überein, mit denen sie auch ein gemeinsames Cluster bildeten (grauer Rahmen). Beide Zelltypen exprimierten die Mehrzahl der Gene verhältnismäßig stark. Die antitumoralen TAM\_GIST dagegen exprimierten, wie die CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut, die Gene relativ schwach. Das deutlich mit den M2-MΦ\_in vitro übereinstimmende Expressionsmuster der proangiogenen und invasiven Gene unterstützt die Vermutung, dass die ercDC\_RCC protumorale Eigenschaften haben könnten.





**Abbildung 7-32: Expression der Gene des proangiogenen und invasiven Gensets.** Die Heatmap zeigt die relative Expression (Z-Score) der Gene sowie das Clustering der Zelltypen. Die ercDC\_RCC sind gelb markiert. Sie bilden ein Cluster mit den M2-Mφ\_in vitro (grauer Rahmen). Die antitumoralen TAM\_GIST und CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut dienen als Negativkontrolle. Die invasiven Gene wurden der Publikation von Wang et al.<sup>191</sup> entnommen und durch proangiogene Gene aus der Literatur ergänzt (Genset „Angiogenesis“ der GSEA-Datenbank, Marker von QIAGEN Homepage).

### 7.5.7 Einfluss von Gewebemilieufaktoren auf das Genexpressionsprofil der ercDC aus dem RCC

Einschlägige Arbeiten der letzten Jahre zeigten, dass die Variabilität geweberesidenter Makrophagen sehr groß ist<sup>10,12,14</sup>. Dabei werden der Phänotyp und die Funktion entscheidend durch die im jeweiligen Mikromilieu vorkommenden löslichen Faktoren geprägt. Xue et al.<sup>112</sup> benutzten definierte Aktivierungssignale (Stimuli) und bestimmten das entsprechend in den MΦ induzierte Genexpressionsprofil. Sie fassten die Stimulus-spezifischen Gensets zu Modulen zusammen und bestimmten jeweils das Modul-„Eigengen“ (ME). Dieses wurde mit den verschiedenen Stimuli korreliert. In Anlehnung an diese Arbeit wurden nun unsere In-vitro- und Ex-vivo-Datensätze sowie die externen Datensätze dahingehend analysiert, ob Korrelationen mit bestimmten Modulen, also bestimmten polarisierenden Aktivierungssignalen, vorliegen. Dies sollte zeigen, ob eventuell Rückschlüsse gezogen werden können, welchem Milieu die ercDC im RCC ausgesetzt waren und durch welche Faktoren die ercDC-Polarisierung ausgelöst wurde.

Abbildung 7-33 (Seite 122) zeigt eine Korrelationsheatmap, in welcher die myeloischen Zelltypen, abhängig von der Korrelation mit den Modulen, geclustert wurden. In der Heatmap sind neben den Modulen auch die jeweils positiv mit den Modulen korrelierenden Stimuli annotiert. Die vollständige Bezeichnung der Stimuli sowie die negativ assoziierten Stimuli können Tabelle 11-8 bzw. Tabelle 11-9 im Anhang (Seite 180 und 181) entnommen werden. Das Clustering teilte die Zelltypen in 4 Gruppen und die Module in 3 Gruppen, A, B und C, ein (Abbildung 7-33). Die Modulgruppen A und B wurden nochmals in 2 Subgruppen unterteilt (a und b). Zellgruppe 1 wurde ausschließlich von im Blut vorkommenden Zellen gebildet. Die Zelltypen dieser Gruppe zeichneten sich dadurch aus, dass sie mit den Modulen in Gruppe B positiv und denen in Gruppe A negativ korrelierten. Die Zelltypen in Gruppe 2 zeigten keine eindeutige Tendenz für das Überwiegen positiver oder negativer Korrelation mit den Modulgruppen.

Zellgruppe 3, welche die ercDC\_RCC enthielt, wird im Folgenden detaillierter betrachtet. Dieser Zellgruppe gehörten auch die infMΦ\_ascOvCa an, welche bereits in den vorherigen Analysen als mit den ercDC\_RCC unmittelbar verwandt identifiziert wurden. Weiterhin gehörten zu dieser Gruppe die infDC\_ascOvCa, MΦ\_RCC, M2-MΦ\_in vitro, ercDC\_in vitro sowie die CD103<sup>+</sup>Sirpα<sup>+</sup> DC\_Darm. Letztere ähnelten den ercDC\_RCC insbesondere in der ausgeprägten negativen Korrelation mit den Modulen der Modulgruppe B und C, während sie in Modulgruppe A überwiegend konträr zu den ercDC\_RCC waren. Für die Modulgruppe A zeigten alle Zelltypen der Gruppe 3, mit Ausnahme der CD103<sup>+</sup>Sirpα<sup>+</sup> DC\_Darm und teilweise der ercDC\_in vitro, eine starke positive Korrelation. Die Module der Gruppe A sind überwiegend geprägt von der Stimulation mit Glucocorticoiden (GC), Palmitinsäure (PA, engl.: palmitic acid) und PGE<sub>2</sub> oder einer Kombination aus TNF, PGE<sub>2</sub> und P3C (Pam3CysSerLys4, TLR2-Ligand) (= TPP) (orange Schrift). PGE<sub>2</sub> hat wie GC eine

antiinflammatorische Wirkung, PA- und TPP-Stimulierung ist mit chronischer Inflammation verknüpft<sup>192,193,194,195</sup>. Die ercDC\_in vitro zeigten in der Modul-Subgruppe Aa weitgehende Parallelen mit den ercDC\_RCC, während sie sich in der Modul-Subgruppe Ab konträr verhielten (schwarzer Kasten). Für die Modulgruppe B zeigten die Zelltypen der Gruppe 3 eine überwiegend negative Korrelation. Die ercDC\_RCC korrelierten sogar ausschließlich negativ und waren darin den ercDC\_in vitro vergleichbar. In der Mehrzahl waren die Module der Gruppe B positiv mit dem Zytokin IL-4 (grüne Schrift) assoziiert. Die mit den ercDC\_RCC nahe verwandten infMΦ\_ascOvCa korrelierten mit Modulgruppe B auch überwiegend negativ. Jedoch unterschieden sie sich von den ercDC\_RCC in der positiven Korrelation mit den fettsäureassoziierten Modulen 1,6,24 und 26 sowie Modul 49 (Modul-Subgruppe Ba, schwarz eingerahmt). Mit den meisten dieser Module korrelierten auch die infDC\_ascOvCa, M2-MΦ\_in vitro und MΦ\_RCC positiv.

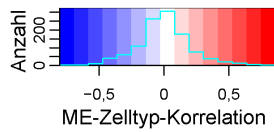
Gruppe C enthielt überwiegend Module, die durch M1-Stimuli (IFN-γ, TNF, sLPS, braune Schrift) induziert werden. Entsprechend zeigte sich eine starke positive Korrelation mit den M1-MΦ\_in vitro, die die Zellgruppe 4 bildeten. Die ercDC\_RCC, ercDC\_in vitro, M2-MΦ\_in vitro und CD103<sup>+</sup>Sirpα<sup>+</sup> DC\_Darm korrelierten dagegen ausschließlich negativ mit diesen Modulen. Die MΦ\_RCC, infDC\_ascOvCa und infMΦ\_ascOvCa zeigten im Gegensatz dazu teilweise positive Korrelationen. Die MΦ\_RCC korrelierten überraschenderweise, wie die M1-MΦ\_in vitro, positiv mit Modul 8, welches von Xue et al.<sup>112</sup> als ein für M1-MΦ charakteristisches Modul, das mit IFN-γ assoziiert ist, hervorgehoben wurde.

Aus dem Ergebnis der Korrelationsanalyse kann geschlossen werden, dass das transkriptionelle Programm der ercDC\_RCC nicht durch IL-4 bedingt wurde, sondern v.a. durch GC, PGE<sub>2</sub>, PA und TPP induziert wird. Es ist bekannt, dass PGE<sub>2</sub> ein wichtiger Milieufaktor im RCC ist<sup>100</sup>. Das PGE<sub>2</sub>- und GC-reiche Milieu könnte auch ursächlich für die beobachtete Expression von *CD163* in ercDC\_RCC und infMΦ\_ascOvCa (nicht gezeigt) sein, da beschrieben ist, dass beide Faktoren die Expression von *CD163* in MΦ induzieren<sup>196,197</sup>. Für GC ist darüber hinaus bekannt, dass es das für die M2c-Polarisierung charakteristische MerTK induziert<sup>178</sup>, ein Marker, welcher auch von ercDC\_RCC und infMΦ\_ascOvCa (nicht gezeigt) stark exprimiert wurde. Die ausgeprägten Parallelen im Korrelationsmuster der ercDC\_RCC und infMΦ\_ascOvCa deuten darauf hin, dass die beiden Zelltypen durch ein ähnliches Gewebemilieu geprägt wurden. Die negative Korrelation der ercDC mit Modulen, die mit IL-4 assoziiert sind, steht in Einklang mit unserer Beobachtung, dass im RCC-Gewebe kein IL-4 detektiert wurde (Hosse (Eckl), Dissertationsarbeit, 2009<sup>198</sup>) und auch in dem für die Generierung der ercDC\_in vitro verwendeten konditionierten RCC-26-Medium IL-4 nicht nachweisbar war<sup>101</sup>.

Die ercDC\_in vitro zeigten starke Parallelen mit dem Korrelationsmuster der ercDC\_RCC. Unterschiede gab es in der Modul-Subgruppe Ab, wo die ercDC\_in vitro negative

Korrelationen zeigten, die ercDC\_RCC jedoch positive. Die Module dieser Subgruppe sind u.a. von der Stimuluskombination TPP (TNF + PGE<sub>2</sub> + P3C) bestimmt. Die negative Korrelation der ercDC\_in vitro mit diesen Modulen könnte darauf zurückzuführen sein, dass das für die Generierung der ercDC\_in vitro verwendete tumorkonditionierte Medium (RCC-26-CM) weniger komplex ist als das Tumormilieu und v.a. TNF vermisst, das von den RCC-26-Zellen nicht sezerniert wurde (nicht gezeigt).

Die ebenfalls aus dem RCC stammenden MΦ\_RCC ähnelten den ercDC\_RCC im Korrelationsmuster, wobei die Korrelationen durchgehend über alle Module hinweg weniger stark ausgeprägt waren. Im Unterschied zu den ercDC\_RCC korrelierten die MΦ\_RCC positiv mit dem Modul 8, welchem der M1-Stimulus IFN-γ zugrunde liegt. Dies lässt vermuten, dass im RCC-Tumor verschiedene Mikromilieus existieren, die sich in einer unterschiedlichen Prägung der myeloischen Zellen niederschlagen.



**Abbildung 7-33: Korrelation der Modul-Eigengene (ME) - basierend auf den von Xue et al.<sup>112</sup> definierten Modulen - mit dem Genexpressionsprofil verschiedener myeloischer Zelltypen.** Blau bedeutet negative Korrelation, rot bedeutet positive Korrelation. Die Zelltypen teilten sich anhand von Parallelen im Korrelationsmuster in 4 Gruppen ein. Die Module mit den positiv korrelierenden Stimuli bildeten 3 Gruppen, A, B und C. Die Module A und B unterteilten sich nochmals in 2 Subgruppen, a und b. Stimuli, die in der Modulgruppe A dominierten sind orange, die der Modulgruppe B grün und die der Modulgruppe C braun markiert. Erläuterungen zu den Abkürzungen sowie die negativ korrelierenden Stimuli sind in Tabelle 11-8 bzw. Tabelle 11-9 im Anhang zu finden.

## 8 DISKUSSION

Obwohl das Nierenzellkarzinom (RCC) ein reichhaltiges Immunzellinfiltrat aus T-Zellen, NK-Zellen, DC und MΦ besitzt, kommt es trotzdem nur sehr selten zur Abstoßung des Tumors<sup>199,200,201</sup>. Wir und auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen lytische Aktivität besitzen, allerdings erst nach In-vitro-Kultivierung<sup>88,92,94</sup>. Frisch aus dem Tumor gewonnen und unkultiviert sind sie inaktiv. Offensichtlich wird ihre Funktion durch das Tumormilieu supprimiert. DC und MΦ sind zentrale Regulatoren des adaptiven und angeborenen Immunsystems. Sie können abhängig vom Aktivierungszustand Immunität oder Toleranz induzieren. Für den Tumor könnte diese Zellpopulation deshalb ein attraktives Ziel sein, um eine aktivierende Immunantwort in eine tolerogene Immunantwort umzuwandeln.

Das RCC entwickelt sich aus den Zellen des proximalen Tubulusepithels<sup>102</sup>. In der Maus ist für dieses spezifische Organkompartiment beschrieben, dass es von einem dichten Netzwerk aus CD11c<sup>+</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> DC durchzogen ist<sup>78</sup>. Diese tubulointerstitiellen DC besitzen eine charakteristische funktionelle Polarisierung. Sie sezernieren u.a. antiinflammatorisches IL-10, das ein tolerogenes Milieu schafft und das Tubulusepithel vor schädigenden T-Zell-Angriffen bei entzündlichen Gewebereaktionen schützt<sup>83,202</sup>. Auch das humane renale Tubulointerstitium scheint speziell geprägte DC zu besitzen<sup>8</sup>. Wir spekulierten, ob sich dieses Milieu des Tubulointerstitiums möglicherweise auch im RCC wiederfindet und dazu beiträgt, dass durch die Induktion tolerogener DC und MΦ eine immunvermittelte Tumorabstoßung im RCC verhindert wird.

Daraus ergab sich als Ziel der Arbeit, die myeloischen Zellen des RCC näher zu charakterisieren, um neue Erkenntnisse zum „Immunescape“ zu gewinnen und möglicherweise Angriffspunkte für therapeutische Manipulation aufzudecken. Zunächst wurde das myeloische Infiltrat histologisch mit einer 3-fach-Färbung dargestellt<sup>101</sup>. Zur Detektion der interstitiellen DC wurde CD209/DC-SIGN benutzt, weil es im humanen System als Marker für kreuzpräsentierende DC beschrieben ist<sup>114</sup>. CD14 und CD163 wurden zum Nachweis von MΦ verwendet. Bei der Auswertung dieser Färbung fiel ein ungewöhnlicher Zelltyp auf, der CD209/DC-SIGN, CD14 und CD163 koexprimierte. Dieser Zelltyp wurde in der Arbeit Figel, Brech et al.<sup>101</sup> beschrieben und als „enriched-in-renal-carcinoma DC“ (ercDC) bezeichnet, weil er nicht nur im RCC, sondern auch im tumorfreien Nierenparenchym (NKC) vorkam, jedoch in deutlich niedriger Frequenz. Für die Bezeichnung „DC“ entschieden wir uns u.a. deshalb, weil es Parallelen zu den murinen renalen CD11c<sup>+</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> DC gab, die ebenfalls MΦ-Marker koexprimierten<sup>78,203</sup>. Auch in der humanen Dermis und in der Decidua des Ersttrimesters wurden CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Zellen beschrieben, die Antigen präsentieren konnten und als DC-Subtyp eingestuft wurden<sup>204,205</sup>.

Die Zuordnung zu DC schien weiterhin angebracht, weil ercDC Kostimulationsmoleküle und HLA-DR exprimierten.

Mittlerweile ist bekannt, dass viele ursprünglich als Zelltyp-spezifisch geltende Oberflächenmarker von vielen myeloischen Zelltypen exprimiert werden. Beispielsweise wird der im murinen System bislang als DC-spezifisch geltende Marker CD11c auch von MΦ in nicht-lymphatischen Geweben exprimiert<sup>6,12,206</sup>. Die in der Decidua gefundenen, zunächst als DC beschriebenen myeloischen Zellen<sup>204</sup>, werden mittlerweile als MΦ bezeichnet und anhand der Expressionsstärke von CD11c in zwei verschiedene Subtypen eingeteilt<sup>133</sup>. Mittlerweile gibt es zahlreiche Publikationen, die sich mit der Thematik „MΦ oder DC“ beschäftigen. Xue et al.<sup>112</sup> postulierten kürzlich, dass die MΦ-typischen Marker CD14, CD64/FcγRI und MerTK für die FACS-basierte Unterscheidung von DC und MΦ im murinen und humanen System geeignet sind. In der hier durchgeführten FACS-Analyse (Abbildung 7-23, Seite 101) zeigten jedoch die in vitro generierten cDC eine vergleichbar starke Oberflächenexpression von MerTK wie die parallel analysierten MΦ. MerTK eignete sich daher in unserem Fall nicht zur Unterscheidung von DC und MΦ. CD14 und CD64/FcγRI wurden von MΦ stark und von in vitro generierten cDC schwach exprimiert und erfüllten somit das Kriterium für eine DC-MΦ-Unterscheidung in unserem System. Allerdings ist beschrieben, dass renale DC CD64/FcγRI exprimieren können<sup>118</sup>.

Neben Oberflächenmarkern werden auch funktionelle Eigenschaften zur Unterscheidung von DC und MΦ herangezogen. Als charakteristische DC-Eigenschaft gilt die Fähigkeit, nach Antigenkontakt in die T-Zell-Zone der Lymphknoten zu migrieren und dort mittels Antigenpräsentation und Kostimulation naive T-Zellen zu aktivieren<sup>4,5</sup>. Typisch für MΦ ist eine ausgeprägte Phagozytosefähigkeit sowie die Bildung bakterizider Substanzen, v.a. ROS und NO, nach Stimulation<sup>11</sup>. Mittlerweile sind diese Unterscheidungskriterien schon wieder umstritten, da auch MΦ zu den Lymphknoten migrieren und naive T-Zellen stimulieren können<sup>207</sup> und einige DC-Subtypen, beispielsweise die TipDC, auch zytotoxische Funktion ausüben<sup>208</sup>. Im Tumor ist die funktionsbasierte Unterscheidung der DC und MΦ zusätzlich problematisch, weil ursprünglich charakteristische Funktionen durch das Tumormilieu verändert werden können. So ist beispielsweise beschrieben, dass Tumoren Oxysterole sezernieren, die durch Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors LXR-α die Expression von CCR7 und damit die Migration der DC in den Lymphknoten blockieren<sup>76</sup>. Über LXR-α wird auch die T-Zell-Stimulationsfähigkeit beeinträchtigt, indem proinflammatorische Zytokine (v.a. IL-12) und Fascin inhibiert werden<sup>149,209,210</sup>, ungeachtet der Expression von Kostimulations- und MHC-Molekülen.

Weil DC und MΦ stark durch das sie umgebende Mikromilieu beeinflusst werden, ist insbesondere in nicht-lymphatischen Geweben eine Klassifizierung basierend auf phänotypischen und funktionellen Charakteristika kaum möglich. Aktuell wird diskutiert, die

DC und MΦ nicht mehr als separate Zelltypen anzusehen, sondern sie an gegensätzlichen Polen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) zu positionieren<sup>6,12</sup>. Unter dem MPS würde man demnach ein Kontinuum verschiedener mononukleärer myeloischer Zelltypen verstehen, deren Positionierung innerhalb des Kontinuums durch eine Kombination aus Phänotyp, Funktion, Ontogenie und anatomischer Lokalisation erreicht wird.

### **8.1 Positionierung der ercDC aus dem RCC im Kontinuum des mononukleären Phagozytensystems**

Aufgrund der aktuellen Diskussion wurde die Einordnung der ercDC als „DC“ neu überdacht. In dieser Arbeit wurde mittels einer vergleichenden Genexpressionsanalyse die Position der aus dem RCC stammenden ercDC im MPS-Kontinuum definiert und ein charakteristisches Genexpressionsprofil erstellt. Als myeloische Vergleichszellen wurden MΦ aus dem RCC, CD1c<sup>+</sup> DC, slanDC und Monozyten aus dem Blut sowie externe Datensätze humaner myeloischer Zelltypen aus dem Blut (CD141<sup>+</sup> DC) und nicht-lymphatischen Geweben (Decidua, Darm, Lunge, Ascites von Ovarialkarzinompatienten) verwendet. Es wurden nur humane Datensätze analysiert, um die beim Vergleich mit murinen Daten auftretenden Probleme nicht-orthologer Gene zu vermeiden.

Die decidualen MΦ wurden gewählt, da sie wie ercDC CD209/DC-SIGN und CD14 koexprimieren<sup>133</sup>. Die Datensätze myeloischer Zellen aus dem Darm und der Lunge wurden verwendet, weil in diesen beiden Organen, wie bei der Niere, eine Balance zwischen Immunität und peripherer Toleranz aufrecht gehalten werden muss<sup>134,135</sup>. Auch MΦ aus einem soliden Tumor (Gastrointestinaler Stromatumor, GIST) sowie inflammatorische MΦ und DC aus dem Ascites von Ovarialkarzinompatienten wurden in die Analyse eingeschlossen. Um die Positionierung der ercDC zu erreichen, wurden verschiedene Analysemethoden durchgeführt. Zunächst wurde basierend auf den informativen Genen eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Mit Hilfe der „nearest shrunken centroids“ Methode wurde dann ein charakteristisches Markergenprofil der ercDC erstellt, anhand dessen die Ähnlichkeit der vergleichend analysierten myeloischen Zelltypen mit den ercDC bestimmt wurde. Ergänzend zum Markergenprofil wurden, mit Hilfe eines statistischen Verfahrens, die Signaturgene der ercDC ermittelt. Außerdem wurde die Expression aus der Literatur entnommener DC- und MΦ-Kerngene in ercDC geprüft, ebenso die Expression Zelltyp-spezifischer Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren, welche eine Positionierung nach Ontogenie erlauben.

Die hierarchische Clusteranalyse zeigte, dass die ercDC den MΦ aus dem RCC und den inflammatorischen DC und MΦ aus dem Ascites von Ovarialkarzinompatienten ähnlich waren. Die „nearest shrunken centroids“ Analyse sowie die ercDC\_RCC-Signaturgene, für deren Ermittlung die ercDC mit den inflammatorischen MΦ zusammengefasst werden



mussten, konkretisierten darüber hinaus, dass die inflammatorischen MΦ des Ascites den ercDC am nächsten standen. Die Parallelen in der Expression der Markergene zwischen ercDC und den inflammatorischen MΦ des Ascites waren sogar so groß, dass die inflammatorischen MΦ als ercDC klassifiziert wurden. Zu den Markergenen zählten u.a. *SEPP1* und *HMOX1*, die an der Stressantwort beteiligt sind, sowie einige Gene, die mit Angiogenese und Tumorinvasion assoziiert sind (*NRP1*, *GPNMB*, *CCL18*).

Bei der Gegenüberstellung der DC- und MΦ-Kerngenlisten, die von Wissenschaftlern des „Immunologischen Genomprojektes“ (ImmGen)<sup>175,176</sup> aufgestellt und von Xue et al.<sup>112</sup> überarbeitet und an das humane System angepasst wurden, zeigte sich, dass die ercDC die MΦ-Kerngene ähnlich stark exprimierten wie die zum Vergleich analysierten MΦ-Subtypen (Abbildung 7-25, Seite 103). Zu den MΦ-Kerngenen gehören u.a. *MERTK*, *CD14* und *SEPP1*. Die DC-Kerngene wurden dagegen im Vergleich zu den DC verhältnismäßig schwach exprimiert. Insgesamt ergab sich bei dieser Gegenüberstellung, dass sich die ercDC aus dem RCC im MPS-Kontinuum eher auf der Seite der MΦ positionieren. Auch die Analyse der Zelltyp-spezifischen Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren zeigte, dass die Transkriptlevel von MΦ-assoziierten Transkriptionsfaktoren, insbesondere *MAFB* und *CREG1*, in ercDC sehr hoch waren. Der für die Rekrutierung und Differenzierung von MΦ wichtige Wachstumsfaktorrezeptor *CSF1R*<sup>11,211</sup> wurde von ercDC ebenfalls ähnlich stark exprimiert wie von den MΦ-Kontrollen. Die DC-assoziierten Gene wurden dagegen nur schwach exprimiert.

Zusammenfassend ergab sich aus den Analysen der DC- und MΦ-Kerngene sowie der Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren, dass eine Positionierung der ercDC im MPS-Kontinuum eher auf der Seite der MΦ angebracht ist. Die hierarchische Clusteranalyse, die „nearest shrunken centroids“ Analyse und das ercDC\_RCC-Signaturgenprofil identifizierten die inflammatorischen MΦ aus dem Ascites von Ovarialkarzinompatienten als den am nächsten verwandten myeloischen Zelltyp der ercDC aus dem RCC.

## **8.2 ErcDC besitzen ein gemischtes Funktionsprofil, welches Eigenschaften verschiedener Makrophagensubtypen vereint**

Unter den Begriff „Makrophage“ sind wiederum verschiedene Subtypen zusammengefasst. Die gängige Einteilung anhand von Aktivierungsstimuli unterscheidet zwei Kategorien: i) klassisch aktivierte M1-MΦ, die durch IFN-γ und TLR-Liganden induziert werden; ii) alternativ aktivierte M2-MΦ, die in vier Subtypen unterteilt werden und u.a. durch IL-4 und IL-13 (M2a) induziert werden. Auch die tumorassoziierten Makrophagen (TAM, M2d) zählen hierzu. Das Transkriptom der M1-MΦ ist durch Gene mit proinflammatorischen (*IL12*, *IL6*, *IL15*, *CXCL10*) und bakteriziden (*NOS2*) Eigenschaften geprägt. Typisch für M2-MΦ sind

Membranrezeptoren, wie z.B. Mannose- und Scavenger-Rezeptoren, die durch die Gene *CD206/MRC1* und *CD204/MSR1* kodiert werden. Auch mit der extrazellulären Matrix assoziierte Gene, wie *FN1* und *MMP9*, sind charakteristisch für den M2-Phänotyp. Mosser et al.<sup>183</sup> schlagen neben der M1/M2-Klassifizierung, da sie der Heterogenität und Plastizität der Gewebemakrophagen nicht gerecht wird, eine Einteilung der MΦ in drei Subtypen entsprechend der homöostatischen Funktionen „Bakterizide Aktivität“, „Wundheilung“ und „Immunregulation“ vor.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen ergaben, dass die ercDC sowohl einige der von Martinez et al.<sup>103</sup>, Shaykhiev et al.<sup>137</sup> und Houser et al.<sup>133</sup> definierten M1-assoziierten Gene als auch M2-assoziierte Gene exprimierten. Tendenziell stimmten sie etwas mehr mit dem M2-Profil überein, was sich u.a. darin äußerte, dass unter den Markergenen und Signaturgenen der ercDC mehr M2-assoziierte als M1-assoziierte Gene vertreten waren. Weil jedoch auch viele M1-assoziierte Gene exprimiert wurden, können die ercDC weder den alternativ aktivierten M2-MΦ noch den klassisch aktivierten M1-MΦ zugeordnet werden. Charakteristische Gene wundheilungsassoziiierter, gewebeomodulierender und regulatorischer, immunsupprimierender MΦ wurden von den ercDC verhältnismäßig stark exprimiert. Sie exprimierten aber auch Gene, die für bakterizide MΦ typisch sind. Diese Assoziationen bestätigten sich auch in der GO-Term-Analyse, welche die Kategorien „Wundheilung“, „ECM-Modulierung“ und „bakterizider Aktivität“ als signifikant angereicht identifizierte. In diesen Eigenschaften ähnelten die ercDC aus dem RCC den von Houser et al.<sup>133</sup> beschriebenen CD11c<sup>LO</sup> MΦ aus der Decidua. Auch diese entsprechen laut Publikation weder dem M1-Phänotyp noch dem M2-Phänotyp. Für sie ist, wie bei den ercDC, die Expression gewebeomodulierender Gene beschrieben<sup>133</sup>. Funktionell wird für die CD11c<sup>LO</sup> MΦ postuliert, dass sie im tolerogenen Milieu der Decidua des Ersttrimesters an der Modulierung der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Auch für renale DC und MΦ ist beschrieben, dass sie unter homöostatischen Bedingungen gewebeomodulierende und regulatorische Funktionen ausüben, um die Gewebekomöostase und die periphere Toleranz aufrecht zu erhalten<sup>77,84</sup>. Für die ercDC im Kontext des RCC könnte der Besitz dieser Eigenschaften zur Folge haben, dass im Tumor ein tolerogenes Milieu geschaffen bzw. erhalten wird, welches die Immunzellen in einem inaktiven Zustand hält und gleichzeitig die Tumorerinvasion durch die Modulierung der ECM begünstigt. Das ausgeprägte invasive und proangiogene Genexpressionsprofil der ercDC (siehe Abbildung 7-32, Seite 118) lässt vermuten, dass ercDC protumoral sein könnten. Das entspricht auch der histopathologischen Beobachtung, dass ercDC besonders zahlreich in Tumoren des fortgeschrittenen Stadiums gefunden wurden (Figel, Brech et al.<sup>101</sup>). Dem invasiven und proangiogenen Profil gehörten beispielsweise *FOLR2*, *MMP2*, *MMP9*, *NRP1*, *CCL2* und *GNMB* an, die auch zu den ercDC\_RCC-Marker- und Signaturgenen zählten. Im Gegensatz zu den als antitumoral und proinflammatorisch beschriebenen TAM aus dem GIST exprimierten ercDC auch M2-

assoziierte TAM-Marker stark. Mit den TAM\_GIST stimmten die ercDC allerdings in der Expression der Gene *CD68*, *CD14* und *CD11B/ITGAM* überein, die allgemein zur Identifizierung humaner TAM verwendet werden.

Insgesamt zeigten die Analysen, dass die ercDC Eigenschaften verschiedener MΦ-Subtypen vereinen und weder anhand der M1/M2-Nomenklatur noch basierend auf homöostatischen Funktionen eindeutig zugeordnet werden können. Es ließen sich protumorale, gewebe modulierende und immunsuppressive Eigenschaften, aber auch bakterizide Funktionen ableiten. Die ercDC ähnelten den CD11c<sup>LO</sup> MΦ aus der Decidua, die ebenfalls weder M1-MΦ noch M2-MΦ zugeordnet werden konnten und sich, wie die ercDC\_RCC, durch die Expression gewebe modulierender Gene auszeichneten.

### 8.3 Das RCC-Milieu prägt das Transkriptom der ercDC

Mehrere Publikationen weisen darauf hin, dass die funktionelle Polarisierung der myeloischen Zellen entscheidend durch das gewebespezifische Mikromilieu und die darin enthaltenen löslichen Faktoren bestimmt wird<sup>12,212,213,214</sup>. Da die ercDC aus dem Gewebe des RCC isoliert wurden, stellte sich die Frage, ob sich Charakteristika dieser anatomischen Lokalisation im Transkriptom wiederfinden lassen. Bei der „nearest shrunken centroids“ Analyse und den daraus resultierenden Markergenen zeigte sich deutlich, dass die ercDC ein anderes Genexpressionsprofil besaßen als die meisten vergleichend analysierten myeloischen Zellen anderer nicht-lymphatischer Gewebe. Interessanterweise grenzten sie sich von den proinflammatorischen TAM aus dem GIST deutlich ab und stimmten mit den CD11c<sup>LO</sup> MΦ aus der Decidua und insbesondere mit den inflammatorischen MΦ aus dem Ascites von Ovarialkarzinompatienten stark überein.

Für das RCC ist ein reichhaltiges Zytokin- und Chemokinmilieu mit besonders starker Anreicherung von IL-6, VEGF, CXCL8/IL-8 und IL-15 beschrieben<sup>98,101,215,216</sup>. Auch PGE<sub>2</sub>, TNF-α und CCL5/RANTES sind bekannte Milieufaktoren<sup>99,100,217</sup>. Interessanterweise sind IL-6, CXCL8/IL-8 und VEGF auch im Ascites von Ovarialkarzinompatienten beschrieben<sup>218,219,220</sup>, so dass sich die Verwandtschaft zu den inflammatorischen MΦ aus dem Ascites auf den prägenden Einfluss eines ähnlichen Milieus zurückführen lässt. In Figel, Brech et al.<sup>101</sup> zeigten wir, dass drei Faktoren in Kombination, IL-6, CXCL8/IL-8 und VEGF, entscheidend an der Ausprägung des ercDC-Phänotyps beteiligt sind. Diese Faktoren fördern proangiogene Funktionen, u.a. über die Induktion von MMP-9<sup>221,222,223</sup>. Für IL-6 ist außerdem beschrieben, dass es eine M2-Polarisierung der MΦ induziert<sup>224</sup> und über die Hochregulierung von CSF1R die Differenzierung von Monozyten zu MΦ gegenüber DC begünstigt<sup>213</sup>.

Die Genexpressionsanalyse zeigte, dass ercDC *CSF1R* und einige mit der M2-Polarisierung assoziierten Gene (z.B. *FOLR2*, *CD206/MRC1*, *MERTK*, *MMP9*) stark exprimierten. Somit konnten also Eigenschaften eines durch IL-6 geprägten Transkriptoms gefunden werden. Heusinkveld et al.<sup>225</sup> beobachteten, dass IL-6- und PGE<sub>2</sub>-reiche Kulturüberstände von Zervikalkarzinomzellen tolerogene M2-MΦ induzieren, welche keine T-Zell-Proliferation bewirken und kein IL-12 sezernieren. Diese Eigenschaften wurden auch bei den in vitro generierten ercDC beobachtet. Allerdings war bei den mit Kulturüberständen von Zervikalkarzinomzellen generierten M2-MΦ, im Unterschied zu den in vitro generierten ercDC, die Expression der Kostimulationsmoleküle beeinträchtigt. Dieser Unterschied könnte auf das immunstimulatorische Uromodulin/Tamm-Horsfall-Protein (THP) zurückzuführen sein, welches bei Entzündungsvorgängen aus den renalen Tubuli in das Interstitium gelangen kann<sup>226,227</sup>. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Hans-Joachim Anders konnten wir zeigen, dass THP Kostimulationsmoleküle und HLA-DR auf Monozyten hochreguliert und die Sezernierung von IL-6, CXCL8/IL-8, TNF-α und CCL5/RANTES induziert<sup>226</sup>. Dies könnte der ansonsten bei tumorinfiltrierenden myeloischen Zellen häufig beobachteten Herabregulierung von CD80, CD86 und CD40<sup>66</sup> entgegenwirken und die starke Expression dieser Moleküle auf ercDC erklären.

Unter Zuhilfenahme der von Xue et al.<sup>112</sup> erarbeiteten Stimulus-spezifischen Gensets, sogenannten Modulen, wurde versucht, weitere Polarisierungssignale des RCC-Milieus zu identifizieren (Abbildung 7-33, Seite 122). Die ercDC aus dem RCC korrelierten stark positiv mit Modulen, die durch PGE<sub>2</sub>, Glucocorticoide (GC), Palmitinsäure (PA, engl.: palmitic acid) oder eine Kombination aus TNF, PGE<sub>2</sub> und Pam3CysSerLys4 (TPP) induziert werden. Die phänotypischen und funktionellen Charakteristika der ercDC lassen sich gut durch diese Stimuli erklären. So ist bekannt, dass PGE<sub>2</sub> und GC die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-12, supprimieren und die Polarisierung alternativ aktivierter MΦ und tolerogener DC fördern<sup>75,185,193,194</sup>. Für beide Stimuli ist auch beschrieben, dass sie die Expression von CD163, und für GC zusätzlich MerTK, induzieren, welche für die M2c- bzw. M2d-Polarisierung der MΦ charakteristisch sind<sup>178,196,197</sup>. Diese Gene wurden von ercDC exprimiert, was eine Prägung des ercDC-Transkriptoms durch PGE<sub>2</sub> und GC unterstützt. PA induziert die TNF-α-Sekretion von MΦ und ist mit chronischer Inflammation assoziiert<sup>192</sup>. Auch ist bekannt, dass TNF-α im RCC angereichert ist<sup>99</sup>. Im Gegensatz zu der positiven Korrelation mit Modulen, die durch PGE<sub>2</sub>, GC, PA und TPP geprägt sind, zeigte sich eine starke negative Korrelation mit IL-4-assoziierten Modulen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass IL-4 im RCC-Gewebe nicht angereichert ist (Hosse (Eckl), Dissertationsarbeit, 2009<sup>198</sup>) und auch damit, dass das RCC-26-konditionierte Medium, welches für die In-vitro-Generierung der ercDC verwendet wurde, keine messbaren Mengen an IL-4 enthielt<sup>101</sup>. Die ercDC aus dem RCC zeigten starke Parallelen im Korrelationsmuster mit den inflammatorischen MΦ aus dem Ascites, mit denen sie auch ein gemeinsames Cluster

bildeten. Dies lässt vermuten, dass die beiden Zelltypen einem ähnlichen Milieu ausgesetzt waren. Auch die inflammatorischen MΦ korrelierten stark positiv mit PGE<sub>2</sub>-, GC-, PA- und TPP-assoziierten Modulen und negativ mit IL-4-assoziierten Modulen. Für den Ascites des Ovarialkarzinoms ist in der Tat beschrieben, dass er u.a. reich an TNF-α und PGE<sub>2</sub> ist<sup>228,229</sup>. Auch die MΦ aus dem RCC waren den ercDC aus dem RCC sehr ähnlich, die Korrelationen waren jedoch insgesamt schwächer ausgeprägt. Ein interessanter Unterschied zeigte sich in der Korrelation mit dem Modul 8, welches mit dem M1-Stimulus IFN-γ assoziiert ist. Hier korrelierten die ercDC negativ und die MΦ positiv. Dies deutet darauf hin, dass sich die MΦ und die ercDC in verschiedenen Mikromilieus innerhalb des RCC-Tumors befanden und die MΦ dabei möglicherweise in Regionen vorkamen, in denen tumorreaktive T-Zellen IFN-γ sezernieren. Die Koexistenz mehrerer differentiell aktivierter MΦ innerhalb eines Tumors ist in Maustumoren beschrieben<sup>230,231</sup>.

Festzuhalten ist, dass sich die ercDC durch ein Transkriptom auszeichneten, welches mit den Eigenschaften des RCC-Milieus in Einklang steht. Dabei wurden nicht nur Einflüsse von IL-6, CXCL8/IL-8 und VEGF, sondern auch von PGE<sub>2</sub>, GC, PA und TPP nachgewiesen. Diese Faktoren könnten ursächlich für das proangiogene und invasive Genexpressionsprofil der ercDC sein und eine Polarisierung der myeloischen Zellen bewirken, die eine Immunevasion des Tumors begünstigt.

#### 8.4 ErcDC und Immunevasion

Während unserer anfänglichen Untersuchungen stellten wir eine positive Korrelation zwischen der Anzahl von ercDC im RCC-Gewebe und dem Tumorstadium fest, d.h., es wurden mehr ercDC in Tumoren fortgeschritteneren Stadiums gefunden, die eine schlechte Prognose besitzen<sup>101</sup>. Wir vermuteten, dass die ercDC zur Immunevasion beitragen könnten. Die funktionellen Untersuchungen mit den in vitro generierten ercDC zeigten, dass die ercDC eine deutliche Schwäche in der IL-12-Sekretion und in der Fähigkeit naive T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren besaßen. Es wurde nach möglichen Ursachen gesucht, mit dem Gedanken, therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren, die für die Repolarisierung der ercDC zu einem immunkompetenten Zelltyp geeignet sind. Die starke Oberflächenexpression der Kostimulations-, MHC- und Adhäsionsmoleküle ließ es unwahrscheinlich erscheinen, dass hierdurch die schwache T-Zell-Proliferation bedingt werden könnte. Auch das Fehlen von IL-12 konnte die festgestellte Schwäche in der Induktion der T-Zell-Proliferation nicht hinreichend erklären, denn bei exogener IL-12-Zugabe wurde die T-Zell-Proliferation zwar gesteigert, blieb aber weit hinter der mit cDC erreichten Proliferation zurück.

Mit Hilfe der Genexpressionsanalyse sollte ein tieferes Verständnis der immuntolerogenen bzw. immunsuppressiven Eigenschaften erreicht werden. Es bestand auch die Hoffnung,

dass eine Erklärung für die schwache Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation gefunden werden könnte, da über das Transkriptom ein viel breiteres Markerspektrum analysiert werden kann als das bei der durchflusszytometrischen Analyse und mit limitierter Zellzahl möglich ist. Außerdem bestand die Hoffnung, dass durch den Vergleich des Transkriptoms von in vitro generierten ercDC mit dem von ercDC aus dem RCC abgeschätzt werden könnte, ob funktionelle Eigenschaften der In-vitro-ercDC auch bei ercDC aus dem RCC zu erwarten sind. Beim detaillierten Betrachten von Markern, welche bei der Induktion der T-Zell-Proliferation eine Rolle spielen, wurde festgestellt, dass das Transkriptlevel von *FSCN1* (kodiert für Fascin), welches für die Stabilität der immunologischen Synapse nötig ist, sowohl bei den ercDC aus dem RCC als auch bei den in vitro generierten ercDC sehr niedrig war. Weiterhin wurden bei beiden ercDC-Typen hohe Transkriptlevel von *CD48* und *ILT4* gemessen, die für inhibitorische Oberflächenmoleküle kodieren. Diese Eigenschaften lassen vermuten, dass auch die ercDC aus dem RCC eine eher geringe T-Zell-aktivierende Kapazität haben dürften.

Darüber hinaus fiel ein hohes Transkriptlevel von *VSIG4* auf. Bei den durchgeführten Analysen wurde *VSIG4* als mit den ercDC\_RCC-Markergenen verwandtes Gen identifiziert. Weiterhin gehörte es auch zu den ercDC\_RCC-Signaturgenen und war Bestandteil des proangiogenen und invasiven Gensets. *VSIG4* ist ein koinhibitorischer Komplementrezeptor, der ausschließlich von bestimmten Subtypen gewebeständiger, naiver MΦ exprimiert wird<sup>166,232,233</sup>. Zur Funktion ist bisher noch wenig bekannt. Erste publizierte Daten lassen jedoch vermuten, dass es die T-Zell-Antwort inhibiert. *VSIG4* scheint die Proliferation naiver CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu supprimieren<sup>234</sup> und für die Aufrechterhaltung der oralen Toleranz essentiell zu sein<sup>166</sup>. Erst kürzlich wurden VSIG4<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> MΦ auch in soliden humanen Tumoren beschrieben<sup>235</sup>. In einem entsprechenden murinen Modellsystem des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms beobachteten Liao et al.<sup>235</sup>, dass *VSIG4* das Tumorwachstum fördert, vermutlich durch die Inhibition der Proliferation und Effektor-Zytokinsekretion von T-Zellen. Auch im RCC konnten wir zeigen, dass die infiltrierenden T-Zellen kein IFN-γ sezernieren<sup>236</sup>. Ob die T-Zell-Inhibition im RCC in Zusammenhang mit VSIG4<sup>+</sup> ercDC zu sehen ist, müssen zukünftige Untersuchungen klären. Die für *VSIG4* beschriebenen Mechanismen der T-Zell-Inhibition lassen dies möglich erscheinen. So ist beschrieben, dass *VSIG4* keine T-Zell-Apoptose auslöst<sup>166</sup>. Auch meine Daten zeigten, dass in Kokulturen von ercDC mit PBL keine erhöhte Apoptoseinduktion gegenüber cDC:PBL-Kokulturen vorlag. Vielmehr ist beschrieben, dass *VSIG4* über Zellzyklusarrest und Induktion des Zellzyklusinhibitors p27<sup>kip-1</sup> T-Zellen inhibiert<sup>166</sup>. Eine erhöhte Expression von p27<sup>kip-1</sup> und Zellzyklusarrest wird auch bei tumorinfiltrierenden T-Zellen und NK-Zellen des RCC in Zusammenhang mit funktioneller Inhibition diskutiert<sup>236,237</sup>.

Zusammenfassend ergaben sich verschiedene Hinweise, dass ercDC in vivo tolerogene und protumorale Eigenschaften haben dürften. Das über die Genexpressionsanalyse identifizierte

VSIG4 könnte bei der Ausprägung beider Eigenschaften eine Schlüsselrolle spielen. Als koinhibitorisches Molekül könnte es zur Inhibition der T-Zell-Aktivität beitragen und durch die Sekretion von CXCL8/IL-8 und MMP-9<sup>167</sup> die Progression des Tumors unterstützen.

## **8.5 Ausblick und therapeutische Ansatzpunkte für eine Repolarisierung der ercDC**

Mit Hilfe der Genexpressionsanalyse unter Einbeziehung verschiedener Aspekte, u.a. der Bestimmung eines Markergenprofils und funktionsrelevanter Gengruppen sowie Berücksichtigung der Ontogenie, konnte gezeigt werden, dass die ercDC aus dem RCC im MPS eher auf der Seite der MΦ anzusiedeln sind. Im Spektrum der MΦ ähnelten sie stark den inflammatorischen MΦ aus dem Ascites von Ovarialkarzinompatienten sowie den CD11c<sup>LO</sup> MΦ aus der Decidua. Die ursprüngliche Bezeichnung als „DC“ scheint nach diesen Untersuchungen nicht mehr passend. Auch andere zunächst als DC bezeichnete Zelltypen, beispielsweise die CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Zellen der Decidua, werden mittlerweile als MΦ bezeichnet<sup>133,204</sup>.

Die myeloischen Zellen der Niere sind eine heterogene Zellgruppe, die sowohl im murinen als auch im humanen System DC- und MΦ-Marker koexprimiert<sup>8,77</sup>. Mittlerweile sind im murinen System 5 verschiedene renale mononukleäre Phagozytenpopulationen beschrieben, die sich nicht nur in der Expression von Oberflächenmarkern unterscheiden, sondern auch unterschiedliche Funktionen ausüben<sup>77</sup>. In Mausmodellen konnte nachgewiesen werden, dass renale DC und MΦ sowohl protektive, antiinflammatorische als auch proinflammatorische, den Krankheitsverlauf verstärkende, Funktionen im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen der Niere ausüben<sup>82,83,84,85,234</sup>. Die DC und MΦ im humanen RCC scheinen eher immunsuppressive, tolerogene Funktionen auszuüben. Es ist beschrieben, dass aus dem RCC isolierte TAM die Expression von FOXP3 und CTLA4 in T-Zellen hochregulieren und große Mengen antiinflammatorisches IL-10 und PGE<sub>2</sub> sezernieren<sup>95</sup>. Neben den von uns beschriebenen ercDC wurde kürzlich von der Arbeitsgruppe um Marc Schmitz in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe ein weiterer myeloischer Zelltyp im RCC beschrieben, die sogenannten slanDC (Manuskript eingereicht). Die slanDC sind als DC-Subtyp im Blut sowie verschiedenen inflammatorischen Geweben, z.B. bei chronischen Erkrankungen der Haut (Psoriasis), beschrieben<sup>46,238</sup>. Sie besitzen proinflammatorische, T-Zell-stimulierende Eigenschaften und können anhand der 6-sulfo LacNAc (slan)-Modifizierung des Adhäsionsmoleküls PSGL-1 eindeutig von anderen myeloischen Zelltypen abgegrenzt werden. Anhand dieses Markers wurden sie auch im Gewebe des RCC entdeckt. Eine große Anzahl von slanDC im RCC-Gewebe zeigte sich als ungünstiger Prognosefaktor für das Patientenüberleben. Weitere Analysen ergaben, dass die slanDC im RCC, entgegen den proinflammatorischen Eigenschaften im Blut und in

inflammatorischen Geweben, einen tolerogenen Phänotyp (u.a. Expression von ILT3 und ILT4) besitzen. Wie die ercDC waren sie nach In-vitro-Kokultur mit RCC-Zellen nicht in der Lage, naive T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren. Die Inhibition der T-Zell-Stimulationsfähigkeit myeloischer Zellen scheint somit ein allgemeiner Suppressionsmechanismus des RCC zu sein. Die Sortierung der slanDC aus dem RCC und die Analyse des Transkriptoms ist eines der zukünftig geplanten Experimente.

Die Genexpressionsanalyse ließ weitere Rückschlüsse auf die funktionelle Polarisierung zu. So scheinen die ercDC ein myeloischer Mischtyp mit pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften zu sein, indem sie sowohl Parallelen mit M2-M $\Phi$  als auch mit M1-M $\Phi$  zeigten. Insgesamt besaßen sie ein durch proangiogene und invasive Gene geprägtes Transkriptom, so dass sie im Tumor wohl eher protumorale, M2-ähnliche Funktionen ausüben. Dies unterstützt unseren Befund, dass eine große Anzahl von ercDC im RCC mit einer schlechten Prognose assoziiert ist<sup>101</sup>. Auch hinsichtlich der Kommunikation mit den Zellen des adaptiven Immunsystems ergaben sich interessante Aspekte aus dem Genexpressionsprofil der ercDC. Die schwache Expression von *FSCN1*, einhergehend mit der starken Expression der mit T-Zell-Inhibition und Toleranz assoziierten Gene *CD48* und *ILT4* sowie *VSIG4* könnte das Ausbleiben einer produktiven Unterstützung der T-Zell-Funktion erklären und die Immunevasion des Tumors begünstigen. Wie in der Literatur mittlerweile häufig diskutiert<sup>239,240,241</sup>, könnte auch für die ercDC eine Repolarisierung zu einem immunkompetenten Zelltyp ein attraktiver therapeutischer Ansatzpunkt sein. Denn die ercDC besitzen neben den inhibierenden Eigenschaften auch Marker, die einen positiven Effekt auf die Kommunikation mit T-Zellen haben (z.B. CD80, CD86, CD40, HLA-DR). Es ist daher denkbar, dass die aktivierenden Eigenschaften zum Tragen kommen, wenn die Inhibierenden aufgehoben werden. Die ercDC sollten sich dann produktiv an einer antitumoralen Immunantwort beteiligen können.

In Abbildung 8-1 (Seite 135) sind einige therapeutische Zielstrukturen aufgeführt, die durch die Genexpressionsanalyse in den Fokus rückten. Besonders interessant dürfte VSIG4 sein, da es einen direkten Einfluss sowohl auf die Immunzellen als auch auf den Tumor hat. So dürfte die gezielte Blockade von VSIG4 der Tolerogenisierung der T-Zellen vorbeugen und durch die gleichzeitige Inhibition der proangiogenen Faktoren CXCL8/IL-8 und MMP-9 auch der Tumorprogression entgegen wirken (Abbildung 8-1, ①). In der Literatur finden sich Hinweise, dass dies so eintreten könnte. Liao et al.<sup>235</sup> wiesen die Expression von VSIG4 im Gewebe des humanen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms und in entsprechenden Mausmodellen nach. Sie schlagen die gezielte Blockade von VSIG4 als neue, effektive Strategie für die Behandlung dieses Tumors vor. Die antitumorale T-Zell-Antwort könnte weiterhin durch eine Antikörper-basierte Blockade der T-Zell-inhibierenden Oberflächenmoleküle CD48 und ILT4 unterstützt werden (Abbildung 8-1, ②). Vielversprechend erscheint außerdem eine Inhibition des durch Oxysterole induzierten LXR-



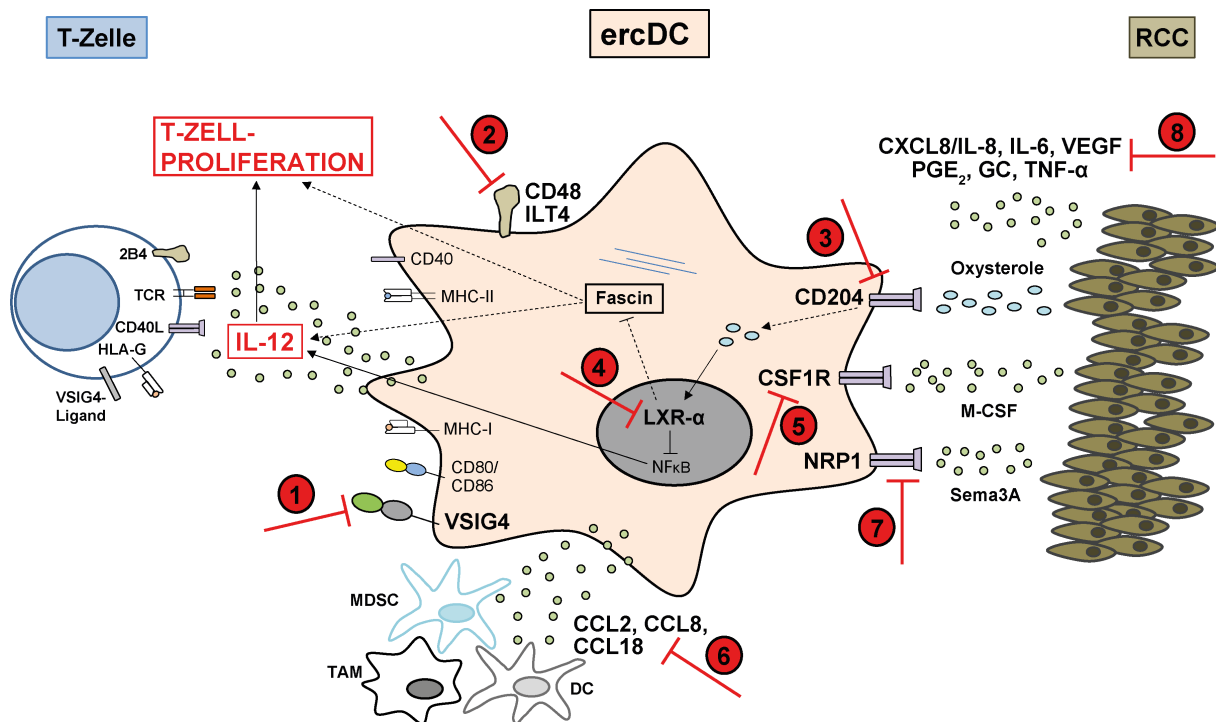
$\alpha$ -Signalwegs, der in den ercDC aus dem RCC hochreguliert war (siehe Funktionsgruppe 1 in Abbildung 7-16 (Seite 87)). Für LXR- $\alpha$  ist beschrieben, dass es bei Aktivierung durch Lipide (Oxysterole) in DC und M $\Phi$  die Transkription NF $\kappa$ B-induzierter proinflammatorischer Gene inhibiert und eine Herabregulierung des Aktin-bündelnden Proteins Fascin sowie des Chemokinrezeptors CCR7 bewirkt<sup>76,149,209</sup>. Als Folge davon wird die Migration in die tumordrainierenden Lymphknoten verhindert und die T-Zell-stimulatorischen Fähigkeiten abgeschwächt. Der LXR- $\alpha$ -Signalweg könnte durch gezielte Blockade des Lipidrezeptors CD204/MSR1 mittels spezifischer Antikörper (Abbildung 8-1, ③) sowie durch direkte Inhibition von LXR- $\alpha$  durch Antagonisten, wie GSK2033<sup>242</sup> und 22(S)-Hydroxycholesterol<sup>243</sup>, beeinflusst werden (Abbildung 8-1, ④). Es ist zu erwarten, dass dadurch die Expression von Fascin sowie die IL-12-Sekretion der ercDC gesteigert werden kann. Insbesondere über IL-12 ist ein positiver Effekt auf die Tumorkontrolle zu erwarten, da dies in verschiedenen Modellen gezeigt wurde<sup>244,245,246</sup>.

Weiterhin könnte therapeutisch auf die protumoralen Eigenschaften der ercDC Einfluss genommen werden. So ist denkbar, deren Rekrutierung und Akkumulation im Tumor zu verhindern. Ursächlich für die Rekrutierung und Akkumulation von protumoralen TAM sind u.a. der Wachstumsrezeptor CSF1R (bindet M-CSF)<sup>247</sup> und die Chemokine CCL2, CCL8 und CCL18<sup>156</sup> (Abbildung 8-1, ⑤ und ⑥). Die Marker werden von den ercDC stark exprimiert, so dass eine gezielte Blockade dieser Moleküle mit neutralisierenden Antikörpern oder „small-molecule“-Inhibitoren im Kontext des metastasierenden RCC relevant sein könnte. Erste Versuche laufen bereits in Mausmodellen und klinischen Studien. Dabei zeigte sich in einem murinen Glioblastom-Modell, dass die Inhibition von CSF1R nicht nur zu einer reduzierten Anzahl protumoraler TAM im Tumorgewebe führt, sondern auch deren Repolarisierung zu antitumoralen, M1-ähnlichen TAM bewirkt<sup>248</sup>.

Interessant ist auch der Rezeptor NRP1 (Neuropilin-1, Abbildung 8-1, ⑦), der zu den ercDC\_RCC-Marker- und Signaturgenen gehört. Casazza et al.<sup>157</sup> beobachteten, dass TAM durch die NRP1-vermittelte Bindung von tumorsezerniertem Semaphorin 3A (Sema3A) in hypoxische Bereiche gelockt werden. Dort wird die Differenzierung eines protumoralen Phänotyps begünstigt. Die gezielte Intervention dieses Signalwegs führte dazu, dass die TAM in normoxischen Bereichen verblieben und ihre tumorsuppressiven Fähigkeiten behielten<sup>157</sup>. Weitere Immuntherapieansätze könnten auf die Neutralisierung lokaler Tumormilieufaktoren, beispielsweise mit anti-IL-6, anti-CXCL8/IL-8 oder anti-VEGF-Antikörpern, abzielen (Abbildung 8-1, ⑧). Dies könnte verhindern, dass ercDC proangiogene Eigenschaften entwickeln und die Fähigkeit zur Stimulation tumorreaktiver T-Zellen verlieren.

Auch wenn es mit der Zulassung der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) mittlerweile eine Reihe von Möglichkeiten zur Behandlung des metastasierenden Nierenzellkarzinoms gibt, so ist

dennoch keine dieser Behandlungen kurativ. Oft kommt es aufgrund von Resistenzentwicklung zum Tumorprogress<sup>249</sup>. Die Immuntherapie mit hochdosiertem IL-2 war vor Einführung der TKI die einzige Therapieoption<sup>250,251</sup>. Auch wenn nur ein geringer Prozentsatz der Patienten anspricht, so zeichnet sich diese Therapie gegenüber den TKI dadurch aus, dass ein Teil der Patienten Langzeitsprechen zeigt und als geheilt gilt. Wegen der starken Nebenwirkungen ist die Hochdosis-IL-2-Therapie jedoch nicht für die breite Anwendung geeignet und wird derzeit im klinischen Alltag praktisch nicht mehr eingesetzt. Wegen des Potenzials der Immuntherapie Tumorlangzeitkontrolle zu erzielen, sind neuartige therapeutische Ansätze, die auf eine Stärkung der antitumoralen Immunantwort abzielen, besonders vielversprechend. Die gezielte Blockade der in dieser Arbeit durch die Genexpressionsanalyse in den Fokus gelangten potentiellen Zielstrukturen, z.B. VSIG4, CSF1R oder LXR- $\alpha$ , könnte die Repolarisierung der ercDC zu einem immunkompetenten Zelltyp bewirken und damit zur Bekämpfung des RCC beitragen.



**Abbildung 8-1: Potenzielle therapeutische Zielstrukturen für die Repolarisierung der ercDC zu immunkompetenten, antitumoralen Zellen.** 1) Blockade des koinhibitorischen Komplementrezeptors VSIG4 durch spezifische Antikörper könnte der Tolerogenisierung der T-Zellen und der Sekretion von proangiogenen Faktoren (MMP-9, CXCL8/IL-8) entgegenwirken. 2) Blockade der inhibitorischen Oberflächenmoleküle CD48 und ILT4, um die Bindung an 2B4 bzw. HLA-G auf T-Zellen und somit deren Suppression zu verhindern. 3) Inhibition des Lipidrezeptors CD204/MSR1, um der Akkumulation von Oxysterolen und damit der Aktivierung des antiinflammatorischen LXR- $\alpha$  vorzubeugen. 4) Applikation von LXR- $\alpha$ -Antagonisten, um die Suppression von IL-12 und Fascin zu verhindern. 5) Blockade des Rezeptors CSF1R zur Verhinderung der Rekrutierung und Akkumulation sowie der Induktion eines protumoralen Phänotyps der ercDC. 6) Blockade von CCL2, CCL8 und CCL18 um die Akkumulation von weiteren tolerogenen und protumoralen myeloischen Zellen zu verhindern. 7) Intervention des NRP1 (Neuropilin-1)-Signalwegs, um die Akkumulation der ercDC in hypoxischen Bereichen des Tumors zu verhindern und dadurch die antitumoralen Fähigkeiten zu erhalten. 8) Neutralisierung tumorsezernierter Faktoren mit blockierenden Antikörpern, um die Differenzierung proangiogener ercDC zu vermeiden. Pfeile: durchgezogen: direkte, gestrichelt: indirekte Verbindung

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>7-AAD</b>	7-Aminoactinomycin D
<b>ADCC</b>	engl.: antibody-dependent cellular cytotoxicity
<b>APAAP</b>	alkalische Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
<b>APC</b>	antigenpräsentierende Zelle
<b>ARG1</b>	Arginase-1
<b>BDCA</b>	engl.: blood dendritic cell antigen
<b>cDC</b>	engl.: classical dendritic cell
<b>CDP</b>	engl.: common DC progenitor
<b>CFDA-SE</b>	engl.: Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
<b>CFSE</b>	engl.: Carboxyfluorescein succinimidyl ester
<b>CMP</b>	engl.: common myeloid progenitor
<b>COPD</b>	engl.: chronic obstructive pulmonary disease
<b>CTL</b>	engl.: cytotoxic T lymphocyte
<b>DC-SIGN</b>	engl.: DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>ECM</b>	engl.: extracellular matrix
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ELISA</b>	engl.: enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ercDC</b>	engl.: enriched-in-renal-carcinoma DC
<b>ES</b>	engl.: enrichment score
<b>FACS</b>	engl.: fluorescence activated cell sorting
<b>FC</b>	engl.: fold change
<b>FcR</b>	Fc-Rezeptor
<b>FCS</b>	engl.: fetal calf serum
<b>FDR</b>	engl.: false discovery rate
<b>FLT3</b>	engl.: Fms-like tyrosine kinase 3
<b>FOXP3</b>	engl.: forkhead box P3
<b>FSC</b>	engl.: forward scatter
<b>GC</b>	Glucocorticoide
<b>GIST</b>	Gastrointestinaler Stromatumor
<b>GM-CSF</b>	engl.: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
<b>GO</b>	engl.: Gene Ontology
<b>GPR</b>	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
<b>GSEA</b>	engl.: Gene Set Enrichment Analysis
<b>GTP</b>	Guanosin-Triphosphat
<b>HLA</b>	humanes Leukozyten-Antigen
<b>HRP</b>	engl.: horseradish peroxidase
<b>HS</b>	Humanserum
<b>IC</b>	engl.: immune complexes
<b>ICAM-1</b>	engl.: intercellular adhesion molecule 1
<b>IDEC</b>	engl.: inflammatory dendritic epidermal cells
<b>IDO1</b>	Indolamin-2,3-Dioxygenase 1
<b>IL-1Ra</b>	IL-1-Rezeptor-Antagonist
<b>ImmGen</b>	engl.: Immunological Genome
<b>iNOS</b>	engl.: inducible nitric oxide synthase
<b>LXR</b>	Leber-X-Rezeptor
<b>MACS</b>	engl.: magnetic activated cell sorting
<b>MART</b>	engl.: melanoma antigen recognized by T cells
<b>MCF</b>	Makrophagen-chemotaktischer Faktor
<b>M-CFU</b>	engl.: myeloid colony-forming units
<b>MCP-1</b>	engl.: monocyte chemoattractant protein-1
<b>M-CSF</b>	engl.: macrophage colony-stimulating factor

<b>MDP</b>	engl.: macrophage-DC progenitor
<b>MDSC</b>	engl.: myeloid-derived suppressor cells
<b>ME</b>	Modul-Eigengen
<b>MFI</b>	mediane Fluoreszenzintensität
<b>MGF</b>	engl.: mast cell growth factor
<b>MHC</b>	engl.: major histocompatibility complex
<b>MMP</b>	Matrixmetalloproteinase
<b>MoDC</b>	engl.: monocyte-derived dendritic cell
<b>MPS</b>	mononukleäres Phagozytensystem
<b>MRC1</b>	Mannose-Rezeptor, C-Typ 1
<b>MSR1</b>	Makrophagen Scavenger-Rezeptor 1
<b>MΦ</b>	Makrophage
<b>NES</b>	engl.: normalized enrichment score
<b>NKC</b>	engl.: nontumor kidney cortices
<b>NK-Zelle</b>	natürliche Killerzelle
<b>NO</b>	engl.: nitric oxide
<b>NRP1</b>	Neuropilin-1
<b>OvCa</b>	engl.: ovarian cancer
<b>oxFS</b>	oxidierte Fettsäuren
<b>PAMP</b>	engl.: pathogen associated molecular pattern
<b>PBL</b>	engl.: peripheral blood lymphocytes
<b>PBMC</b>	engl.: peripheral blood mononuclear cells
<b>pDC</b>	plasmazytoide dendritische Zelle
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PI</b>	Propidiumjodid
<b>PMT</b>	engl.: photomultiplier tube
<b>PRR</b>	engl.: pattern recognition receptor
<b>PSGL-1</b>	engl.: P-selectin glycoprotein ligand-1
<b>RCC</b>	engl.: renal cell carcinoma
<b>RCC-26-CM</b>	engl.: renal cell carcinoma-26 conditioned medium
<b>Rhu</b>	rekombinant human
<b>RIN</b>	engl.: RNA integrity number
<b>RMA</b>	engl.: Robust Multi-array Average
<b>rMoPh</b>	renale mononukleäre Phagozyten
<b>ROS</b>	engl.: reactive oxygen species
<b>SD</b>	engl.: standard deviation
<b>SEM</b>	engl.: standard error of the mean
<b>Sema3A</b>	Semaphorin 3A
<b>slanDC</b>	engl.: 6-sulfo LacNAc dendritic cells
<b>SSC</b>	engl.: side scatter
<b>STAT</b>	engl.: signal transducer and activator of transcription
<b>TAM</b>	tumorassoziierte Makrophagen
<b>TCR</b>	engl.: T cell receptor
<b>TEM</b>	Tie2 exprimierender Makrophage
<b>T<sub>FH</sub></b>	follikuläre T-Helferzellen
<b>THP</b>	Tamm-Horsfall-Protein
<b>TipDC</b>	TNF/iNOS-produzierende DC
<b>TKI</b>	Tyrosinkinaseinhibitoren
<b>TLR</b>	engl.: Toll-like receptor
<b>TMB</b>	Tetramethylbenzidin
<b>Treg</b>	regulatorische T-Zelle
<b>U</b>	Unit
<b>VEGF</b>	engl.: vascular endothelial growth factor

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

1. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006, **124**(4): 783-801.
2. Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. *Journal of leukocyte biology* 2002, **72**(4): 621-627.
3. Chow A, Brown BD, Merad M. Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nature reviews immunology* 2011, **11**(11): 788-798.
4. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 1973, **137**(5): 1142-1162.
5. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, **392**(6673): 245-252.
6. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *Journal of immunology* 2008, **181**(9): 5829-5835.
7. Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *The Journal of experimental medicine* 1990, **171**(5): 1753-1771.
8. Segerer S, Heller F, Lindenmeyer MT, *et al.* Compartment specific expression of dendritic cell markers in human glomerulonephritis. *Kidney international* 2008, **74**(1): 37-46.
9. Woltman AM, de Fijter JW, Zuidwijk K, *et al.* Quantification of dendritic cell subsets in human renal tissue under normal and pathological conditions. *Kidney international* 2007, **71**(10): 1001-1008.
10. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews immunology* 2005, **5**(12): 953-964.
11. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013, **496**(7446): 445-455.
12. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature reviews immunology* 2010, **10**(6): 453-460.
13. Boltjes A, van Wijk F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Frontiers in immunology* 2014, **5**: 131.
14. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nature immunology* 2013, **14**(10): 986-995.

15. Moore AJ, Anderson MK. Dendritic cell development: a choose-your-own-adventure story. *Advances in hematology* 2013, **2013**: 949513.
16. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nature immunology* 2012, **13**(12): 1145-1154.
17. Cisse B, Caton ML, Lehner M, *et al.* Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 2008, **135**(1): 37-48.
18. Belz GT, Nutt SL. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nature reviews immunology* 2012, **12**(2): 101-113.
19. Tsunetsugu-Yokota Y, Muhsen M. Development of human dendritic cells and their role in HIV infection: antiviral immunity versus HIV transmission. *Frontiers in microbiology* 2013, **4**: 178.
20. Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T. Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in cellular neuroscience* 2013, **7**: 45.
21. Palucka AK, Banchereau J. Langerhans cells: daughters of monocytes. *Nature immunology* 2006, **7**(3): 223-224.
22. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, *et al.* Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011, **118**(5): e16-31.
23. Leon B, Martinez del Hoyo G, Parrillas V, *et al.* Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells. *Blood* 2004, **103**(7): 2668-2676.
24. Rivollier A, He J, Kole A, Valatas V, Kelsall BL. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *The Journal of experimental medicine* 2012, **209**(1): 139-155.
25. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports* 2014, **6**: 13.
26. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 2004, **25**(12): 677-686.
27. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature reviews immunology* 2011, **11**(11): 750-761.
28. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**(3): 787-795.

29. Duluc D, Delneste Y, Tan F, *et al.* Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 2007, **110**(13): 4319-4330.
30. Rovati B, Mariucci S, Manzoni M, Bencardino K, Danova M. Flow cytometric detection of circulating dendritic cells in healthy subjects. *European journal of histochemistry : EJH* 2008, **52**(1): 45-52.
31. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010, **116**(16): e74-80.
32. McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *Journal of virology* 2005, **79**(1): 17-27.
33. Schlitzer A, McGovern N, Teo P, *et al.* IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 2013, **38**(5): 970-983.
34. Bachem A, Guttler S, Hartung E, *et al.* Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(6): 1273-1281.
35. Nizzoli G, Krietsch J, Weick A, *et al.* Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood* 2013, **122**(6): 932-942.
36. Robbins SH, Walzer T, Dembele D, *et al.* Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome biology* 2008, **9**(1): R17.
37. Mittag D, Proietto AI, Loudovaris T, *et al.* Human dendritic cell subsets from spleen and blood are similar in phenotype and function but modified by donor health status. *Journal of immunology* 2011, **186**(11): 6207-6217.
38. Hashimoto D, Miller J, Merad M. Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* 2011, **35**(3): 323-335.
39. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology* 2013, **140**(1): 22-30.
40. Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, *et al.* Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(6): 1247-1260.
41. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, *et al.* Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 2009, **458**(7240): 899-903.
42. Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends in immunology* 2013, **34**(9): 440-445.

43. Segura E, Touzot M, Bohineust A, *et al.* Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 2013, **38**(2): 336-348.
44. Chu CC, Di Meglio P, Nestle FO. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Seminars in immunology* 2011, **23**(1): 28-41.
45. Wilsmann-Theis D, Koch S, Mindnich C, *et al.* Generation and functional analysis of human TNF-alpha/iNOS-producing dendritic cells (Tip-DC). *Allergy* 2013, **68**(7): 890-898.
46. Schakel K, von Kietzell M, Hansel A, *et al.* Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes. *Immunity* 2006, **24**(6): 767-777.
47. Wehner R, Lobel B, Bornhauser M, *et al.* Reciprocal activating interaction between 6-sulfo LacNAc+ dendritic cells and NK cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2009, **124**(2): 358-366.
48. de Baey A, Mende I, Riethmueller G, Baeuerle PA. Phenotype and function of human dendritic cells derived from M-DC8(+) monocytes. *European journal of immunology* 2001, **31**(6): 1646-1655.
49. Siedlar M, Frankenberger M, Ziegler-Heitbrock LH, Belge KU. The M-DC8-positive leukocytes are a subpopulation of the CD14+ CD16+ monocytes. *Immunobiology* 2000, **202**(1): 11-17.
50. Heufler C, Koch F, Stanzl U, *et al.* Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *European journal of immunology* 1996, **26**(3): 659-668.
51. Henry CJ, Ornelles DA, Mitchell LM, Brzoza-Lewis KL, Hiltbold EM. IL-12 produced by dendritic cells augments CD8+ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. *Journal of immunology* 2008, **181**(12): 8576-8584.
52. Makrigiannis AP, Musgrave BL, Haeryfar SM, Hoskin DW. Interleukin-12 can replace CD28-dependent T-cell costimulation during nonspecific cytotoxic T lymphocyte induction by anti-CD3 antibody. *Journal of leukocyte biology* 2001, **69**(1): 113-122.
53. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *Journal of immunology* 1998, **160**(12): 5936-5944.
54. Koch F, Stanzl U, Jennewein P, *et al.* High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *The Journal of experimental medicine* 1996, **184**(2): 741-746.
55. Schwartz RH. T cell anergy. *Annual review of immunology* 2003, **21**: 305-334.
56. Jin HT, Ahmed R, Okazaki T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Current topics in microbiology and immunology* 2011, **350**: 17-37.



57. Askenasy N, Yolcu ES, Yaniv I, Shirwan H. Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator. *Blood* 2005, **105**(4): 1396-1404.
58. Qian BZ, Li J, Zhang H, *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011, **475**(7355): 222-225.
59. Gottfried E, Kreutz M, Mackensen A. Tumor-induced modulation of dendritic cell function. *Cytokine & growth factor reviews* 2008, **19**(1): 65-77.
60. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends in immunology* 2012, **33**(3): 119-126.
61. Noy R, Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity* 2014, **41**(1): 49-61.
62. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *Journal of immunology* 2009, **182**(8): 4499-4506.
63. Zhang B, Wang Z, Wu L, *et al.* Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma. *PloS one* 2013, **8**(2): e57114.
64. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of immunology* 2008, **181**(8): 5791-5802.
65. Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, *et al.* Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer research* 2005, **65**(8): 3044-3048.
66. Harimoto H, Shimizu M, Nakagawa Y, *et al.* Inactivation of tumor-specific CD8(+) CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. *Immunology and cell biology* 2013, **91**(9): 545-555.
67. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010, **141**(1): 39-51.
68. Biswas SK, Gangi L, Paul S, *et al.* A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 2006, **107**(5): 2112-2122.
69. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Frontiers in physiology* 2014, **5**: 75.
70. Li H, Han Y, Guo Q, Zhang M, Cao X. Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *Journal of immunology* 2009, **182**(1): 240-249.
71. Apetoh L, Locher C, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. Harnessing dendritic cells in cancer. *Seminars in immunology* 2011, **23**(1): 42-49.

- 
72. Ma Y, Shurin GV, Peiyuan Z, Shurin MR. Dendritic cells in the cancer microenvironment. *Journal of Cancer* 2013, **4**(1): 36-44.
  73. Ahmadi M, Emery DC, Morgan DJ. Prevention of both direct and cross-priming of antitumor CD8<sup>+</sup> T-cell responses following overproduction of prostaglandin E2 by tumor cells in vivo. *Cancer research* 2008, **68**(18): 7520-7529.
  74. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *European journal of immunology* 1997, **27**(5): 1229-1235.
  75. Moser M, De Smedt T, Sornasse T, *et al.* Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *European journal of immunology* 1995, **25**(10): 2818-2824.
  76. Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, *et al.* Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nature medicine* 2010, **16**(1): 98-105.
  77. Nelson PJ, Rees AJ, Griffin MD, Hughes J, Kurts C, Duffield J. The renal mononuclear phagocytic system. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012, **23**(2): 194-203.
  78. Soos TJ, Sims TN, Barisoni L, *et al.* CX3CR1<sup>+</sup> interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney. *Kidney international* 2006, **70**(3): 591-596.
  79. Kawakami T, Lichtnekert J, Thompson LJ, *et al.* Resident renal mononuclear phagocytes comprise five discrete populations with distinct phenotypes and functions. *Journal of immunology* 2013, **191**(6): 3358-3372.
  80. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney international* 2007, **71**(7): 619-628.
  81. Kruger T, Benke D, Eitner F, *et al.* Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2004, **15**(3): 613-621.
  82. Hochheiser K, Tittel A, Kurts C. Kidney dendritic cells in acute and chronic renal disease. *International journal of experimental pathology* 2011, **92**(3): 193-201.
  83. Scholz J, Lukacs-Kornek V, Engel DR, *et al.* Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2008, **19**(3): 527-537.
  84. Teteris SA, Engel DR, Kurts C. Homeostatic and pathogenic role of renal dendritic cells. *Kidney international* 2011, **80**(2): 139-145.

85. Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC. The role of macrophages in glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2001, **16 Suppl 5**: 3-7.
86. Lee S, Huen S, Nishio H, *et al.* Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2011, **22**(2): 317-326.
87. De Riese W, Goldenberg K, Allhoff E, Jonas U. Spontaneous regression of metastatic renal carcinoma with long-term survival. *British journal of urology* 1991, **68**(1): 98-100.
88. Schendel DJ, Oberneder R, Falk CS, *et al.* Cellular and molecular analyses of major histocompatibility complex (MHC) restricted and non-MHC-restricted effector cells recognizing renal cell carcinomas: problems and perspectives for immunotherapy. *Journal of molecular medicine* 1997, **75**(6): 400-413.
89. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006, **313**(5795): 1960-1964.
90. Nakano O, Sato M, Naito Y, *et al.* Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer research* 2001, **61**(13): 5132-5136.
91. Hamada I, Kato M, Yamasaki T, *et al.* Clinical effects of tumor-associated macrophages and dendritic cells on renal cell carcinoma. *Anticancer research* 2002, **22**(6C): 4281-4284.
92. Schleyen JS, Baur N, Kammerer R, *et al.* Cytotoxic markers and frequency predict functional capacity of natural killer cells infiltrating renal cell carcinoma. *Clinical cancer research* 2006, **12**(3 Pt 1): 718-725.
93. Jantzer P, Schendel DJ. Human renal cell carcinoma antigen-specific CTLs: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo. *Cancer research* 1998, **58**(14): 3078-3086.
94. Leisegang M, Turqueti-Neves A, Engels B, *et al.* T-cell receptor gene-modified T cells with shared renal cell carcinoma specificity for adoptive T-cell therapy. *Clinical cancer research* 2010, **16**(8): 2333-2343.
95. Daurkin I, Eruslanov E, Stoffs T, *et al.* Tumor-associated macrophages mediate immunosuppression in the renal cancer microenvironment by activating the 15-lipoxygenase-2 pathway. *Cancer research* 2011, **71**(20): 6400-6409.
96. Troy AJ, Summers KL, Davidson PJ, Atkinson CH, Hart DN. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clinical cancer research* 1998, **4**(3): 585-593.
97. Ikemoto S, Yoshida N, Narita K, *et al.* Role of tumor-associated macrophages in renal cell carcinoma. *Oncology reports* 2003, **10**(6): 1843-1849.

98. Cabillic F, Bouet-Toussaint F, Toutirais O, *et al.* Interleukin-6 and vascular endothelial growth factor release by renal cell carcinoma cells impedes lymphocyte-dendritic cell cross-talk. *Clinical and experimental immunology* 2006, **146**(3): 518-523.
99. Gogusev J, Augusti M, Chretien Y, Droz D. Interleukin-6 and TNF alpha production in human renal cell carcinoma. *Kidney international* 1993, **44**(3): 585-592.
100. Wu J, Zhang Y, Frilot N, Kim JI, Kim WJ, Daaka Y. Prostaglandin E2 regulates renal cell carcinoma invasion through the EP4 receptor-Rap GTPase signal transduction pathway. *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(39): 33954-33962.
101. Figel AM, Brech D, Prinz PU, *et al.* Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T-cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations. *The American journal of pathology* 2011, **179**(1): 436-451.
102. Tomita Y. Early renal cell cancer. *International journal of clinical oncology* 2006, **11**(1): 22-27.
103. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *Journal of immunology* 2006, **177**(10): 7303-7311.
104. Zobywalski A, Javorovic M, Frankenberger B, *et al.* Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *Journal of translational medicine* 2007, **5**: 18.
105. Engeland M, van den Eijnde SM, Aken T, *et al.* Detection of apoptosis in ovarian cells in vitro and in vivo using the annexin v-affinity assay. *Methods in molecular medicine* 2001, **39**: 669-677.
106. Kimmig S. Thymus-naive und zentral-naive humane Th-Lymphozyten. Doctoral Thesis, Freie Universität Berlin, 2003.
107. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 2007, **8**(1): 118-127.
108. Breuer K, Foroushani AK, Laird MR, *et al.* InnateDB: systems biology of innate immunity and beyond--recent updates and continuing curation. *Nucleic acids research* 2013, **41**(Database issue): D1228-1233.
109. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(43): 15545-15550.
110. Mostafavi S, Ray D, Warde-Farley D, Grouios C, Morris Q. GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function. *Genome biology* 2008, **9 Suppl 1**: S4.

- 
111. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC bioinformatics* 2008, **9**: 559.
  112. Xue J, Schmidt SV, Sander J, *et al.* Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 2014, **40**(2): 274-288.
  113. Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, *et al.* The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *Journal of immunology* 2002, **168**(5): 2118-2126.
  114. van Kooyk Y, Unger WW, Fehres CM, Kalay H, Garcia-Vallejo JJ. Glycan-based DC-SIGN targeting vaccines to enhance antigen cross-presentation. *Molecular immunology* 2013, **55**(2): 143-145.
  115. Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *Journal of translational medicine* 2011, **9**: 216.
  116. Maniecki MB, Moller HJ, Moestrup SK, Moller BK. CD163 positive subsets of blood dendritic cells: the scavenging macrophage receptors CD163 and CD91 are coexpressed on human dendritic cells and monocytes. *Immunobiology* 2006, **211**(6-8): 407-417.
  117. Fabrick BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology* 2005, **210**(2-4): 153-160.
  118. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature reviews immunology* 2013, **13**(10): 738-753.
  119. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001, **106**(3): 255-258.
  120. Dustin ML. Membrane domains and the immunological synapse: keeping T cells resting and ready. *The Journal of clinical investigation* 2002, **109**(2): 155-160.
  121. Askew D, Harding CV. Antigen processing and CD24 expression determine antigen presentation by splenic CD4+ and CD8+ dendritic cells. *Immunology* 2008, **123**(3): 447-455.
  122. Al-Alwan MM, Rowden G, Lee TD, West KA. Fascin is involved in the antigen presentation activity of mature dendritic cells. *Journal of immunology* 2001, **166**(1): 338-345.
  123. Liechtenstein T, Dufait I, Bricogne C, *et al.* PD-L1/PD-1 Co-Stimulation, a Brake for T cell Activation and a T cell Differentiation Signal. *Journal of clinical & cellular immunology* 2012, **S12**.
  124. Morandi B, Costa R, Falco M, *et al.* Distinctive lack of CD48 expression in subsets of human dendritic cells tunes NK cell activation. *Journal of immunology* 2005, **175**(6): 3690-3697.

125. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews immunology* 2013, **13**(4): 227-242.
126. Manavalan JS, Rossi PC, Vlad G, *et al.* High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transplant immunology* 2003, **11**(3-4): 245-258.
127. Radich W. Gestörte T-Zellproliferationsinduktion von tumorkonditionierten dendritischen Zellen - Ursachen und Revertierungsstrategien. Master Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2012.
128. Nagaraj S, Gabrilovich DI. Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells. *Cancer research* 2008, **68**(8): 2561-2563.
129. Mak'Anyengo R. Tumour conditioned dendritic cells: Investigation of the mechanisms underlying the migration defect. Master Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, München, 2012.
130. Haniffa M, Shin A, Bigley V, *et al.* Human tissues contain CD141<sup>hi</sup> cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103<sup>+</sup> nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 2012, **37**(1): 60-73.
131. Lindstedt M, Lundberg K, Borrebaeck CA. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *Journal of immunology* 2005, **175**(8): 4839-4846.
132. Yu CI, Becker C, Wang Y, *et al.* Human CD1c<sup>+</sup> dendritic cells drive the differentiation of CD103<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> mucosal effector T cells via the cytokine TGF-beta. *Immunity* 2013, **38**(4): 818-830.
133. Houser BL, Tilburgs T, Hill J, Nicotra ML, Strominger JL. Two unique human decidual macrophage populations. *Journal of immunology* 2011, **186**(4): 2633-2642.
134. Cerovic V, Bain CC, Mowat AM, Milling SW. Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference? *Trends in immunology* 2014, **35**(6): 270-277.
135. Hussell T, Bell TJ. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature reviews immunology* 2014, **14**(2): 81-93.
136. Watchmaker PB, Lahl K, Lee M, *et al.* Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nature immunology* 2014, **15**(1): 98-108.
137. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, *et al.* Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of immunology* 2009, **183**(4): 2867-2883.
138. Woodruff PG, Koth LL, Yang YH, *et al.* A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005, **172**(11): 1383-1392.

139. Cavnar MJ, Zeng S, Kim TS, *et al.* KIT oncogene inhibition drives intratumoral macrophage M2 polarization. *The Journal of experimental medicine* 2013, **210**(13): 2873-2886.
140. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(10): 6567-6572.
141. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine* 1986, **315**(26): 1650-1659.
142. Fox P, Hudson M, Brown C, *et al.* Markers of systemic inflammation predict survival in patients with advanced renal cell cancer. *British journal of cancer* 2013, **109**(1): 147-153.
143. Drabkin HA, Gemmill RM. Obesity, cholesterol, and clear-cell renal cell carcinoma (RCC). *Advances in cancer research* 2010, **107**: 39-56.
144. Bagavant H, Fu SM. Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology* 2009, **21**(5): 489-494.
145. Otterbein LE, Choi AM. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2000, **279**(6): L1029-1037.
146. Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, *et al.* Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circulation research* 2004, **94**(1): 119-126.
147. Chauveau C, Remy S, Royer PJ, *et al.* Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* 2005, **106**(5): 1694-1702.
148. Cao S, Liu J, Song L, Ma X. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *Journal of immunology* 2005, **174**(6): 3484-3492.
149. Shibata N, Glass CK. Regulation of macrophage function in inflammation and atherosclerosis. *Journal of lipid research* 2009, **50 Suppl**: S277-281.
150. Foell D, Wittkowski H, Kessel C, *et al.* Proinflammatory S100A12 can activate human monocytes via Toll-like receptor 4. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013, **187**(12): 1324-1334.
151. Hulsmans M, Geeraert B, De Keyser D, *et al.* Interleukin-1 receptor-associated kinase-3 is a key inhibitor of inflammation in obesity and metabolic syndrome. *PLoS one* 2012, **7**(1): e30414.

152. Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, *et al.* Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature* 2007, **448**(7152): 474-479.
153. Ripoll VM, Irvine KM, Ravasi T, Sweet MJ, Hume DA. Gpmb is induced in macrophages by IFN-gamma and lipopolysaccharide and acts as a feedback regulator of proinflammatory responses. *Journal of immunology* 2007, **178**(10): 6557-6566.
154. Vuletic S, Dong W, Wolfbauer G, Tang C, Albers JJ. PLTP regulates STAT3 and NFkappaB in differentiated THP1 cells and human monocyte-derived macrophages. *Biochimica et biophysica acta* 2011, **1813**(10): 1917-1924.
155. Bethunaickan R, Berthier CC, Ramanujam M, *et al.* A unique hybrid renal mononuclear phagocyte activation phenotype in murine systemic lupus erythematosus nephritis. *Journal of immunology* 2011, **186**(8): 4994-5003.
156. Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof BA. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *Journal of leukocyte biology* 2006, **80**(4): 705-713.
157. Casazza A, Laoui D, Wenes M, *et al.* Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity. *Cancer cell* 2013, **24**(6): 695-709.
158. Curreli S, Arany Z, Gerardy-Schahn R, Mann D, Stamatou NM. Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(42): 30346-30356.
159. Walsh PT, Smith LM, O'Connor R. Insulin-like growth factor-1 activates Akt and Jun N-terminal kinases (JNKs) in promoting the survival of T lymphocytes. *Immunology* 2002, **107**(4): 461-471.
160. Johnson EW, Jones LA, Kozak RW. Expression and function of insulin-like growth factor receptors on anti-CD3-activated human T lymphocytes. *Journal of immunology* 1992, **148**(1): 63-71.
161. Haabeth OA, Lorvik KB, Hammarstrom C, *et al.* Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature communications* 2011, **2**: 240.
162. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Experimental cell research* 2011, **317**(5): 620-631.
163. Rosenblum JM, Shimoda N, Schenk AD, *et al.* CXC chemokine ligand (CXCL) 9 and CXCL10 are antagonistic costimulation molecules during the priming of alloreactive T cell effectors. *Journal of immunology* 2010, **184**(7): 3450-3460.
164. Oldham KA, Parsonage G, Bhatt RI, *et al.* T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: a role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6. *European urology* 2012, **61**(2): 385-394.



165. He JQ, Wiesmann C, van Lookeren Campagne M. A role of macrophage complement receptor CR1g in immune clearance and inflammation. *Molecular immunology* 2008, **45**(16): 4041-4047.
166. Jung K, Kang M, Park C, *et al.* Protective role of V-set and immunoglobulin domain-containing 4 expressed on kupffer cells during immune-mediated liver injury by inducing tolerance of liver T- and natural killer T-cells. *Hepatology* 2012, **56**(5): 1838-1848.
167. Lee MY, Kim WJ, Kang YJ, *et al.* Z39Ig is expressed on macrophages and may mediate inflammatory reactions in arthritis and atherosclerosis. *Journal of leukocyte biology* 2006, **80**(4): 922-928.
168. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 2014, **41**(1): 14-20.
169. Fleetwood AJ, Dinh H, Cook AD, Hertzog PJ, Hamilton JA. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *Journal of leukocyte biology* 2009, **86**(2): 411-421.
170. Lehtonen A, Ahlfors H, Veckman V, Miettinen M, Lahesmaa R, Julkunen I. Gene expression profiling during differentiation of human monocytes to macrophages or dendritic cells. *Journal of leukocyte biology* 2007, **82**(3): 710-720.
171. Hegde VL, Singh NP, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. CD44 mobilization in allogeneic dendritic cell-T cell immunological synapse plays a key role in T cell activation. *Journal of leukocyte biology* 2008, **84**(1): 134-142.
172. Termeer C, Averbeck M, Hara H, *et al.* Targeting dendritic cells with CD44 monoclonal antibodies selectively inhibits the proliferation of naive CD4+ T-helper cells by induction of FAS-independent T-cell apoptosis. *Immunology* 2003, **109**(1): 32-40.
173. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010, **327**(5966): 656-661.
174. Lichanska AM, Browne CM, Henkel GW, *et al.* Differentiation of the mononuclear phagocyte system during mouse embryogenesis: the role of transcription factor PU.1. *Blood* 1999, **94**(1): 127-138.
175. Gautier EL, Shay T, Miller J, *et al.* Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature immunology* 2012, **13**(11): 1118-1128.
176. Miller JC, Brown BD, Shay T, *et al.* Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nature immunology* 2012, **13**(9): 888-899.
177. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, *et al.* CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* 2011, **147**(4): 868-880.

178. Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, Cohen PL. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *Journal of immunology* 2012, **189**(7): 3508-3520.
179. Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, *et al.* Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *Journal of immunological methods* 2012, **375**(1-2): 196-206.
180. Ghosh M, McAuliffe B, Subramani J, Basu S, Shapiro LH. CD13 regulates dendritic cell cross-presentation and T cell responses by inhibiting receptor-mediated antigen uptake. *Journal of immunology* 2012, **188**(11): 5489-5499.
181. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of immunology* 2000, **164**(12): 6166-6173.
182. Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MP, Donners MM. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* 2014, **17**(1): 109-118.
183. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews immunology* 2008, **8**(12): 958-969.
184. Gustafsson C, Mjosberg J, Matussek A, *et al.* Gene expression profiling of human decidual macrophages: evidence for immunosuppressive phenotype. *PloS one* 2008, **3**(4): e2078.
185. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology* 2003, **73**(2): 209-212.
186. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews immunology* 2011, **11**(11): 723-737.
187. Coffelt SB, Chen YY, Muthana M, *et al.* Angiopoietin 2 stimulates TIE2-expressing monocytes to suppress T cell activation and to promote regulatory T cell expansion. *Journal of immunology* 2011, **186**(7): 4183-4190.
188. Venneri MA, De Palma M, Ponzoni M, *et al.* Identification of proangiogenic TIE2-expressing monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer. *Blood* 2007, **109**(12): 5276-5285.
189. Kayal S, Mathur S, Karak AK, *et al.* CD68 tumor-associated macrophage marker is not prognostic of clinical outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia & lymphoma* 2014, **55**(5): 1031-1037.
190. Puig-Kroger A, Sierra-Filardi E, Dominguez-Soto A, *et al.* Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer research* 2009, **69**(24): 9395-9403.
191. Wang T, Ge Y, Xiao M, *et al.* Melanoma-derived conditioned media efficiently induce the differentiation of monocytes to macrophages that display a highly invasive gene signature. *Pigment cell & melanoma research* 2012, **25**(4): 493-505.

192. Gao M, Ma Y, Liu D. Rutin suppresses palmitic acids-triggered inflammation in macrophages and blocks high fat diet-induced obesity and fatty liver in mice. *Pharmaceutical research* 2013, **30**(11): 2940-2950.
193. MacKenzie KF, Clark K, Naqvi S, *et al.* PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *Journal of immunology* 2013, **190**(2): 565-577.
194. Piemonti L, Monti P, Allavena P, *et al.* Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *Journal of immunology* 1999, **162**(11): 6473-6481.
195. Popov A, Abdullah Z, Wickenhauser C, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of clinical investigation* 2006, **116**(12): 3160-3170.
196. Schaer DJ, Boretti FS, Schoedon G, Schaffner A. Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. *British journal of haematology* 2002, **119**(1): 239-243.
197. Zhang M, Ye Y, Wang F, *et al.* Liver myofibroblasts up-regulate monocyte CD163 expression via PGE2 during hepatitis B induced liver failure. *Journal of translational medicine* 2014, **12**: 60.
198. Hosse J. Die molekulare Quantifizierung von NK-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom und die Bedeutung von CCL5 in NK-Zellen und für die Phagozytose. Doctoral Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2009.
199. Frankenberger B, Noessner E, Schendel DJ. Immune suppression in renal cell carcinoma. *Seminars in cancer biology* 2007, **17**(4): 330-343.
200. Geiger C, Nossner E, Frankenberger B, Falk CS, Pohla H, Schendel DJ. Harnessing innate and adaptive immunity for adoptive cell therapy of renal cell carcinoma. *Journal of molecular medicine* 2009, **87**(6): 595-612.
201. Noessner E, Brech D, Mendler AN, Masouris I, Schlenker R, Prinz PU. Intratumoral alterations of dendritic-cell differentiation and CD8(+) T-cell anergy are immune escape mechanisms of clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2012, **1**(8): 1451-1453.
202. Li L, Huang L, Ye H, *et al.* Dendritic cells tolerized with adenosine A(2)AR agonist attenuate acute kidney injury. *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**(11): 3931-3942.
203. Hochheiser K, Heuser C, Krause TA, *et al.* Exclusive CX3CR1 dependence of kidney DCs impacts glomerulonephritis progression. *The Journal of clinical investigation* 2013, **123**(10): 4242-4254.
204. Kammerer U, Eggert AO, Kapp M, *et al.* Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *The American journal of pathology* 2003, **162**(3): 887-896.

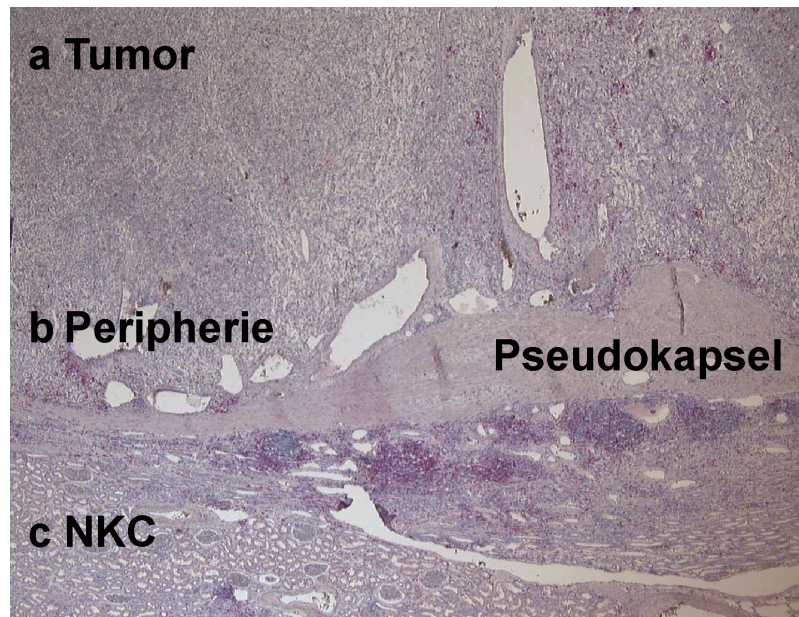
- 
205. Klechevsky E, Morita R, Liu M, *et al.* Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity* 2008, **29**(3): 497-510.
206. Hume DA. Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal immunology* 2008, **1**(6): 432-441.
207. Pozzi LA, Maciaszek JW, Rock KL. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *Journal of immunology* 2005, **175**(4): 2071-2081.
208. Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 2003, **19**(1): 59-70.
209. Geyeregger R, Zeyda M, Bauer W, *et al.* Liver X receptors regulate dendritic cell phenotype and function through blocked induction of the actin-bundling protein fascin. *Blood* 2007, **109**(10): 4288-4295.
210. Canavan M, McCarthy C, Larbi NB, *et al.* Activation of liver X receptor suppresses the production of the IL-12 family of cytokines by blocking nuclear translocation of NF-kappaBp50. *Innate immunity* 2014, **20**(7): 675-687.
211. Pixley FJ. Macrophage Migration and Its Regulation by CSF-1. *International journal of cell biology* 2012, **2012**: 501962.
212. Becker L, Liu NC, Averill MM, *et al.* Unique proteomic signatures distinguish macrophages and dendritic cells. *PloS one* 2012, **7**(3): e33297.
213. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature immunology* 2000, **1**(6): 510-514.
214. Chomarat P, Dantin C, Bennett L, Banchereau J, Palucka AK. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *Journal of immunology* 2003, **171**(5): 2262-2269.
215. Hosse J. Einfluss von Tumorzellmenge und Zytokinen auf den Zytotoxingehalt zytotoxischer T-Lymphozyten. Diploma Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 2005.
216. Mestas J, Burdick MD, Reckamp K, Pantuck A, Figlin RA, Strieter RM. The role of CXCR2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. *Journal of immunology* 2005, **175**(8): 5351-5357.
217. Kondo T, Ito F, Nakazawa H, Horita S, Osaka Y, Toma H. High expression of chemokine gene as a favorable prognostic factor in renal cell carcinoma. *The Journal of urology* 2004, **171**(6 Pt 1): 2171-2175.
218. Reinartz S, Schumann T, Finkernagel F, *et al.* Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: correlation of CD163

- expression, cytokine levels and early relapse. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2014, **134**(1): 32-42.
219. Lane D, Matte I, Rancourt C, Piche A. Prognostic significance of IL-6 and IL-8 ascites levels in ovarian cancer patients. *BMC cancer* 2011, **11**: 210.
220. Giuntoli RL, 2nd, Webb TJ, Zoso A, *et al.* Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Anticancer research* 2009, **29**(8): 2875-2884.
221. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, *et al.* MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. *Cancer cell* 2002, **2**(4): 289-300.
222. Steenport M, Khan KM, Du B, Barnhard SE, Dannenberg AJ, Falcone DJ. Matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 induce macrophage MMP-9: evidence for the role of TNF-alpha and cyclooxygenase-2. *Journal of immunology* 2009, **183**(12): 8119-8127.
223. Moreau M, Brocheriou I, Petit L, Ninio E, Chapman MJ, Rouis M. Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation* 1999, **99**(3): 420-426.
224. Fernando MR, Reyes JL, Iannuzzi J, Leung G, McKay DM. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PloS one* 2014, **9**(4): e94188.
225. Heusinkveld M, de Vos van Steenwijk PJ, Goedemans R, *et al.* M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *Journal of immunology* 2011, **187**(3): 1157-1165.
226. Darisipudi MN, Thomasova D, Mulay SR, *et al.* Uromodulin triggers IL-1beta-dependent innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012, **23**(11): 1783-1789.
227. Lhotta K. Uromodulin and chronic kidney disease. *Kidney & blood pressure research* 2010, **33**(5): 393-398.
228. Obermajer N, Muthuswamy R, Odunsi K, Edwards RP, Kalinski P. PGE(2)-induced CXCL12 production and CXCR4 expression controls the accumulation of human MDSCs in ovarian cancer environment. *Cancer research* 2011, **71**(24): 7463-7470.
229. Moradi MM, Carson LF, Weinberg B, Haney AF, Twiggs LB, Ramakrishnan S. Serum and ascitic fluid levels of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in patients with ovarian epithelial cancer. *Cancer* 1993, **72**(8): 2433-2440.
230. Laoui D, Van Overmeire E, Di Conza G, *et al.* Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population. *Cancer research* 2014, **74**(1): 24-30.

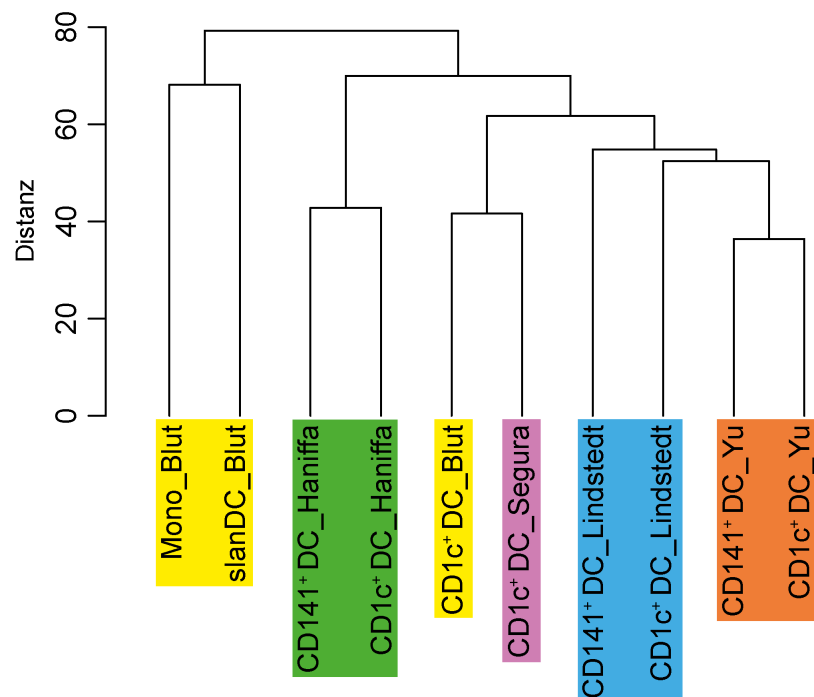
- 
231. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, *et al.* Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer research* 2010, **70**(14): 5728-5739.
232. Ikarashi M, Nakashima H, Kinoshita M, *et al.* Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. *Journal of leukocyte biology* 2013, **94**(6): 1325-1336.
233. Tanaka M, Nagai T, Usami M, Hasui K, Takao S, Matsuyama T. Phenotypic and functional profiles of CRIg (Z39Ig)-expressing macrophages in the large intestine. *Innate immunity* 2012, **18**(2): 258-267.
234. Vogt L, Schmitz N, Kurrer MO, *et al.* VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation. *The Journal of clinical investigation* 2006, **116**(10): 2817-2826.
235. Liao Y, Guo S, Chen Y, *et al.* VSIG4 expression on macrophages facilitates lung cancer development. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2014, **94**(7): 706-715.
236. Prinz PU, Mendler AN, Masouris I, Durner L, Oberneder R, Noessner E. High DGK-alpha and disabled MAPK pathways cause dysfunction of human tumor-infiltrating CD8+ T cells that is reversible by pharmacologic intervention. *Journal of immunology* 2012, **188**(12): 5990-6000.
237. Prinz PU, Mendler AN, Brech D, Masouris I, Oberneder R, Noessner E. NK-cell dysfunction in human renal carcinoma reveals diacylglycerol kinase as key regulator and target for therapeutic intervention. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2014, **135**(8): 1832-1841.
238. Hansel A, Gunther C, Ingwersen J, *et al.* Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011, **127**(3): 787-794 e781-789.
239. Santoni M, Massari F, Amantini C, *et al.* Emerging role of tumor-associated macrophages as therapeutic targets in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2013, **62**(12): 1757-1768.
240. Stout RD, Watkins SK, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *Journal of leukocyte biology* 2009, **86**(5): 1105-1109.
241. Yue ZQ, Liu YP, Ruan JS, Zhou L, Lu Y. Tumor-associated macrophages: a novel potential target for cancer treatment. *Chinese medical journal* 2012, **125**(18): 3305-3311.
242. Zuercher WJ, Buckholz RG, Campobasso N, *et al.* Discovery of tertiary sulfonamides as potent liver X receptor antagonists. *Journal of medicinal chemistry* 2010, **53**(8): 3412-3416.

- 
243. Hessvik NP, Bakke SS, Smith R, *et al.* The liver X receptor modulator 22(S)-hydroxycholesterol exerts cell-type specific effects on lipid and glucose metabolism. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2012, **128**(3-5): 154-164.
244. Wigginton JM, Komschlies KL, Back TC, Franco JL, Brunda MJ, Wilttrout RH. Administration of interleukin 12 with pulse interleukin 2 and the rapid and complete eradication of murine renal carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 1996, **88**(1): 38-43.
245. Zhang S, Zeng G, Wilkes DS, *et al.* Dendritic cells transfected with interleukin-12 and pulsed with tumor extract inhibit growth of murine prostatic carcinoma in vivo. *The Prostate* 2003, **55**(4): 292-298.
246. Zou JP, Yamamoto N, Fujii T, *et al.* Systemic administration of rIL-12 induces complete tumor regression and protective immunity: response is correlated with a striking reversal of suppressed IFN-gamma production by anti-tumor T cells. *International immunology* 1995, **7**(7): 1135-1145.
247. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, *et al.* Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer discovery* 2011, **1**(1): 54-67.
248. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, *et al.* CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nature medicine* 2013, **19**(10): 1264-1272.
249. Buczek M, Escudier B, Bartnik E, Szczylik C, Czarnecka A. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear cell renal cell carcinoma: from the patient's bed to molecular mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* 2014, **1845**(1): 31-41.
250. Escudier B. Emerging immunotherapies for renal cell carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2012, **23 Suppl 8**: viii35-40.
251. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, *et al.* A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *The New England journal of medicine* 1987, **316**(15): 889-897.

## 11 ANHANG

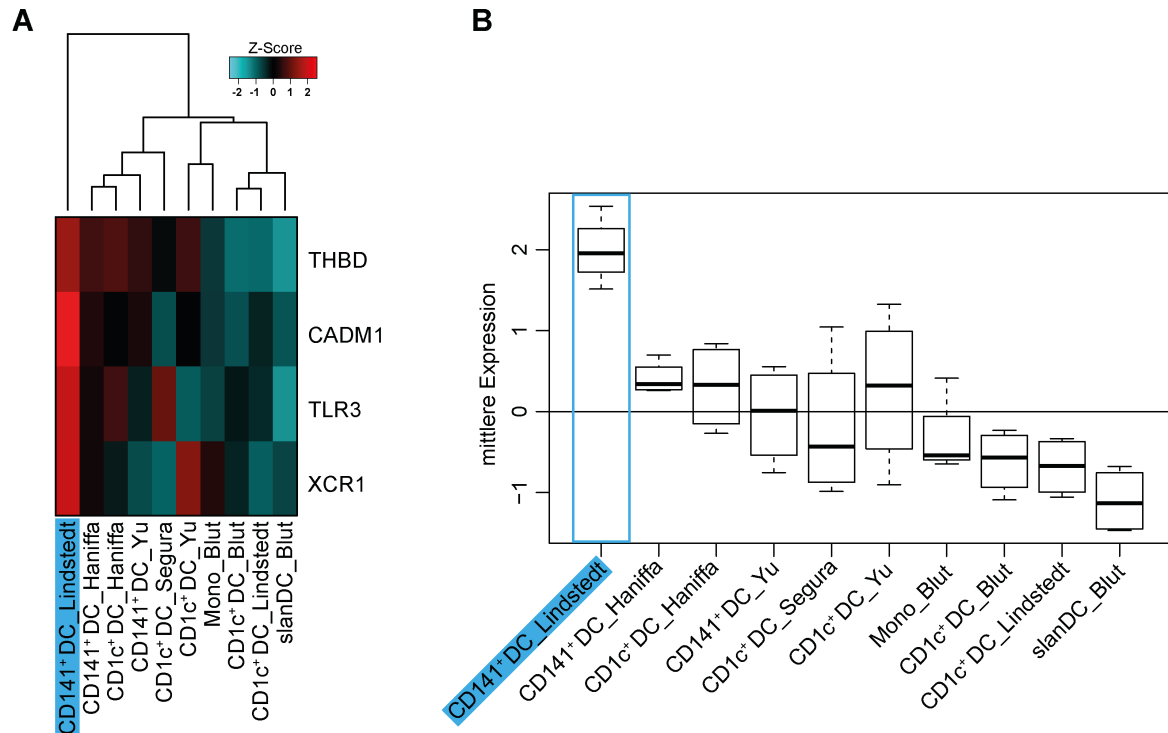


**Abbildung 11-1: Histomorphologische Übersicht des Übergangsbereiches zwischen RCC-Tumor und NKC.** Gezeigt ist in 100-facher Vergrößerung die faserige Pseudokapsel, die den RCC-Tumor (a) umschließt und diesen von dem tumorfreien Bereich der Niere (NKC, c) abgrenzt. Die Peripherie (b) stellt den Randbereich des Tumors an der Grenze zur Pseudokapsel dar. Der Gewebeschnitt wurde mit anti-CD8 Antikörper (rot, APAAP-Technik) gefärbt und mit Hämatoxylin (blau, Zellkerne) gegengefärbt. Weitere Informationen siehe Figel, Brech et al.<sup>101</sup>

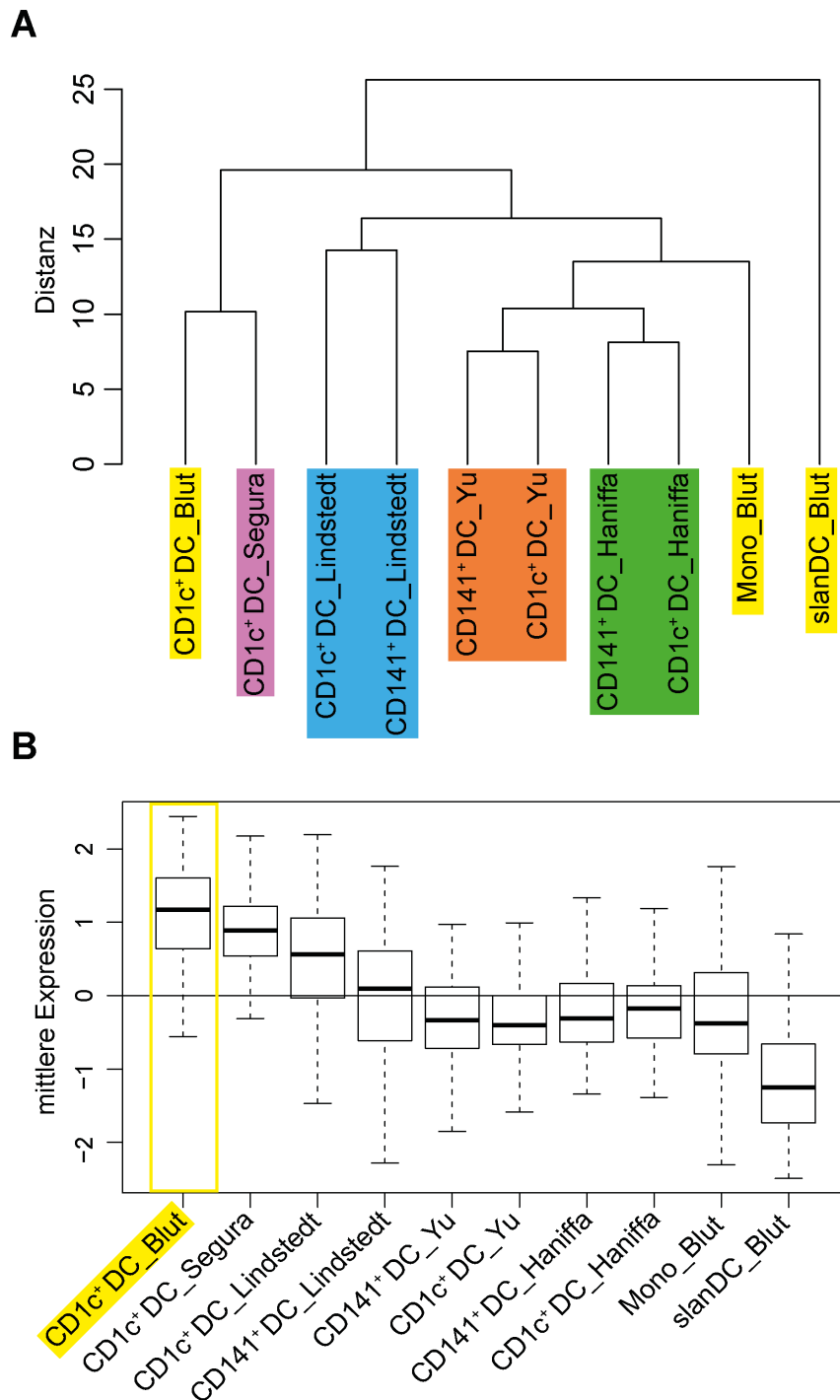


**Abbildung 11-2: Hierarchisches Clustering von CD1c<sup>+</sup> DC, CD141<sup>+</sup> DC, slanDC und Monozyten aus dem Blut.** Hinter der Bezeichnung des Zelltyps ist jeweils der Autor vermerkt, der diesen Datensatz veröffentlichte. Zusätzlich wurden die Datensätze eines Autors jeweils farblich markiert. Mono\_Blut, slanDC\_Blut und CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut stammen von unseren Analysen (gelb).





**Abbildung 11-3: Expression der CD141<sup>+</sup> DC-Kerngene in CD141<sup>+</sup> DC, CD1c<sup>+</sup> DC, slanDC und Monozyten aus dem Blut.** **A)** Die Heatmap zeigt die relative Expression (Z-Score) der durch Haniffa et al.<sup>130</sup> definierten CD141<sup>+</sup> DC-Kerngene in den verschiedenen Zelltypen. Die Zelltypen wurden entsprechend geclustert. CD141<sup>+</sup> DC\_Lindstedt ist markiert (blau), da hier die Gene am stärksten exprimiert wurden. **B)** Der Boxplot zeigt die normalisierten mittleren Expressionswerte der CD141<sup>+</sup> DC-Kerngene. Der Boxplot wurde nach Tukey erstellt, d.h. die Länge der „Whisker“ (obere und untere Antenne) ist auf maximal das 1,5-fache des Interquartilsabstands beschränkt. CD141<sup>+</sup> DC\_Lindstedt (blau) wurden für die Genexpressionsanalyse ausgewählt.



**Abbildung 11-4: Hierarchisches Clustering und Expression CD1c<sup>+</sup> DC-assoziierter Gene in CD1c<sup>+</sup> DC, CD141<sup>+</sup> DC, slanDC und Monozyten aus dem Blut. A)** Das Dendrogramm zeigt das Clustering der verschiedenen Zelltypen basierend auf den 140 von Haniffa et al.<sup>130</sup> und Segura et al.<sup>43</sup> definierten CD1c<sup>+</sup> DC-assozierten Genen. Hinter der Bezeichnung des Zelltyps ist jeweils der Autor vermerkt, der diesen Datensatz veröffentlichte. Zusätzlich wurden die Datensätze eines Autors jeweils farblich markiert. Mono\_Blut, slanDC\_Blut und CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut stammen von unseren Analysen (gelb). **B)** Der Boxplot zeigt die normalisierten mittleren Expressionswerte aller CD1c<sup>+</sup> DC-assozierten Gene an. Der Boxplot wurde nach Tukey erstellt, d.h. die Länge der „Whisker“ (obere und untere Antenne) ist auf maximal das 1,5-fache des Interquartilsabstands beschränkt. Unsere CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut exprimierten die Gene am stärksten und wurden für die Genexpressionsanalyse ausgewählt (gelb).

**Tabelle 11-1: Hochregulierte ercDC\_RCC-Signaturgene.** Gezeigt sind die von ercDC\_RCC & infMΦ\_ascOvCa gegenüber der Kontrollgruppe hochregulierten Gene (431 der 788 ercDC\_RCC-Signaturgene). Die Gene sind nach zunehmendem korrigierten p-Wert sortiert. Entrez ID: vom NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vergebene Nummer zur Identifizierung eines Gens; FC: engl.: fold change, x-facher Unterschied der Expression (log2) der Signaturgene zwischen den beiden Vergleichsgruppen. In grün markiert sind die ercDC\_RCC-Markergene (zusätzlich Fettdruck) und deren verwandte Gene sowie zusätzlich einige im Text erwähnte Gene.

Gensymbol	Entrez ID	norm. Expr.werte (log2) ercDC_RCC & infMΦ_ascOvCa	norm. Expr.werte (log2) Kontrollgruppe	logFC	Korrig. p-Wert
<b>APOC1</b>	341	11,82	10,04	1,78	0,00003
<b>FOLR2</b>	2350	8,70	7,31	1,39	0,00003
<b>GAL3ST4</b>	79690	8,01	6,59	1,42	0,00006
<b>SDC3</b>	9672	7,65	6,42	1,23	0,00006
<b>ME1</b>	4199	9,59	8,13	1,46	0,00008
<b>C2</b>	717	8,52	7,07	1,46	0,00008
<b>CCL8</b>	6355	8,53	6,57	1,96	0,00012
<b>CD209</b>	30835	8,44	7,05	1,39	0,00012
<b>PLTP</b>	5360	9,71	7,71	2,00	0,00019
SLC2A5	6518	6,85	5,53	1,32	0,00019
ITGA9	3680	6,19	5,28	0,90	0,00019
<b>SLCO2B1</b>	11309	9,65	7,79	1,86	0,00027
<b>GPNMB</b>	10457	11,22	9,09	2,13	0,00031
<b>ABCC5</b>	10057	7,94	7,10	0,84	0,00031
AP2A2	161	8,97	8,28	0,69	0,00031
TNS3	64759	9,41	8,79	0,63	0,00031
<b>SEPP1</b>	6414	9,11	6,69	2,42	0,00034
<b>NRP2</b>	8828	8,12	6,62	1,50	0,00034
CXCL12	6387	6,52	5,73	0,79	0,00034
LHFPL2	10184	10,97	9,58	1,38	0,00036
<b>SLC38A6</b>	145389	10,17	9,02	1,15	0,00036
CMKLR1	1240	8,61	7,16	1,46	0,00040
OLFML2B	25903	7,65	6,34	1,31	0,00040
<b>NRP1</b>	8829	9,98	8,25	1,73	0,00042
<b>SLC7A8</b>	23428	7,90	6,27	1,63	0,00042
SLC38A7	55238	7,49	6,79	0,70	0,00042
LILRB5	10990	6,87	5,90	0,97	0,00044
<b>NUPR1</b>	26471	9,85	8,51	1,34	0,00047
ACP2	53	9,95	9,05	0,91	0,00047
EPHB2	2048	6,71	5,80	0,91	0,00050
WBP5	51186	8,96	7,98	0,98	0,00051
CTSL	1514	12,28	10,97	1,30	0,00052
SLC36A1	206358	8,10	7,41	0,69	0,00057
<b>FABP3</b>	2170	8,40	6,86	1,54	0,00059
<b>DAB2</b>	1601	9,90	8,39	1,51	0,00059
MMP14	4323	8,05	6,92	1,14	0,00059
KAL1	3730	8,95	7,78	1,16	0,00065
<b>APOE</b>	348	11,05	9,23	1,82	0,00068
ABCA1	19	9,63	8,46	1,17	0,00068
FRMD4A	55691	7,92	6,81	1,11	0,00068
TEC	7006	6,45	5,96	0,49	0,00068
<b>SIGLEC1</b>	6614	9,68	8,23	1,45	0,00070
<b>CCL18</b>	6362	11,42	9,62	1,80	0,00076
<b>ADAMDEC1</b>	27299	9,06	7,33	1,73	0,00077
<b>C1QA</b>	712	11,83	10,41	1,42	0,00081
DOCK4	9732	9,29	8,04	1,25	0,00081
<b>CRYAB</b>	1410	6,75	5,68	1,08	0,00083
NR1H3	10062	9,01	7,95	1,06	0,00083
RAB3IL1	5866	7,30	6,76	0,54	0,00093

TREM2	54209	9,99	8,39	1,60	0,00099
PLOD2	5352	5,22	4,27	0,95	0,00099
SLC1A3	6507	8,06	6,67	1,39	0,00109
<b>RHOBTB3</b>	22836	7,21	6,07	1,14	0,00109
DRAM1	55332	10,26	9,37	0,89	0,00109
HS3ST1	9957	6,90	5,74	1,16	0,00109
<b>MAF</b>	4094	8,17	6,88	1,28	0,00111
<b>C1QB</b>	713	12,33	10,92	1,42	0,00112
CD64	2209	6,96	5,79	1,18	0,00112
<b>IL2RA</b>	3559	6,85	5,69	1,16	0,00112
<b>ARHGAP12</b>	94134	7,61	6,79	0,82	0,00112
PSD3	23362	7,92	6,81	1,11	0,00115
TNFRSF11A	8792	6,77	5,81	0,96	0,00119
CTSB	1508	12,23	11,32	0,91	0,00119
ADAP2	55803	9,85	9,02	0,83	0,00119
CFH	3075	5,72	5,09	0,63	0,00127
RNASE1	6035	10,53	8,67	1,86	0,00135
ITGAV	3685	10,50	9,47	1,03	0,00135
<b>SCAMP5</b>	192683	6,18	5,54	0,64	0,00149
TCN2	6948	8,26	7,45	0,81	0,00149
TDRKH	11022	6,33	5,65	0,68	0,00149
<b>SERPING1</b>	710	11,43	9,99	1,45	0,00150
IL10	3586	6,98	5,89	1,10	0,00165
MMP19	4327	9,50	8,23	1,27	0,00165
<b>MS4A4A</b>	51338	10,52	9,30	1,21	0,00193
TMEM51	55092	8,87	7,95	0,92	0,00193
MYO7A	4647	5,97	5,27	0,71	0,00193
ZFYVE26	23503	9,17	8,55	0,62	0,00193
ITSN1	6453	7,87	6,90	0,97	0,00199
SCARB2	950	9,58	8,67	0,91	0,00199
CFB	629	8,06	6,82	1,25	0,00206
EDNRB	1910	5,53	4,79	0,74	0,00207
<b>CD163</b>	9332	8,32	6,79	1,53	0,00207
PDCD1LG2	80380	7,64	6,48	1,16	0,00207
<b>STAB1</b>	23166	8,69	7,56	1,13	0,00207
ADAM9	8754	10,03	9,10	0,93	0,00207
SNX24	28966	7,07	6,31	0,76	0,00207
CD81	975	12,34	11,60	0,75	0,00207
CD28	940	4,91	4,28	0,63	0,00207
FLCN	201163	6,85	6,34	0,51	0,00207
C3	718	9,97	8,43	1,54	0,00223
MITF	4286	8,40	7,70	0,70	0,00228
CRYBB1	1414	6,20	5,70	0,50	0,00228
EPAS1	2034	9,11	7,93	1,18	0,00244
GLUL	2752	10,80	9,74	1,06	0,00246
<b>MERTK</b>	10461	7,93	6,50	1,43	0,00250
ADORA3	140	7,24	6,02	1,22	0,00250
TRPV4	59341	6,56	5,98	0,57	0,00257
PTPRM	5797	8,37	7,57	0,79	0,00260
BMP2K	55589	8,97	8,16	0,81	0,00262
APPL2	55198	7,39	6,79	0,60	0,00263
KIAA0226L	80183	8,69	7,60	1,09	0,00267
NPC1	4864	9,11	8,04	1,07	0,00267
LAIR1	3903	9,89	8,86	1,02	0,00267
VAT1	10493	10,31	9,55	0,76	0,00267
LGALS3BP	3959	10,19	9,19	1,00	0,00280
GNPDA1	10007	9,75	9,19	0,56	0,00285
IDH1	3417	10,69	9,84	0,85	0,00288
HNMT	3176	9,35	8,36	1,00	0,00288
<b>LGMN</b>	5641	11,67	10,11	1,56	0,00288

CD84	8832	9,11	7,84	1,27	0,00290
SGMS1	259230	8,66	7,91	0,75	0,00330
CTSD	1509	11,32	10,42	0,90	0,00346
BCL2L1	598	7,62	6,72	0,90	0,00348
STX4	6810	9,78	9,24	0,53	0,00355
SDS	10993	7,87	6,80	1,07	0,00369
BNIP3	664	8,06	7,01	1,05	0,00369
SPP1	6696	11,15	8,64	2,51	0,00375
MPP1	4354	10,58	9,99	0,59	0,00385
IL6	3569	7,68	6,29	1,39	0,00389
NPL	80896	9,00	7,94	1,06	0,00389
STARD13	90627	6,22	5,70	0,52	0,00395
FCGR1B	2210	11,09	9,80	1,29	0,00400
MARCKS	4082	10,25	8,94	1,31	0,00412
TCF12	6938	9,19	8,63	0,56	0,00412
PLA2G15	23659	8,76	8,07	0,68	0,00421
CCL4	6351	11,32	9,56	1,76	0,00432
VSIG4	11326	11,86	10,59	1,27	0,00433
CCL2	6347	10,46	8,71	1,76	0,00459
MGAT4A	11320	9,30	8,10	1,20	0,00459
RND3	390	8,82	7,69	1,13	0,00459
RGL1	23179	9,28	8,17	1,11	0,00459
LIPA	3988	12,69	12,00	0,69	0,00459
COLGALT1	79709	8,91	8,32	0,59	0,00459
CREG1	8804	12,04	11,50	0,53	0,00459
LRP1	4035	8,64	7,99	0,65	0,00463
CYFIP1	23191	11,25	10,73	0,52	0,00463
CPM	1368	9,70	8,68	1,02	0,00465
CALU	813	8,49	7,88	0,61	0,00475
MYO5A	4644	8,96	8,43	0,53	0,00490
IGF1	3479	7,08	5,85	1,23	0,00491
MAPK13	5603	8,20	7,49	0,72	0,00491
GALC	2581	9,19	8,47	0,72	0,00491
FZD5	7855	7,25	6,59	0,67	0,00504
SLC6A8	6535	6,72	6,19	0,53	0,00504
DYNLT3	6990	10,21	9,72	0,49	0,00540
PLIN2	123	10,84	9,93	0,92	0,00547
METTL1	4234	7,44	6,86	0,58	0,00561
EYA2	2139	5,29	4,87	0,42	0,00574
CXCL10	3627	10,24	8,15	2,08	0,00575
CXCL2	2920	10,79	9,38	1,41	0,00582
TFRC	7037	10,35	9,33	1,03	0,00582
PLXNA3	55558	6,46	5,86	0,60	0,00582
ATP13A2	23400	7,37	6,72	0,65	0,00605
LYVE1	10894	6,39	5,40	1,00	0,00660
OLR1	4973	11,00	9,40	1,60	0,00663
RBM47	54502	9,35	8,69	0,65	0,00668
FN1	2335	10,06	8,12	1,93	0,00675
MARCO	8685	10,44	9,42	1,03	0,00683
FAM13A	10144	8,11	7,33	0,78	0,00683
AP1B1	162	8,95	8,46	0,49	0,00683
CAMSAP2	23271	7,83	7,03	0,80	0,00687
IGFBP4	3487	7,04	6,45	0,59	0,00698
P4HA2	8974	7,50	6,97	0,53	0,00711
ATP6V1C1	528	8,56	7,86	0,70	0,00723
ENOSF1	55556	8,16	7,49	0,67	0,00754
GPR65	8477	10,49	9,78	0,71	0,00760
OLFML3	56944	6,10	5,50	0,60	0,00760
SLC11A2	4891	8,37	7,79	0,57	0,00760
PLAT	5327	5,30	4,77	0,52	0,00760

PLXND1	23129	9,37	8,85	0,52	0,00760
CTSZ	1522	11,03	10,49	0,54	0,00797
CXCL1	2919	8,55	7,33	1,22	0,00807
ETV5	2119	7,67	6,56	1,11	0,00812
DNASE2	1777	8,54	7,76	0,79	0,00812
CD204	4481	9,74	8,14	1,60	0,00817
IFI27	3429	9,65	8,19	1,47	0,00818
ASPH	444	8,16	7,41	0,75	0,00818
PLAU	5328	8,77	7,62	1,15	0,00827
HOMER3	9454	7,32	6,71	0,61	0,00856
ITPR2	3709	9,18	8,33	0,85	0,00876
FABP5	2171	11,79	10,75	1,03	0,00877
FNDC3B	64778	8,84	8,13	0,71	0,00969
GPR137B	7107	10,84	10,08	0,76	0,00992
ANGPTL4	51129	6,29	5,73	0,56	0,00992
TIMP2	7077	10,99	10,48	0,51	0,00992
GLA	2717	10,87	10,29	0,58	0,01010
PI4K2A	55361	8,75	8,17	0,58	0,01016
KCNMA1	3778	8,67	7,51	1,15	0,01024
ELL2	22936	8,79	7,84	0,96	0,01035
MMP2	4313	7,67	6,67	0,99	0,01036
DYRK4	8798	7,75	7,32	0,43	0,01036
CP	1356	5,03	4,20	0,83	0,01039
A2M	2	11,18	9,48	1,70	0,01040
FRMD4B	23150	8,60	7,67	0,93	0,01040
PLEKHO2	80301	9,95	9,46	0,49	0,01079
HAMP	57817	8,10	6,82	1,29	0,01099
ADAMTS2	9509	5,74	5,30	0,44	0,01115
SCIN	85477	5,25	4,52	0,73	0,01139
IQCG	84223	7,12	6,69	0,43	0,01139
LINC00597	81698	5,16	4,73	0,43	0,01139
LILRB4	11006	9,02	8,24	0,77	0,01143
PEAK1	79834	8,04	7,55	0,49	0,01180
SLC16A10	117247	7,59	6,48	1,11	0,01183
CTSA	5476	11,29	10,74	0,55	0,01183
ACE	1636	6,14	5,66	0,48	0,01183
ATG7	10533	7,31	6,79	0,52	0,01194
MKNK1	8569	9,51	8,86	0,65	0,01200
PLD3	23646	10,31	9,49	0,82	0,01204
CXCL11	6373	7,07	5,48	1,59	0,01226
SGPL1	8879	8,52	7,98	0,54	0,01230
FPR3	2359	10,57	9,15	1,42	0,01241
RCN3	57333	6,72	6,32	0,41	0,01252
PMP22	5376	10,30	9,20	1,10	0,01270
PROS1	5627	8,22	7,57	0,65	0,01279
RAB13	5872	10,31	9,57	0,74	0,01288
CDR1	1038	4,36	3,84	0,51	0,01288
ECM1	1893	7,47	6,77	0,71	0,01295
WASF1	8936	4,81	4,31	0,50	0,01313
ATP2A2	488	8,51	8,07	0,44	0,01316
CADM1	23705	7,64	6,36	1,28	0,01320
FARP1	10160	7,68	7,15	0,53	0,01320
WDFY3	23001	7,36	6,77	0,59	0,01333
SLC37A4	2542	7,25	6,86	0,38	0,01348
RNASE2	6036	7,92	6,95	0,97	0,01351
ALG9	79796	7,64	7,20	0,44	0,01352
HSPB1	3315	10,96	10,13	0,83	0,01353
HSP90B1	7184	9,34	8,67	0,67	0,01356
ABCG1	9619	8,03	7,24	0,79	0,01363
DENND2D	79961	9,00	8,54	0,46	0,01373

PDIA5	10954	7,16	6,67	0,49	0,01383
MMP9	4318	9,81	8,47	1,34	0,01402
SAMD4A	23034	7,76	7,11	0,65	0,01404
PPARG	5468	9,26	8,40	0,86	0,01425
TNS1	7145	8,89	7,65	1,23	0,01452
SCCPDH	51097	8,50	7,94	0,56	0,01541
CH25H	9023	7,89	6,63	1,26	0,01549
ADM	133	9,08	8,12	0,96	0,01552
ST8SIA4	7903	7,17	6,48	0,69	0,01595
SCD	6319	9,38	8,19	1,19	0,01618
ACP5	54	11,01	10,19	0,82	0,01647
PCOLCE2	26577	8,39	7,58	0,81	0,01656
SEPT8	23176	6,95	6,52	0,43	0,01656
PLEKHM2	23207	8,46	8,04	0,42	0,01656
CXCL9	4283	9,73	7,88	1,85	0,01704
IL15RA	3601	8,23	7,64	0,60	0,01704
APBB3	10307	7,35	6,91	0,45	0,01737
ZFP36L1	677	9,84	9,12	0,72	0,01763
AMPD3	272	8,78	8,03	0,74	0,01765
SLC4A7	9497	7,41	6,78	0,63	0,01765
TBC1D2	55357	8,50	7,89	0,60	0,01765
SLC2A8	29988	6,73	6,27	0,46	0,01765
EOGT	285203	7,95	7,36	0,59	0,01779
NFE2L1	4779	9,28	8,84	0,44	0,01779
LPAR6	10161	10,06	9,23	0,83	0,01790
RENBP	5973	7,58	7,07	0,51	0,01790
FUCA1	2517	11,39	10,57	0,82	0,01799
MAFB	9935	11,67	10,74	0,93	0,01852
ZDHHC14	79683	7,20	6,72	0,48	0,01852
BAMBI	25805	6,00	5,50	0,50	0,01859
ABCC3	8714	8,43	7,69	0,73	0,01883
TPX2	22974	6,15	5,56	0,59	0,01883
GBAP1	2630	8,10	7,74	0,37	0,01883
GNPTAB	79158	8,78	8,29	0,49	0,01894
CXCL3	2921	9,27	8,22	1,05	0,01896
CTSC	1075	10,90	10,12	0,78	0,01960
CD82	3732	8,49	7,84	0,65	0,01980
RACGAP1	29127	7,72	7,16	0,55	0,01998
P2RX4	5025	9,70	9,03	0,67	0,02036
TGFBI	7045	12,22	11,66	0,56	0,02045
LXN	56925	7,38	6,86	0,52	0,02045
PPAP2B	8613	9,00	8,00	1,00	0,02048
SPHK1	8877	7,41	6,77	0,65	0,02048
P4HB	5034	9,86	9,14	0,72	0,02081
IER3	8870	11,54	10,32	1,21	0,02128
PLOD1	5351	8,60	8,22	0,38	0,02128
ITGB5	3693	6,83	6,05	0,77	0,02155
TMEM140	55281	8,75	8,22	0,53	0,02162
ATP6V0A1	535	8,86	8,32	0,54	0,02167
BNC2	54796	5,75	5,25	0,49	0,02167
NENF	29937	8,57	8,18	0,39	0,02167
RRAGD	58528	9,86	9,27	0,60	0,02170
CD59	966	8,60	7,77	0,83	0,02187
ACVRL1	94	7,62	7,10	0,52	0,02206
GAA	2548	9,63	9,14	0,48	0,02257
CD80	941	8,19	7,10	1,09	0,02272
CTNS	1497	8,43	7,83	0,60	0,02272
SLC31A1	1317	9,10	8,56	0,54	0,02272
NABP1	64859	9,35	8,72	0,63	0,02296
PDIA4	9601	9,21	8,68	0,54	0,02296



HSPA5	3309	10,33	9,79	0,54	0,02311
COLEC12	81035	8,99	8,14	0,85	0,02311
MDFIC	29969	8,23	7,58	0,65	0,02311
BLNK	29760	9,14	8,10	1,04	0,02312
MMP7	4316	6,57	5,61	0,96	0,02329
AAK1	22848	8,95	8,53	0,42	0,02350
CCL7	6354	6,43	5,57	0,86	0,02353
ARHGAP6	395	7,24	6,78	0,46	0,02353
FCGRT	2217	10,71	10,24	0,48	0,02378
EPHX1	2052	8,02	7,43	0,58	0,02387
B2M	567	9,52	9,13	0,39	0,02387
TRIP6	7205	8,46	8,06	0,40	0,02393
CD14	929	11,49	10,52	0,97	0,02409
ATXN1	6310	8,59	7,92	0,67	0,02411
HTRA1	5654	7,60	6,95	0,65	0,02411
LAMP1	3916	9,72	8,81	0,91	0,02412
GGCX	2677	7,50	7,12	0,37	0,02418
GATM	2628	8,50	7,42	1,08	0,02487
PXDC1	221749	7,73	7,07	0,66	0,02520
SERPINE1	5054	7,06	6,24	0,83	0,02551
IKBKE	9641	7,31	6,93	0,38	0,02551
DGKH	160851	5,47	5,10	0,37	0,02551
PAX8	7849	6,53	5,95	0,58	0,02585
PRUNE2	158471	6,94	5,97	0,96	0,02606
ENG	2022	9,20	8,50	0,70	0,02606
C1R	715	6,65	6,08	0,57	0,02606
CD2AP	23607	7,79	7,24	0,56	0,02606
TUBG1	7283	8,36	7,89	0,48	0,02606
KIAA1279	26128	7,78	7,38	0,40	0,02606
ERI2	112479	7,34	6,93	0,42	0,02618
AHI1	54806	7,36	6,70	0,65	0,02626
MSRB2	22921	8,50	8,06	0,44	0,02650
DHRS3	9249	9,01	8,16	0,85	0,02654
SERPINH1	871	7,86	7,23	0,63	0,02736
MR1	3140	7,46	6,96	0,50	0,02736
ME2	4200	9,09	8,60	0,50	0,02736
DSC2	1824	8,48	7,60	0,88	0,02772
LAMP2	3920	9,89	9,34	0,55	0,02806
MORF4L2	9643	6,95	6,43	0,52	0,02842
CA12	771	6,19	5,47	0,72	0,02854
HSD17B14	51171	7,13	6,61	0,51	0,02854
QKI	9444	8,66	8,14	0,52	0,02854
RARRES1	5918	7,02	6,12	0,90	0,02866
CALR	811	10,03	9,35	0,69	0,02887
LUM	4060	4,74	4,20	0,54	0,02912
C10orf10	11067	5,87	5,43	0,45	0,02912
KIAA1199	57214	5,46	5,08	0,37	0,02912
COL1A1	1277	7,07	6,52	0,55	0,02928
PVRL2	5819	7,52	6,88	0,64	0,02929
SMURF2	64750	7,89	7,28	0,61	0,02943
CCL13	6357	7,34	6,43	0,91	0,02989
NTAN1	123803	9,16	8,68	0,49	0,02989
TFEC	22797	9,53	8,68	0,85	0,03004
GCNT1	2650	7,69	7,15	0,54	0,03059
PLD1	5337	6,63	5,95	0,67	0,03059
CD9	928	9,62	8,55	1,07	0,03123
EPB41L2	2037	9,04	8,38	0,66	0,03123
EIF4A3	9775	10,54	10,09	0,44	0,03123
CCRL2	9034	8,92	8,17	0,75	0,03178
ARHGAP10	79658	7,96	7,50	0,46	0,03203



PDGFRL	5157	4,99	4,59	0,40	0,03300
EPB41L3	23136	10,43	9,80	0,64	0,03305
CD24	100133941	6,34	5,38	0,96	0,03320
FAM168A	23201	7,61	7,21	0,40	0,03354
KLF6	1316	9,57	8,89	0,67	0,03429
DSE	29940	11,12	10,48	0,65	0,03434
MELK	9833	6,65	6,07	0,58	0,03434
CD68	968	10,56	10,16	0,40	0,03436
MDC1	9656	7,22	6,82	0,40	0,03443
CLN6	54982	7,98	7,48	0,50	0,03482
COL3A1	1281	5,74	5,32	0,42	0,03482
IBSP	3381	5,37	4,95	0,41	0,03482
RYR1	6261	7,13	6,53	0,60	0,03497
TRPM2	7226	6,98	6,55	0,43	0,03592
ASIP	434	5,23	4,84	0,39	0,03598
PDIA3	2923	10,24	9,89	0,35	0,03652
BHLHE41	79365	8,47	7,43	1,03	0,03661
CEP55	55165	6,05	5,34	0,72	0,03673
HIVEP3	59269	7,13	6,50	0,62	0,03716
PRDX4	10549	9,73	9,32	0,40	0,03728
STAT1	6772	10,14	9,50	0,64	0,03733
APOL1	8542	7,99	7,39	0,60	0,03738
ARHGEF11	9826	7,45	6,96	0,49	0,03756
TGM2	7052	9,77	8,90	0,87	0,03801
MT1E	4493	9,64	8,97	0,67	0,03801
ARMCX1	51309	8,18	7,69	0,49	0,03801
LAMC1	3915	6,79	6,16	0,63	0,03811
CYB5A	1528	9,61	9,19	0,42	0,03819
MGAT5	4249	9,45	9,06	0,39	0,03838
CDCP1	64866	8,31	7,59	0,72	0,03845
DENND4C	55667	9,34	8,86	0,48	0,03845
TSPAN4	7106	8,42	7,80	0,62	0,03850
TLR7	51284	9,49	8,38	1,11	0,03866
MGLL	11343	9,67	9,10	0,57	0,03893
GNG12	55970	6,91	6,35	0,56	0,03893
RPS27L	51065	8,05	7,53	0,52	0,03905
RASGRP3	25780	7,95	7,05	0,90	0,03919
TNFAIP3	7128	10,77	9,97	0,80	0,03919
RBP4	5950	7,85	7,27	0,58	0,03919
COL1A2	1278	6,13	5,70	0,43	0,03919
SASH1	23328	9,01	8,35	0,66	0,03928
THBS3	7059	6,09	5,78	0,31	0,03936
PLOD3	8985	9,36	9,03	0,33	0,03973
SGK1	6446	12,04	11,46	0,58	0,04045
SLC39A8	64116	8,06	7,01	1,05	0,04047
HMOX1	3162	11,21	10,54	0,68	0,04047
LIMK2	3985	7,40	6,87	0,53	0,04047
LY96	23643	10,77	10,36	0,40	0,04047
KIFC3	3801	6,08	5,71	0,36	0,04115
CD151	977	8,58	8,06	0,52	0,04142
RRBP1	6238	7,88	7,48	0,41	0,04143
MILR1	284021	8,30	7,76	0,54	0,04155
FER	2241	6,19	5,80	0,39	0,04155
C3AR1	719	11,49	10,56	0,93	0,04161
B3GALNT1	8706	6,44	5,77	0,67	0,04202
LAP3	51056	11,47	11,01	0,46	0,04242
SPATA7	55812	6,01	5,62	0,39	0,04244
FAM114A1	92689	6,73	6,28	0,46	0,04340
ATRN	8455	7,54	7,18	0,36	0,04370
CCL20	6364	9,16	7,78	1,38	0,04372

MT2A	4502	12,07	11,50	0,58	0,04399
MUC1	4582	6,51	6,10	0,41	0,04402
GIMAP6	474344	8,04	7,24	0,80	0,04425
CCND1	595	6,73	6,03	0,70	0,04425
UAP1L1	91373	6,93	6,55	0,38	0,04426
GADD45B	4616	9,53	8,87	0,66	0,04447
CBR1	873	8,19	7,83	0,36	0,04447
NUCB1	4924	8,87	8,33	0,55	0,04452
MT1G	4495	10,37	9,63	0,75	0,04487
NLK	51701	7,50	7,11	0,39	0,04579
IGFBP3	3486	6,52	5,93	0,59	0,04714
GADD45G	10912	6,77	6,27	0,50	0,04714
VCAM1	7412	6,21	5,50	0,71	0,04716
PRDM1	639	8,73	7,91	0,83	0,04729
KCNJ5	3762	6,19	5,77	0,42	0,04753
ABL2	27	7,44	6,84	0,61	0,04865
STEAP3	55240	7,25	6,77	0,48	0,04884
CDH6	1004	5,62	5,24	0,38	0,04884
SREBF1	6720	7,44	7,11	0,33	0,04892
APOL2	23780	7,40	7,04	0,36	0,04933
FGFR1	2260	6,54	6,12	0,43	0,04939
TMEM180	79847	7,48	7,12	0,35	0,04950

**Tabelle 11-2: Herabregulierte ercDC\_RCC-Signaturgene.** Gezeigt sind die von ercDC\_RCC & infMΦ\_ascOvCa gegenüber der Kontrollgruppe herabregulierten Gene (357 der 788 ercDC\_RCC-Signaturgene). Die Gene sind nach zunehmendem korrigierten p-Wert sortiert. Entrez ID: vom NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vergebene Nummer zur Identifizierung des Gens; FC: engl.: fold change, x-facher Unterschied der Expression (log2) der Signaturgene zwischen den beiden Vergleichsgruppen. In grün markiert sind die ercDC\_RCC-Markergene (zusätzlich Fettdruck) und verwandte Gene sowie zusätzlich einige im Text erwähnte Gene.

Gensymbol	Entrez ID	Norm. Expr.werte (log) ercDC_RCC & infMΦ_ascOvCa	Norm. Expr.werte (log) Kontrollgruppe	logFC	Korrig. p-Wert
<b>FAM65B</b>	9750	5,16	6,40	-1,23	0,00034
RPS9	6203	11,06	11,73	-0,67	0,00040
SLC25A6	293	10,86	11,57	-0,71	0,00043
<b>FGR</b>	2268	9,39	10,53	-1,13	0,00059
NUP210	23225	6,66	7,48	-0,81	0,00068
RHOF	54509	5,82	6,94	-1,12	0,00068
PBX2	5089	7,06	7,64	-0,58	0,00070
CCND3	896	8,81	9,53	-0,71	0,00070
<b>CFP</b>	5199	6,44	7,77	-1,34	0,00081
ICAM3	3385	6,56	7,76	-1,20	0,00093
EIF4EBP2	1979	7,83	8,42	-0,59	0,00104
<b>FYN</b>	2534	6,14	7,22	-1,07	0,00109
CD244	51744	5,14	6,09	-0,95	0,00112
RAB11FIP4	84440	5,73	6,37	-0,65	0,00119
SMAD3	4088	5,91	6,56	-0,65	0,00119
<b>CYTIP</b>	9595	9,11	9,94	-0,83	0,00126
EIF3E	3646	8,19	8,71	-0,51	0,00149
RPL15	6138	8,28	8,79	-0,50	0,00166
LIMD2	80774	5,99	6,50	-0,51	0,00166
ZBTB18	10472	6,57	7,21	-0,65	0,00170
<b>EMR3</b>	84658	5,51	6,98	-1,47	0,00170
CSNK1G2	1455	7,07	7,59	-0,52	0,00183
GSTP1	2950	9,74	10,30	-0,56	0,00196
<b>BCL11A</b>	53335	5,33	6,54	-1,21	0,00197
FCHO1	23149	6,10	6,62	-0,52	0,00199

ATP8A1	10396	5,96	6,76	-0,80	0,00199
RPL31	6160	8,00	8,68	-0,68	0,00207
UPK3A	7380	5,03	5,59	-0,56	0,00223
ITGA4	3676	5,84	6,78	-0,94	0,00223
GLTSCR2	29997	8,11	8,66	-0,55	0,00224
LSP1	4046	7,96	8,87	-0,91	0,00228
SEZ6L	23544	4,82	5,40	-0,58	0,00250
TSPAN32	10077	5,87	6,66	-0,78	0,00254
EIF3G	8666	9,65	10,18	-0,53	0,00267
KIAA0922	23240	7,48	8,29	-0,81	0,00288
JAK1	3716	8,75	9,34	-0,59	0,00289
<b>NEDD9</b>	4739	6,77	7,65	-0,88	0,00298
ACAA1	30	8,38	8,86	-0,48	0,00316
P2RY10	27334	4,45	5,22	-0,77	0,00319
SIGIRR	59307	6,23	6,73	-0,51	0,00327
<b>TES</b>	26136	8,00	8,75	-0,75	0,00330
RPS23	6228	7,21	7,77	-0,56	0,00366
RPS16	6217	9,18	9,64	-0,46	0,00375
MED28	80306	7,76	8,26	-0,49	0,00375
<b>CD48</b>	962	8,97	9,82	-0,85	0,00375
RAC2	5880	8,37	9,26	-0,88	0,00375
CD101	9398	6,47	7,63	-1,16	0,00375
SF3A1	10291	8,16	8,68	-0,53	0,00392
USP3	9960	9,49	10,02	-0,53	0,00421
SPN	6693	6,63	7,43	-0,81	0,00424
S1PR4	8698	6,86	7,41	-0,55	0,00434
<b>LYST</b>	1130	7,27	8,34	-1,07	0,00459
RAB11FIP1	80223	7,96	8,58	-0,62	0,00463
CNN2	1265	8,35	8,93	-0,58	0,00470
POLR1D	51082	9,04	9,51	-0,47	0,00475
C15orf39	56905	6,58	7,21	-0,63	0,00475
TRAF3IP3	80342	5,66	6,48	-0,83	0,00504
MST4	51765	6,54	7,31	-0,77	0,00545
RNF41	10193	6,25	6,73	-0,48	0,00547
FCER1A	2205	4,97	6,36	-1,39	0,00575
RNF24	11237	6,52	7,18	-0,66	0,00582
WAC	51322	8,02	8,49	-0,47	0,00590
BID	637	8,81	9,36	-0,56	0,00600
<b>FLT3</b>	2322	5,43	6,36	-0,93	0,00616
MTMR14	64419	7,39	7,85	-0,46	0,00625
PRKCE	5581	5,48	5,98	-0,49	0,00625
ZNF652	22834	5,99	6,85	-0,85	0,00625
CNOT8	9337	8,02	8,62	-0,60	0,00637
PTP4A2	8073	9,97	10,51	-0,54	0,00660
FLOT2	2319	7,64	8,29	-0,65	0,00663
CD11C	3687	9,01	9,90	-0,89	0,00663
NACA	4666	8,70	9,18	-0,48	0,00663
APOBR	55911	7,27	7,91	-0,63	0,00681
CA5B	11238	5,60	6,09	-0,49	0,00683
<b>CD52</b>	1043	10,72	11,48	-0,76	0,00683
KLF12	11278	5,48	6,26	-0,78	0,00683
FAM117A	81558	6,35	6,91	-0,56	0,00687
INSR	3643	6,55	7,20	-0,65	0,00687
NLRP1	22861	5,88	6,62	-0,74	0,00693
CS	1431	9,84	10,19	-0,35	0,00711
PELI2	57161	6,19	6,87	-0,68	0,00739
APAF1	317	7,06	7,65	-0,60	0,00741
MAP4K1	11184	6,29	7,04	-0,76	0,00741
GALNT3	2591	4,82	5,39	-0,57	0,00741
RASSF2	9770	7,71	8,46	-0,75	0,00760

EIF4B	1975	7,63	8,40	-0,77	0,00760
CPPED1	55313	7,23	8,05	-0,82	0,00760
<b>CCDC88C</b>	440193	4,64	5,48	-0,84	0,00760
CD1C	911	6,20	7,52	-1,31	0,00760
PLP2	5355	9,74	10,44	-0,70	0,00777
PPM1F	9647	7,17	7,63	-0,46	0,00781
VPS51	738	8,27	8,71	-0,44	0,00818
RBL2	5934	6,79	7,34	-0,55	0,00818
IL16	3603	6,91	7,34	-0,44	0,00912
EIF3M	10480	9,05	9,61	-0,56	0,00925
ITPK1	3705	8,55	8,98	-0,43	0,00926
EIF3H	8667	7,30	7,86	-0,55	0,00926
MEFV	4210	4,72	5,35	-0,63	0,00931
PRKCB	5579	6,61	7,54	-0,93	0,00949
ZBTB11	27107	7,77	8,24	-0,47	0,00966
UNC119	9094	7,54	7,98	-0,44	0,00975
PGLS	25796	8,03	8,59	-0,55	0,00975
STK17B	9262	7,68	8,45	-0,78	0,00975
ZDHHC18	84243	7,58	8,08	-0,50	0,00991
OXA1L	5018	9,68	10,07	-0,39	0,00992
GSE1	23199	7,04	7,61	-0,57	0,01000
DNAJC4	3338	6,99	7,51	-0,53	0,01007
TKT	7086	9,12	9,79	-0,67	0,01007
GMFG	9535	10,23	10,68	-0,46	0,01017
RPL36	25873	9,89	10,32	-0,43	0,01024
TOB1	10140	8,36	9,23	-0,87	0,01035
RPS27	6232	8,08	8,48	-0,41	0,01040
NIN	51199	7,34	7,81	-0,46	0,01040
IMPA2	3613	6,92	7,57	-0,64	0,01040
<b>CDC42EP3</b>	10602	7,41	8,31	-0,90	0,01040
CDKN1B	1027	9,32	9,83	-0,51	0,01092
CAT	847	8,61	9,31	-0,70	0,01099
ESYT1	23344	9,09	9,58	-0,48	0,01101
FDFT1	2222	8,65	9,20	-0,55	0,01123
DGKE	8526	4,68	5,18	-0,50	0,01138
FBL	2091	9,28	9,73	-0,45	0,01139
AGTPBP1	23287	7,80	8,33	-0,53	0,01162
ATP2A3	489	5,71	6,32	-0,61	0,01180
CORO1A	11151	8,09	8,87	-0,78	0,01185
SEPT9	10801	6,00	6,57	-0,57	0,01194
SIK3	23387	6,15	6,75	-0,59	0,01194
KAT6A	7994	6,87	7,28	-0,41	0,01196
RSL1D1	26156	7,61	8,09	-0,48	0,01200
C1RL	51279	6,47	7,17	-0,69	0,01200
GABBR1	2550	5,84	6,38	-0,54	0,01200
<b>CAPN2</b>	824	9,86	10,60	-0,74	0,01213
XYLT1	64131	6,58	7,39	-0,82	0,01219
NDUFA10	4705	8,51	8,94	-0,43	0,01226
MPHOSPH9	10198	6,25	6,74	-0,50	0,01241
NDST1	3340	6,13	6,60	-0,47	0,01260
C20orf27	54976	6,14	6,75	-0,61	0,01320
PTPN6	5777	9,75	10,27	-0,52	0,01332
NAP1L1	4673	9,09	9,66	-0,57	0,01333
PSIP1	11168	6,76	7,39	-0,63	0,01348
MAN2A2	4122	6,98	7,41	-0,43	0,01348
ACAP1	9744	5,72	6,32	-0,60	0,01348
ZNF467	168544	5,78	6,22	-0,43	0,01351
SLC9A3R1	9368	7,68	8,15	-0,46	0,01354
CERK	64781	7,72	8,18	-0,46	0,01361
PDE4A	5141	6,02	6,65	-0,63	0,01363

RBM3	5935	6,88	7,39	-0,51	0,01376
RFX7	64864	7,23	7,67	-0,44	0,01383
ELF4	2000	8,01	8,46	-0,45	0,01404
CDKN2D	1032	5,96	6,42	-0,46	0,01414
ROGDI	79641	7,00	7,55	-0,55	0,01425
<b>FLNA</b>	2316	8,08	8,82	-0,74	0,01475
WDR48	57599	7,30	7,76	-0,47	0,01514
FAM60A	58516	6,69	7,26	-0,56	0,01514
CASP1	834	8,60	9,42	-0,83	0,01539
AIP	9049	7,26	7,69	-0,43	0,01541
TESC	54997	5,29	6,02	-0,73	0,01545
LCP1	3936	11,40	11,85	-0,45	0,01549
CYLD	1540	8,07	8,54	-0,47	0,01549
RARA	5914	6,19	6,90	-0,71	0,01549
NEK9	91754	7,55	7,92	-0,38	0,01551
VCL	7414	8,14	8,85	-0,71	0,01552
ABCA7	10347	6,27	6,69	-0,42	0,01580
IL18R1	8809	4,28	4,92	-0,64	0,01618
ADRBK2	157	8,19	8,64	-0,46	0,01621
RUNX3	864	7,46	8,11	-0,65	0,01656
CCNG1	900	9,00	9,48	-0,47	0,01661
SCRN1	9805	7,57	8,20	-0,62	0,01661
AHCYL2	23382	6,29	6,70	-0,41	0,01670
PHF17	79960	5,83	6,32	-0,48	0,01672
SETD2	29072	6,14	6,55	-0,41	0,01732
PCYOX1L	78991	7,21	7,70	-0,48	0,01765
AES	166	7,76	8,22	-0,46	0,01788
<b>PLAC8</b>	51316	7,56	8,84	-1,28	0,01792
SULT1B1	27284	5,20	5,70	-0,50	0,01799
RIN3	79890	7,10	7,80	-0,70	0,01799
RPS21	6227	8,66	9,04	-0,37	0,01818
RAP1GAP2	23108	6,44	7,05	-0,61	0,01826
DHPS	1725	7,38	7,80	-0,42	0,01832
PITPNM1	9600	6,47	6,91	-0,44	0,01837
VRK1	7443	7,18	7,63	-0,45	0,01860
ADAP1	11033	7,48	7,96	-0,48	0,01870
ATP11B	23200	6,42	6,91	-0,49	0,01883
TUBA4A	7277	7,17	7,76	-0,58	0,01891
WDR82	80335	9,50	9,87	-0,37	0,01893
FRAT2	23401	7,63	8,08	-0,45	0,01898
ZFAND1	79752	7,27	7,75	-0,48	0,01902
LRMP	4033	7,08	7,76	-0,68	0,01971
CPSF6	11052	6,52	6,97	-0,45	0,01987
CD207	50489	4,71	5,56	-0,85	0,01987
C11orf21	29125	5,58	6,40	-0,82	0,01998
SRRM1	10250	8,61	8,93	-0,32	0,02036
BRD3	8019	7,75	8,11	-0,36	0,02036
SERTAD2	9792	9,21	9,60	-0,38	0,02036
STAG3L4	64940	6,24	6,69	-0,44	0,02036
DHTKD1	55526	6,23	6,70	-0,47	0,02036
NONO	4841	8,29	8,69	-0,40	0,02066
TBL1X	6907	6,31	7,09	-0,78	0,02072
EIF2S3	1968	7,60	8,33	-0,72	0,02081
LRBA	987	6,61	7,11	-0,50	0,02107
VAMP2	6844	6,94	7,38	-0,43	0,02115
MKNK2	2872	8,60	9,08	-0,48	0,02128
STAG2	10735	7,95	8,44	-0,48	0,02140
FMNL1	752	7,50	8,02	-0,53	0,02140
ELF2	1998	6,53	6,98	-0,44	0,02167
SETBP1	26040	5,30	5,74	-0,45	0,02167

MYO1F	4542	9,27	9,75	-0,48	0,02167
SPATA6	54558	5,31	5,84	-0,54	0,02225
DAPP1	27071	7,76	8,38	-0,63	0,02236
IDH3A	3419	8,05	8,51	-0,46	0,02244
TMEM104	54868	6,98	7,35	-0,37	0,02255
MBNL3	55796	7,27	7,75	-0,48	0,02255
CCNI	10983	8,10	8,64	-0,54	0,02255
ZNF318	24149	6,89	7,28	-0,39	0,02257
RASGRP2	10235	5,83	6,40	-0,57	0,02257
PYCARD	29108	9,79	10,25	-0,46	0,02272
BACH2	60468	4,11	4,46	-0,35	0,02296
STAT5B	6777	6,81	7,19	-0,38	0,02348
C6orf48	50854	8,36	8,91	-0,55	0,02350
ARF5	381	7,99	8,36	-0,37	0,02353
RPS27A	6233	8,58	8,97	-0,39	0,02372
MEF2D	4209	6,90	7,30	-0,40	0,02378
MEX3C	51320	6,84	7,35	-0,52	0,02378
CELF2	10659	8,11	8,69	-0,57	0,02387
GDI2	2665	9,76	10,23	-0,47	0,02409
OSBPL8	114882	7,37	8,09	-0,72	0,02484
GID8	54994	8,29	8,65	-0,36	0,02508
MAP2K3	5606	7,40	7,97	-0,57	0,02535
IPCEF1	26034	5,85	6,52	-0,66	0,02576
ARAF	369	7,87	8,23	-0,36	0,02606
CCDC69	26112	6,21	6,83	-0,61	0,02606
FRY	10129	6,65	7,45	-0,81	0,02606
SNRK	54861	8,11	8,56	-0,46	0,02618
SVIL	6840	6,72	7,43	-0,71	0,02618
SPINT1	6692	7,23	7,74	-0,51	0,02656
AFF3	3899	4,84	5,46	-0,62	0,02656
ARHGEF6	9459	9,37	9,79	-0,42	0,02686
CREBBP	1387	7,33	7,67	-0,34	0,02705
VEZF1	7716	8,31	8,75	-0,44	0,02736
DIAPH1	1729	8,10	8,56	-0,46	0,02736
CHST2	9435	6,02	6,57	-0,55	0,02736
CDC40	51362	6,68	7,10	-0,42	0,02849
RPL14	9045	8,91	9,39	-0,48	0,02868
RMND5A	64795	6,93	7,34	-0,41	0,02929
CIDEB	27141	6,96	7,42	-0,46	0,02941
LIMD1	8994	6,89	7,33	-0,44	0,03059
CHAF1A	10036	5,81	6,14	-0,33	0,03059
TP53	7157	6,67	7,15	-0,48	0,03059
BAG1	573	7,88	8,28	-0,40	0,03104
INPP5F	22876	5,84	6,35	-0,51	0,03104
TRAPPC6A	79090	7,42	7,81	-0,38	0,03112
ANP32A	8125	8,95	9,35	-0,40	0,03123
SLC12A6	9990	6,86	7,43	-0,57	0,03215
PMS2P1	5379	6,89	7,30	-0,41	0,03272
RNF126	55658	6,92	7,30	-0,37	0,03289
BPTF	2186	5,81	6,14	-0,34	0,03306
SELL	6402	6,73	7,49	-0,76	0,03327
PNRC2	55629	8,69	9,05	-0,36	0,03354
VIPR1	7433	5,58	6,08	-0,50	0,03366
TMEM8B	51754	5,77	6,19	-0,42	0,03369
SLC25A40	55972	8,48	8,96	-0,48	0,03369
NADSYN1	55191	7,96	8,31	-0,35	0,03371
PPP3CA	5530	8,44	8,90	-0,47	0,03383
NCF2	4688	10,88	11,37	-0,48	0,03383
ZNF592	9640	7,31	7,65	-0,34	0,03388
TMEM66	51669	7,54	7,91	-0,37	0,03440

IRF4	3662	5,92	6,57	-0,65	0,03444
LSM6	11157	8,82	9,20	-0,38	0,03475
POLR1E	64425	5,27	5,60	-0,34	0,03482
URI1	8725	7,23	7,63	-0,40	0,03482
TNKS2	80351	7,94	8,39	-0,46	0,03482
STK24	8428	8,35	8,69	-0,34	0,03482
LIG3	3980	5,93	6,26	-0,33	0,03497
HIVEP1	3096	6,93	7,49	-0,56	0,03511
FAM168B	130074	7,59	8,00	-0,41	0,03547
SLC38A1	81539	5,58	6,49	-0,92	0,03584
SPIB	6689	5,16	5,66	-0,50	0,03589
SLCO3A1	28232	7,28	7,88	-0,60	0,03598
CYFIP2	26999	6,50	7,21	-0,70	0,03598
AMPD2	271	7,62	8,22	-0,60	0,03630
DCLRE1C	64421	6,68	7,08	-0,40	0,03652
NFE2	4778	4,43	4,95	-0,52	0,03652
CARS2	79587	8,43	8,78	-0,35	0,03687
G3BP2	9908	8,25	8,62	-0,37	0,03738
PPP6C	5537	8,90	9,26	-0,36	0,03765
SLC25A28	81894	7,50	7,91	-0,41	0,03765
RSL24D1	51187	9,06	9,46	-0,41	0,03801
MTMR1	8776	7,46	8,00	-0,54	0,03801
RPS6KA3	6197	9,00	9,41	-0,41	0,03837
NCOA1	8648	8,07	8,44	-0,37	0,03845
EPB41	2035	6,10	6,49	-0,40	0,03845
RPL23A	6147	9,34	9,79	-0,45	0,03845
SEPT6	23157	7,30	7,79	-0,48	0,03845
LST1	7940	9,87	10,42	-0,55	0,03845
PACS1	55690	6,94	7,27	-0,33	0,03850
LNPEP	4012	7,13	7,65	-0,53	0,03871
RCOR1	23186	7,83	8,17	-0,34	0,03919
OBFC1	79991	6,69	7,02	-0,34	0,03919
CASP2	835	5,73	6,14	-0,41	0,03919
USP48	84196	6,51	6,85	-0,34	0,03928
IFT20	90410	8,71	9,13	-0,42	0,03928
SCAF4	57466	6,47	6,90	-0,43	0,03936
CBX7	23492	6,92	7,28	-0,36	0,03955
RGS14	10636	5,77	6,15	-0,38	0,03997
NAAA	27163	7,98	8,49	-0,52	0,04045
CHP1	11261	7,62	8,04	-0,42	0,04045
SLC25A38	54977	7,26	7,59	-0,33	0,04047
MKL1	57591	7,13	7,50	-0,37	0,04047
LSM7	51690	8,42	8,79	-0,38	0,04047
EFHD2	79180	9,56	10,01	-0,46	0,04062
ZBTB33	10009	8,84	9,18	-0,34	0,04082
SH2D3C	10044	5,50	6,01	-0,51	0,04133
CD1E	913	4,58	5,72	-1,14	0,04144
C2orf49	79074	5,79	6,10	-0,31	0,04147
PDE6G	5148	6,41	6,77	-0,36	0,04155
CRBN	51185	8,36	8,75	-0,40	0,04155
CLEC4A	50856	7,78	8,56	-0,77	0,04155
IRAK3	11213	7,18	8,02	-0,84	0,04155
NOTCH2	4853	8,19	8,73	-0,54	0,04161
KCTD15	79047	4,80	5,28	-0,47	0,04203
SMARCC1	6599	7,39	7,75	-0,35	0,04211
BCL2L13	23786	6,48	6,82	-0,35	0,04214
KDM4B	23030	7,02	7,38	-0,36	0,04241
SLC25A12	8604	6,28	6,62	-0,34	0,04242
ERLIN2	11160	6,42	6,85	-0,44	0,04242
KLF13	51621	7,21	7,74	-0,54	0,04242

CD37	951	9,15	9,74	-0,59	0,04242
U2SURP	23350	6,31	6,79	-0,48	0,04251
MAML3	55534	5,91	6,43	-0,52	0,04256
ZNF281	23528	7,48	7,86	-0,39	0,04402
RFTN1	23180	8,65	9,08	-0,43	0,04425
C21orf91	54149	6,51	6,98	-0,47	0,04425
ANAPC15	25906	7,64	7,99	-0,35	0,04443
UQCRB	7381	6,38	6,75	-0,37	0,04443
PLCB2	5330	8,01	8,41	-0,40	0,04443
AKIRIN1	79647	7,91	8,35	-0,44	0,04443
STK4	6789	7,23	7,79	-0,56	0,04443
METTL9	51108	8,88	9,40	-0,52	0,04447
PHF20	51230	7,39	7,84	-0,45	0,04452
IPO5	3843	7,60	8,06	-0,46	0,04487
CBX4	8535	7,15	7,56	-0,41	0,04535
RSBN1	54665	7,42	7,85	-0,43	0,04573
SLC1A5	6510	7,39	7,80	-0,40	0,04585
LANCL1	10314	7,85	8,21	-0,36	0,04716
ATPAF2	91647	6,47	6,81	-0,33	0,04729
HNRNPUL1	11100	7,95	8,31	-0,36	0,04729
ZMIZ1	57178	8,79	9,11	-0,32	0,04753
SCN9A	6335	3,97	4,40	-0,44	0,04753
OGT	8473	6,57	7,18	-0,61	0,04768
KLHDC2	23588	8,30	8,68	-0,39	0,04794
TMPO	7112	7,13	7,65	-0,52	0,04844
EVI2B	2124	11,04	11,39	-0,36	0,04884
KDM5A	5927	6,64	7,03	-0,39	0,04884
UQCRC2	7385	6,85	7,21	-0,36	0,04892
FXYS5	53827	9,88	10,31	-0,43	0,04892
CBX6	23466	7,35	7,72	-0,38	0,04939
DDX46	9879	7,73	8,06	-0,33	0,04950
ADRBK1	156	7,28	7,70	-0,42	0,04983

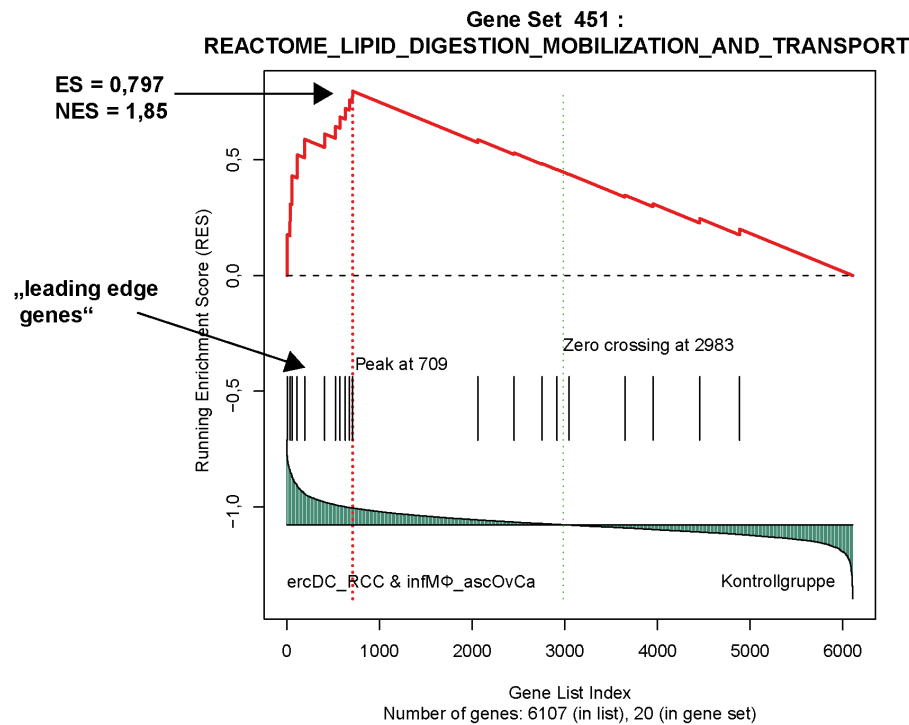


**Tabelle 11-3: Top 20 der überrepräsentierten Signalwege der hochregulierten ercDC\_RCC-Signaturgene bei Analyse mit der InnateDB Plattform.** Als signifikant überrepräsentiert gelten Signalwege mit einem korrigierten p-Wert < 0,05 (orange Markierung).

Signalweg	Korrigierter p-Wert
Lysosome	$3,99 \times 10^{-7}$
Complement and coagulation cascades	$1,57 \times 10^{-4}$
Beta1 integrin cell surface interactions	$7,68 \times 10^{-4}$
Collagen biosynthesis and modifying enzymes	0,009
Beta3 integrin cell surface interactions	0,016
HDL-mediated lipid transport	0,020
Phagosome	0,041
ECM-receptor interaction	0,041
Regulation of complement cascade	0,068
NOD-like receptor signaling pathway	0,079
Staphylococcus aureus infection	0,098
Validated transcriptional targets of AP1 family members Fra1 and Fra2	0,113
Integrin cell surface interactions	0,114
Inhibition of matrix metalloproteinases	0,148
Toll-like receptor signaling pathway	0,150
Chemokine receptors bind chemokines	0,158
Degradation of collagen	0,165
Fibrinolysis pathway	0,166
Metal ion SLC transporters	0,166
Platelet amyloid precursor protein pathway	0,166

**Tabelle 11-4: Top 20 der überrepräsentierten Signalwege der herabregulierten ercDC\_RCC-Signaturgene bei Analyse mit der InnateDB Plattform.** Als signifikant überrepräsentiert gelten Signalwege mit einem korrigierten p-Wert < 0,05 (orange Markierung).

Signalweg	Korrigierter p-Wert
L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	$2,66 \times 10^{-8}$
Formation of a pool of free 40S subunits	$6,95 \times 10^{-8}$
Ribosome	$1,27 \times 10^{-6}$
Eukaryotic translation termination	$4,16 \times 10^{-6}$
Peptide chain elongation	$4,16 \times 10^{-6}$
Ribosomal scanning and start codon recognition	$4,86 \times 10^{-6}$
Translation initiation complex formation	$4,86 \times 10^{-6}$
Viral mRNA translation	$4,86 \times 10^{-6}$
Nonsense mediated decay independent of the exon junction complex	$6,74 \times 10^{-6}$
Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	$6,78 \times 10^{-6}$
Nonsense mediated decay enhanced by the exon junction complex	$1,14 \times 10^{-4}$
SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	$1,14 \times 10^{-4}$
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	0,053
Long-term potentiation	0,372
Role of mef2d in t-cell apoptosis	0,384
Wnt signaling pathway	0,394
Alzheimer's disease	0,444
Natural killer cell mediated cytotoxicity	0,444
IL-7 signal transduction	0,472
Cell surface interactions at the vascular wall	0,514

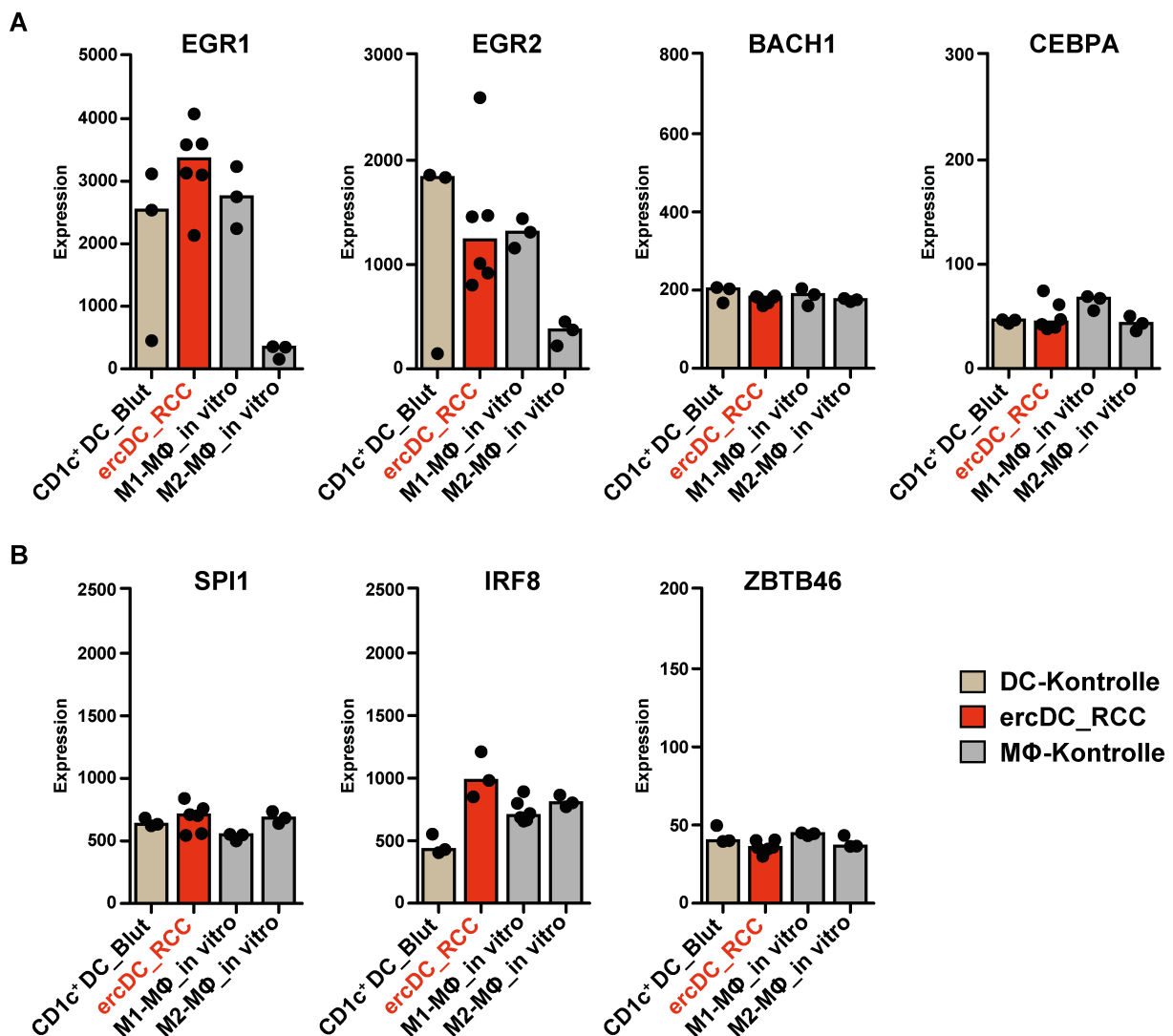


**Abbildung 11-5: „Enrichment Plot“ für das Genset „Lipid digestion mobilization and transport“ bei der GSEA.** Der „enrichment score“ (ES) zeigt an, wie stark die systematische Abweichung von Genexpressionsveränderungen (ercDC\_RCC & infMΦ\_ascOvCa vs. Kontrollgruppe) in einem Testgenset ist. Der ES (oberer Pfeil) ergibt sich aus der maximalen Abweichung von Null. Diejenigen Gene (dargestellt als schwarze Striche), die vor diesem Punkt liegen („leading edge genes“, unterer Pfeil), tragen am meisten zum ES bei. Aus dem ES ergibt sich durch Normalisierung der normalisierte „enrichment score“ (NES). Parallel mit dem NES werden auch ein p-Wert und eine FDR berechnet (nicht gezeigt).

**Tabelle 11-5: Top 20 der überexprimierten Signalwege der ercDC\_RCC & infMΦ\_ascOvCa-Gruppe, die bei der GSEA ermittelt wurden.** Da die p-Werte und FDR-Werte sehr hoch waren, wurde der NES zur Beurteilung der Stärke der Genexpressionsunterschiede zwischen der ercDC\_RCC & infMΦ\_ascOvCa-Gruppe und der Kontrollgruppe verwendet. In der rechten Spalte sind ercDC\_RCC-Markergene und verwandte Gene angegeben, die zu den „leading edge“ Genen des jeweiligen Gensets gehören. Fettdruck: Signalwege, die im Ergebnisteil erwähnt werden.

Signalweg	Datenbank	NES	Markergene/ verwandte Gene „Leading edge“
Lysosome	KEGG	1,94	LGMN
<b>Complement and coagulation cascades</b>	KEGG	1,86	C2, SERPING1, C1QA, C1QB
<b>Lipid digestion mobilization and transport</b>	Reactome	1,85	PLTP, APOE
Activation of chaperone genes by XBP1S	Reactome	1,76	
Arginine and proline metabolism	KEGG	1,69	
Iron uptake and transport	Reactome	1,68	HMOX1
<b>Complement cascade</b>	Reactome	1,66	C2, C1QA, C1QB
<b>Extracellular matrix organization</b>	Reactome	1,66	
MHC class II antigen presentation	Reactome	1,64	LGMN
Unfolded protein response	Reactome	1,63	
Diabetes pathways	Reactome	1,61	PLA2G7
Peptide ligand binding receptors	Reactome	1,60	CXCL9, C3AR1

Collagen formation	Reactome	1,60	
Response to elevated platelet cytosolic_CA2	Reactome	1,58	SERPING1
Toll like receptor signaling pathway	KEGG	1,55	CXCL9, CD14
Axon guidance	Reactome	1,55	NRP1, NRP2, GFRA2
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	KEGG	1,55	
Signal transduction by L1	Reactome	1,54	NRP1
<b>Systemic lupus erythematosus</b>	KEGG	1,53	C2, C1QA, C1QB
<b>ECM receptor interaction</b>	KEGG	1,53	SDC3



**Abbildung 11-6: Transkriptlevel von Makrophagen- und DC-assoziierten Transkriptionsfaktoren, die bei den Makrophagen- und DC-Kontrollzellen keinen Unterschied zeigten. A)** Gene, die für MΦ-assoziierte Transkriptionsfaktoren kodieren. **B)** Gene, die für DC-assoziierte Transkriptionsfaktoren kodieren. Die aufgeführten Gene wurden für die Analyse nicht berücksichtigt, da sie entweder zwischen MΦ- und DC-Kontrollzellen nicht unterschiedlich exprimiert wurden (*EGR1*, *EGR2*, *BACH1*, *SPI1/PU.1*, *IRF8*) bzw. von allen Zelltypen nur sehr schwach exprimiert wurden (*ZBTB46*, *CEBPA*). Die ercDC\_RCC sind rot gekennzeichnet, die DC-Kontrollzelle, CD1c<sup>+</sup> DC\_Blut, beige und die MΦ-Kontrollzellen grau. Der Balken zeigt den Median an, die Symbole die einzelnen Replikate eines Zelltyps. Die unterschiedliche Skalierung der Y-Achse ist zu beachten.

**Tabelle 11-6: Liste M1-assoziiierter Gene, die aus Publikationen von Martinez et al.<sup>103</sup>, Shaykhiev et al.<sup>137</sup> und Houser et al.<sup>133</sup> zusammengestellt wurde.** Die Gene sind nach Funktion gruppiert. Gezeigt ist der Genname, das Gensymbol und die Zugehörigkeit zu den in der Abbildung 7-27 aufgeführten informativen Genen. Fettdruck: ercDC\_RCC-Markergen; lila: ercDC\_RCC-Signaturgen

Genname	Gensymbol/alternat. Bez.	Informativ
<b>Membranrezeptoren</b>		
Complement component 3a receptor 1	C3AR1	ja
CCR7	CCR7	ja
CD69	CD69	ja
CD80	CD80	ja
CD86	CD86	nein
Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)	CD64/FCGR1A	ja
Fc fragment of IgG, high affinity IIa, receptor (CD32)	CD32/FCGR2A	ja
Fc fragment of IgG, high affinity IIIa, receptor (CD16)	CD16/FCGR3A	ja
ICAM1	ICAM1	ja
Interleukin 15 receptor $\alpha$ chain	IL15RA	ja
Interleukin 2 receptor $\alpha$ chain	IL2RA	ja
Interleukin 7 receptor	IL7R	ja
Toll-like receptor 2	TLR2	ja
Toll-like receptor 4	TLR4	ja
<b>Zytokine und Chemokine</b>		
CXCL11	CXCL11	ja
CCL14	CCL14	nein
CCL15	CCL15	nein
CCL19	CCL19	ja
CCL20	CCL20	ja
CCL4	CCL4	ja
CCL5	CCL5	ja
CXCL1	CXCL1	ja
CXCL10	CXCL10	ja
CXCL9	CXCL9	ja
Thymidine phosphorylase	TYMP	ja
Interleukin 12B	IL12B	nein
Interleukin 15	IL15	nein
Interleukin 18	IL18	ja
Interleukin 1B	IL1B	ja
Interleukin 23	IL23	ja
Interleukin 32	IL32	ja
Interleukin 6	IL6	ja
Nicotinamide phosphoribosyltransferase	NAMPT/PBEF1	ja
Tumor necrosis factor ligand superfamily, member 2	TNF	ja
Tumor necrosis factor, $\alpha$ -induced protein 6	TNFAIP6	ja
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TRAIL	ja
<b>Apoptose-assoziierte Gene</b>		
BCL2-related protein A1	BCL2A1	ja
Baculoviral 1AP repeat-containing 3	BIRC3	ja
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	FAS	ja
Growth arrest and DNA-damage-inducible, $\gamma$	GADD45G	ja
XIAP associated factor-1	HSXIAPAF1	ja
<b>Transportproteine</b>		
Solute carrier family 21, member 15	SLC21A15	ja
Solute carrier family 2, member 6	SLC2A6	ja
Solute carrier family 31, member 2	SLC31A2	ja
Solute carrier family 7, member 5	SLC7A5	ja
<b>Enzyme und andere Proteine</b>		
Adenylate kinase 3	AK3	ja

B factor, properdin (complement factor B)	CFB	ja
Chitinase 3-like 2	CHI3L2	ja
Hydroxysteroid (11- $\beta$ ) dehydrogenase 1	HSD11B1	ja
Indoleamine 2,3 dioxygenase 1	IDO1	ja
Nitric oxide synthase 2A (inducible)	NOS2A	nein
2'-5'-oligoadenylate synthetase 2	OAS2	ja
2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	OASL	ja
Phosphodiesterase 4B, cAMP-specific	PDE4B	ja
6-phosphofructo-2-kinase/fructo-2,6-biphosphatase 3	PFKFB3	ja
Phosphofructokinase	PFKP	ja
Phospholipase A1 member A	PLA1A	ja
Proteasome subunit $\alpha$ type 2	PSMA2	ja
Proteasome subunit $\beta$ type 9	PSMB9	ja
Proteasome activator subunit 2	PSME2	ja
Sphingosine kinase 1	SPHK1	ja
<b>Extrazelluläre Mediatoren</b>		
Apolipoprotein L1	APOL1	ja
Apolipoprotein L2	APOL2	ja
Apolipoprotein L3	APOL3	ja
Apolipoprotein L6	APOL6	ja
Chondroitin sulfate proteoglycan 2	CSPG2	ja
Endothelin 1	EDN1	ja
Insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	ja
Inhibin $\beta$ A	INHBA	ja
Platelet-derived growth factor $\alpha$	PDGFA	ja
Pentraxin 3	PTX3	ja
<b>DNA-bindende Faktoren</b>		
Activating transcription factor 3	ATF3	ja
Homeobox expressed in ES cells 1	HESX1	ja
Interferon regulatory factor 1	IRF1	ja
Interferon regulatory factor 7	IRF7	ja
Storkhead box 1	STOX1	nein
<b>Signaling-assoziierte Gene</b>		
Guanylate-binding protein 1, IFN-inducible	GBP1	ja
Guanylate-binding protein 2, IFN-inducible	GBP2	ja
Guanylate-binding protein 3	GBP3	ja
Guanylate-binding protein 4	GBP4	ja
Guanylate-binding protein 5	GBP5	ja
Immunoresponsive 1 homolog	IRG1	nein
Suppressor of cytokine signaling 3	SOCS3	ja
<b>Funktion unbekannt</b>		
Chromosome 7 open reading frame 25	C7orf25	ja

**Tabelle 11-7: Liste M2-assoziiierter Gene, die aus Publikationen von Martinez et al.<sup>103</sup>, Shaykhiev et al.<sup>137</sup> und Houser et al.<sup>133</sup> zusammengestellt wurde.** Die Gene sind nach Funktion gruppiert. Gezeigt ist der Genname, das Gensymbol und die Zugehörigkeit zu den in der Abbildung 7-27 aufgeführten informativen Genen. Fettdruck: ercDC\_RCC-Markergen; lila: ercDC\_RCC-Signaturgen

Genname	Gensymbol/alternat. Bez.	Informativ
<b>Membranrezeptoren</b>		
Adenosine A3 receptor	ADORA3	ja
CCR5	CCR5	ja
CD163	CD163	ja
CD36	CD36	ja
CD9	CD9	ja
C-type lectin family 7A	CLEC7A/DECTIN1	ja
C-type lectin domain family 10, member A	CLEC10A/CLECSF13	ja
CXCR4	CXCR4	ja
CD302	CD302/DCL-1	ja
CD209	CD209/DC-SIGN	ja
Fc fragment IgE, low affinity II, receptor for (CD23)	FCER2/CD23	ja
G protein-coupled receptor 86	GPR86	ja
Histamine receptor H1	HRH1	ja
IL4R	IL4R	ja
c-mer protooncogene tyrosine kinase	MERTK	ja
Mannose receptor, C type 1	CD206/MRC1	ja
Mannose receptor, C type 2	MRC2	ja
Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4A	MS4A4A	ja
Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	MS4A6A	ja
Macrophage scavenger receptor 1	CD204/MSR1	ja
Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	P2RY14	ja
Purinergic receptor P2Y, G protein-coupled, 5	P2RY5/LPAR6	ja
Stabilin 1	STAB1	ja
Transforming growth factor $\beta$ receptor II	TGFBR2	ja
Toll-like receptor 5	TLR5	ja
<b>Zytokine und Chemokine</b>		
CCL13	CCL13	ja
CCL17	CCL17	ja
CCL18	CCL18	ja
CCL22	CCL22	ja
CCL23	CCL23	ja
CCL24	CCL24	ja
Insulin-like growth factor 1	IGF1	ja
Interleukin 10	IL10	ja
IL1 receptor antagonist	IL1RN	ja
TGFB1	TGFB1	ja
<b>Transportproteine</b>		
Solute carrier family 21, member 15	SLCO2B1/SLC21A9	ja
Solute carrier family 38, member 6	SLC38A6	ja
Solute carrier family 4, member 7	SLC4A7	ja
<b>Enzyme und andere Proteine</b>		
Adenosine kinase	ADK	ja
Arachidonate 15-lipoxygenase	ALOX15	ja
Arginase 1	ARG1	nein
Carbonic anhydrase II	CA2	ja
Ceramide kinase	CERK	ja
Collagen, type VI, $\alpha$ 2	COL6A2	nein
Cathepsin C	CTSC	ja
Hexosaminidase B	HEXB	ja

Histamine <i>N</i> -methyltransferase	HNMT	ja
Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	HS3ST1	ja
Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2	HS3ST2	ja
Lipase A cholesterol esterase	LIPA	ja
Leukotriene A4 hydrolase	LTA4H	ja
Matrixmetallopeptidase 2 (gelatinase A, 72-kDa gelatinase)	MMP2	ja
MMP7 (matrilysin, uterine)	MMP7	ja
MMP9 (gelatinase B, 92-kDa gelatinase)	MMP9	ja
Tyrosylprotein sulfotransferase 2	TPST2	ja
<b>Extrazelluläre Mediatoren</b>		
Chimerin 2	CHN2	ja
Fibrinogen-like 2	FGL2	ja
Fibronectin 1	FN1	ja
Selenoprotein P, plasma, 1	SEPP1	ja
Transforming growth factor, beta-induced, 68 kDa	TGFB1	ja
<b>DNA-bindende Faktoren</b>		
Early growth response 2	EGR2	ja
Growth arrest-specific 7	GAS7	ja
<i>v-maf</i> musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog	MAF	ja
<b>Signaling-assoziierte Gene</b>		
Regulator of G protein signaling 1	RGS1	ja

Tabelle 11-8: Aktivierungssignale (Stimuli) aus Xue et al.<sup>112</sup>

Stimulus	Bezeichnung
IL-4	Interleukin-4
IL-13	Interleukin-13
IL-10	Interleukin-10
GC	Glucocorticoide
IC	engl.: immune complexes
HDL	engl.: high density lipoprotein
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
OA	engl.: oleic acid
LiA	engl.: linoleic acid
TPP	TNF+ PGE <sub>2</sub> + P3C
PA	engl.: palmitic acid
LA	engl.: lauric acid
SA	engl.: stearic acid
P3C	Pam3CysSerLys4
sLPS	engl.: standard lipopolysaccharid
upLPS	engl.: ultrapure lipopolysaccharid
IFN-β	Interferon-β
IFN-γ	Interferon-γ
TNF	Tumornekrosefaktor
UP	unpolarisiert, ohne Stimulus

**Tabelle 11-9: Module und deren korrelierende Stimuli aus Xue et al.<sup>112</sup>.** Die Zuordnung eines Stimulus zu einem Modul erfolgte bei p-Werten  $< 0,05$ . Bei p-Werten  $\leq 10^{-6}$  wurde nur das Modul mit dem niedrigsten p-Wert mit dem Stimulus assoziiert, auch wenn andere Stimuli p-Werte  $< 0,05$  besaßen. Diese Regel ist angelehnt an Xue et al.<sup>112</sup>. Wenn keiner der Stimuli einen p-Wert  $\leq 10^{-6}$  hatte, wurden die beiden signifikantesten ( $p < 0,05$ ) Stimuli verwendet. In der Tabelle ist die signifikantere Korrelation zuerst aufgeführt.

Modul	Stimulus	
	Positive Korrelation	Negative Korrelation
1	LA, OA	IL-13, IL-4
2	n.d.	IL-13, IL-4
3	sLPS, UP	IL-13, LiA
4	OA	IL-13, IL-4
5	PA	IL-4, IL-13
6	OA, LA	TPP, sLPS + IC
7	IFN- $\gamma$ , PA	TPP, TNF+ PGE <sub>2</sub>
8	IFN- $\gamma$	TPP*
9	IFN- $\gamma$ + TNF, IFN- $\gamma$	TPP, TPP + IFN- $\beta$
10	IL-4, TNF	PA, LiA
11	IL-4	PA
12	IL-4, IFN- $\gamma$	TPP
13	IL-4, IL-13	TPP
14	IL-4	sLPS, upLPS + IC
15	IL-4	TPP*
16	PA	IL-4, TPP + IFN- $\gamma$
17	PA	IL-4, IFN- $\gamma$ + TNF
18	PA	sLPS, TPP
19	PA	IL-4, upLPS
20	PA	TPP
21	PA	TPP + IFN- $\beta$ , TPP
22	OA	TPP + IFN- $\beta$ + IFN- $\gamma$ , TPP + IFN- $\beta$
23	OA, LiA	TPP, sLPS
24	OA	TPP, TPP + IFN- $\beta$ + IFN- $\gamma$
25	PA	sLPS, TPP
26	LiA	sLPS, TPP
27	LA, HDL	sLPS
28	OA, IL-4	sLPS
29	TNF+ PGE <sub>2</sub> , TPP	UP, IFN- $\gamma$
30	TPP	IL-4, UP
31	PA	IL-4, UP
32	TPP	IL-4, UP
33	TPP	PA, OA
34	TPP, sLPS + IC	OA, LA
35	IFN- $\gamma$ + TNF, sLPS + IFN- $\gamma$	OA, LA
36	TPP, P3C + PGE <sub>2</sub>	OA, IFN- $\gamma$
37	IL-4, upLPS	PA
38	TPP, sLPS + IC	OA
39	TPP, PGE <sub>2</sub>	PA
40	TPP, upLPS	PA
41	GC, PGE <sub>2</sub>	PA, TNF
42	GC, UP	PA, TNF + PGE <sub>2</sub>
43	UP, PGE <sub>2</sub>	sLPS, IFN- $\gamma$ + TNF
44	OA, GC	IFN- $\gamma$ , TPP + IFN- $\beta$ + IFN- $\gamma$
45	IL-4	PA, sLPS
46	IL-4	PA
47	IL-4, GC	PA
48	IL-4	PA, OA
49	n.d.	n.d.

\* Nur ein Stimulus besaß für das Modul einen p-Wert  $< 0,05$ , aber  $> 10^{-6}$ ; n.d.: nicht detektiert



## DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Elfriede Nößner, bedanken. Sie gab mir dieses spannende und herausfordernde Projekt, durch das ich in eine ganz neue Thematik eintauchen konnte. Sie hatte immer ein offenes Ohr und Zeit für fachliche Diskussionen. Auch während des Verfassens der Arbeit war sie eine große Unterstützung, motivierte mich stets und vermittelte mir großen Spaß an dem Projekt.

Bei Frau Prof. Schendel und Herrn Prof. Mocikat möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass ich meine Doktorarbeit am Institut für Molekulare Immunologie anfertigen konnte.

Ein ganz großes Dankeschön gilt unserer Arbeitsgruppe, den beiden Annas, Petra, Ramona, Luis, Anja, Ilias, Jan und allen anderen ehemaligen Doktoranden, Master- und Bachelorstudenten, die ich während meiner Zeit als Doktorandin erlebt habe. Es war immer eine große Freude mit euch zu arbeiten, zu lachen, zu kochen. Bei Anna Brandl möchte ich mich ganz besonders für die Hilfe bei den vielen In-vitro-Versuchen bedanken.

Beim ganzen IMI möchte ich mich für die tolle Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere Josef und Joachim für die unermüdliche Unterstützung bei den vielen Sortierungen und für die anregenden fachlichen Diskussionen. Bei Adam möchte ich mich für die große Unterstützung bei jeglichen Computerfragen bedanken.

Ein herzliches Dankeschön an Tobias Straub, Martin Irmeler und Anke Bettenbrock für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Durchführung und Auswertung der Microarrayanalysen. Mir machte es großen Spaß mit euch zu arbeiten. Ich freue mich auf weitere konstruktive Kooperationen.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Bocker für die anregenden fachlichen Diskussionen und die guten Ratschläge im Rahmen der Thesis Committee Meetings.

Ich danke auch Sabine Diepenbruck und Herrn Prof. Peter Nelson für die Unterstützung bei den Versuchen. Sabine danke ich außerdem recht herzlich für das Lesen meiner Arbeit.

Außerdem gilt mein Dank Katrin Schenberger für die Unterstützung bei der Formatierung und dem ganzen Team der Physiopraxis „Gesundheit & Bewegung“.

Vielen lieben Dank an meine Familie, insbesondere meiner Mama, für die unermüdliche Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Promotion. Sie haben mir sehr viel Kraft gegeben, diese nicht immer einfache Zeit zu meistern.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Freund, Fredrik, bedanken. Er war mir eine riesige Unterstützung, mein großer Rückhalt, ohne den ich v.a. die letzte Zeit wohl nicht so gut überstanden hätte. Das hat mir sehr viel bedeutet, vielen herzlichen Dank!

## PUBLIKATIONEN

Figel AM\*, Brech D\*, Prinz PU, *et al.* Human renal cell carcinoma induces a dendritic cell subset that uses T-cell crosstalk for tumor-permissive milieu alterations. *The American journal of pathology* 2011, **179**(1): 436-451.

Darisipudi MN, Thomasova D, Mulay SR, Brech D, Noessner E, Liapis H, Anders HJ. Uromodulin triggers IL-1beta-dependent innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012, **23**(11): 1783-1789.

Noessner E, Brech D, Mendler AN, Masouris I, Schlenker R, Prinz PU. Intratumoral alterations of dendritic-cell differentiation and CD8(+) T-cell anergy are immune escape mechanisms of clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2012, **1**(8): 1451-1453.

Prinz PU, Mendler AN, Brech D, Masouris I, Oberneder R, Noessner E. NK-cell dysfunction in human renal carcinoma reveals diacylglycerol kinase as key regulator and target for therapeutic intervention. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2014, **135**(8): 1832-1841.

Marieta Toma, Rebekka Wehner, Anja Kloß, Linda Hübner, Georgia Fodelianaki, Kati Erdmann, Susanne Füssel, Stefan Zastrow, Matthias Meinhardt, Barbara Seliger, Dorothee Brech, Elfriede Noessner, Torsten Tonn, Knut Schäkel, Martin Bornhäuser, Michael Bachmann, Manfred Wirth, Gustavo Baretton, Marc Schmitz. Accumulation of tolerogenic human 6-sulfo LacNAc<sup>+</sup> dendritic cells in renal cell carcinoma is associated with poor prognosis. *Manuskript eingereicht*

\* Ko-Erstautoren

**EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

Brech, Dorothee

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„Ein neuartiger humaner CD209<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> myeloischer Zelltyp im  
klarzelligen Nierenzellkarzinom“**

**„Genexpressionsprofil, funktionelle Polarisierung und Einordnung im mononukleären  
Phagozytensystem“**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin