

# **Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

Vorgelegt von

M.Sc. Svenja Busch

aus Ludwigshafen am Rhein

Tag der mündlichen Prüfung: .....



**Immunglobulin-Expression Tumor-  
assoziierter Makrophagen und  
zirkulierender Monozyten bei Patienten  
mit Glioblastoma multiforme**

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wieland  
Prof. Dr. med. Michael Neumaier



*Meiner Familie*



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>III</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>5</b>
1. Innates und kognates Immunsystem .....	5
2. Zellen des innaten und kognaten Immunsystems .....	6
3. Monozyten und Makrophagen – Effektorzellen des innaten Immunsystems .....	8
4. Antikörper .....	14
5. Immunglobuline und Nicht-B-Lymphozyten.....	22
6. Zytokine im Tumormilieu.....	23
7. Glioblastoma multiforme (GBM) .....	27
8. Hypothese .....	29
<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>31</b>
1. Material .....	31
2. Methoden.....	39
<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>63</b>
1. Validierung der Methoden / allgemeine Charakterisierung .....	64
2. CDR3-Variabilität .....	83
3. Verwendete Ketten .....	88
4. Mutationen .....	91
5. Korrelation des Repertoires mit dem Tumolvolumen .....	102
6. Veränderung des Repertoires im Blut nach Tumorsektion .....	106
7. Zytokin-Status der Patienten.....	120

<b>DISKUSSION .....</b>	<b>123</b>
1. Glioblastom .....	123
2. Immunglobuline in Nicht-Lymphozyten .....	123
3. Molekulare Mechanismen der Ig-Rekombination.....	126
4. Mögliche biologische Funktion der von nicht-lymphoiden Zellen exprimierten Immunglobuline .....	127
5. Validierung der Methoden .....	128
6. CDR3-Variabilität und Nutzung der V-Ketten.....	130
7. Mutationen.....	132
8. Korrelation zwischen Repertoire und Tumolvolumen .....	134
9. Veränderungen nach der Tumorresektion.....	135
10. Fazit und Ausblick .....	137
<b>QUELLEN .....</b>	<b>139</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>153</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>157</b>
<b>PUBLIKATIONEN, VORTRÄGE, POSTER UND AUSZEICHNUNGEN.....</b>	<b>159</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>161</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>163</b>



---

## Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität/ antibody-dependent cellular cytotoxicity
AID	activation-induced cytidine deaminase
AML	akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
°C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	complementary DNA
CDR1-3	complementary determining region 1-3
CFU-GM	colony-forming unit granulocyte-macrophage
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CSF-1	colony stimulating factor-1
CSR	Klassenwechsel/ Class Switch Recombination
D	diversity
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
dsDNA	doppelsträngige DNA
E.coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor/ epidermal growth factor
EGFR	EGF-Rezeptor
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
et al.	et alii
Fab	fragment, antigen-binding
Fc	fragment, constant
FcR	Fc-Rezeptor
FDC	follicular dendritische Zelle/ follicular dendritic cell
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor/ fibroblast growth factor
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
H <sub>2</sub> O	Wasser

## Abkürzungsverzeichnis

---

ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül/ endothelial intracellular adhesion molecule 1
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulinartiger Wachstumsfaktor/ Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
J	joining
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
kD	Kilo Dalton
KGF	Keranozyten-Wachstumsfaktor/ keranocyte growth factor
l	Liter
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M1-Makrophage	klassisch aktivierter Makrophage (pro-inflammatorisch)
M2-Makrophage	alternativ aktivierter Makrophage (anti-inflammatorisch)
MACS	magnetic assisted cell sorting (magnetunterstützte Zellsortierung)
MCP	Monozyten-Chemoattraktorprotein/ monocyte chemotactic protein
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex/ major histocompatibility complex
min	Minute
mL	Milliliter
mM	millimolar
MMP	Matrix-Metalloprotease
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ L	Mikroliter
$\mu$ M	mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
NGS	Next-Generation Sequencing
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
ORF	offener Leserahmen/ open reading frame
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster /pathogen-associated molecular pattern

---

PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor/ platelet-derived growth factor
PD-L1	programmed cell death ligand 1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRR	Mustererkennungsrezeptor/ pattern-recognition receptor
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
RAG	recombination activation gene
rpm	revolutions per minute
RSS	Rekombinationssignalsequenz/ recombination signal sequences
RT	Reverse Transkriptase
sek	Sekunde
SHM	somatische Hypermutation
TACE	TNF-konvertierendes Enzym/ TNF-converting enzym
TAM	tumor-assoziiertes Makrophage
TCR	T-Zell-Rezeptor
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TGF- $\alpha/\beta$	transforming growth factor- $\alpha/\beta$
T <sub>H</sub> 1/2	T-Helferzelle 1/2
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
U	Unit
V	variable
VEGF	Endothelzell-Wachstumsfaktor/ vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VP	Verlaufspatient

---

## Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist der häufigste und höchstgradig maligne menschliche Hirntumor. In den meisten Fällen verläuft das GBM 12-15 Monate nach der Diagnose tödlich, was den Bedarf an neuen nicht ausschließlich palliativ orientierten Therapiemöglichkeiten zeigt. Tumor-assoziierte Makrophagen gelten als ein Hauptmediator der Tumorprogression beim GBM. Aus aktuellen Untersuchungen ist bekannt, dass – entgegen dem Paradigma – auch Subpopulationen von Monozyten, in-vitro polarisierten Makrophagen sowie tumor-assoziierten Makrophagen variable Immunglobuline und T-Zellrezeptoren exprimieren können, wobei die funktionelle Relevanz dieses Befundes nicht klar ist.

Zu diesem Zweck wurden die Immunglobulin-Repertoires der zirkulierenden Monozyten und Tumormakrophagen sowie korrespondierender B-Zellen bei 15 Glioblastom-Patienten per PCR und Sanger-Sequenzierung untersucht. Zusätzlich erfolgte die Untersuchung der Repertoires von zwei weiteren Patienten mittels RACE-PCR und NGS in Zeitverlauf nach der Tumorresektion im Sinne eines Methodenvergleichs. Um ein vollkommeneres Bild der Situation zu erhalten, wurden auch weitere Aspekte wie die Immunkompetenz der verschiedenen Zellpopulationen und die Zytokinlevel in den Seren der Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert.

Antikörper-exprimierende Monozyten und Makrophagen wurden bei allen Patienten gefunden. Das jeweilige Immunglobulin-Repertoire ist deutlich weniger divers als das der jeweils korrespondierenden B-Zellen. Zusätzlich zeigte sich eine Einschränkung der Repertoire-Diversität bei Tumormakrophagen im Vergleich zu den Monozyten der Peripherie. Wir konnten erstmals zeigen, dass die Diversität der Immunglobulin-Repertoires invers mit dem jeweiligen Tumolvolumen korreliert, was eine immunsuppressive Wirkung des Tumors vermuten lässt. Diese konnte weitergehend durch die HLA-DR-Konzentrationen und die Zytokinlevel im Serum der Patienten untermauert werden. Zusätzlich ergab die Untersuchung der Repertoires im Zeitverlauf nach der Tumorresektion, dass zum Zeitpunkt des Rezidivs eine geringere Diversität als bei der Tumorresektion vorlag, während ein Ausbleiben des Rezidivs mit einem deutlichen Anstieg der Diversität korrelierte. Diese Abhängigkeit der Immunglobulin-Repertoires von der Tumorgröße ist bei den B-Zellen nicht festzustellen und somit eine spezifische Eigenschaft der myeloiden Zellen als Reaktion auf die Tumorlast.

Nach einer Vergrößerung des Patientenkollektivs ist es denkbar, dass die Diversität der Immunglobulin-Repertoires aus Makrophagen als Bestandteil eines Immunmonitorings für personalisierte Therapieansätze nutzbar werden kann.

---

## Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and highest malignant human brain tumor. In most cases, the GBM is fatal 12-15 months after diagnosis, which shows the need for new, not exclusively palliative-oriented therapy options. Tumor-associated macrophages are considered a major mediator of tumor progression in GBM. It is known from current studies that - contrary to the paradigm - subpopulations of monocytes, in-vitro polarized macrophages and tumor-associated macrophages can also express variable immunoglobulins and T cell receptors, although the functional relevance of this finding is not clear.

For this purpose, the immunoglobulin repertoire of the circulating monocytes and tumor macrophages as well as corresponding B cells in 15 glioblastoma patients were examined by PCR and Sanger sequencing. In addition, the repertoire of two other patients was examined using RACE-PCR and NGS over time after tumor resection in the sense of a method comparison. In order to get a more complete picture of the situation, other aspects such as the immune competence of the different cell populations and the cytokine levels in the sera of the patients at different times were analyzed.

Antibody-expressing monocytes and macrophages were found in all patients. The respective immunoglobulin repertoire is significantly less diverse than that of the corresponding B cells. In addition, there was a restriction of the repertoire diversity in tumor macrophages compared to the monocytes in the periphery. We were able to show for the first time that the diversity of the immunoglobulin repertoire correlated inversely with the respective tumor volume, which suggests an immunosuppressive effect of the tumor. This could be further substantiated by the HLA-DR concentrations and the cytokine levels in the serum of the patients. In addition, the examination of the repertoire over time after the tumor resection revealed that there was less diversity at the time of the relapse than at the tumor resection, while the absence of the relapse correlated with a significant increase in diversity. This dependence of the immunoglobulin repertoire on the tumor size cannot be determined in the B cells and is therefore a specific property of the myeloid cells in response to the tumor load.

After expanding the patient population, it is conceivable that the diversity of the immunoglobulin repertoire from macrophages can be used as part of an immune monitoring for personalized therapy approaches.





# Einleitung

## 1. Innates und kognates Immunsystem

Das Immunsystem erfüllt die wichtige Funktion der Erkennung von Selbst und Nicht-Selbst. Hierbei unterscheidet das Immunsystem zwischen körpereigenen Zellen und beispielsweise von außen eindringenden Erregern wie Bakterien und Viren, die potentiell Schaden anrichten können. Wir unterscheiden das Immunsystem in das angeborene (innate) und das erworbene (kognate) Immunsystem, welche unterschiedliche Bereiche der körpereigenen Abwehr abdecken.

Das sehr alte innate Immunsystem, das in Wirbeltieren, Wirbellosen und sogar Pflanzen entdeckt wurde, agiert hauptsächlich durch Neutrophile, mononukleäre Phagozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die relativ unspezifische zelluläre und molekulare Effektorfunktionen aufweisen [1]. Die Verteidigungsstrategie dieser Effektorzellen ist die Erkennung von konservierten Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), wie Lipopolysacchariden (LPS), Lipoteichonsäure (lipoteichoic acid, LTA) und Glykanen durch vordefinierte und nicht-variable Pathogen- oder Muster-Rezeptoren wie den Toll-like Rezeptoren. Das innate Immunsystem kann daher sehr schnell z.B. auf eindringende infektiöse Mikroorganismen reagieren, da es keine Antigen-spezifische Erinnerungsfunktion benötigt und so ko-stimulatorische Moleküle, Alarmzytokine und Chemokine unmittelbar zur Verfügung stellen kann [2-5]. Diese Funktionen führen zudem sekundär zur Unterstützung der Entwicklung einer kognaten Immunantwort.

Im Gegensatz hierzu ist das vor weniger als 500 Millionen Jahren entstandene kognate Immunsystem nur in Wirbeltieren zu finden [1]. Der Kern des adaptiven Immunsystems sind die B- und T-Lymphozyten und deren Fähigkeit variable Immunrezeptoren, wie Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren aus nukleären chromosomal kodierten Genkassetten herzustellen und zu exprimieren. Diese bieten die Möglichkeit sehr spezifisch gegen Pathogene vorzugehen. Da kognate Immunzellen in einen Memomodus wechseln können, entsteht ein immunologisches Langzeitgedächtnis, was teils lebenslange Immunität gegen ein Antigen verleiht. Da das Rearrangement der genomischen Segmente für die Rezeptoren auf stochastische Weise erfolgt und hinsichtlich der Spezifität extrem flexibel ist, bietet das kognate System den Vorteil spezifische Immunantworten gegen (mehr oder weniger) alle Antigene zu erzeugen. Der komplizierte Mechanismus des

Rearrangements benötigt jedoch Zeit und erklärt daher die verzögerte Antwort durch das kognate Immunsystem.

## **2. Zellen des innaten und kognaten Immunsystems**

Alle im Blut gefundenen Zellen des Immunsystems stammen von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab (Abbildung 1). Diese pluripotenten Zellen teilen sich klassisch in zwei Wege auf – den lymphoiden Vorläufer, aus dem B- und T-Zellen entstehen, und den myeloiden Vorläufer, der sich zu Monozyten, Granulozyten, dendritischen Zellen, Erythrozyten und Megakaryozyten entwickeln kann.

Jeder dieser vielen verschiedenen Zelltypen agiert im Rahmen der Immunantwort unterschiedlich und hat seine spezifische Aufgabe. So exprimieren die B- und T-Zellen, die im Knochenmark bzw. im Thymus differenzieren, Antigen-spezifische Immunglobuline bzw. T-Zell-Rezeptoren und bilden die Effektorzellen des kognaten Immunsystems.

Bei den Zellen des myeloiden Vorläufers bilden die Granulozyten die größte Fraktion der myeloiden Zellen im Blut. Gemeinsam mit Monozyten und dendritischen Zellen zirkulieren sie im Blut und wandern in das Gewebe ein, wenn sie zu einer Infektions- oder Entzündungsstelle rekrutiert werden, um dort zu Makrophagen auszudifferenzieren. Makrophagen bilden die größte Fraktion der im Gewebe befindlichen Phagozyten des innaten Immunsystems. Die Neutrophilen hingegen phagozytieren im Blut Bakterien, während Eosinophile und Basophile in Allergiereaktionen und die Abwehr von Parasiten involviert sind [1, 6].

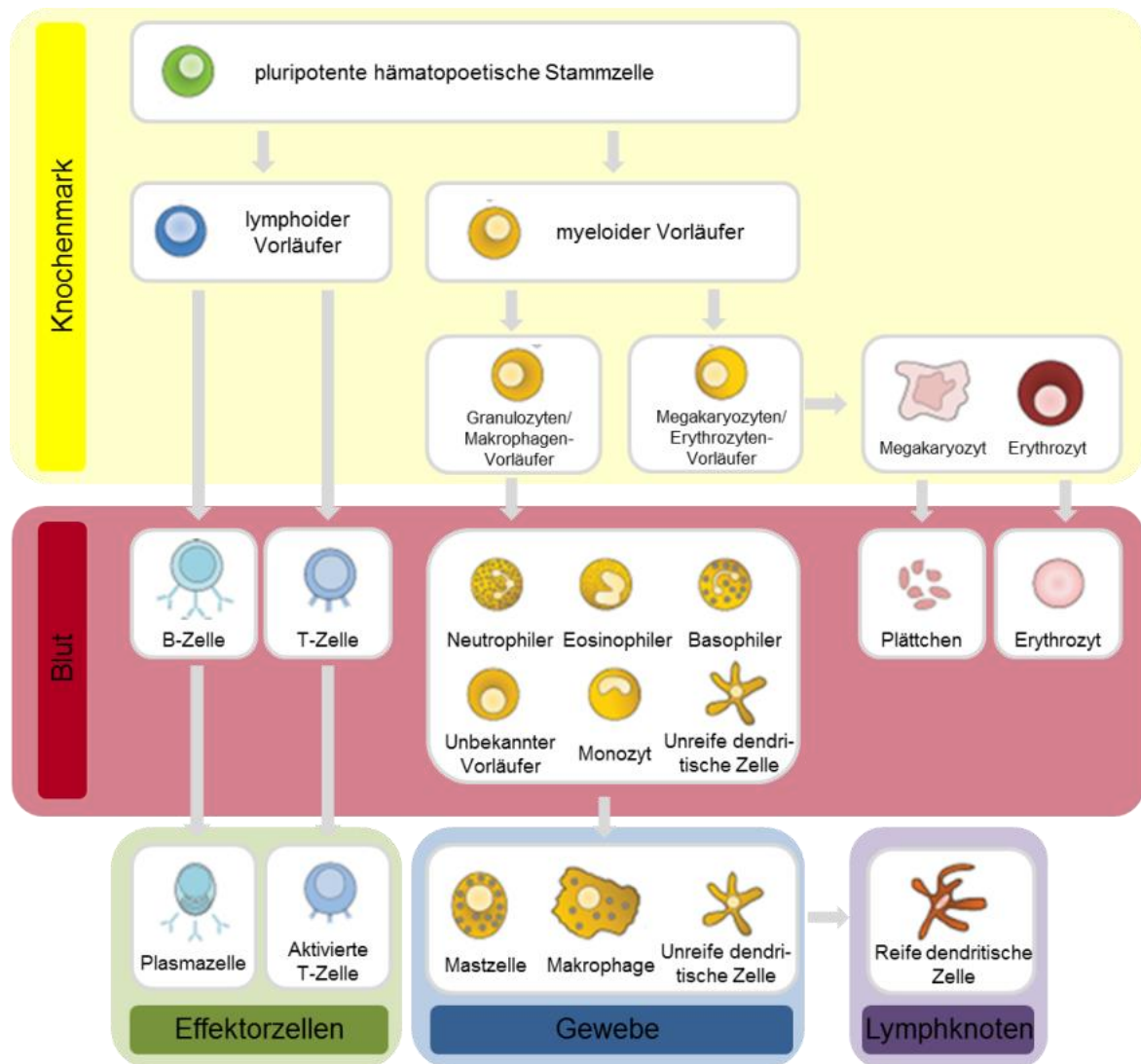


Abbildung 1: Entwicklung der verschiedenen Blutzellen (adaptiert von [6])

Alle im Blut zu findenden Zellen entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Diese teilen sich in den lymphoiden und myeloiden Vorläufer auf, aus denen dann die B- und T-Zellen sowie die Monozyten und Makrophagen entstehen.

### **3. Monozyten und Makrophagen – Effektorzellen des innate Immunsystems**

Monozyten gehören zu den hauptsächlichen Effektorzellen des innate Immunsystems. Sie entstehen im Knochenmark und zirkulieren anschließend im Blut. Sie sind die Vorläufer der Zellen des mononuklearen phagozytischen Systems, bestehend aus Makrophagen und dendritischen Zellen. Diese sind essentiell für die Erhaltung und Verteidigung des Wirtsgewebes, indem sie eindringende Partikel aufspüren und verschlingen und wenn nötig eine pro-inflammatorische Antwort auslösen. Die hierbei von Makrophagen freigesetzten Zytokine können Neutrophile und Monozyten aus dem Blutkreislauf anlocken und so die Entzündungsreaktion im Gewebe auslösen [6]. Da den Makrophagen eine Vielzahl von Aufgaben zuteilwird, ist auch eine Vielzahl unterschiedlicher Makrophagen nötig. Diese entstehen durch unterschiedliche Aktivierung, die hauptsächlich vom direkten Umfeld der Zellen abhängt.

#### **3.1. Entwicklung der Makrophagen**

Die Entwicklung der Makrophagen beginnt im Knochenmark mit der Kolonie-bildenden Einheit der Granulozyten und Makrophagen (colony-forming unit granulocyte-macrophage, CFU-GM), dem Vorläufer der Makrophagen und Neutrophilen [7]. Bereits frühe Monoblasten, die aus dem CFU-GM entstehen, besitzen Fc-Rezeptoren, welche die konstante Region von IgG binden können. So können z.B. IgG-beschichtete (opsonierte) Zellen erkannt und phagozytiert werden. Im nächsten Schritt der Entwicklung teilen sich die Monoblasten in zwei Promonozyten mit Rezeptoren für IgG und C3b, einem Teil des Komplementsystems [8]. Diese Promonozyten sind die direkten Vorläufer der Monozyten. Sie verbleiben bis zu 24 Stunden im Knochenmark und migrieren dann in die Blutbahn, wo sie etwa 70 Stunden überleben. Der gesamte Zyklus von Monoblast zu Monozyt dauert etwa 28 Stunden [9]. Die peripheren Blutmonozyten machen etwa 1-6% aller weißen Blutzellen aus, was bedeutet, dass sich ständig durchschnittlich  $1,5-3,5 \cdot 10^9$  Blutmonozyten in der Zirkulation eines Erwachsenen befinden. Ihre Hauptaufgabe ist es, vornehmlich an Entzündungsstellen, in das Gewebe zu migrieren und dort zu Makrophagen zu differenzieren (resident tissue macrophages). Die Extravasation der Monozyten in das umliegende Gewebe wird durch das Lymphozyten-Funktion assoziierte Antigen 1 (lymphocyte function-associated antigen 1, LFA-1) auf der Oberfläche der Monozyten eingeleitet. Es interagiert mit dem intrazellulären Adhäsionsmolekül 1 (endothelial intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1/CD54) der Endothelzellen und ermöglicht den Austritt der Monozyten aus dem Blutkreislauf [10]. An der Stelle der Entzündung stimulieren

Interleukin-1 (IL-1) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) zusätzlich die CD54-Expression auf den Endothelzellen, was die chemotaktische Migration der Monozyten weiter fördert. Sobald die Monozyten im Gewebe eingetroffen sind, erfolgt die Differenzierung zu M1-Makrophagen, die dort dann mehrere Monate verbleiben. Ein anderer Typ, die M2-Makrophagen, hingegen kann nach der Einwanderung aus erwachsenen Zellen proliferieren. M2-Makrophagen sind hauptsächlich in Lungengewebe, der Milz und dem Knochenmark zu finden und starten ihre Differenzierung als Antwort auf IL-4 [11, 12]. Aufgrund ihrer Funktion als Phagozyten werden Makrophagen dem innate Immunsystem zugeordnet. Sie besetzen eine Schlüsselrolle bei chronischen Entzündungen [13, 14].

## **3.2. Aktivitäten der Makrophagen**

### **3.2.1. Phagozytose**

Die wichtigste Aufgabe der Makrophagen ist die Phagozytose, welche als erstes von Metchnikoff beschrieben wurde [15]. Sie ist der Hauptweg des Organismus sich von Pathogenen und Zellschrott zu befreien. Die Makrophagen exprimieren Mustererkennungsrezeptoren (pattern-recognition receptors, PRR), Fc- und Komplementrezeptoren auf ihrer Oberfläche, wodurch sie in der Lage sind PAMPs und durch Antikörper oder Komponenten des Komplementsystems opsonierte Ziele zu erkennen. Bindet nun ein Partikel an den Rezeptor des Makrophagen, so regruppieren sich die Rezeptoren auf der Zelloberfläche und sorgen für eine Re-Organisation des submembranen Aktin-basierten Zytoskeletts. Dies führt zur Aufnahme des Partikels, welcher nun in einem Phagosom im Makrophagen vorliegt. Durch die Interaktion mit Teilen des endosomalen/ lysosomalen Systems kommt es zur Formation eines Phagolysosoms und der Partikel im Inneren wird durch hydrolytische Enzyme abgebaut [16, 17]. Des Weiteren sind Makrophagen in der Lage sogenannte Scavenger-Rezeptoren zu exprimieren, wodurch es ihnen möglich ist, Apoptose-assoziierte Moleküle auf der Oberfläche apoptotischer Zellen zu detektieren. Hierdurch spielen die Makrophagen eine bedeutende Rolle in der Beseitigung von zellulärem Debris aus dem Organismus [18].

### **3.2.2. Chemotaxis**

Die Fortbewegung der Makrophagen wird von chemotaktischen Signalen gesteuert. Die Makrophagen können sich aktiv entlang eines Gradienten chemotaktischer Faktoren, die von Bakterien oder anderen Immunzellen freigesetzt werden, bewegen. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem das Komplementprotein C5a und das Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1). Um sich entlang des

Gradienten fortbewegen zu können, binden die Makrophagen die chemotaktischen Faktoren, was zur Ausbildung von Pseudopodien führt. Mit deren Hilfe können sich die Makrophagen anschließend aktiv entlang der Endothelzellschicht zur Stelle der Entzündung bewegen [16].

### **3.2.3. Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung**

Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen sind sogenannte professionelle Antigen-präsentierende Zellen. Die Antigen-Präsentation erfolgt durch MHC I- oder MHC II-Moleküle (Haupthistokompatibilitätskomplex/ major histocompatibility complex) auf der Zelloberfläche. Bindet ein Antigen nun an ein MHC I-Molekül, so führt dies zur Aktivierung von CD8-positiven T-Zellen, die sowohl den Makrophagen als auch das von ihm aufgenommene Pathogen zerstören. Eine Bindung des Antigens an ein MHC II-Molekül führt zur Erkennung durch T-Helferzellen, die deren Aktivierung auslöst [16, 19].

### **3.2.4. Kontrolle von Tumorzellen**

Die Verteidigung des Körpers gegen entstehende Tumore erfolgt auf verschiedenen Wegen, jedoch stets unter Mithilfe von Makrophagen. Diese können die Tumorzellen entweder in einem antikörperunabhängigen Prozess lysieren oder durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) bekämpfen. Ist eine Tumorzelle immunogen, weil sie z.B. ein dem Immunsystem unbekanntes Neoantigen exprimiert, gegen welches B-Zellen einen Antikörper gebildet haben, dann werden die Antikörper-besetzten Tumorzellen von den Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der Makrophagen erkannt und durch von ihm ausgeschüttete zytotoxische Stoffe wie Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies zerstört [20]. Tumorzellen sind allerdings in der Lage Strategien zu entwickeln, um diese Reaktionen zu unterdrücken und sich so der Immunantwort des Körpers zu entziehen, was zu Tumorentwicklung und -progression führt. Auch können Tumorzellen durch sekretierte Stoffe Makrophagen „umerziehen“, wodurch diese tumor-fördernde Eigenschaften erlangen können [21].

## **3.3. Klassische und alternative Aktivierung von Monozyten**

Wie bereits beschrieben, erfüllen Makrophagen eine große Palette von Aufgaben. Daher sind auch mehrere Subtypen notwendig, die durch ihre verschiedenen Wege der Aktivierung unterschieden werden. So entstehen die klassisch aktivierten und alternativ aktivierten Makrophagen.

Die klassisch aktivierten Makrophagen – auch M1-Makrophagen genannt – werden durch IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , das von T<sub>H</sub>1-Zellen produziert wird, oder durch Stimulation von PAMP wie LPS, LTA oder dsDNA aktiviert (Abbildung 2) [22]. Sie setzen pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 oder TNF- $\alpha$ , sowie reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies wie Stickstoffmonoxid (NO), Peroxinitrit, Hydrogenperoxid oder Superoxid frei [23-27]. Zusätzlich phagozytieren sie Pathogene mit Antikörpern gegen PAMP und präsentieren selbst Antigene für T-Zellen, um die T<sub>H</sub>1-Antwort zu fördern und werden so selbst ein Teil davon [28, 29]. Diese T<sub>H</sub>1-Antwort ist gegen den Tumor gerichtet, allerdings können lange Entzündungsprozesse zu Gewebs- und DNA-Schäden führen und somit selbst die Tumorentstehung fördern [30].

Um diesem Effekt entgegenzuwirken, haben M2-Makrophagen aufgrund ihrer alternativen Aktivierung eine anti-inflammatorische Wirkung. Die alternative Aktivierung beruht auf den T<sub>H</sub>2-typischen Zytokinen IL-4 und IL-13 [31-33]. M2-Makrophagen sekretieren große Mengen anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$ . Sie wirken somit immunsuppressiv und inhibieren trotz geringer IL-12-Expression die T-Zell-Proliferation [34-40]. Zusätzlich weisen M2-Makrophagen eine erhöhte Arginase-1-Aktivität auf, die durch den so eintretenden L-Arginin-Mangel die Bildung der für T-Zellen nötigen CD3 $\zeta$ -Kette unterdrückt [38, 41].

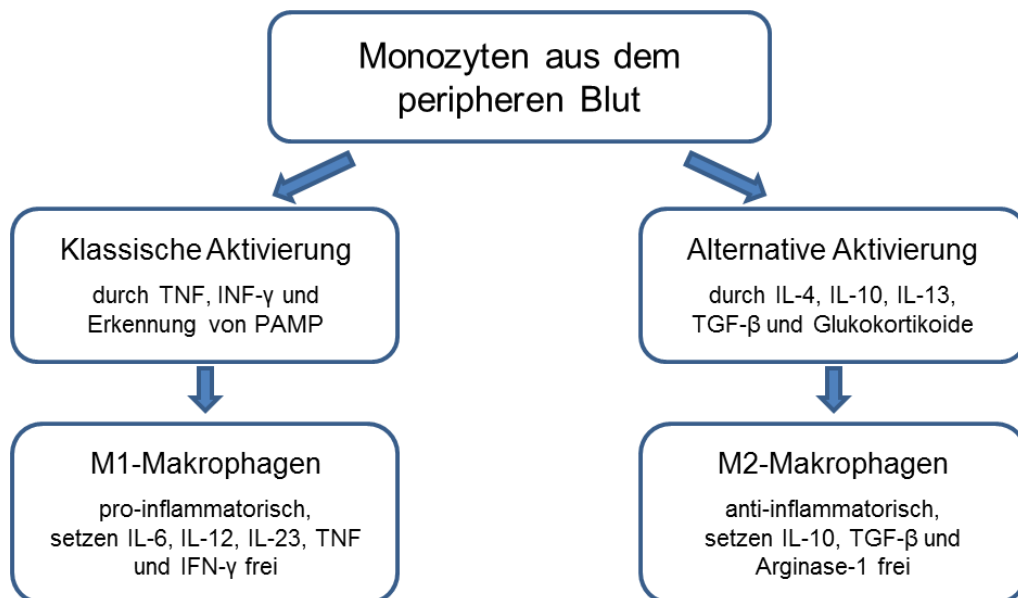


Abbildung 2: Klassische und alternative Aktivierung von Makrophagen (adaptiert von [42])

Periphere Monozyten werden durch die klassische Aktivierung mit TNF und IFN- $\gamma$  zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen. Um deren Effekt entgegenzuwirken und ein Gleichgewicht herzustellen, entstehen durch die alternative Aktivierung mittels IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$  die anti-inflammatorischen M2-Makrophagen.

### 3.4. Makrophagen im Tumormilieu

Makrophagen aus gesundem oder entzündetem Gewebe entsprechen der Definition von M1-Makrophagen und besitzen auch die entsprechenden Fähigkeiten wie die Lyse von Tumorzellen, die Antigenpräsentation für T-Zellen und die Produktion immunstimulatorischer Zytokine. In Tumormakrophagen (TAM) hingegen sind diese Fähigkeiten stark vermindert oder sogar ganz abhandengekommen [43]. Die von Tumoren sezernierten Zytokine IL-4 und IL-10 verändern die TAM hin zu M2-Makrophagen [42]. TAM zeigen eine reduzierte Antigenpräsentation, unterdrücken die T-Zell-Proliferation und – Aktivität und fördern die Angiogenese, was zu einer stärkeren Tumorzell-Migration führt und ein invasiveres Wachstum erlaubt [42, 44]. Mit diesen Eigenschaften fördern sie das Tumorstadium einerseits aktiv durch die Förderung der Zellproliferation und andererseits indirekt durch das von ihnen kreierte immunsuppressive Umfeld [45-49]. Aus diesem Grund ist die Infiltration von Tumoren mit Tumor-assoziierten Makrophagen auch mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert [50-52].

Aktuelle Studien zeigen, dass es auch weitere Formen von TAM gibt, deren Transkriptom-Analysen ein Muster zwischen dem von M1- und M2-Makrophagen zeigen [53] (Tabelle 1). Es zeigt sich auch, dass M1 und M2 umkehrbare Stadien mit einem Kontinuum dazwischen sind, die sehr sensitiv auf Änderungen im molekularen Umfeld reagieren. So werden M1-Makrophagen während der Tumorprogression durch die immer weiter sinkende NF-κB-Aktivität zu M2-Makrophagen „umprogrammiert“. Im Gegenzug ist es möglich, durch die Erhöhung von NF-κB zurück zum M1-Stadium der Makrophagen zu gelangen [37, 54].

Doch trotz all dieser bisherigen Erkenntnisse bleibt die exakte Rolle der TAM in Tumorprogression, Metastasierung und Immunsuppression im Umfeld des Tumors unklar.

	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>TAM</b>
INOS-Produktion	hoch	nein	ja
CD163-Expression	nein	ja	ja
Antwort auf Stimulation durch	IFN-γ, LPS, GM-CSF	IL-4, IL-13, M-CSF	Mikroumfeld des Tumors
Zytokin-Produktion	IL-1, IL-12, IL-18, TNF-α	IL-10, IL-12 (niedrig)	IL-10, TGF-β, CCL2, CCL5

Tabelle 1: Charakteristika von M1- und M2-Makrophagen (adaptiert von [55])

Charakteristische Eigenschaften vom Makrophagen im Vergleich zwischen den M1- und M2-Subtypen sowie den Tumor-assoziierten Makrophagen.



### **3.4.1. Hypoxie und Metastasierung**

Die schnelle und unkontrollierte Zellproliferation bei Tumorerkrankungen führt zu Hypoxie und Nährstoffmangel, wodurch das Gewebe nekrotisch wird. Durch die Nekrose werden Phagozyten zum Tumorgewebe angelockt [56, 57]. Um dem entgegenzuwirken, exprimieren Tumor-assoziierte Makrophagen Wachstumsfaktoren wie VEGF-C (Endothelzellwachstumsfaktor/ vascular endothelial growth factor). Dieser stimuliert die Bildung von neuen Lymph- und Blutgefäßen, wodurch das Tumorgewebe wieder ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird [58]. Des Weiteren können TAM nicht nur durch VEGF die Vaskularisierung stimulieren, sondern auch durch die Sezernierung von CSF-1 (colony stimulating factor-1) und EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor/ epidermal growth factor) Tumorzellen dazu bringen in den Blutkreislauf zu wandern. Aufgrund dessen ist eine hohe TAM-Zahl im Primärtumor mit einer frühen Metastasierung assoziiert [52, 59]. Den Nachweis für die Beteiligung der Makrophagen an der Metastasierung erbrachten Oosterling et al. als sie zeigten, dass in Makrophagen-depletierten Mäusen nach Tumoringjektion ein langsamerer Tumorprogress stattfand als in den Kontrollmäusen [60].

### **3.4.2. Immunsuppression**

Tumorzellen drängen Makrophagen durch die Produktion inhibitorischer Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  aktiv zur Differenzierung in M2-Makrophagen, was zur Suppression der Zelltoxizität und der MHC II-Expression führt und in der fehlenden Antigenpräsentation für T-Zellen endet [61, 62]. Des Weiteren ist die Expression von IL-2, welches in die T-Zell- und NK-Zell-Toxizität und -Proliferation involviert ist [63], in TAM deutlich reduziert [61, 64]. Auf diesem Weg sorgen die Tumorzellen aktiv für eine Immunsuppression und entgehen so der normalen Immunantwort.



## 4.2. Funktion

Immunglobuline können als spezifische Erkennungsmoleküle in zwei Formen vorkommen, als membrangebundene oder als sezernierte und im Blut zirkulierende Antikörper.

In B-Zellen formen membrangebundene Antikörper zusammen mit den Transmembranproteinen Ig- $\alpha$  und Ig- $\beta$  den B-Zell-Antigen-Rezeptor [69]. Ein Crosslinking dieser B-Zell-Antigen-Rezeptoren triggert verschiedenste Signalwege innerhalb der Zelle, wie beispielsweise die Phospholipase Cy2-, Phosphoinositide 3-Kinase- und GTPase-Signalwege. Diese helfen der B-Zelle Prozesse wie Proliferation, Deletion, Anergie, Rezeptor-Editing und Überleben zu regulieren [70].

Serum-Antikörper erreichen als lösliche Moleküle ihre spezifischen Antigene und aktivieren nach Bindung Effektormoleküle wie Komplementproteine und Fc-Rezeptoren (FcR) [67]. Die Fc-Rezeptoren binden den konstanten Teil des Antikörpers und werden auf der Oberfläche von Effektorzellen wie Makrophagen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, Mastzellen, NK-Zellen, B-Zellen, T-Zellen und Gewebsmakrophagen exprimiert [71, 72]. Ein Crosslinking der Fc-Rezeptoren auf den entsprechenden Zellen sorgt für eine Vielfalt von Interaktionen wie Phagozytose, Endozytose, Antikörper-vermittelte Zelltoxizität, Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Regulation der B-Zell-Aktivität und Antikörperproduktion [71, 73, 74].

## 4.3. Entstehung der Antikörper-Diversität

Je größer die Vielfalt an verschiedenen Antikörpern ist, desto höher ist die Chance auf jedes eindringende Pathogen spezifisch reagieren zu können. Die erforderliche Antikörpervielfalt wird durch mehrere Mechanismen genetischer Rekombination und genetischer Reifung erreicht. Hierbei unterscheidet man zwischen der sogenannten primären und sekundären Diversifikation, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfinden.

### 4.3.1. Primäre Diversifikation

Die primäre Diversifikation bildet den Ausgangspunkt der Immunglobulin-Vielfalt. Sie beinhaltet die grundlegende Auswahl der V-, D- und J-Ketten, ihre Kombination durch RAG (recombination activating gene) sowie das Einfügen von P- und N-Nukleotiden als auch die Deletion einzelner Nukleotide im Grenzbereich zweier verbundener Segmente. Auf die einzelnen Aspekte der primären Diversifikation wird im Folgenden näher eingegangen.

## Auswahl der V-, D- und J-Ketten

Der größte Teil der Diversität entsteht durch die hohe Menge an V-, D- und J-Ketten, die jeweils beliebig kombiniert werden können. Ziel der Rekombination ist die Erzeugung einer Antigenbindungsstelle, die durch das durch räumliche Beziehung entstehende Zusammenwirken von drei CDRs ("complementary determining region 1-3" = CDR1-3) gebildet wird. Hierbei entstehen drei getrennte Bereiche, die eine größere Diversität aufweisen als die restlichen Bereiche (Abbildung 4). CDR1 und CDR2 sind dabei durch das V-Kettengen genomisch kodiert, während die CDR3-Region durch einen genetischen Rekombinationsprozess entsteht. Bei den Schwereketten bildet das „Zusammenschweißen“ von jeweils einem V-, D- und J-Segment die CDR3-Region der schweren Kette, während die CDR3-Region der Leichtketten durch Kombination von V- und J-Sequenzen gebildet wird. Aufgrund der zufälligen Kombination von einzelnen Genabschnitten bei ihrer Entstehung und ihren direkten Einfluss auf die Antigenbindungsstelle sind die CDRs für den größten Teil der Diversität verantwortlich. Zusätzlich wird die Variabilität durch das Anhängen von N- und/ oder P-Nukleotiden oder durch die Deletion von Nukleotiden an der Grenze zwischen den einzelnen Segmenten, besonders an der CDR3, erhöht. Durch diese drei Mechanismen entstehen insgesamt geschätzt  $10^{11}$  mögliche unterschiedliche Kombinationen [6].

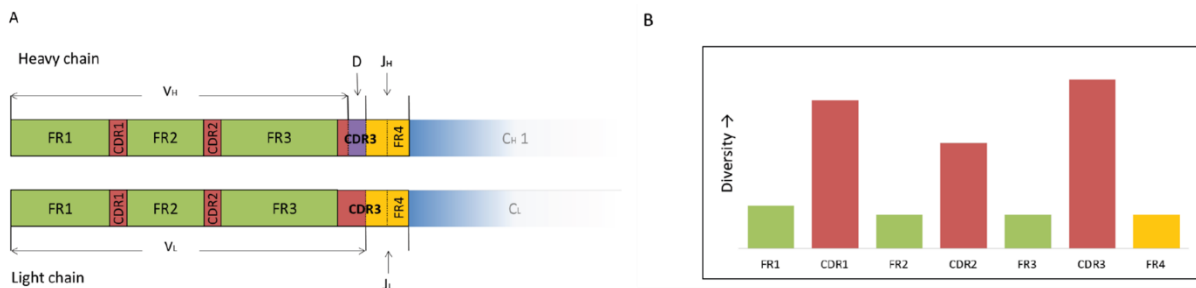


Abbildung 4: Diversität der CDR [6]

(A) Die V-Kette der Schwer- und Leichtketten ist in die Segmente FR1, CDR1, FR2, CDR2 und FR3 aufgeteilt. Die CDR3-Region, die für den größten Teil der Variabilität verantwortlich ist, erstreckt sich bei den Schwereketten über die Grenze von V, D und J und bei den Leichtketten über den Grenzbereich zwischen V und J. (B) Die Diversität unterscheidet sich zwischen den einzelnen Bereichen der Immunglobuli-Sequenz. Die CDRs weisen eine deutlich höhere Diversität auf als die FRs.

Die Gene der V-, D- und J-Segmente der Schwereketten sind im Genlocus 14q32.33 auf Chromosom 14 codiert. Insgesamt sind für die Schwereketten 142  $V_H$ -Gene, 27  $D_H$ -Gene und neun  $J_H$ -Gene bekannt. Hierbei sind jedoch nicht alle Gene funktionell, da ein Teil auch als Pseudogen klassifiziert werden kann [75]. Die variable Region der Leichtketten besteht aus je einem V- und einem J-Segment, deren Gene auf Chromosom 2 am Locus 2p11.2 codiert sind. Hier wurden bisher 76  $V_K$ -Gene und fünf  $J_K$ -Gene identifiziert [76]. Die Gene

des zweiten Leichtketten-Isotyps, Ig $\lambda$ , sind auf Chromosom 22 codiert. Hier finden sich im Locus 22q11.2 74 V $\lambda$ -Gene und sieben J $\lambda$ -Gene [77].

Anhand ihrer Homologien sind die V- und D-Gene in Familien gruppiert. Innerhalb einer Familie liegt die Übereinstimmung der Nukleotid-Sequenz zwischen den einzelnen Ketten bei über 80%. Die V<sub>H</sub>- und V<sub>K</sub>-Gene sind somit jeweils in sieben Familien unterteilt, die V $\lambda$ -Gene in elf Familien und die D-Gene in sechs Familien [78, 79].

### **V(D)J-Rekombination durch RAG und RSS**

Korsmeyer et al. konnten bereits 1981 zeigen, dass die Gen-Rekombination der Immunglobuline einer ganz bestimmten Hierarchie folgt. So wird zuerst die Schwereketten rekombiniert, indem das maternale oder das paternale Allel verwendet wird, jedoch niemals beide. Vorausgesetzt die Rekombination der Schwereketten war erfolgreich, erfolgt die Rekombination der Ig $\kappa$ -Leichtkette. Im Falle einer Deletion oder einer fehlerhaften Rekombination des ersten Allels wird das zweite vorhandene Allel für die Rekombination genutzt. Sollte auch dies nicht zum Erfolg führen, so erfolgt der Wechsel zur Ig $\lambda$ -Leichtkette, die bis zu diesem Zeitpunkt in der Keimbahn-Konfiguration verharret [80].

Zur Initiierung der V(D)J-Rekombination ist die VDJ-Rekombinase RAG (recombination-activation gene) von Nöten. Dieser Enzymkomplex besteht aus den beiden Molekülen RAG1 und RAG2 [81, 82]. Innerhalb des Komplexes verbinden sich drei bis fünf RAG2-Moleküle mit einem RAG1 [83, 84]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Knock-Out von RAG1 und RAG2 zum Fehlen von reifen B- und T-Lymphozyten führt, da diese keine erfolgreiche V(D)J-Rekombination ausführen können [85, 86]. Dieser Effekt ist so stark ausgeprägt, da nur RAG1 und RAG2 den benötigten DNA-Bruch an den V(D)J-Rekombinationsstellen verursachen können [81].

Die Rekombination eines funktionellen Antikörpers basiert auf der Verbindung der V-, (D-) und J-Ketten an den korrekten Stellen. Dieser Prozess wird durch konservierte Nukleotidsequenzen an den kodierenden Sequenzen, die Rekombinationssignalsequenzen (recombination signal sequences, RSS), gesteuert [87]. Am 5'-Ende bestehen die RSS aus einem hoch konservierten Heptamer (5'-CACAGTG-3'), das direkt auf die kodierende Sequenz folgt. An das Heptamer schließt sich ein Spacer aus 12 oder 23 variablen Basenpaaren an. Den Abschluss der RSS bildet ein ebenfalls hoch konserviertes Nonamer (5'-ACAAAACC-3'). Die Spacer in der Mitte der RSS variieren in der Sequenz, jedoch beträgt ihre Länge immer 12 oder 23 Basenpaare, was der Länge von einer bzw. zwei Schleifen der DNA-Doppelhelix im Nukleosom entspricht. So binden die Proteinkomplexe immer auf der gleichen Seite des DNA-Stranges. Die Rekombination von

zwei kodierenden Segmenten erfolgt immer nach der 12/23-Regel, welche besagt, dass Segmente mit einer 12bp-RSS nur mit Segmenten mit einer 23bp-RSS und umgekehrt kombiniert werden können [88-90].

### **P-Nukleotide**

Während der Zusammenführung der V-, D- und J-Segmente werden am kodierenden Ende sogenannte Haarnadel-Strukturen (Hairpin) gebildet, wenn der RAG1/2-Komplex die RSS entfernt. Durch das Enzym Artemis wird der Hairpin anschließend an einer beliebigen Stelle wieder geöffnet [91]. Geschieht dieser Kettenbruch an einer anderen Stelle als ursprünglich durch RAG, so bildet sich aus dem kodierenden Teil ein einzelsträngiger Überhang, dessen komplementärer Teil neu gebildet wird. Wenn die DNA-Reparaturenzyme nun die Lücken füllen und die kodierenden Gensegmente ohne weitere Nuklease-Aktivität verbunden werden, so entstehen palindromische Nukleotid-Sequenzen, die sogenannten P-Nukleotide [6].

### **N-Nukleotide**

Nach der Spaltung der Hairpin-Struktur durch Artemis addiert die Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) auch ohne Template bis zu 20 Nukleotide an den einzelsträngigen Überhang. Wenn nun zwischen den kodierenden Segmenten komplementäre Basen gebildet werden, entfernen die DNA-Reparaturenzyme nicht-gepaarte Basen, füllen die fehlenden Nukleotide auf und ligieren die DNA. Die hierbei entstehenden N-Nukleotide sind hauptsächlich bei den Immunglobulin-Schwerketten zu finden, da die benötigte TdT während der Schwerketten-Rekombination am stärksten exprimiert wird [6].

### **Deletionen**

Ein weiterer Mechanismus zur primären Diversifikation des Immunglobulin-Repertoires sind Deletionen einzelner Nukleotide an der Grenze zwischen zwei kodierenden Segmenten während der Rekombinationsvorgänge. Dies geschieht häufig und ist ein stochastischer Prozess, d.h. die entfernten Nukleotide werden nicht spezifisch bestimmt, sondern zufällig ausgewählt. Die Zahl der betroffenen Nukleotide kann von einzelnen Basen bis hin zu kompletten D-Segmenten bei den Schwerketten stark schwanken. Durch das Entfernen von Basenpaaren an den Grenzen der kodierenden Regionen ist es oft unmöglich, die oben beschriebenen P- und N-Nukleotide nachzuweisen. Im Falle der Deletionen geht man davon aus, dass bei zwei von drei betroffenen Rekombinationen eine entstehende Leserahmenverschiebung zu nicht-funktionellen Antikörpergenen führt [6].

### 4.3.2. Sekundäre Diversifikation

Der bereits beschriebene RAG1/RAG2-Komplex ist mit der Rekombination der V-, D- und J-Ketten für die erste Diversifikation des Immunglobulin-Repertoires verantwortlich. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die B-Zellen noch im Keimzentrum. Dieser Mechanismus sorgt für eine große Variabilität ohne vorherigen Antigen-Kontakt. Getriggert durch die Interaktion mit Antigenen in den lymphatischen Organen kann die Diversität der Immunglobuline weiter erhöht werden. Dies geschieht durch zwei Mechanismen, die in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben werden: die somatische Hypermutation und der Klassenwechsel (Abbildung 5) [92, 93].

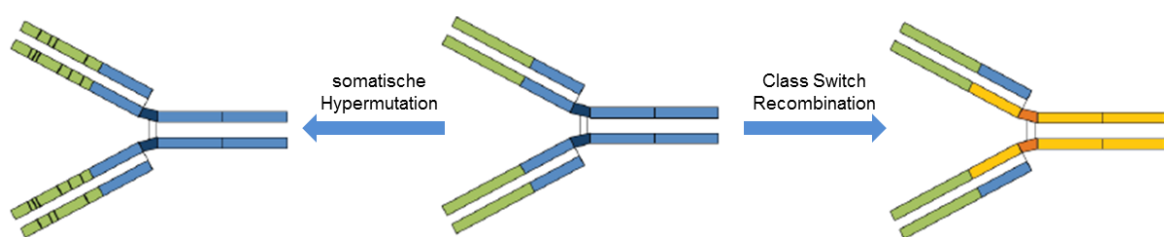


Abbildung 5: Sekundäre Diversifikation der Antikörper

#### Somatische Hypermutation

Nach der V(D)J-Rekombination beginnt die somatische Hypermutation, um die Antigen-Affinität der frisch produzierten Antikörper weiter zu erhöhen (Affinitätsreifung). Sie findet statt, während die B-Zellen im Keimzentrum proliferieren. Nach Aktivierung durch ihr kognates Antigen und Empfang des passenden Signals aktivierter T-Helferzellen werden durch eine aktivierungsinduzierte Deaminase (AID) und die räumliche Nähe zu follikulär dendritischen Zellen (FDC) Punktmutationen induziert. Die somatische Hypermutation findet hauptsächlich in neu arrangierten und aktiv transkribierten Regionen statt, da AID hierfür ein einzelsträngiges Template benötigt (Abbildung 5).

Die Rate der somatischen Hypermutation beträgt etwa eine Base pro  $10^3$  Basenpaare. Da der kodierende Bereich der variablen Regionen von Schwer- und Leichtketten etwa 700 Nukleotide umfasst, führt dies durchschnittlich zu einer Mutation pro Zellteilung. Schätzungen zufolge können so nach abgeschlossener somatischer Hypermutation bis zu 5% einer IgG-Sequenz von der ursprünglichen Keimbahnsequenz abweichen, was in etwa zehn Aminosäuren entspricht. Meist finden die Mutationen in vier bis fünf „Hotspots“ statt. Somatische Hypermutationen werden sowohl in Framework-Regionen als auch in Bereichen der CDRs beobachtet. Im Gegensatz zu den variablen Regionen sind die konstanten Bereiche nicht von der somatischen Hypermutation betroffen.

Die Einführung der Punktmutationen kann neben der Erhöhung der Antigenaffinität auch stille Mutationen oder unproduktive Rekombinationen durch die Einführung von Stopp-Codons oder Leserahmenverschiebungen zur Folge haben. B-Zellen, deren Antigen-Affinität gestiegen ist, erhalten eine bessere „Zytokinbelohnung“ und selektionieren so über die Zeit B-Zell-Klone gleicher Spezifität aber schwächerer Antigenbindung [94, 95].

### **Klassenwechsel**

Neben der somatischen Hypermutation ist es ebenfalls möglich die Affinität der Antikörper zu erhöhen, indem ein Wechsel des Isotyps stattfindet. Dieser wird durch T-Zellen veranlasst, indem der CD40L (CD40-Ligand), der sich auf der T-Zelle befindet, mit dem CD40-Rezeptor auf der Oberfläche der B-Zelle interagiert. Weiterhin haben Zytokine einen Einfluss darauf, zu welcher Immunglobulinklasse der Wechsel stattfindet. So führt eine Stimulation mit IL-4 beispielsweise zu einem Wechsel zu IgE.

Auch für den Klassenwechsel, der in den Keimzentren der Lymphfollikel stattfindet, wird die aktivierungsinduzierte Deaminase benötigt. Es erfolgt eine somatische Rekombination zwischen der bereits gebildeten VDJ-Kassette mit einem dahinter gelegenen konstanten Bereich durch die Deletion der dazwischenliegenden DNA-Sequenz. Da hieran konservierte DNA-Sequenzen, die sogenannten Switch-Regionen, beteiligt sind, die in jedem Intron vor dem konstanten Bereich liegen, spricht man auch von einer Switch-Rekombination. Die Switch-Regionen umspannen etwa ein bis zehn Kilobasen und enthalten eine hohe Anzahl konservierter Tandem-Wiederholungen. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen einer oder mehrerer Switch-Regionen zum Ausbleiben des Klassenwechsels führt [95-97].

### **4.4. Untersuchung der Antikörper-Diversität mittels Sequenzierung**

Die RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA ends) ist eine PCR-Technik, die eine Bias-freie Amplifikation von Sequenzen in voller Länge garantiert, da hier keine Consensus-Primer in der variablen Region der Immunglobuline verwendet werden. In der vorliegenden Studie wurde die RACE-PCR mit Next-Generation-Sequencing (NGS) kombiniert, um eine möglichst große Anzahl an Sequenzen zu generieren.

Bereits bei der Synthese der RACE-cDNA werden hierbei spezifische RT-Primer für die gewünschte Immunglobulin-Amplifikation eingesetzt. Hierfür ist lediglich eine RNA-Menge von 10ng notwendig, um die Reaktion durchzuführen. Das Anfügen von SMARTer II A Oligos am 5'Ende der cDNA im zweiten Teilschritt der cDNA-Synthese ermöglicht die Amplifikation der vollständigen cDNA-Sequenz vom 5' Ende bis zum spezifischen



Immunglobulin RT-Primer. In der RACE-Reaktion kommt eine Kombination aus kurzen und langen Universal-Primern sowie spezifischen, selbst designten Primern für die gewünschten Immunglobulin-Schwer- und Leichtketten zum Einsatz. Durch den universellen SMARTer II A Oligo Tag am 5' Ende kann eine Amplifikation aller V-Genklassen unabhängig von der Primerfunktionalität von Consensus-Primern gewährleistet werden, was zu einer gleichmäßigen, Bias-freien Amplifikation der cDNAs führt. Das hierbei entstehende PCR-Produkt kann dann sowohl zur Klonierung als auch zum Next-Generation-Sequencing eingesetzt werden. [98]

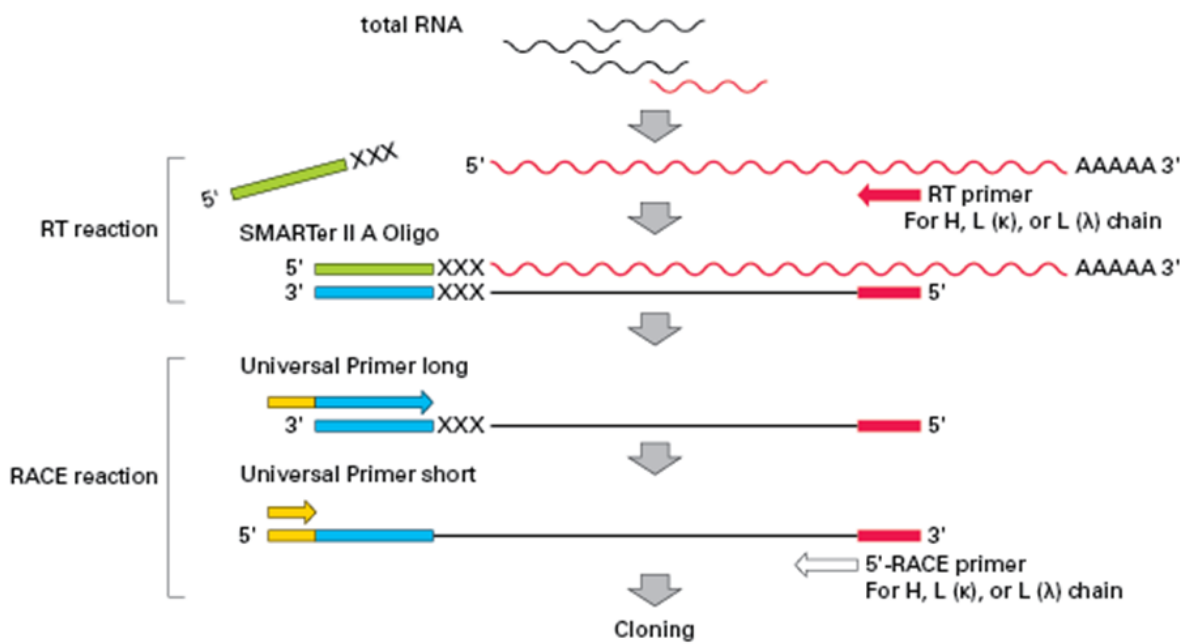


Abbildung 6: Mechanismus der SMARTer RACE-PCR [98]

## 5. Immunglobuline und Nicht-B-Lymphozyten

Das traditionelle Dogma der Immunologie besagt, dass die Rekombination variabler Immunrezeptoren wie Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren ausschließlich den B- bzw. T-Lymphozyten vorbehalten ist [14, 99-101]. Antikörper, die in Tumoren gefunden wurden, die keine B-Zellen besitzen, wurden lange Zeit sogenannten „bewaffneten Makrophagen“ („armed macrophages“) zugeordnet. „Bewaffnet“ bedeutet in diesem Zusammenhang die Bindung von Immunglobulinen an die Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche [102].

Nach aktuellen Erkenntnissen sind jedoch auch nicht-lymphatische Zellen in der Lage variable Immunrezeptoren zu exprimieren, was in der vergangenen Dekade in immer mehr Publikationen gezeigt wurde [103, 104]. Die wesentlichen am Institut für Klinische Chemie der Universitätsmedizin Mannheim erarbeiteten Erkenntnisse von Püllmann et al. im Jahr 2006 zeigten erstmals systematisch die Expression variabler T-Zell  $\alpha\beta$ -Rezeptoren in einer Subpopulation von Neutrophilen [105-107], gefolgt von Studien, die die Rekombination von TCR  $\alpha\beta/\gamma\delta$  in Monozyten und Makrophagen [108, 109] und TCR  $\gamma\delta$  in Eosinophilen nachwiesen [110]. Weiterhin konnte der Einfluss dieser TCR-basierten variablen Immunrezeptoren aus myeloiden Zellen bei verschiedenen chronischen Erkrankungen wie Autoimmunkrankheiten [111], chronischer Parodontitis [112], Tuberkulose [109] und Arteriosklerose [113] gezeigt werden. Ferner konnte eine aktuelle Studie die Rekombination variabler TCR $\alpha\beta$  durch Makrophagen im Mikroumfeld von Tumoren nachweisen [114]. Zusätzlich brachten weitere Studien den Nachweis einer Expression von Immunglobulin-Schwer- und Leichtketten durch myeloiden Effektorzellen [115-117]. Auch in myeloiden Zellen einer akuten myeloischen Leukämie (AML) ist eine Ig-Expression zu finden [118, 119]. Neben den myeloiden Zellen, wurde auch in humanen Epithelzellen [120-125] und mehreren humanen Krebs-Zelllinien [126, 127] die Expression von Immunglobulinen gezeigt. Die wichtigen Bestandteile der V(D)J-Rekombination, RAG1/2 und AID, konnten ebenfalls in Nicht-Lymphozyten nachgewiesen werden [120, 122, 127].

Wenngleich die funktionelle Bedeutung dieser Beobachtungen bisher nicht abschließend geklärt ist, scheinen die Grenzen zwischen der traditionell streng getrennten angeborenen und adaptiven Immunität heute schwächer und beginnen hinsichtlich der strengen Beschränkung kognativer Funktionen möglicherweise zu verschwimmen.

## 6. Zytokine im Tumormilieu

Im Mikroumfeld von Tumoren spielen Zytokine eine große regulatorische Rolle. Die Funktionen der wichtigsten Zytokine, die im Rahmen der vorliegenden Studie getestet wurden, werden nachfolgend genauer erläutert.

### 6.1. Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF)

Der epidermale Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) wurde bereits 1962 von Dr. Stanley Cohen entdeckt [128]. Er ist ein prototypisches Mitglied der Familie der Peptid-Wachstumsfaktoren, die an den EGF-Rezeptor binden. Der bei dieser Bindung aktivierte Signalweg spielt eine wichtige Rolle für Proliferation, Differenzierung und Migration von verschiedenen Zelltypen, speziell jedoch bei Epithelzellen. Beim Menschen wird EGF hauptsächlich in der Niere produziert, wodurch die höchsten Konzentrationen im Urin zu finden sind [129]. EGF triggert viele biologische Funktionen wie die Zellproliferation, Differenzierung und Migration, was ihm in der normalen Entwicklung als auch in pathologischen Prozessen wie der Wundheilung [130-133] sowie der Gewebsreparatur nach Ischämien und Reperfusionsschäden [134-136] eine regulatorische Rolle zuteilwerden lässt. Eine erhöhte EGF-Aktivität aufgrund von verstärkter EGF-Synthese beziehungsweise einer Überexpression oder Mutation des EGF-Rezeptors wurde allerdings auch im Zusammenhang mit Glioblastomen, dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, Brust-, Kolorektal-, Ovar-, Prostata- sowie Pankreas-Karzinom nachgewiesen [137]. In diesen Fällen korreliert das EGF-Level mit progressivem Tumorwachstum und Metastasierung [138-141]. Aufgrund des großen Einflusses des EGF in Tumorentstehung und -progression ist eine spezifische EGF-Hemmung zu einem der Schlüsselziele in der modernen Krebstherapie geworden. Diese erfolgt zum einen durch monoklonale, therapeutische Antikörper wie Cetuximab und Panitumumab oder niedrig-molekulare Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wie Gefitinib und Erlotinib, die die Liganden-Bindung verhindern, und zum anderen durch anti-EGFR-Impfungen, die eine spezifische Immunantwort gegen EGFR-exprimierende Tumorzellen auslösen [142, 143].

## **6.2. Interleukin-8 (IL-8)**

Interleukin-8, das auch als CXCL-8 bezeichnet wird, wurde ursprünglich als potenter Chemoattraktor für Neutrophile klassifiziert [144]. Es bindet an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, die sowohl in normalen als auch in malignen Zellen exprimiert werden. Die hierbei entstehende hochaffine Bindung triggert die weiterführenden Signalwege. CXCR1 ist hierbei spezifisch für Interleukin-8, während CXCR2 auch andere CXC-Chemokine binden kann [145, 146].

Interleukin-8 spielt eine kritische Rolle während der Tumorangiogenese, dem Tumorwachstum und der Metastasierung, speziell beim Kolon-, Magen- und Pankreas-Karzinom. Des Weiteren ist es bei verschiedenen Erkrankungen wie dem Leber-, Nasopharynx-, Magen-, Lungen und Prostatakarzinom als prognostischer Marker nutzbar [147-149]. In gesundem Gewebe ist Interleukin-8 nur sehr schwer nachweisbar, jedoch steigt die Konzentration unter pathologischen Bedingungen als Antwort auf pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  schnell und stark an [150, 151].

## **6.3. MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1)**

Das Monozyten-Chemoattraktorprotein 1 (monocyte-chemotactic protein 1, MCP-1) ist ein CC-Chemokin der MCP-Subgruppe, das die Chemotaxis von Immunzellen fördert und an den Rezeptor CCR2 bindet [152]. Diese Bindung führt zur Aktivierung von Monozyten, T-Zellen, Eosinophilen und NK-Zellen [153]. Die MCP-Chemokine werden von Tumorzellen exprimiert, wobei nicht jede Tumorzelle alle Subtypen sezerniert. So sind viele Tumorzellen zu finden, die lediglich MCP-3, jedoch nicht MCP-1 exprimieren. Kommt es jedoch zur Expression von MCP-1, wie sie beispielsweise beim Gliom erfolgt, so erleichtert diese die Infiltration des Tumorgewebes durch Makrophagen und Microglia. Die Expression von MCP-1 sorgt für eine starke Infiltration des Tumors mit Makrophagen, jedoch ist nicht immer eine Korrelation zwischen dem Anteil der Tumor-infiltrierenden Makrophagen/ Microglia (TIM/M) und der vorliegenden MCP-1-Konzentration zu erkennen [154-158]. Im Fall des Glioms ist jedoch zu beobachten, dass die MCP-1-Expression mit der Infiltration von TIM/M und somit einer schlechten Prognose korreliert [159-161]. Zusammenfassend kann man sagen, dass MCP-1 eine starke tumorfördernde Wirkung besitzt.

#### **6.4. VEGF (vascular endothelial growth factor)**

Bereits im Jahr 1971 konnte Judah Folkman zeigen, dass Tumoren ab einer Größe von zwei Millimetern ihr Wachstum einstellen, sollten sie nicht in der Lage sein Angiogenese zu betreiben und sich auf diese Weise mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen [162]. Angiogenese ist jedoch nicht nur für das Wachstum von Tumoren und deren Metastasierung entscheidend, sondern auch für physiologische Prozesse wie das Wachstum und die Entwicklung von gesundem Gewebe, Wundheilung sowie embryonales Wachstum [163]. Kommt es jedoch zu einem unbalancierten Mix aus pro- und anti-angiogenen Faktoren, so erhalten Tumorzellen die Chance, neue Gefäße auszubilden und zu wachsen. Der in diesem Zusammenhang am besten untersuchte pro-angiogene Faktor ist der Endothelwachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF). Dieser ist sowohl während der physiologischen Angiogenese, dem frühen kindlichen Wachstum und der Knochenbildung, aber auch während pathologischen Vorgängen wie dem Wachstum solider Tumoren, multipler Myelome und hämatopoetischen Krankheiten überexprimiert. Die Überexpression im Tumor wird durch Sauerstoffmangel, Wachstumsfaktoren und Onkogene ausgelöst [164], zu denen unter anderem TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , der Keratinozyten-Wachstumsfaktor (keratinocyte growth factor, KGF), der insulinartige Wachstumsfaktor-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1), der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor, FGF) und der Blutplättchen-Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor, PDGF) zählen [165, 166]. Nach seiner Freisetzung bindet VEGF an die intrazelluläre Domäne des VEGF-Rezeptors, einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die mehrere Signalkaskaden aktiviert [167]. Die zwei wichtigsten sind hierbei der ERK-Signalweg, der zur Zellmigration führt, und der AKT-Signalweg, der das Überleben der Tumorzellen sichert [166]. Aufgrund dieser Schlüsselrolle von VEGF in der Tumorangiogenese ruhen derzeit große Hoffnungen auf diversen anti-angiogenen Therapeutika, die den VEGF-Rezeptor blockieren und aktuell getestet werden [168].

#### **6.5. sCD40L**

sCD40L, der lösliche Ligand von CD40, wird von T-Zellen und Blutplättchen gebildet und ist in die B-Zell-Antwort involviert. Normalerweise ist sCD40L nur bei Entzündungen aktiviert. Hohe Levels werden ebenfalls bei Krebspatienten gemessen, was zu einer direkten Induktion der Immunsuppression durch Expansion von Tregs und die Produktion inflammatorischer Zytokine führt [169].

## 6.6. Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  ist ein multifunktionelles Zytokin, das über zwei Rezeptoren agiert. Es wurde 1975 zum ersten Mal isoliert und spielt sowohl im Zusammenhang mit der Apoptose, dem Zellüberleben, Entzündungen als auch der Immunität eine Rolle [170-173]. Das 17kDa schwere und aus 157 Aminosäuren bestehende Protein ist auf dem humanen Chromosom 6 kodiert. Es wird vorwiegend durch aktivierte Makrophagen, T-Zellen und NK-Zellen, sowie in niedrigen Konzentrationen auch von Fibroblasten und Tumorzellen exprimiert. Hierbei wird es als pro-TNF (26kDa) synthetisiert und anschließend durch das TNF-konvertierende Enzym (TNF-converting enzyme, TACE) gespalten [174]. Die beiden zugehörigen Rezeptoren sind TNFR-1 und TNFR-2. TNFR-1 wird deutlich häufiger und in fast allen Zellen exprimiert, während TNFR-2 nur in Immunzellen vorkommt, im Vergleich jedoch eine fünfmal höhere Affinität zu TNF- $\alpha$  besitzt [175, 176]. TNFR-1 ist Mitglied der Familie der Todesrezeptoren (death receptor family) und kann somit Apoptosesignale freisetzen [177]. Eine Ligandenbindung an TNFR-2 hingegen aktiviert sowohl die Signalwege von NF- $\kappa$ B, JNK, p38 MAPK, ERK als auch PI3K. Aufgrund dieser Vielzahl von Reaktionen ist die biologische Rolle des Rezeptors noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch besteht die Vermutung, dass TNF- $\alpha$  durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 in die Entstehung und das Wachstum von Tumoren involviert ist [46].

TNF- $\alpha$ , dessen Bioaktivität durch den löslichen Rezeptor bestimmt wird, besitzt jedoch auch anti-Tumor-Eigenschaften, da es in hohen Dosen durch die spezifische Zerstörung von Blutgefäßen hämorrhagische Nekrosen und so eine spezifische T-Zell-Antwort in manchen Tumorarten induzieren kann [178, 179]. Weiter konnte auch ein synergistischer Effekt von TNF- $\alpha$  in der Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika gezeigt werden [180]. So zeigte sich bei der Gabe von TNF- $\alpha$  alleine nur eine leichte Nekrose, während in der Kombination eine drei bis sechs fache Anreicherung des Chemotherapeutikums im Tumor zu finden war, wodurch Konzentrationen nahe des spezifischen IC<sub>50</sub>-Wertes erreicht wurden [181, 182].

Die andere Seite der Medaille zeigt jedoch die Rolle von TNF- $\alpha$  in der Promotion und Progression von Tumoren. TNF- $\alpha$  ist der Hauptmediator bei Entzündungs-assoziierten Tumoren [183], da chronische Entzündungen – unter anderem durch Tumornekrosefaktoren ausgelöst – mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert sind und Tumore meist an Entzündungsstellen entstehen [184-186].

## **6.7. MDC**

Das von Makrophagen exprimierte Chemokin (macrophage-derived chemokine, MDC) gehört zur Familie der CC-Chemokine und wird auch CCL2 genannt [187]. Es ist auf Chromosom 16 in der Bande q13 kodiert und gehört mit einer Länge von 3,4kb zu den längsten Chemokinen. Der einzige bisher bekannte Rezeptor ist CCR4, jedoch werden weitere vermutet. MDC gilt als ein potenter Chemoattraktor für unreife dendritische Zellen. Es ist bekannt, dass MDC im Wesentlichen direkt nach der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen exprimiert wird, jedoch ist seine genaue Rolle, vor allem bei Krebspatienten, noch nicht abschließend aufgeklärt [188].

## **7. Glioblastoma multiforme (GBM)**

### **7.1. Inzidenz und Krankheitsverlauf**

Das GBM ist der am häufigsten vorkommende maligne Tumor des zentralen Nervensystems und die hochgradigste Form der Gliome. Es hat eine Inzidenz von 0,59-3,69 pro 100.000 Einwohner. Die Inzidenz steigt mit dem Alter und hat ihr relatives Häufigkeitsmaximum in der fünften und sechsten Lebensdekade [189, 190]. Eine Glioblastom-Erkrankung ist mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert. Laut Studien aus den Jahren 2005 und 2008 lag das durchschnittliche Überleben nach Erstdiagnose zwischen 12 und 15 Monaten [191, 192]. Nach neueren Erkenntnissen aus dem Jahr 2016 ist dieses auf 15 bis 18 Monate angestiegen [193]. Betrachtet man das Langzeitüberleben der Patienten so sind ähnliche Tendenzen zu erkennen. In den Jahren 2007 und 2009 lag die 3-Jahre-Überlebensrate noch bei 3-5% [194, 195]. Bis zum Jahr 2016 stieg hingegen sogar die 5-Jahre-Überlebensrate auf etwa 10% [193]. Trotz dieser Verbesserung im Überleben der Patienten in den letzten zehn Jahren, sind die Therapieerfolge bei Glioblastom-Patienten bei weitem nicht befriedigend.

### **7.2. Behandlung**

Da Glioblastom-Erkrankungen in den meisten Fällen innerhalb kurzer Zeit tödlich enden, wird normalerweise ohne Verzögerung das volle Therapie-Spektrum genutzt. Der Gold-Standard in der Glioblastom-Therapie ist die größtmögliche chirurgische Tumorresektion gefolgt von adjuvanter Radiotherapie und Chemotherapie mit Temozolomid. Trotz alledem hat die Behandlung von Glioblastom-Patienten nur palliativen Charakter [191, 196, 197].

Große Hoffnungen für die Zukunft der Glioblastom-Therapie werden derzeit für die sogenannten Immuntherapien und personalisierten Therapien für jeden betroffenen Patienten gesehen.

### **7.3. Charakteristika**

Das GBM ist molekular in mehrere Subtypen zu unterteilen. Man unterscheidet zwischen dem klassischen, dem pro-neuralen, dem neuralen und dem mesenchymalen Glioblastom. Diese Unterteilung basiert auf Microarray-Daten aus dem „Cancer Genome Project“ [198, 199]. Des Weiteren wurde ein Panel aus neun verschiedenen Genen festgelegt, deren Expression Rückschlüsse auf eine gute oder schlechte Prognose zulassen [200]. Zusätzlich sind im genetischen Profil Unterschiede zwischen Glioblastomen, die aus der Progression niedrig gradiger Gliome entstanden sind und solchen, die sich direkt als primäres Glioblastom entwickelt haben, zu erkennen [198, 199]. Hauptkriterium für die Unterscheidung zwischen primären und sekundären Glioblastomen sind Mutationen der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH). Diese sind in 80% der sekundären, jedoch nur in 5% der primären Glioblastome zu finden [201]. Weiterhin ist das Vorhandensein einer IDH-Mutation mit einer besseren Prognose assoziiert. Ebenfalls häufiges Ziel von Mutationen ist der EGF-Rezeptor. Bei 40-50% der Glioblastom-Patienten ist eine Amplifikation des Rezeptors zu finden und bei 20-50% davon handelt es sich um eine mutierte Form des EGF-Rezeptors [198]. Aktuell liegen noch keine gesicherten Erkenntnisse über die Auswirkung des EGF im Zusammenhang mit dem Glioblastom vor, jedoch werden höhere EGF-Level mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht [202].

Im Umfeld des GBM ist eine große Zahl von immunsuppressiven Mechanismen zu finden, die die Detektion und Vernichtung der Tumorzellen durch das Immunsystem verhindern [203]. So unterdrücken beispielsweise regulatorische T-Zellen (Treg) eine Immunantwort bzgl. der Lymphozyten-Aktivität durch die Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10 oder durch direkten Zell-Zell-Kontakt [204-208]. Das Mikroumfeld des Tumors ist außerdem in der Lage die Apoptose von T-Zellen zu induzieren, um auch auf diesem Weg der Immunantwort des Körpers zu entgehen [209].

Die Progression des Glioblastoms wird unter anderem durch die Expression des Kolonie-stimulierenden Faktors 1 (colony stimulating factor 1, CSF-1) angeregt [210], da dieser die Polarisierung von immunsuppressiven M2-Makrophagen induziert [211]. Des Weiteren führt VEGF zur Erhöhung der Tumorigenität und des Tumorwachstums [212-215] und verhindert die Reifung und Funktion von dendritischen Zellen [216]. Ein weiterer Regulator im Umfeld des Glioblastoms ist der Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor



(granulocyte macrophage CSF, GM-CSF), der sowohl als Zytokin und Wachstumsfaktor für Granulozyten und Makrophagen agiert, aber auch die Proliferation von myeloiden Suppressorzellen (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) fördert [217]. Ebenfalls im Umfeld des Glioblastoms hochreguliert ist PD-L1 (programmed cell death ligand 1) [218], der wahrscheinlich mit dem mesenchymalen Subtypen assoziiert ist [219]. PD-L1 wird auf Immun- und Gliomzellen exprimiert [220-223] und führt sowohl zur Inhibition der T-Zell-Aktivierung als auch zur Induktion der T-Zell-Apoptose [209, 224].

## 8. Hypothese

Mit Blick auf das Glioblastom, für welches stetig neue Behandlungsmöglichkeiten und diagnostische Kriterien gesucht werden, wird in der vorliegenden Arbeit die Expression von variablen Immunrezeptoren in nicht-lymphoiden Zellen als neuer Ansatzpunkt untersucht.

Da neueste Erkenntnisse zeigen, dass auch Tumor-assoziierte Makrophagen bei Glioblastom-Patienten in der Lage sind Immunglobuline zu exprimieren, sollen diese charakterisiert und im besten Fall ihre Funktion bestimmt werden. Um ein möglichst umfassendes Bild über die Vorgänge in den Tumoren und ihrem Mikromilieu zu erhalten, sollen in der vorliegenden Studie nicht nur die durch zirkulierende Monozyten und Tumor-assoziierte Makrophagen exprimierten Immunglobuline sequenziert und untersucht werden, sondern auch die von den Zellen sezernierten bzw. auf die Zellen einwirkenden Zytokine. Hierzu zählen sowohl MCP-1 und sCD40L, die die Infiltration von Tumorgewebe durch Makrophagen fördern und die Immunsuppression des Tumors induzieren, die Wachstumsfaktoren EGF und VEGF als auch TNF- $\alpha$ , das als Hauptmediator Entzündungs-assoziiierter Tumore gilt, und Interleukin 8, welches die Tumorangiogenese fördert.

Die Konzentrationen der Zytokine sowie die Diversität der untersuchten Makrophagen-Antikörper werden bei Glioblastom-Patienten und gesunden Kontrollen verglichen. Zudem werden die Zytokinkonzentrationen und Antikörper-Diversitäten bei Glioblastom Patienten unter Therapie untersucht und Unterschiede zwischen Patienten mit leichteren und schwereren Verläufen analysiert.

Sollten sich Besonderheiten bei den Repertoires der Makrophagen-Immunglobuline in Abhängigkeit des Tumors zeigen, so könnten diese in Zukunft als diagnostischer Marker genutzt werden.

---

---

# Material und Methoden

## 1. Material

### 1.1. Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Aut. Zellzähler	Luna	Logos Biosystems, Südkorea
Bioanalyser	2100 Bioanalyser	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Durchflusszytometer	Canto II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Feinwaage	isoCAL	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Geldokumentation	ChemiDoc XRS+	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelkammern	Midi-large (120 Volt)	Harnischmacher, Schauenburg, Deutschland
Hämatologie-Analysator	XP-3000	Sysmex, Norderstedt, Deutschland
Inkubator		Binder
Kamera	Progres Gryphax	Jenoptik, Jena, Deutschland
Kühlschrank		Siemens, München, Deutschland
Kühltruhe, -20°C		Siemens, München, Deutschland
Kühltruhe, -80°C	HeraFreeze	Thermo Scientific, Waltham, USA
Luminex	Milliplex Analyser	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
MACS-Magnet	MidiMACS Separator	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop	IX70	Olympus
NanoDrop	ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
NGS	Ion OneTouch 2	Life Technologies, Carlsbad, USA
	Ion OneTouch ES	
	Ion Torrent	

---

PCR-Cycler	Veriti, Veriti Dx	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pipetten	Research Plus, Research Plus 8- Kanal, Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Rollenmischer	RS-TR05	Phoenix Instruments, Garbsen, Deutschland
Sanger- Sequenzierer	3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sterilwerkbank	HeraSafe	Heraeus
Tischzentrifuge		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vortexer		IKA, Staufen, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X3R	Thermo Scientific, Waltham, USA

Tabelle 2: Geräte

## 1.2. Kits

Kit	Hersteller
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Gelextraktions-Kit (InnuPrep)	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
Milliplex MAP Human Cytokine/ Chemokine	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Magnetic Bead Panel 38Ple	
NucleoSEQColumns	Macherey & Nagel, Düren, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tabelle 3: Kits

### 1.3. Enzyme

Enzym	Hersteller
AMV RT	Promega, Madison, USA
Collagenase IV	Worthington, Lakewood, USA
DNase I	Roche, Mannheim, Deutschland
Phusion Polymerase	New England Biolabs
Sensiscript RT	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 4: Enzyme

### 1.4. FACS-Antikörper

Antigen	Fluorochrom	Hersteller	Artikelnummer	Lotnummer
CD14	FITC	BD	345784	7326978
CD19	APC-H7	BD	641395	8054843
CD2	APC	BD Pharmingen	560642	7146515
CD14	PE	BD	345785	93927
CD19	APC	BD	345791	4073864
CD22	FITC	BD	337898	6141647
CD20	PE	BD	345793	7163936

Tabelle 5: FACS-Antikörper

### 1.5. Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
AMPure XP Beads	Bekman Coulter, Brea, USA
Antibody Diluent	Dako, Glostrup, Dänemark
Borsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA (Bovines Serum Albumin)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CD14 MicroBeads	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

CD19 MicroBeads	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Cell Wash	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
dNTPs	Bioron, Ludwigshafen, Deutschland
Dulbecco's PBS 1x	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gel Red	Biotium, Fremont, USA
Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus	Fermentas, Ontario, Kanada
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
H <sub>2</sub> O, PCR-rein	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LB Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Oligo(dT)	Bioron, Ludwigshafen, Deutschland
TRI Reagent	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 6: Reagenzien

## 1.6. Puffer

Puffer	Zutaten
MACS-Puffer	1X PBS 2mM EDTA 0,5% BSA
5X TBE-Puffer (Gelelektrophorese)	54g Tris 27,5g Borsäure 20mL 0,5M EDTA (pH 8,0) mit H <sub>2</sub> O auf 1L auffüllen

5X DNA-Ladepuffer (für Gelelektrophorese)	5 ml Glycerol 5 ml 5xTBE 25 mg Bromphenolblau 25 mg XylenCyanol F
SOB++ Medium	2,5g Hefeextrakt (=0,5%) 10g Tryptone (=2,0%) 0,2922g NaCl (=10mM) 0,0932g KCl (=2,5mM) 1,0165g MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O (=10mM) 2,4648g MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O (=20mM) → auf 500mL auffüllen → pH 7 (mit 10M NaOH)

Tabelle 7: Puffer

## 1.7. Primer

### Allgemeine Primer

Primer	Sequenz
GAPDH forward	TTGGTATCGTGGAAGGACTCAT
GAPDH reverse	TGTCATATTTGGCAGGTTT
HLA-DR forward	AGCGCCCAAGAAGAAAATGG
HLA-DR reverse	CCTCAAAGCTGGCAAATCGT

Tabelle 8: Allgemeine Primer

### CD-Primer

Primer	Sequenz
CD2 forward	ACTTGTATCAACACAACCCT
CD2 reverse	TGAGGGGTTGAAGCTGGAAT
CD14 forward	AGAACCTTGTGAGCTGGACG
CD14 reverse	TTGAGGCCTGGCTTGAGCCA
CD19 forward	GGCTGGACAGTCAATGTGGA
CD19 reverse	CCAGCCACCAGTCCTCAGCA
CD68 forward	CAGCCCAGGATTCACCAGTT
CD68 reverse	AGGCAGCAAGATGGACCGGT

CD163 forward	GACGCGTGGAGGGAATATGT
CD163 reverse	AGAAACGCTGTCAAGCCAGA

Tabelle 9: CD-Primer

*Immunglobulin-Primer*

Primer	Sequenz
IgM forward	CGCCACTGAAGCAGACCATC
IgM reverse	CAGCTGTGTCTGGACATGACCA
IgG forward	CTCAGCAGCGTGGTGACCGT
IgG reverse	ACGTCCACCACCACGCATGT
IgM forward	CGCCACTGAAGCAG
IgM reverse soluble	CAGCTGTGTCTGGACATGACCA
IgM reverse transmembrane	CGGTGGTACTGTAGAAGAGGCTCA

Tabelle 10: Immunglobulin-Primer

*Immunglobulin-Repertoire- und RACE-Primer*

Primer	Sequenz
IgC $\mu$ reverse	GGGAATTCTCACAGGAGACGA
IgC $\gamma$ reverse	GGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTGG
IgC $\kappa$ reverse	CAGCAGGCACACAACAGAGGCAGTTCC
IgC $\lambda$ reverse	CACCAGTGTGGCCTTGTTGGCTTG
V <sub>H1,5,7</sub>	CAGGTGCAGCTGGTGSARTCTGG
V <sub>H2</sub>	CAGRTCACCTTGAAGGAGTCTG
V <sub>H3</sub>	GAGGTGCAGCTGKTGGAGWCY
V <sub>H4</sub>	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCSG
V <sub>H6</sub>	CAGGTACAGCTGCAGCAGTCA
V <sub>K1</sub>	GACATCCRGDTGACCCAGTCTCC
V <sub>K2,4,6</sub>	GATATTGTGMTGACBCAGWCTCC
V <sub>K3</sub>	GAAATTGTRWTGACRCAGTCTCC
V <sub>K5</sub>	GAAACGACACTCACGCAGTCTC
V <sub><math>\lambda</math>1,4,5,9</sub>	CAGCCTGTGCTGACTCARYC



$V_{\lambda 1,5,9,10}$	CAGCCWGGKCTGACTCAGCCMCC
$V_{\lambda 2}$	CAGTCTGYYCTGAYTCAGCCT
$V_{\lambda 3}$	TCCTATGWGCTGACWCAGCCAA
$V_{\lambda 3-38}$	TCCTATGAGCTGAYRCAGCYACC
$V_{\lambda 6}$	AATTTTATGCTGACTCAGCCCC
$V_{\lambda 7,8}$	CAGDCTGTGGTGACYCAGGAGCC

Tabelle 11: Immunglobulin-Repertoire- und RACE-Primer

## 1.8. Software / Datenbanken

Software/ Datenbank	Anbieter
CLC Genomics Workbench	Qiagen, Hilden, Deutschland
IgBLAST	National Institutes of Health, Maryland, USA
IMGT	Marie-Paule Lefranc, Universität Montpellier, Montpellier, Frankreich
VBASE 2	AbCheck, Plzen, Tschechien

Tabelle 12: Software / Datenbanken

## 1.9. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Modell	Hersteller
96 Well-Platten	PP-Microplate, 96 well	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Bioanalyser-Chips	High Sensitivity DNA RNA Nano	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Bioanalyser-Reagenzien	High Sensitivity DNA RNA Nano	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Combitips	Combitips advanced	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einwegskalpell	Feather Disposable	Feather, Osaka, Japan
Falcon-Röhrchen	15mL 50mL	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
MACS-Säulen	LS Columns	MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

## Material und Methoden

	LiHe	
Monovetten	EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	Serum Gel Z	
NGS-Chips	Ion 316 Chip Kit V2 BC	Life Technologies, Carlsbad, USA
Objektträger	Superfrost Plus	R.Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße		Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Petrischalen		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	10µL	
Pipettenspitzen	200µL	Nerbe Plus, Winsen, Deutschland
	1000µL	
	0,5mL	
Reaktionsgefäße	1,5mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Low Bind 1,5mL	
	2,0mL	
	Cellstar 5mL	
Serologische Pipetten	Cellstar 10mL	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
	Cellstar 25mL	
Spritze	10mL BD Discardit II	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Sterilfilter	0,22µm Porengröße	
Sterilfilter	CytoOne Bottle Top Filtration Unit	Starlab, Hamburg, Deutschland
Zellsieb	100µM Porengröße	VWR International, Bruchsal, Deutschland
Zellzählungs-Chips	Luna Cell Counting Slide	Logos Biosystems, Südkorea

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien

## 2. Methoden

### 2.1. Patienten

	Geschlecht	Geburtsjahr	Alter bei OP	Blutabnahme	Tumorvolumen (ml)	progressionsfrei (Tage)	Tod	KI 67 (%)	ATRX	IDH	Histo	Komorbidität	Lokalisation
GBM001	weiblich	1988	46	OP-Tag	11,032	188		15	1	0	GBM	Wundheilungsstörung	frontoparietal links parasagittal (zentral)
GBM002	männlich	1942	73	OP-Tag	8,673	73		15	1	0	GBM	Epilepsie, aHT, VHV, Prostata-Ca	frontal links peripher
GBM003	männlich	1953	62	OP-Tag	74,978	235	lebt	15	1	0	Gliosarkom	LAE, Epilepsie, aHT, DM II	parietotemporooccipital (von zentral bis peripher reichend)
GBM004	weiblich	1941	74	OP-Tag	62,01	200		25	1	0	GBM	Epilepsie, aHT, KHK	rechts occipital (von zentral bis peripher reichend)
GBM005	weiblich	1971	44	OP-Tag	36,604	153	161 Tage postOP	20	1	0	GBM	Hydrocephalus, Shuntinfektion	Balken-GBM (zentral)
GBM006	männlich	1961	54	OP-Tag	50,488	343	lebt	20	1	0	GBM	KHK, pAVK, Epilepsie	frontal rechts (peripher)
GBM007	männlich	1951	64	OP-Tag	59,349	124	313 Tage postOP	15	1	0	GBM	Epilepsie, aHT, DM II	frontal rechts (peripher)
GBM008	männlich	1960	55	OP-Tag	7,562	125	lebt	40	1	0	GBM	keine	temporal rechts (peripher)
GBM009	männlich	1961	65	OP-Tag	91,338	249		10	1	0	GBM	keine	temporal rechts (zentral)
GBM010	weiblich	1958	58	OP-Tag	41,188	388		30	1	0	GBM	Epilepsie	frontal links (zentral und peripher 2 Herde)
GBM011	männlich	1646	70	OP-Tag	28,173			15	1	0	GBM	KHK, aHT, Epilepsie	temporooccipital rechts (zentral)
GBM012	weiblich	1973	43	OP-Tag	15,681	219		20	1	0	GBM	keine	frontoparietal rechts (peripher)
GBM013	weiblich	1969	47	OP-Tag	50,481	36	215 Tage postOP	50	1	0	Gliosarkom	Hydrocephalus, Epilepsie	Balken-GBM (zentral)
GBM014	weiblich	1964	52	OP-Tag	3,542	235	lebt	12	1	0	GBM	Morbus Wegener, aHT, Epilepsie	frontal links (peripher)
GBM015	weiblich	1944	72	OP-Tag	34,35	169		20	1	0	GBM	Epilepsie	frontal links (von zentral bis peripher reichend)
GBM/P001	männlich	1952	65	OP-Tag 4 Tage postOP 165 Tage postOP	4,941	149	lebt	35	1	0	GBM	Epilepsie, aHT	parietal links (peripher)
GBM/P002	männlich	1962	55	OP-Tag 3 Tage postOP 107 Tage postOP	40,547	197	lebt	20	1	0	GBM	keine	parietotemporooccipital links (von zentral bis peripher reichend)

Tabelle 14: Patientenkollektiv

Die Nutzung der humanen Gewebe- und Blutproben wurde durch das Ethikvotum 2017-548N-MA der Ethikkommission II der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg genehmigt. Des Weiteren bestätigte jeder in die Studie eingeschlossene Patient schriftlich sein Einverständnis. Die Aufklärung der Patienten erfolgte im Rahmen der OP-Vorbereitung durch die Kollegen der Neurochirurgischen Klinik.

### 2.2. Zellisolation aus Tumorgewebe

Das Glioblastom-Gewebe wurde noch während der OP abgeholt und innerhalb von maximal zwei Stunden verarbeitet. Hierfür wurde das Tumorgewebe mit einem sterilen Einmalskalpell so gut wie möglich zerkleinert und anschließend in einer Enzymlyösung aus Collagenase IV (190 U/ml) und DNase I (500 U/ml) in RPMI verdaut. Der Verdau erfolgte für 90 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf einem Rollenmischer. Um die Tumorzellen weiter zu vereinzeln, wurde das verdaute Gewebe auf einen Zellfilter mit einer Porengröße von 100µm gegeben, mit kaltem PBS gespült und gewaschen. Abhängig von der Anzahl der im Pellet verbliebenen Erythrozyten wurden bis zu zwei Lyse-Durchgänge für Erythrozyten durchgeführt, um die Reinheit der gewonnenen Zellfraktion zu erhöhen. Hierfür wurden 10mL Wasser zu den Zellen gegeben und nach 30 Sekunden 10mL 1,8%ige NaCl-Lösung hinzugegeben, um die physiologische Salzkonzentration wiederherzustellen. Im letzten Schritt wurde die Zahl der gewonnenen Tumorzellen bestimmt.

### 2.3. Zellisolation aus Lithium-Heparin-Blut oder Buffy Coats

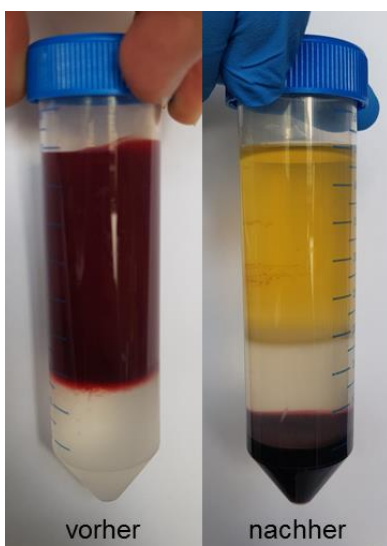


Abbildung 7: Ficoll-Gradient (vorher/ nachher)

Periphere Blutmonozyten (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wurden sowohl aus Vollblut der Glioblastom-Patienten als auch aus Buffy Coats, die als gesunde Kontrolle und zur Etablierung der Methoden dienen, isoliert. Das Lithium-Heparin-Blut der Patienten wurde am OP-Tag, etwa vier Tage danach und etwa vier bis fünf Monate nach der Tumorresektion parallel zur MRT-Kontrolle entnommen. Die Buffy Coats wurden vom Blutspendedienst Baden-Württemberg des Deutschen Roten Kreuzes bezogen.

Die erste Auftrennung des Blutes erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation.

Das Blut wurde hierfür in Falcons überführt und etwa 1:1 mit PBS verdünnt. In 50mL Falcons wurden 15mL Ficoll vorgelegt und langsam mit 35mL des verdünnten Blutes

überschichtet. In einem Zentrifugationsschritt von 30 Minuten bei 1500rpm ohne Bremse wurden die Blutbestandteile gemäß ihrer Dichte aufgetrennt (wie in Abbildung 7 dargestellt). Nach erfolgreicher Auftrennung wurde der weiße Ring, der die PBMCs enthält, abgenommen, in einen frischen Falcon überführt und mit PBS gewaschen. Die noch enthaltenen Erythrozyten wurden lysiert und die Zellzahl der PBMCs wurde bestimmt.

## 2.4. MACS

Zur Isolierung von Makrophagen und B-Zellen aus der vorher gewonnenen Fraktion der PBMCs wurde die Methode der magnetischen Zellsortierung (Magnetic Assisted Cell Sorting, MACS) der Firma Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach) angewandt. Hierbei werden die gewünschten Zellen innerhalb einer Zellsuspension mittels Antikörpern, die mit Magnetpartikeln konjugiert sind, markiert und in speziellen Säulen gebunden. Nach dem gründlichen Waschen der Säulen werden die markierten Zellen von den Säulen eluiert (Abbildung 8). Mit dieser Methode ist es möglich eine einzelne Zellpopulation anzureichern oder aber auch eine bestimmte Zellart zu depletieren, indem man mit dem ersten Durchfluss durch die Säule weiterarbeitet.

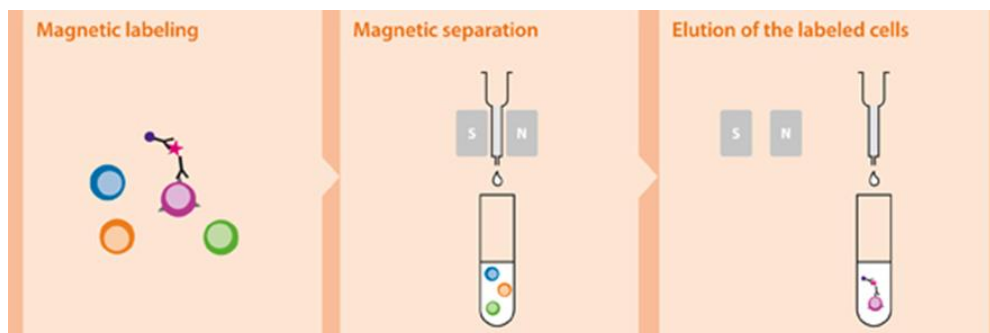


Abbildung 8: MACS-Aufreinigung (Miltenyi)

In den hier durchgeführten Experimenten wurden beide Methoden kombiniert. Im ersten Schritt wurden die CD19-positiven B-Zellen isoliert und im zweiten Schritt wurden die CD14-positiven Makrophagen aus dem vorherigen CD19-negativen Durchfluss angereichert.

Praktisch wurden hierfür  $10^7$  Zellen mit 80µL MACS-Puffer und 10µL der entsprechenden Micro-Beads (CD14 bzw. CD19) für 15 Minuten bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert und anschließend mit MACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1mL MACS-Puffer aufgenommen und auf eine in den Magneten eingespannte und vorher äquilibrierte Säule (LS-Column) gegeben. Nachdem die Zellsuspension vollkommen hindurchgetropft war, wurde die Säule drei Mal mit 3mL MACS-Puffer gespült. Die Säule wurde im Anschluss vom Magneten entfernt und auf einen frischen Falcon gesetzt, bevor die markierten und vorher magnetisch gebundenen Zellen (CD14- bzw. CD19-positiv) mit 5mL MACS-Puffer aus der Säule gespült wurden. Sowohl für die CD14- als auch für die CD19-positiven

Zellfraktion wurde die Zellzahl mit dem Sysmex XP-300 und die Reinheit der Zellfraktionen im FACS bestimmt. Die verbliebenen Zellen wurden für die weitere Verarbeitung in je einem Milliliter Trizol pro Probe aufgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.5. RNA-Isolation aus Trizol

Mittels Trizol (ThermoFisher) ist es möglich aus einer Probe sowohl RNA, DNA als auch die enthaltenen Proteine zu isolieren. Hierbei kann in einem ersten Schritt die RNA isoliert werden und DNA und Proteine in einem weiteren Arbeitsschritt nach nochmaliger Lagerung der Trizol-Probe bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Zur Isolation der RNA wurde die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerte Trizol-Probe aufgetaut und anschließend mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur gehalten. Pro Probe wurden  $200\mu\text{L}$  Chloroform hinzugegeben und für 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach zwei Minuten Inkubation erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation bei  $12000\text{rpm}$  und  $4^{\circ}\text{C}$ . In diesem Zentrifugationsschritt bildeten sich drei Phasen – eine untere, pinke Phase mit Proteinen, ein weißer Film in der Mitte mit DNA und eine obere, klare Phase, die die gewünschte RNA enthält (Abbildung 9). Dieser farblose Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die anderen beiden Phasen erneut weggefroren und zur DNA- und Proteinisolation aufbewahrt. Der klaren Phase wurden je  $500\mu\text{L}$  Propanol zugefügt, gemixt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation von 10 Minuten bei  $12000\text{rpm}$  und  $4^{\circ}\text{C}$ , in der sich die RNA als gelartiges Pellet am Boden des Röhrchens absetzte. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in je  $1\text{mL}$  kaltem 70% Ethanol durch vortexen gelöst. In einer weiteren Zentrifugation von fünf Minuten bei  $7500\text{rpm}$  wurde die RNA erneut pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet kurz angetrocknet. Abschließend wurde die RNA in  $15\text{-}20\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser gelöst, für 10 Minuten bei  $55^{\circ}\text{C}$  inkubiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Im Anschluss an die Isolation wurde die Konzentration der RNA-Probe am NanoDrop photometrisch bestimmt.

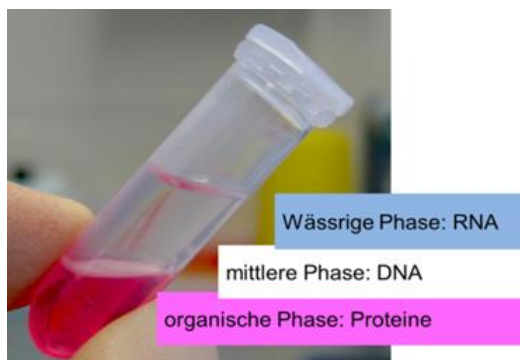
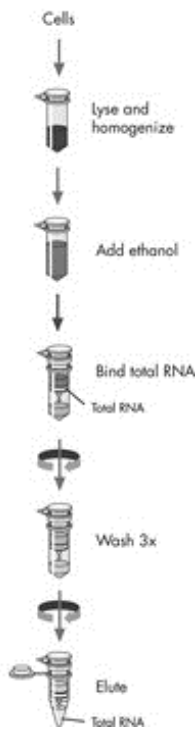


Abbildung 9: RNA-Extraktion mit Trizol

Die hier genannten Volumina beziehen sich auf Zellen, die in einem Milliliter Trizol resuspendiert wurden. Besonders kleine Zellpellets können allerdings auch in  $500\mu\text{L}$  Trizol aufgenommen werden. Die restlichen Volumina müssen dann entsprechend angepasst werden.

## 2.6. RNA-Isolation mittels Säulenchromatographie



Bei sehr geringen Zellzahlen wurde für die RNA-Isolation anstatt Trizol das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet, um die Ausbeute zu optimieren.

Nach der Aufreinigung der Zellen wurde das Pellet in 350µL (<math>5 \cdot 10^6</math> Zellen) bzw. 600µL ( $5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$  Zellen) Lysepuffer (Buffer RLT) gelöst. Das so entstandene Zelllysate wurde auf die RNeasy-Säulen überführt und für 15 Sekunden bei 10000rpm zentrifugiert, bevor der Durchfluss verworfen wurde. Die Membran der Säule wurde einmal mit 700µL RW1-Puffer und anschließend zwei Mal mit je 500µL RPE-Puffer gemäß Protokoll des Herstellers gewaschen. Die gereinigte Säule wurde eine Minute bei maximaler Umdrehung trocken zentrifugiert und auf ein frisches Röhrchen überführt. Im letzten Schritt wurde die RNA mit 30-50µL Wasser von der Membran eluiert und eine Minute bei 10000rpm zentrifugiert.

Abbildung 10: RNA-Isolation mit RNeasy Kit [225]

## 2.7. RT-PCR

Die RT-PCR dient zur Umschreibung der gewonnenen RNA in cDNA mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase.

Die Auswahl des Enzyms und des entsprechenden Protokolls wurde der jeweils vorliegenden RNA-Konzentration angepasst.

### RT-PCR für hohe RNA-Konzentrationen

Bei normalen bis hohen RNA-Konzentrationen wurde die AMV Reverse Transkriptase von Promega verwendet. Der Mastermix für die RT-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

pro Probe:

MgCl <sub>2</sub>	4 µl
5x Puffer	4 µl
dNTP (10mM)	2 µl
oligo dT	1 µl
RNase Inhibitor	0,1 µl
<u>Reverse Transkriptase</u>	<u>0,8 µl</u>
Σ	11,9 µl

Dem vorbereiteten Mastermix wurde pro Probe 1µg RNA hinzugefügt und mit RNase-freiem Wasser auf jeweils 20µL aufgefüllt.

Abschließend wurde die Reaktion mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

42 °C für ∞  
42 °C für 1 h  
72 °C für 10 min  
4 °C für ∞

### Sensiscript-RT-PCR für RNA-Mengen bis 50ng

Wenn die verfügbare RNA-Menge nicht ausreichend für das Standardprotokoll war, wurde auf das „Sensiscript Reverse Transcription Kit“ von Qiagen ausgewichen. Mit diesem Enzym ist es möglich, auch sehr geringe RNA-Mengen bis 50ng in cDNA umzuschreiben. Der Mastermix des deutlich sensitiveren Kits bestand aus folgenden Reagenzien:

pro Probe:

10x RT-Puffer	2 µl
dNTP (5mM)	2 µl
oligodT	2 µl
RNase Inhibitor	0,25 µl
<u>Sensiscript RT</u>	<u>1 µl</u>
Σ	7,25 µl

Dem vorbereiteten Mastermix wurden pro Probe maximal 50ng RNA hinzugefügt und mit RNase-freiem Wasser auf jeweils 20µL aufgefüllt.

Die PCR wurde gemäß dem folgenden, vom Hersteller vorgegebenen, Protokoll durchgeführt:

37°C für ∞  
37°C für 1 h  
4°C für ∞



## 2.8. PCR

Die vorbereitete cDNA wurde mit der Taq DNA Polymerase von Qiagen und den gewünschten Primern amplifiziert. Das jeweils verwendete Reaktionsvolumen betrug 12,5µL pro Probe und setzte sich wie folgt zusammen:

pro Probe:

Q-Solution	2,5 µL
10x Puffer	1,25 µL
dNTP (10mM)	0,25 µL
fw. Primer (1:10)	0,25 µL
rev. Primer/(1:10)	0,25 µL
Taq-Polymerase I	0,1 µL
H <sub>2</sub> O	7,5 µL
$\Sigma$	12,1 µl

Jeder Probe wurden je 0,4 µL cDNA zugesetzt, bevor die Reaktion gemäß folgendem Schema im Cyclor stattfand:

Vorheizen	95 °C für ∞
Denaturierung	96 °C für 90 Sek.
40 Zyklen:	
Denaturierung	96 °C für 20 Sek.
Hybridisierung	55 °C für 45 Sek.
Verlängerung	72 °C für 60 Sek.
Verlängerung	72 °C für 5 min
Ende	4 °C für ∞

## 2.9. Repertoire-PCR

In der bereits beschriebenen PCR wurde pro Probe die Genexpression eines einzelnen Gens untersucht. Um jedoch die exprimierten Immunglobulin-Repertoires der isolierten Blut- und Tumorzellen zu untersuchen, wurden nicht nur je ein forward und ein reverse Primer eingesetzt, sondern ein reverse Primer im konstanten Teil in Kombination mit unterschiedlichen forward Primern, die in den variablen Teilen der Immunglobulin-Sequenz liegen, verwendet.

Der Mastermix entsprach dem der Standard-PCR. Für die Schwerketten IgM und IgG wurde das PCR-Programm von 40 auf 35 Zyklen verkürzt, während das Standard-Programm mit

40 Zyklen für die Leichtketten Igk und Igλ beibehalten wurde, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

Für die verschiedenen Immunglobulin-Klassen wurden folgende Primer verwendet:

	<u>IgM</u>	<u>IgG</u>	<u>Igk</u>	<u>Igλ</u>
Reverse Primer	IgM 229R / IgM 195R	IgG 573R / IgG 313R	Igk 633R / Igk 445R	Igλ 208R / Igλ 63R
Forward Primer	V <sub>H1,5,7</sub> V <sub>H2</sub> V <sub>H3</sub> V <sub>H4</sub> V <sub>H6</sub>	V <sub>H1,5,7</sub> V <sub>H2</sub> V <sub>H3</sub> V <sub>H4</sub> V <sub>H6</sub>	V <sub>k1</sub> V <sub>k2,4,6</sub> V <sub>k3</sub> V <sub>k5</sub>	V <sub>λ1,4,5,9</sub> V <sub>λ1,5,9,10</sub> V <sub>λ2</sub> V <sub>λ3</sub> V <sub>λ3-38</sub> V <sub>λ6</sub> V <sub>λ7,8</sub>

### 2.10. Gelelektrophorese

Die Auftrennung der erhaltenen PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Es wurden standardmäßig 1,5%ige Agarosegele eingesetzt, die mit GelRed als Farbstoff versetzt wurden.

Pro Probe wurden 10µL PCR-Produkt mit 2µL 5x Ladepuffer eingesetzt. Die Läufe erfolgten bei 140V für ca. 60 Minuten, um eine optimale Auftrennung zu erreichen.

Im letzten Schritt wurden mit Hilfe des Gel-Dokumentations-Systems von Bio-Rad Fotos der Gele zur Auswertung angefertigt.

### 2.11. Herstellung kompetenter *E. coli*

Die chemisch kompetenten Top 10 *E. coli*-Bakterien, die für die folgende Klonierung benötigt wurden, wurden zu Beginn einmal kommerziell erworben und im Anschluss selbst kultiviert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Ein Aliquot der erworbenen Bakterien wurde aufgetaut, auf Agar-Platten ohne Antibiotika-Zugabe ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden mehrere Kolonien gepickt und in je 5mL SOB++ Medium überführt. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C über Nacht. Am Tag drei wurde eine der 5mL-Kulturen in 250mL SOB++ Medium überführt und weiterhin bei 37°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben gezogen und die optische Dichte bestimmt. Sobald die optische Dichte von OD<sub>600</sub>

= 0,5 erreicht wurde, wurden die 250mL-Kultur auf fünf 50mL Falcons aufgeteilt und auf Eis gestellt. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 4000rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen und die Bakterien in insgesamt 100mL eiskaltem CaCl<sub>2</sub> gelöst. Nach 20 Minuten Wartezeit erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4000rpm und 4°C. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 7mL eiskaltem 0,1M CaCl<sub>2</sub> mit 1,6mL 80% Glycerol resuspendiert. Die so entstandene Zellsuspension wurde in 0,1mL Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

## 2.12. Klonierung

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden zur weiteren Amplifizierung an einen Vektor gekoppelt und in *E. coli* eingebracht. Durch das im Vektor enthaltene Resistenzgen sind die Bakterien in der Lage, auf Agarplatten mit Kanamycin zu wachsen und können so selektioniert werden.

Zur Durchführung der Klonierungen wurde das „TOPO TA Cloning Kit for Sequencing“ von ThermoFisher verwendet. Hierbei wurden im ersten Schritt je 0,5µl des TOPO Vektors (siehe Abbildung 11) und der enthaltenen Salzlösung mit 2µl PCR-Produkt gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 50µl kompetenter *E. coli* (Top10) erfolgte eine 20 minütige Inkubation auf Eis, gefolgt von einem 20 sekündigen Hitzeschock bei 42°C und einer weiteren Inkubation von 2 Minuten auf Eis. Nachdem 200µl SOC++ Medium pro Probe hinzugefügt wurden, erfolgte die finale Inkubation bei 37°C für ca. eine Stunde bei 200rpm. Daraufhin wurden 120-150µl pro LB-Agarplatte mit Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

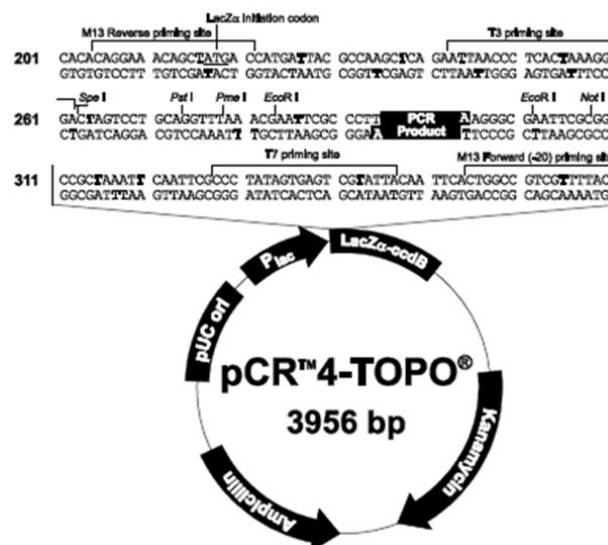


Abbildung 11: TOPO-Vektor [226]

### 2.13. DNA-Isolation aus Gel

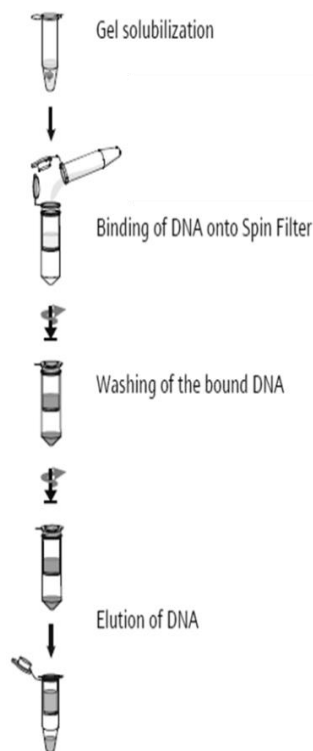


Abbildung 12: DNA-Isolation aus Gel [227]

Im Anschluss an die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese wurden die relevanten Banden mit einem Einmalskalpell ausgeschnitten und in 1,5mL Reaktionsgefäße überführt. Die folgende DNA-Extraktion aus den ausgeschnittenen Gelstücken erfolgte mit dem „innuPREP Gel Extraction Kit“ von Analytik Jena (siehe Abbildung 12).

Jedes Gelstück wurde in 650µL Gel Solubilizer gelöst. Hierfür wurde das Gelstück für etwa 10 Minuten bei 50°C inkubiert bis es sich vollkommen aufgelöst hatte. Nach der Zugabe von 50µL Binding Optimizer wurde die Probe auf die Säulen des Kits übertragen und eine Minute mit 11000rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Filter der Säule zwei Mal mit 700µL Waschlösung gewaschen. Um die übrige Waschlösung zu entfernen, wurden die Säulen zwei Minuten mit offenem Deckel bei maximaler Umdrehung zentrifugiert und getrocknet. Nachdem die Säulen auf neue Reaktionsgefäße überführt wurden, wurden 30-50µL Wasser hinzugegeben und nach einer Minute Inkubationszeit für eine Minute bei 11000rpm zentrifugiert, um die DNA vom Filter zu eluieren.

### 2.14. Sequenzier-PCR

Voraussetzung für die Sanger-Sequenzierung ist ein einzelsträngiges PCR-Produkt. Hierfür ist eine sogenannte Sequenzier-PCR nötig, in der nur ein Primer (forward oder reverse) eingesetzt wird. Diese PCR kann sowohl direkt mit dem aus Bakterien isolierten Plasmid als auch mit der isolierten DNA nach einem weiteren PCR-Schritt durchgeführt werden.

Der benötigte Mastermix wurde wie folgt mit Reagenzien aus dem „BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit“ von Applied Biosystems angesetzt:

Sequencing Premix	2µl
Big Dye Buffer	1µl
fw. oder rev. Primer (1:10)	0,5µl
aufgereinigtes Plasmid / PCR-Produkt	1µl
H <sub>2</sub> O	5,5µl
Σ	10µl

Für die Reaktion wurde folgendes PCR-Programm benötigt:

Vorheizen	95 °C für ∞
Denaturierung	96 °C für 60 Sek.
25 Zyklen:	
Denaturierung	96 °C für 10 Sek.
Hybridisierung	55 °C für 35 Sek.
Verlängerung	60 °C für 4 Min.
Ende	4 °C für ∞

#### Aufreinigung des Sequenzier-PCR-Produkts

Um das PCR-Produkt in der Sanger-Sequenzierung einsetzen zu können, war noch eine Aufreinigung mit den NucleoSeq-Säulen von Macherey&Nagel notwendig.

Die Vorbereitung der Säulen bestand darin, das enthaltene getrocknete Harzgel herunter zu zentrifugieren (eine Minute bei 2800rpm) und anschließend mit 600µL Wasser für 30 Minuten zu rehydrieren. Anschließend wurde das überschüssige Wasser bei 2800rpm in einer Minute herunterzentrifugiert. Die nun einsatzbereiten Säulen wurden auf frische Reaktionsgefäße überführt und mit den PCR-Produkten beladen. Abschließend erfolgte ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 2800rpm.

### **2.15. Sanger-Sequenzierung**

Für die abschließende Sanger-Sequenzierung wurden 4µL der aufgereinigten Proben mit 16µL HiDi in den benötigten 96-Well-Platten gemischt, mit der passenden Gummimatte verschlossen und anschließend gemäß den folgenden Bedingungen auf einem 3130 Genetic Analyzer von Applied Biosystems analysiert.

	<b>Value</b>
Oven_Temperature	60°C
Poly_Fill_Vol	4840 Steps
Current_Stability	5,0 µAmp
PreRun_Voltage	15,0 kVolt
PreRun_Time	180 Sek.
Injection_Voltage	1,2 kVolt
Injection_Time	13 Sek.
Voltage_Number_Of_Stages	20 nk
Voltage_Step_Interval	15 Sek.
Data_Delay_Time	80 Sek.
Run-Voltage	13,2 kVolt
Run_Time	900 Sek.

Tabelle 15: Bedingungen Sanger-Sequenzierung

## 2.16. RACE-PCR

Um auch sehr geringe Unterschiede im Immunglobulin-Repertoire der Makrophagen und Monozyten im Zeitverlauf nach der Tumorsektion detektieren zu können, wurden die Proben dieser Patienten nicht mittels Sanger-Sequenzierung, sondern mittels Next Generation Sequencing (NGS) untersucht. Die hierfür nötigen PCRs wurden nach dem so genannten RACE-Protokoll der Firma Takara durchgeführt. RACE steht hierbei für "rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction".

### 2.16.1. Synthese der RACE-cDNA

Vorbereitend wurde in einem ersten Schritt der später benötigte Puffer-Mix hergestellt. Hierfür wurde pro Probe folgender Mastermix erstellt, der anschließend kurz abzentrifugiert und bei Raumtemperatur gelagert wurde:

5x First-Strand Buffer	2 $\mu$ l
DTT	0,25 $\mu$ l
dNTP	0,5 $\mu$ l
$\Sigma$	2,75 $\mu$ l

In einem zweiten Schritt wurde der sogenannte 5'-RACE-Ready cDNA-Ansatz mit den nachfolgenden Reagenzien vorbereitet. Die RNA-Menge betrug jeweils 100-200ng.

RNA bzw. Kontroll-RNA	1-5 $\mu$ l
5'-CDS Primer	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	0-5 $\mu$ l
$\Sigma$	5,5 $\mu$ l

Dieser Ansatz wurde gemischt, abzentrifugiert und gemäß dem Programm RACE1 im PCR-Cycler inkubiert:

72 °C für  $\infty$   
72 °C für 3 min  
42 °C für 2 min  
10 °C für  $\infty$

Anschließend wurden jedem 5'-RACE-Ready cDNA-Ansatz 0,5 $\mu$ L SMARTer II A Oligos hinzugefügt.

Für den abschließenden Schritt war die Herstellung eines weiteren Mastermixes gemäß folgender Auflistung nötig:

Buffer Mix (aus Schritt 1)	2,75 $\mu$ l
RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ L)	0,25 $\mu$ l
<u>SMARTScribe Reverse Transcriptase (100U)</u>	<u>1<math>\mu</math>l</u>
$\Sigma$	4 $\mu$ l

Vier Mikroliter dieses Mastermixes wurden nun dem fertigen 5'-RACE-Ready cDNA-Ansatz mit Oligonukleotiden zugefügt, was ein Gesamtvolumen von 10 $\mu$ L pro Probe ergab. Die abschließende PCR-Reaktion der cDNA-Synthese fand gemäß folgendem Programm (RACE 2) statt:

42 °C für  $\infty$   
 42 °C für 90 min  
 72 °C für 10 min  
 10 °C für  $\infty$

Nach der Zugabe von 5 $\mu$ L Tricine-EDTA-Puffer konnte die cDNA bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden.

### 2.16.2. Amplifikation der RACE-cDNA

Die Amplifikation der zuvor hergestellten RACE-cDNA erfolgte mit einem universellen Primer-Mix als forward Primer und einem speziellen reverse Primer für die gewünschte Immunglobulin-Klasse. Als Polymerase wurde die Phusion Polymerase der Firma New England Biolabs eingesetzt. Der hierfür benötigte Mastermix (pro Probe) wurde wie folgt hergestellt:

5x Phusion HF Buffer	2,5 $\mu$ l
10x UPM	1,25 $\mu$ l
Reverse Primer (IgCm, IgCg, IgCk, IgCl)	0,25 $\mu$ l
Phusion Polymerase	0,1 $\mu$ l
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>7,6<math>\mu</math>l</u>
$\Sigma$	11,7 $\mu$ l

Im Anschluss wurden dem Mastermix pro Probe 0,6 $\mu$ L der RACE-cDNA hinzugefügt. Die PCR-Reaktion erfolgte abhängig von den verwendeten reverse Primern mit zwei unterschiedlichen Programmen mit Hybridisierungstemperaturen von 58°C bzw. 60°C.

### RACE 3 (IgC $\mu$ , IgC $\kappa$ , IgC $\lambda$ ):

Vorheizen	98 °C für $\infty$
Denaturierung	98 °C für 30 sek
40 Zyklen:	
Denaturierung	98 °C für 45 sek
Hybridisierung	58 °C für 45 sek
Verlängerung	72 °C für 3 min
Verlängerung	72 °C für 10 min
Ende	10 °C für $\infty$

### RACE 3 (IgC $\gamma$ ):

Vorheizen	98 °C für $\infty$
Denaturierung	98 °C für 30 sek
40 Zyklen:	
Denaturierung	98 °C für 45 sek
Hybridisierung	60 °C für 45 sek
Verlängerung	72 °C für 3 min
Verlängerung	72 °C für 10 min
Ende	10 °C für $\infty$

### 2.16.3. Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der entstandenen PCR-Produkte wurden pro Probe jeweils 2 $\mu$ L PCR-Produkt mit 2 $\mu$ L Ladepuffer auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Im Falle korrekter Banden, wurde die Qualität und Konzentration der PCR-Produkte am Bioanalyser überprüft, um im Anschluss die Library zu erstellen.



## 2.17. Next-Generation-Sequencing

### 2.17.1. Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer

Die Qualität und Konzentration der DNA wurde mit dem „High Sensitivity DNA Assay“ der Firma Agilent am dazugehörigen Messgerät (Bioanalyzer) bestimmt.

Im ersten Schritt wurde die benötigte Gelmatrix aus zwei Komponenten hergestellt und anschließend mit der dazugehörigen Chip Priming Station in den Chip gegeben (Abbildung 13). Anschließend wurde der Chip mit Marker, DNA-Leiter und Proben beladen. Die Messung wurde innerhalb von fünf Minuten gestartet und anschließend mithilfe der Agilent-Software (2100 Expert) ausgewertet.

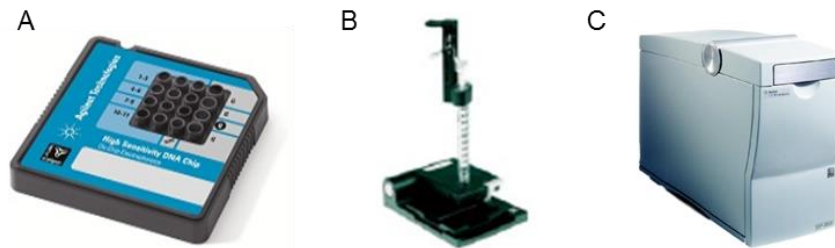


Abbildung 13: Bioanalyzer [228]

A: High Sensitivity DNA Chip, B: Priming Station, C: Bioanalyzer

### 2.17.2. Aufreinigung mittels AMPure XP Kit

Alle Reagenzien des AMPure XP Kit wurden für ca. 30 Minuten auf Raumtemperatur gebracht, während pro Probe 70 $\mu$ L 70% Ethanol vorbereitet wurden.

Im ersten Schritt wurden jeder Probe 90 $\mu$ L (1,8-faches Probenvolumen) Agencourt AMPure XP Reagenz hinzugefügt, kurz gemixt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 3 Minuten auf dem entsprechenden Magneten platziert. Sobald die Lösung klar war, wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Ohne die Proben vom Magneten zu nehmen, wurden die Pellets in je 30 $\mu$ L 70% Ethanol resuspendiert und für weitere 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert bis die Lösung wieder klar war. Der Überstand wurde erneut abgenommen und verworfen, bevor der Waschschrift noch einmal wiederholt wurde. Um die letzten Ethanol-Reste zu entfernen, wurde das Pellet im offenen Reaktionsgefäß am Magneten für 3-5 Minuten luftgetrocknet. Im Anschluss wurden die beladenen Beads in 15 $\mu$ L RNase-freiem Wasser aufgenommen, um die DNA von den Magnetpartikeln zu eluieren. Um die Beads aus der Lösung zu entfernen, wurden die Proben erneut auf den Magneten gestellt und anschließend der klare Überstand, der nun die eluierte DNA enthielt, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

### 2.17.3. Erstellung der Library

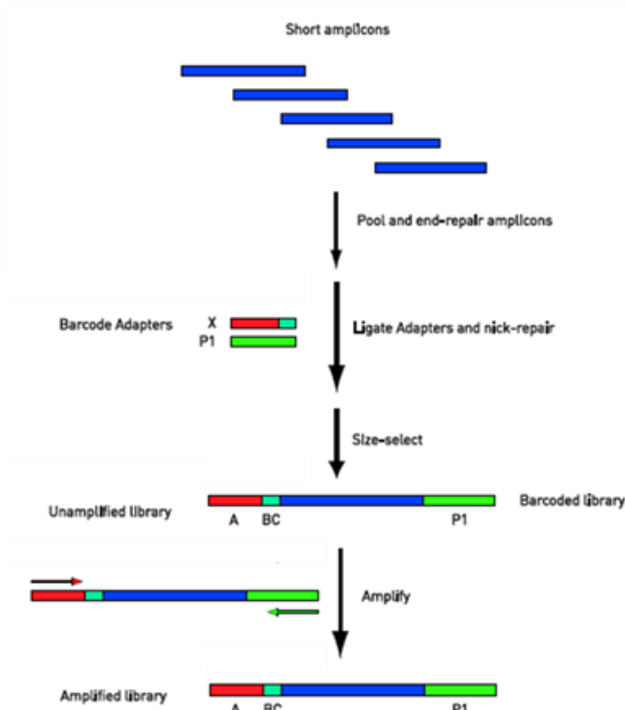


Abbildung 14: Workflow der Library-Erstellung

Um die Library der amplifizierten DNA-Segmente zu erstellen, sind mehrere PCR-Schritte und Aufreinigungen nötig (siehe Abbildung 14). Hierfür wurden die Protokolle und Produkt von Ion Torrent verwendet.

Im ersten Schritt erfolgt das sogenannte End-Repair und die Aufreinigung der Proben. Anschließend wird die Ligation der Barcodes und das Nick-Repair durchgeführt, wonach eine erneute Aufreinigung stattfindet. Im letzten Schritt wird die auf diesem Weg hergestellte Library amplifiziert und kann anschließend sequenziert werden.

#### End-Repair

Die aufgereinigten PCR-Proben der unterschiedlichen Primer wurden entsprechend ihrer jeweiligen Konzentration gepoolt und 10-100ng hiervon in insgesamt 79µL RNase-freiem Wasser aufgenommen und anschließend in folgendem Mastermix eingesetzt:

Gepoolte Amplikons, 10-100ng	79µL
5x End Repair Buffer	20µL
<u>End Repair Enzyme</u>	<u>1µL</u>
Σ	100µL

Der Mastermix wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit dem AMPure XP Kit aufgereinigt.

#### Ligation und NickRepair

Im Zuge der Ligation und des Nick-Repair erhielten die amplifizierten DNA-Sequenzen ihre Barcodes, um sie später nach der Sequenzierung wieder identifizieren und den entsprechenden Patienten zuordnen zu können.

Hierfür wurde folgender Mastermix verwendet:

DNA	~25 $\mu$ L
10x Ligase Buffer	10 $\mu$ L
Ion P1 Adapter	2 $\mu$ L
Ion Xpress Barcode	2 $\mu$ L
dNTP Mix	2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	49 $\mu$ L
DNA Ligase	2 $\mu$ L
<u>Nick Repair Polymerase</u>	<u>8<math>\mu</math>L</u>
$\Sigma$	100 $\mu$ L

Die Inkubation im PCR-Cycler erfolgte gemäß folgendem Schema:

25 °C für 15 min

72 °C für 5 min

4 °C für  $\infty$

#### Aufreinigung

Nach der Ligation der Barcodes erfolgte eine weitere Aufreinigung mit dem AMPure XP Kit gemäß dem bereits in 2.17.2. beschriebenen Protokoll.

#### Amplifikation der Library

Bevor die eigentliche Sequenzierung stattfinden konnte, musste die hergestellte Library der PCR-Produkte nochmals amplifiziert werden.

Hierfür wurden den ~20 $\mu$ L der aufgereinigten und Adapter-ligierten Library 5 $\mu$ L TE-Puffer hinzugefügt bevor sie im folgenden Mastermix eingesetzt wurden:

Platinum PCR SuperMix High Fidelity	100 $\mu$ L
Library Amplification Primer Mix	5 $\mu$ L
<u>Zu amplifizierende Library</u>	<u>25<math>\mu</math>L</u>
$\Sigma$	130 $\mu$ L

Das Reaktionsvolumen von 130 $\mu$ l wurde auf zwei PCR-Reaktionsgefäße mit je 65 $\mu$ L aufgeteilt, bevor die Reaktion gemäß nachfolgendem Temperaturverlauf gestartet wurde. Die Zykluszahl wurde hierbei von der eingesetzten DNA-Menge bestimmt und lag zwischen fünf und sieben Zyklen.

Vorheizen	95 °C für ∞
6 Zyklen:	
Denaturierung	95 °C für 15 Sek.
Hybridisierung	58 °C für 15 Sek.
Verlängerung	70 °C für 1 Min.
Ende	4 °C für ∞

Abschließend wurde nach der Amplifikation der Library eine erneute Aufreinigung mit AMPure XP durchgeführt.

### 2.17.4. Emulsions-PCR

Der letzte Schritt der Library Herstellung bestand aus einer Emulsions-PCR am Ion OneTouch 2. Diese wurde mithilfe des Ion PGM Hi-Q View OT2-Kits von Life Technologies durchgeführt. Nach den Vorbereitungen des Geräts (Installation der OneTouch Recovery Tubes und des Recovery Routers, sowie der Amplifikation Plate) wurde die im vorigen Schritt hergestellte Library entsprechend den Herstellerangaben verdünnt.

Library-Konzentration	100pM
Volumen der Library	6,5µL
<u>Volumen an Nuklease-freiem Wasser</u>	<u>18,5µL</u>
Gesamtvolumen der verdünnten Library	25µL

Im nächsten Schritt wurde der benötigte Reaktionsmix erstellt. Alle Reagenzien wurden hierfür zunächst auf Raumtemperatur gebracht und anschließend in der nachfolgenden Reihenfolge hinzugegeben.

Ion PGM Hi-Q View Reagent Mix	800µl
Nuklease-freies Wasser	25µL
Ion PGM Hi-Q View Enzyme Mix	50µL
Verdünnte Library	25µL
<u>Ion PGM Hi-Q View ISPs</u>	<u>100µL</u>
Total	1000µL

Nach einer 5 sekündigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurden die 100µL der Amplifikationslösung und anschließend 2x 850µL des OneTouch Reaction Oil auf den Reaktionsfilter gegeben. Nach dem Einsetzen des Reaktionsfilters in den Ion OneTouch 2, konnten der Lauf und die anschließende Zentrifugation gestartet werden.

Gemäß Herstellerprotokoll wurde anschließend die Emulsion aufgebrochen und das PCR-Produkt aufgereinigt, bevor es im nächsten Schritt sequenziert wurde.

### 2.17.5. Next-Generation-Sequencing

Zu Beginn der Sequenzierung erfolgten mehrere Reinigungs- und Initialisierungsschritte gemäß Herstellerprotokoll.

Bevor der Sequenzierungschip beladen werden konnte, wurden den Proben 5µL Kontroll-Partikel zugegeben, gemischt und für zwei Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden 12µL Sequenzierungs-Primer zur Probe gegeben und, wenn nötig, mit Annealing-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 27µL aufgefüllt. Nach dem gründlichen Mischen der Probe, wurde diese gemäß dem folgenden Programm im PCR-Cycler inkubiert.

Vorheizen	95 °C für ∞
Inkubation 1	95°C für 2 Min.
Inkubation 2	37°C für 2 Min.
Lagerung	RT (20-30°C)

Zur weiteren Vorbereitung des Geräts wurde der sogenannte „Chip-Check“ durchgeführt, bevor die Probe mit der Ion PGM Hi-Q View Sequenzierungs-Polymerase versetzt und auf den Chip geladen wurde. Bei den verwendeten Ion 316 Chips wurde jeweils das komplette Probenvolumen von ca. 30µL geladen. Im Anschluss konnte der im Vorfeld geplante Lauf gestartet werden.

### 2.18. Sequenzanalysen

Die Auswertung der erhaltenen DNA-Sequenzen erfolgte mithilfe der Datenbanken IgBLAST und IMGT, um die einzelnen V-, D- und J-Ketten zu bestimmen. Alle weiteren Untersuchungen, wie Alignments, Mutations- und Verwandtschaftsanalysen wurden mit dem Programm CLC Genomics Workbench der Firma Qiagen durchgeführt.

Für die Auswertung der NGS-Daten wurde das Tool IMGT HighQuest genutzt [229].

## 2.19. Luminex-Assay

Mit dem sogenannten Luminex-System der Firma Merck Millipore ist es möglich, in einem einzigen Experiment die Konzentrationen von bis zu 41 verschiedenen Zytokinen und Chemokinen zu messen. In dieser Arbeit wurde das Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel der Firma Merck Millipore verwendet, mit dem 38 verschiedene Analyten gleichzeitig quantifiziert werden können. Hierbei handelte es sich um EGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1RA, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , VEGF, FGF-2, TGF- $\alpha$ , FIT-3L, Fractalkine, GRO, MCP-3, MDC, sCD40L und IL-9.

Bevor die eigentliche Reaktion durchgeführt werden konnte, bedurfte es mehrerer Vorbereitungsschritte. Die im Kit enthaltenen Beads wurden für 30 Sekunden in ein Ultraschallbad gegeben und anschließend für eine Minute gevortext, um mögliche Verklumpungen zu lösen und eine optimale Reaktion mit den zu messenden Analyten zu gewährleisten. Die beiden Qualitätskontrollen und die lyophilisierte Serum-Matrix wurden in je 250 $\mu$ L bzw. 1mL Wasser rekonstituiert. Der beigefügte 10x Waschpuffer (60mL) wurde mit 540mL Wasser verdünnt. Im letzten Vorbereitungsschritt wurde der Zytokin-Standard in 250 $\mu$ L Wasser rekonstituiert, kurz gevortext und nach ca. 10 Minuten Wartezeit in Reaktionsgefäße überführt, um die Verdünnungsreihe nach dem folgenden Schema anzusetzen (Abbildung 15).

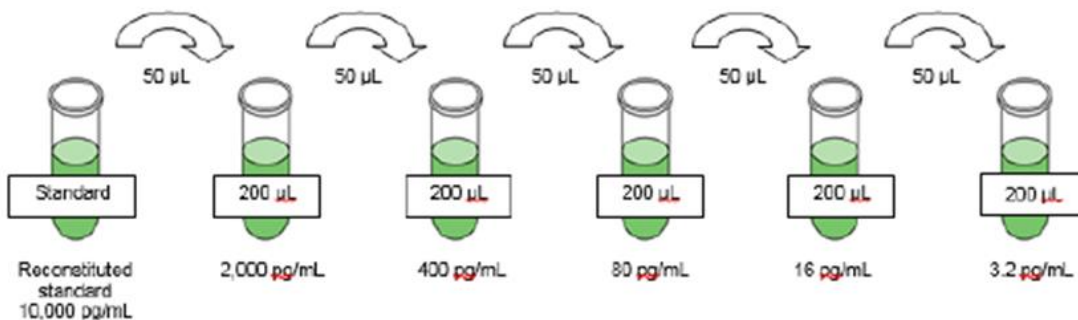


Abbildung 15: Verdünnungsreihe des Zytokin-Standards (Luminex-Assay)

Nach Beendigung der Vorbereitungen wurden 200 $\mu$ L Waschpuffer in jedes Well der Platte gegeben. Die Platte wurde verschlossen, zehn Minuten gemixt und anschließend der Waschpuffer verworfen. Gemäß der in Abbildung 16 gezeigten Plattenbelegung wurden 25 $\mu$ L der Standards und Qualitätskontrollen sowie 25 $\mu$ L Reaktionspuffer für die Proben in die jeweiligen Wells gegeben. Den Standards und Kontrollen wurden weiterhin 25 $\mu$ L Serum-Matrix zugefügt. Die zu untersuchenden Serum-Proben (25 $\mu$ L) wurden ebenfalls in

die entsprechenden Wells gegeben. Um die Reaktion zu starten wurden jedem belegten Well 25µL Beads hinzugefügt. Die Platte wurde versiegelt und inkubierte zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach beendeter Inkubationszeit wurde der Inhalt der Platte verworfen und diese zwei Mal gewaschen bevor 25µl Detektionsantikörper in jedes Well gegeben wurden. Nach einer erneuten Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurden pro Well 25µL Streptavidin-Phycoerythrin zugegeben, ohne vorher den Inhalt zu verwerfen. Im Anschluss an die finale Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur folgten zwei Waschschrirte und die Zugabe von 150µL Sheath Fluid bevor die Platte im zugehörigen Gerät gemessen werden konnte.

Die Standards und Qualitätskontrollen wurden jeweils in Duplikaten, die Patientenproben in Triplikaten aufgetragen und gemessen, um anschließend die jeweilige Standardabweichung berechnen zu können.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 pg/ml Standard (Background)	400 pg/ml Standard	QC-2 Control	GBM007	GBM009	GBM012	GBM015	Rezidiv 3Tage	GBMVP001 3 Monate	GBMVP002 3 Monate	Gesund 2 (weiblich)	Gesund 5 (Männlich)
B	0 pg/ml Standard (Background)	400 pg/ml Standard	QC-2 Control	GBM007	GBM010	GBM012	GBM015	GBMVP001 bei OP	GBMVP001 3 Monate	GBMVP002 3 Monate	Gesund 3 (weiblich)	Gesund 5 (Männlich)
C	3,2 pg/ml Standard	2000 pg/ml Standard	GBM001	GBM007	GBM010	GBM013	GBM015	GBMVP001 bei OP	GBMVP002 bei OP	GBMVP002 3 Monate	Gesund 3 (weiblich)	Gesund 6 (Männlich)
D	3,2 pg/ml Standard	2000 pg/ml Standard	GBM001	GBM008	GBM010	GBM013	Rezidiv bei OP	GBMVP001 bei OP	GBMVP002 bei OP	Gesund 1 (weiblich)	Gesund 3 (weiblich)	Gesund 6 (Männlich)
E	16 pg/ml Standard	10000 pg/ml Standard	GBM001	GBM008	GBM011	GBM013	Rezidiv bei OP	GBMVP001 3Tage	GBMVP002 bei OP	Gesund 1 (weiblich)	Gesund 4 (weiblich)	Gesund 6 (Männlich)
F	16 pg/ml Standard	10000 pg/ml Standard	GBM002	GBM008	GBM011	GBM014	Rezidiv bei OP	GBMVP001 3Tage	GBMVP002 3Tage	Gesund 1 (weiblich)	Gesund 4 (weiblich)	Gesund 7 (Männlich)
G	80 pg/ml Standard	QC-1 Control	GBM002	GBM009	GBM011	GBM014	Rezidiv 3Tage	GBMVP001 3Tage	GBMVP002 3Tage	Gesund 2 (weiblich)	Gesund 4 (weiblich)	Gesund 7 (Männlich)
H	80 pg/ml Standard	QC-2 Control	GBM002	GBM009	GBM012	GBM014	Rezidiv 3Tage	GBMVP001 3 Monate	GBMVP002 3Tage	Gesund 2 (weiblich)	Gesund 5 (Männlich)	Gesund 7 (Männlich)

Abbildung 16: Plattenbelegung Luminex-Assay

## **2.20. Immunhistologie**

Die histologische Begutachtung der Glioblastom-Proben erfolgte nach dem Routineprotokoll der Neuropathologie der Universitätsklinik Heidelberg, die freundlicherweise die HE- und CD14-Färbungen der in der Studie eingeschlossenen Patienten übernommen haben.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist die Routinefärbung für morphologische Untersuchungen und die Tumordiagnostik. Der natürliche Farbstoff Hämatoxylin färbt die in den Zellkernen enthaltene DNA blau, während der synthetische Farbstoff Eosin zu einer Rotfärbung der eosinophilen Zellbestandteile wie Plasmaproteine, Mitochondrien, Keratin und Kollagen führt.

Um den Anteil der CD14-positiven Zellen innerhalb des Tumorgewebes beurteilen zu können, wurden zusätzlich zur HE-Färbung auch Färbungen für den Oberflächenmarker CD14 angefertigt.

## **2.21. Mikroskopie**

Die Mikroskopie der immunhistologischen Färbungen erfolgte mit dem IX70 Mikroskop der Firma Olympus. Für die Fotografie wurde die in das System eingebundene Kamera Progres Graphyx der Firma Jenoptik und die dazugehörige genutzt.

## **2.22. FACS-Analysen**

Um die Zellen zusätzlich zur PCR genauer zu charakterisieren und die Reinheit der isolierten Zellfraktionen zu überprüfen, wurden die Zellen gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Pro Probe wurden  $5 \cdot 10^5$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden mit 1mL CellWash (BD) gewaschen, bevor je 5 $\mu$ L (25 $\mu$ g/mL) der benötigten Fluoreszenz-markierten Antikörper hinzugegeben wurden, was 0,125 $\mu$ g pro Probe entspricht. Für die verwendeten Antikörper siehe Material und Methoden, Kapitel 1.4. Die Inkubation von 30 Minuten erfolgte bei Raumtemperatur an einem abgedunkelten Ort. Nach einem erneuten Waschschrift mit 1mL CellWash wurden die Zellen in 500 $\mu$ L CellWash pro Probe aufgenommen und für die Messung eingesetzt.

Die Messung erfolgte am Canto II von BD. Bei der ersten Messung einer jeden Antikörper-Kombination wurde mit den entsprechenden Einzelfärbungen die benötigte Kompensation erstellt und für spätere Messungen gespeichert.



Die Auswertung der FACS-Messungen inklusive dem Setzen aller Gates wurde mithilfe der Diva-Software von BD durchgeführt.

## 2.23. Statistik

Um die Repertoires der Makrophagen und B-Zellen auch bei unterschiedlichen Sequenzanzahlen und Sequenzierungsmethoden vergleichen zu können, wurden sowohl der Shannon-Diversity-Index als auch der Simpson-Index bestimmt.

Beide Werte werden in der Biometrie eingesetzt, um die Diversität untersuchter Populationen zu beschreiben. Bei der Berechnung werden sowohl die Anzahl der unterschiedlichen Arten, in unserem Fall Immunglobulin-Ketten oder CDR3-Regionen, als auch die Häufigkeit der Individuen pro Art berücksichtigt.

### 2.23.1. Shannon-Diversity-Index

Der Shannon-Diversity-Index berechnet sich wie folgt:

$$H = - \sum_i p_i * \ln p_i \quad \text{mit} \quad p_i = \frac{n_i}{N}$$

Der Wert des Index steigt bei wachsender Diversität an [230].

### 2.23.2. Simpson-Index

Der Simpson-Index wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$D = 1 - \sum_{i=1}^s p_i^2$$

Im Gegensatz zum Shannon-Diversity-Index steht beim Simpson-Index ein kleinerer Wert für eine größere Diversität [231, 232]

---

## Ergebnisse

Die Untersuchung der Immunglobuline wurde mit zwei unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden durchgeführt, zum einen mittels Sanger-Sequenzierung basierend auf einer PCR mit Consensus-Primern und zum anderen mit einer Kombination aus RACE-PCR und Next-Generation-Sequencing (NGS). Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde ein detaillierter Vergleich der beiden Methoden erstellt.

Zusätzlich zu den Immunglobulin-Repertoires wurden weitere Aspekte wie beispielsweise die Reinheit der untersuchten Zellfraktionen, die Expression verschiedener Oberflächenmarker wie CD14 auf Gewebeschnitten der Tumore und die Zytokin-Konzentrationen im Serum der Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert, um ein genaueres Bild der äußeren Umstände zu erhalten.

Die Analyse der exprimierten Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen und B-Zellen erfolgte primär auf drei verschiedenen Ebenen:

1. auf Ebene der CDR3-Regionen, um die Variabilität der Immunglobuline darzustellen und zwischen den verschiedenen Patienten und Zelltypen vergleichen zu können
2. auf Ebene der verwendeten V-, D- und J-Ketten auf der Suche nach Unterschieden in der Rekombination zwischen Makrophagen und B-Zellen
3. auf Ebene der Mutationen, um die Fähigkeiten zur somatischen Hypermutation zwischen Makrophagen und B-Zellen zu vergleichen

Die hierbei untersuchten Faktoren wurden sowohl zum Zeitpunkt der Operation als auch im Verlauf nach der Tumoresektion untersucht.

## 1. Validierung der Methoden / allgemeine Charakterisierung

### 1.1. Reinheit der untersuchten Zellfraktionen

Die Reinheit der untersuchten Zellfraktionen wurde zunächst während der Etablierung der Methode im FACS und anschließend für jeden Patienten routinemäßig mit hoch sensitiven PCR-Untersuchungen überprüft.

Im FACS wurden sowohl die PBMCs als Positivkontrolle als auch die CD14- und CD19-positiven Fraktionen nach der MACS-Separation untersucht und mit Antikörpern gegen CD14, CD19, CD22 und CD2 angefärbt. Hierbei zeigt sich, dass die CD14-positive Fraktion lediglich 0,1% CD19- und CD22-positive Zellen enthält. Daher kann man davon ausgehen, dass die Zellfraktion frei von kontaminierenden B-Zellen ist. Auch in Bezug auf die Verunreinigung mit T-Zellen wurde eine Reinheit von über 99% erreicht.

Für die PCR wurden Primer für das Housekeeping-Gen GAPDH, die Makrophagen-/ Monozytenmarker CD14, CD68 und CD163, den B-Zell-Marker CD19 und den T-Zell-Marker CD2 verwendet. In den als Positivkontrolle verwendeten PBMCs sind Banden für alle verwendeten Primer zu sehen. In der CD14-positiven Fraktion lassen sich deutliche Banden für GAPDH sowie für alle Makrophagen- und Monozytenmarker, jedoch keine CD19-Expression erkennen. Auch die CD19-Fraktion erweist sich mit deutlichen Banden für GAPDH und CD19 als rein und frei von Monozyten und T-Zellen.

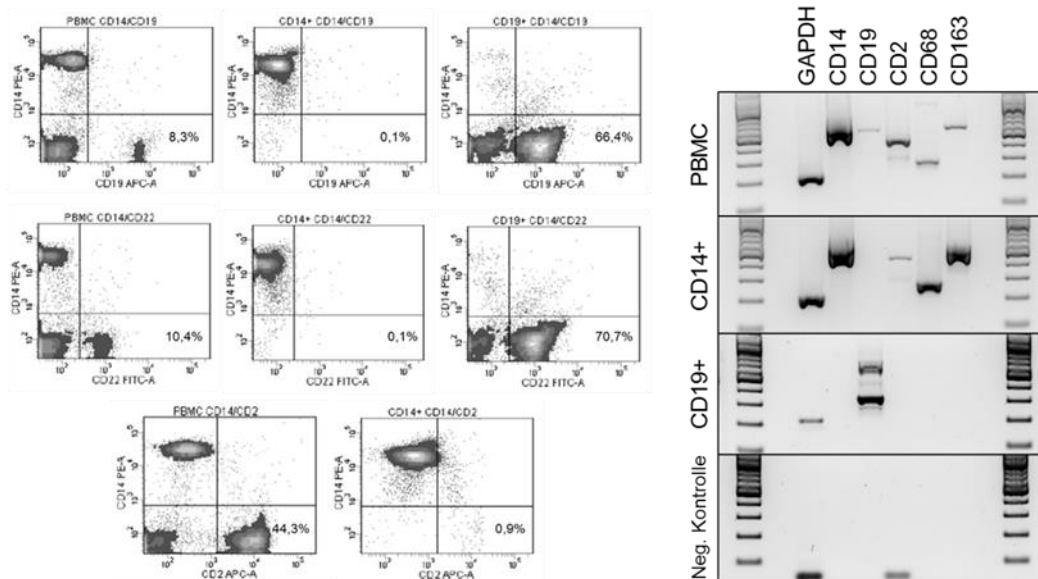


Abbildung 17: Reinheit der untersuchten Zellfraktionen

Die Reinheit der untersuchten Zellfraktionen wurde sowohl im FACS (links) als auch mittels PCR (rechts) nachgewiesen. Zur Untersuchung im FACS wurden drei fluoreszenzmarkierte Antikörper (CD14-PE, CD19-APC, CD2-APC und CD22-FITC) genutzt. In der PCR wurden Primer für GAPDH, CD14, CD19, CD2, CD68 und CD163 eingesetzt.

## 1.2. Sensitivität der CD19-PCR

Da die Reinheit der untersuchten Zellfraktionen unter anderem in der PCR überprüft wurde, musste zunächst sichergestellt werden, dass diese sensitiv genug ist, um auch geringe CD19-Verunreinigungen nachzuweisen.

Hierfür wurde die RNA CD19-positiver Zellen in fünf ausgewählten Konzentrationen (5%, 2%, 1%, 0,5% und 0,1%) in die RNA CD14-positiver Zellen eingespikt. Zusätzlich wurde die Fraktion der CD19-positiven Zellen als Positivkontrolle der CD19-Primer genutzt. Sowohl die Positivkontrolle als auch die beiden höchsten CD19-Konzentrationen von 5% und 2% zeigten sehr deutliche Banden in der Gelelektrophorese. Auch für 1% CD19 ist noch eine eindeutige Bande zu erkennen. Lediglich die beiden niedrigsten Konzentrationen von 0,5% und 0,1% konnten mit der verwendeten PCR nicht mehr zweifelsfrei nachgewiesen werden. Somit stand eine negative CD19-PCR stets für eine Reinheit der CD14-positiven Fraktion von über 99%.

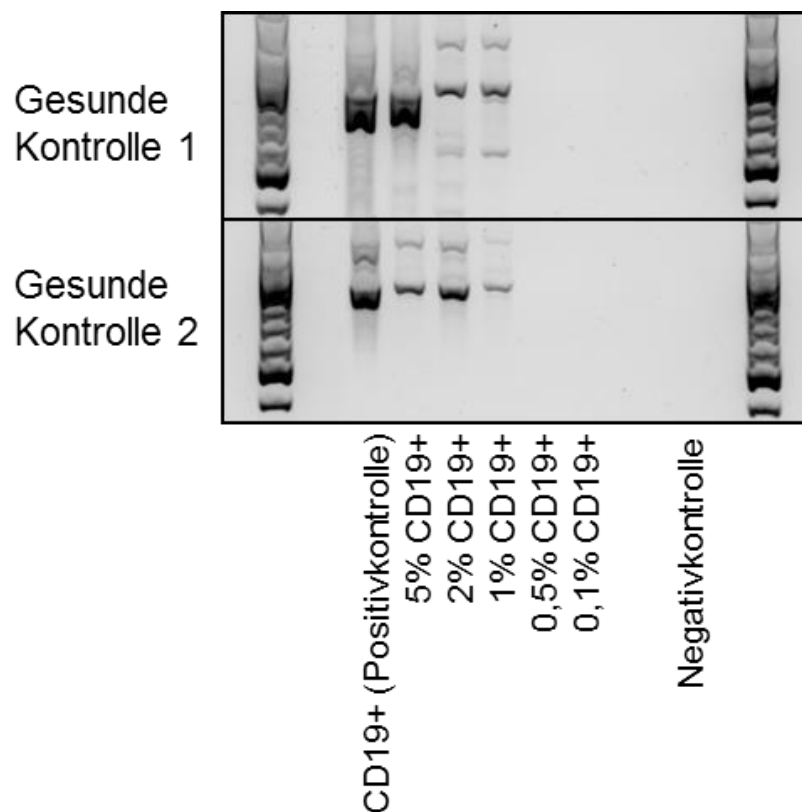


Abbildung 18: Sensitivität der CD19-PCR

Zum Nachweis der Sensitivität der genutzten CD19-PCR wurde CD19-RNA in CD14-RNA in unterschiedlichen Konzentrationen eingespikt und anschließend für die PCR genutzt. 5%, 2% und 1% CD19-RNA konnten mithilfe der PCR nachgewiesen werden. Eine negative PCR zeigt somit eine Reinheit von mindestens 99%.

### 1.3. Expression der löslichen und transmembranösen Formen von IgM

Immunglobuline können in der löslichen oder transmembranösen, an die Zellmembran gebundene Form, exprimiert werden. Findet man transmembranöse Immunglobuline auf der Oberfläche einer Zelle, so kann man davon ausgehen, dass die Zelle sie selbst produziert und an die Zelloberfläche gebracht hat, um die jeweiligen Antigene zu binden und die Zelle auf diesem Weg zu aktivieren.

Mit Primern, die an die spezifischen und unterschiedlichen Regionen der löslichen und transmembranösen Form von IgM binden, lässt sich in der PCR zeigen, welche Formen des Immunglobulins in den untersuchten Zellfraktionen vorliegen. Hierfür wurden jeweils die Makrophagen/ Monozyten und B-Zellen einer gesunden Probe und zweier Patientenproben untersucht. Die löslichen Immunglobuline sind in allen untersuchten Proben sehr deutlich nachzuweisen. Bei der transmembranösen Form zeigten sich für die gesunde Kontrolle als auch für eine der beiden Patientenproben sehr starke Signale, beim zweiten Patienten ein schwaches Signal in der CD14-positiven Zellfraktion.

Es konnte also gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit nachgewiesenen Immunglobuline nicht nur die lösliche Form sind, sondern auch die membrangebundene Form beinhalten und so von den untersuchten Zellen selbst exprimiert und nicht von außen aufgenommen wurden.

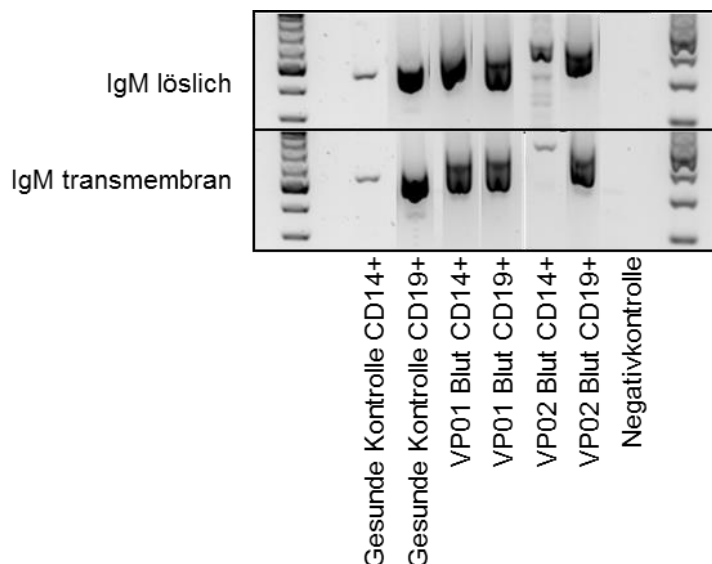


Abbildung 19: lösliches und transmembranöses IgM

In einer gesunden Kontrolle und zwei Glioblastom-Patienten (jeweils CD14+ und CD19+) wurde die Expression der löslichen und der transmembranösen Form von IgM untersucht. In allem Proben konnten beiden Antikörperformen mit unterschiedlich starker Expression nachgewiesen werden.

## 1.4. Immunkompetenz der Makrophagen

Die Immunkompetenz von Zellen wird, besonders in der Sepsis-Diagnostik, anhand der HLA-DR-Expression bestimmt [233]. Um die Immunkompetenz der Studienpatienten zu untersuchen, wurde die HLA-DR-Expression der Tumormakrophagen und zirkulierenden Monozyten exemplarisch für fünf Patienten und zwei gesunde Kontrollen in der PCR bestimmt. Hierfür wurden Primer für das Housekeeping-Gen GAPDH und das zu untersuchende HLA-DR verwendet. Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, exprimieren alle untersuchten Zellfraktionen HLA-DR, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß.

Bei der durchgeführten PCR handelt es sich nicht um eine quantitative PCR. Sie diente dem Nachweis der HLA-DR-Expression in den untersuchten Zellen. In allen untersuchten Proben konnte eine sehr deutliche Expression des Housekeeping-Gens GAPDH sowie eine Expression von HLA-DR gezeigt werden. Die Negativkontrollen beider Marker waren negativ.

Bei den untersuchten Tumormakrophagen zeigten sich verglichen mit den gesunden Kontrollen deutlich schwächere Banden für beide Marker. Vergleicht man die HLA-DR-Banden der Tumorpatienten anhand der Intensität ihrer GAPDH-Bande, so zeigt sich eine Abnahme der HLA-DR-Expression bei steigender Tumorgöße der Patienten (aufgetragen von links nach rechts).

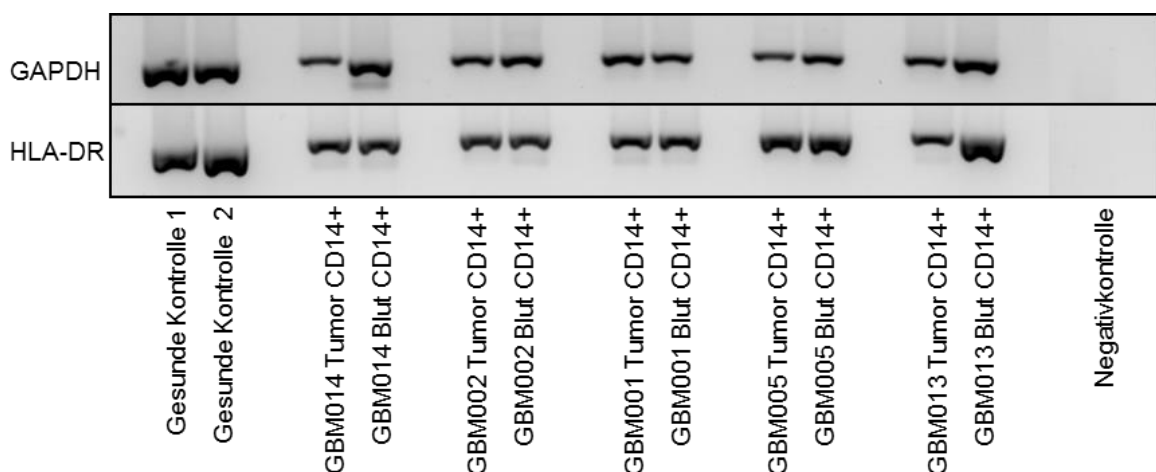
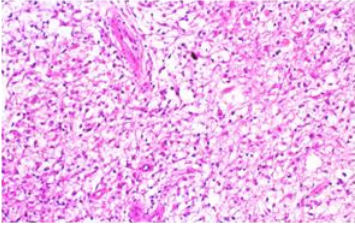

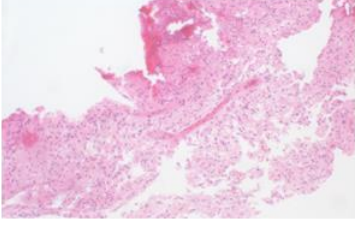
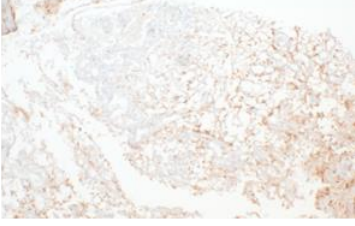
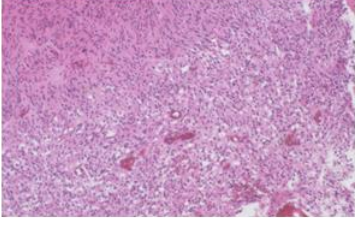

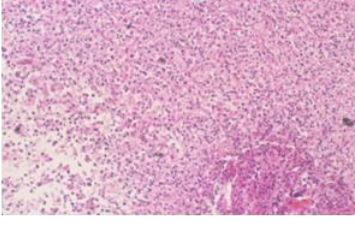
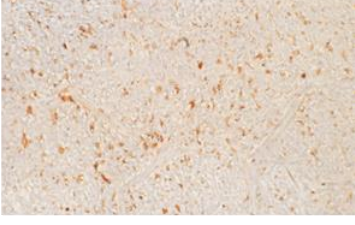
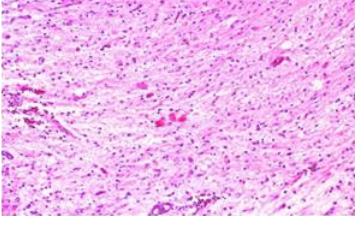

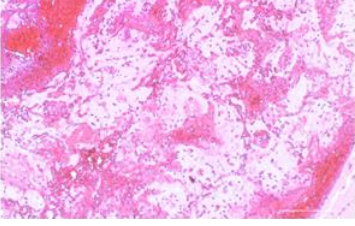
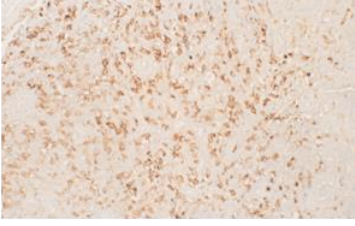
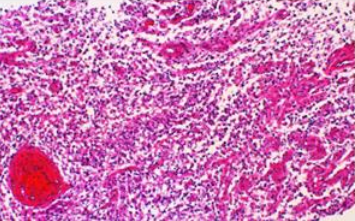
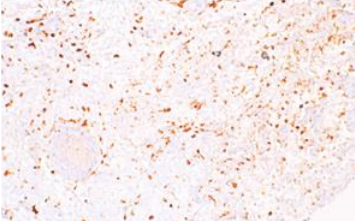


Abbildung 20: Immunkompetenz der Makrophagen

Die PCR zeigt die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH und HLA-DR zum Nachweis der Immunkompetenz der untersuchten Zellen. Untersucht wurden die CD14+ Zellen zwei gesunder Kontrollen und von drei Glioblastom-Patienten (jeweils aus dem Tumor und dem Blut).

1.5. HE- und CD14-Färbungen der Glioblastome

	HE-Färbung	CD14-Färbung
<b>GBM014</b> 3,54mL		
<b>GBM002</b> 8,67mL		
<b>GBM001</b> 11,03mL		
<b>GBM012</b> 15,68mL		
<b>GBM011</b> 28,17mL		
<b>GBM015</b> 34,35mL		
<b>GBM005</b> 36,60mL		



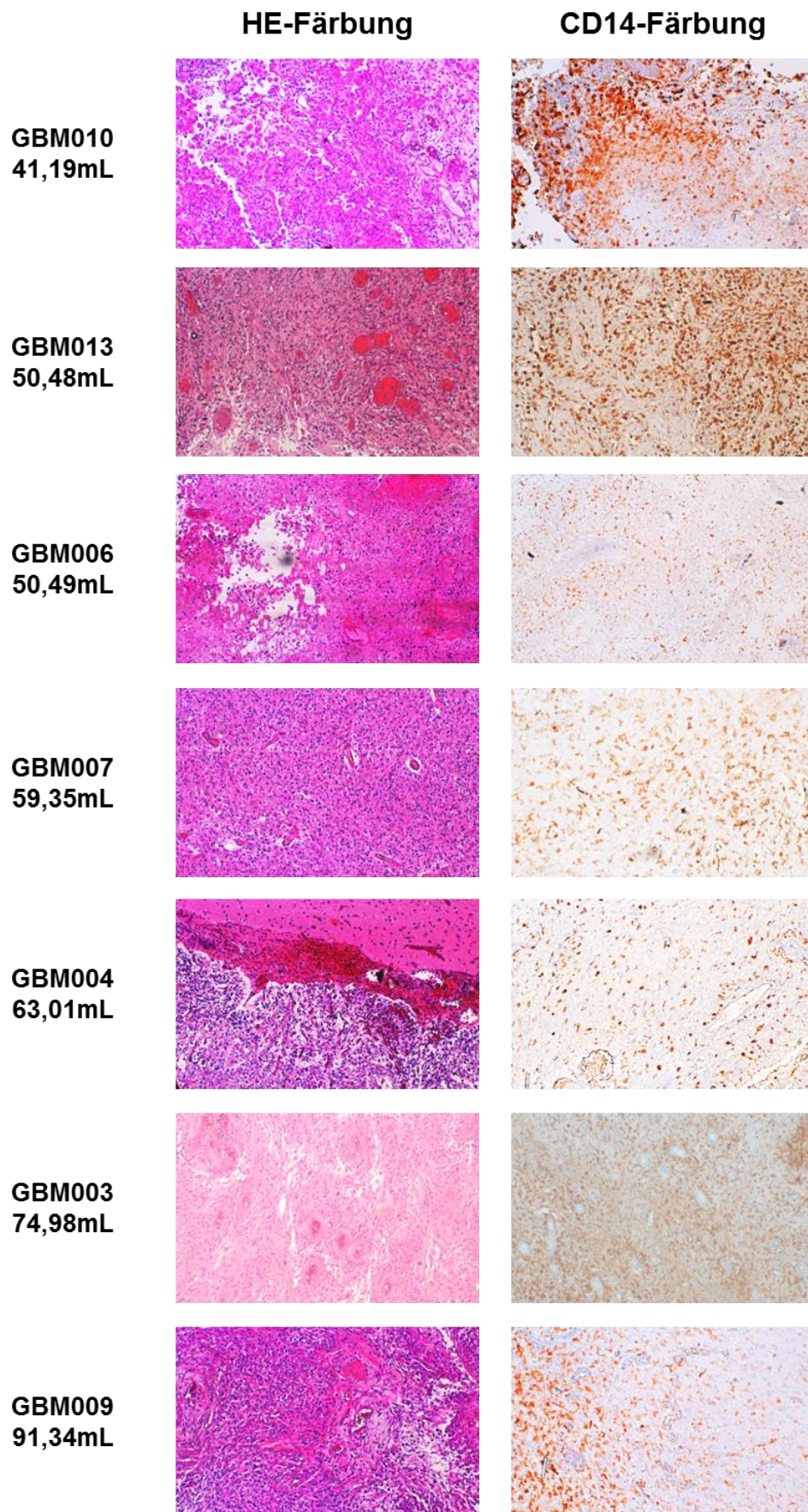


Abbildung 21: HE- und CD14-Färbungen der Glioblastome. Die Angabe des Tumorzvolumen in mL wurde radiologisch bestimmt.

Um nicht nur die einzelnen isolierten Zellen der Glioblastom-Patienten zu untersuchen, sondern auch einen Überblick über den Gewebeaufbau und die Infiltration des Tumors mit Makrophagen zu bekommen, wurden sowohl HE- als auch CD14-Färbungen der Gewebeschnitte aller Patienten angefertigt.

Abbildung 21 zeigt die HE- und CD14-Färbungen aufsteigend nach der TumorgroÙe der Patienten sortiert. Das Tumolvolumen wurde dabei radiologisch bestimmt. In der HE-Färbung sind alle Gewebe deutlich als Tumorgewebe zu erkennen, teilweise wie bei GBM001 und GBM004 auch mit dem Übergang zum gesunden Normalgewebe.

Die Infiltration des Tumorgewebes mit CD14-positiven Zellen wird mit der CD14-Färbung deutlich. Diese CD14-Infiltration ist bei allen Patienten zu erkennen. Es zeigt sich kein Zusammenhang zwischen der individuellen TumorgroÙe der Patienten und der Stärke der CD14-Infiltration.

## 1.6. Vergleich der unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden

Zu Beginn der Studie wurden die Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen und B-Zellen und deren Variabilität mittels Klonierung und Sanger-Sequenzierung untersucht. Hierbei kamen verschiedene Primer für die unterschiedlichen Schwer- und Leichtketten (IgM, IgG, Igκ, Igλ) zum Einsatz. Die Reverse-Primer lagen hierbei im konstanten Bereich der Immunglobuline und wurden mit mehreren forward-Consensus-Primern in den variablen Regionen kombiniert. Die forward-Primer unterscheiden zwischen den verschiedenen Immunglobulin-Familien. Um dabei ein möglichst großes Spektrum der verschiedenen Immunglobulin-Sequenzen abzudecken, enthielten die Consensus-Primer sogenannte Wobble-Basen, welche an mehrere Nukleotide binden können. Neben der Chance möglichst viele verschiedene Ketten im Anschluss sequenzieren zu können, besteht hierbei allerdings auch die Gefahr eines gewissen Bias und der bevorzugten Amplifikation einzelner Immunglobulin-Ketten. Des Weiteren bleibt bei der Verwendung dieser Primer die Gefahr nicht alle möglichen Ketten amplifizieren zu können, da sie nicht das gesamte Spektrum abdecken. Die forward-Primer wurden von Lim et al. übernommen [234].

Um diesen Effekt zu vermeiden und zusätzlich die volle Länge der Immunglobulin-Sequenzen zu erhalten, wurde die Sequenzierung im Laufe der Studie auf Next-Generation-Sequencing (NGS) in Kombination mit der sogenannten SMARTer RACE-PCR umgestellt. Diese garantiert eine Bias-freie Amplifikation der Immunglobulin-Ketten bis zum 5'-Ende [98].

Die vorherigen Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen sollten mit denen der NGS-Analysen verglichen werden. Hierfür wurde die Probe eines gesunden Spenders mit beiden Methoden untersucht. Zusätzlich wurde die mit den Consensus-Primern amplifizierte Probe auch im NGS eingesetzt, um eine tiefere Sequenzierung mit mehr Sequenzen zu erhalten. Dieser Vergleich der unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden wurde sowohl für die Makrophagen (Abbildung 22) als auch die B-Zellen (Abbildung 23), jeweils für die Schwereketten IgM und IgG als auch die Kappa- und Lambda-Leichtketten durchgeführt. Damit ein sinnvoller Vergleich der verschiedenen Methoden mit deutlichen Unterschieden in den Sequenzanzahlen möglich ist, wurden der sogenannte Shannon-Diversity-Index [230] sowie der Simpson-Index [231, 232] berechnet, welche die Diversität der Repertoires im Verhältnis zur vorhandenen Sequenzanzahl darstellen.

## 1.6.1. Monozyten/ Makrophagen:

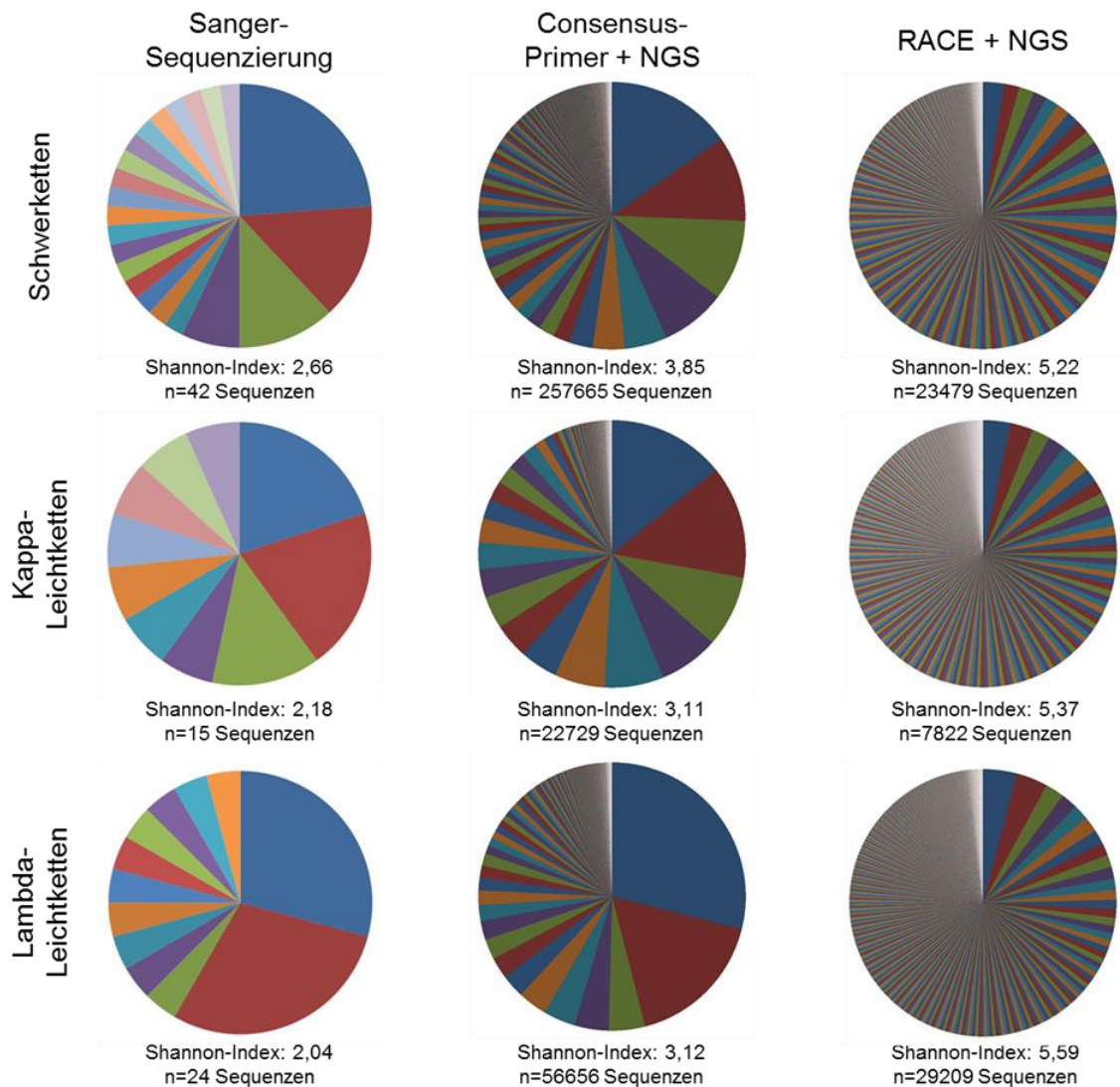


Abbildung 22: Vergleich der unterschiedlichen Sequenzierungen (CDR3 der Monozyten/ Makrophagen)

CDR3-Variabilität der jeweiligen V-Ketten der untersuchten Schwerketten, Kappa- und Lambda-Leichtketten in Monozyten und Makrophagen als Ausdruck der Abdeckung des Repertoires durch Primer-basierte Amplifikation von Immunglobulin mRNAs nach allen drei getesteten Sequenzierungs-Methoden.

Betrachtet man die Diversität der mit drei unterschiedlichen Methoden erhaltenen Schwerketten, so zeigt sich wie erwartet die geringste Anzahl (Komplexität) unterschiedlicher CDR3-Regionen in der Sanger-Sequenzierung. Aus 42 Sequenzen wurden 22 verschiedene CDR3-Regionen identifiziert, was einem Shannon-Index von 2,66 entspricht. Die NGS-Analyse der gleichen, mit Consensus-Primern amplifizierten DNA, ergab 4.263 verschiedene CDR3-Regionen aus 257.665 Sequenzen, entsprechend einem Shannon-Index von 3,85. Kombiniert man nun die Bias-lose RACE-PCR mit NGS, so erhält man basierend auf 799 unterschiedlichen CDR3-Regionen aus 23.479 Sequenzen einen Shannon-Index von 5,22. Das mittels NGS erzielte Ergebnis zeigt, dass die Amplifikation von Immunglobulin-Gen mRNAs einen deutlichen Bias für den Consensusprimer-Ansatz

zeigt, der zwar zu einer hohen Zahl an Einzelsequenzen führt, allerdings ein deutliches Skewing aufweist, welches durch präferentielle Amplifikation durch einzelne Consensusprimer erklärt wird. So stellt die häufigste CDR3-Region nach dem „RACE-PCR-NGS“ nur noch etwa 2,6% aller CDR3-Regionen dar und nicht mehr ca. 15,3% wie bei der Kombination aus Consensus-Primern und NGS (Tabelle 16).

Im NGS mit Consensus-Primern erscheint ein höherer Anteil extrem seltener Sequenzen. Sequenzartefakte können hier als Ursache jedoch weitestgehend ausgeschlossen werden, da alle Sequenzen, die nur ein einziges Mal gefunden wurden, nicht in die Auswertung einbezogen wurden.

	Top10 V-Ketten		Top10 CDR3-Regionen	
	V-Kette	% Anteil	CDR3-Region	% Anteil
Sanger-Sequenzierung	IGHV3-73*01	26,19	TRQSPVWGDDYFRFFGMDV	23,81
	IGHV2-5*02	14,29	ARALSGGSLPS	14,29
	IGHV4-61*01	14,29	AHTHPGGYSRGMDV	11,9
	IGHV1-69*01	7,14	ARGIEQLRYHYGMDV	7,14
	IGHV4-59*01	4,76	ARIPGQRYYYGLDV	2,38
	IGHV3-30-3*01	4,76	AREGAGPRQQIDALDI	2,38
	IGHV2-26*01	2,38	VKDAWLQFFGY	2,38
	IGHV3-74*01	2,38	AAAVRLGMGY	2,38
	IGHV3-64D*06	2,38	ARDLEGSSSSHYGMDV	2,38
	IGHV3-48*03	2,38	AREGGAVDTAMVTTWYYFDY	2,38
Consensus Primer + NGS	IGHV2-5*02	13,61	AHTHPGGYSRGMDV	15,27
	IGHV4-61*08	10,98	ARIPGQRYYYGLDV	10,35
	IGHV3-7*01	9,75	AREGEARGKIDALDI	9,78
	IGHV2-26*01	9,29	ARDWASVGPTQHYIDY	7,89
	IGHV3-74*01	9,07	AREFAP	5,16
	IGHV1-69*01	4,32	ARGSYIILGATMGGFDP	3,86
	IGHV3-21*01	3,68	ARALSGGSLPS	2,91
	IGHV3-30*01	3,43	ARGYSSSYHDAFDI	1,97
	IGHV3-30-3*01	3,42	ARENSSGWSKNWFDP	1,94
	IGHV4-61*01	2,79	ARGIEQLRYYYGMDV	1,73
RACE + NGS	IGHV4-34*01	10,17	AKGPVISGYDAFDI	2,57
	IGHV1-69*01	7,53	AGEGSVLTSTFDI	1,84
	IGHV4-59*01	5,21	ARGRYTDY	1,84
	IGHV4-39*01	4,66	ARGYGYNLD	1,63
	IGHV3-23*01	4,43	ARVGRRELNLRYFDL	1,6
	IGHV1-2*01	4,32	ASGQWRYGMDV	1,6
	IGHV1-8*01	3,79	AKLGAPPVNTVTLRDY	1,57
	IGHV3-30*01	3,71	ARIGGSSGWYYFDY	1,57
	IGHV1-24*01	3,68	ARAGHDSSGYDY	1,54
	IGHV4-38-2*01	3,58	ARGGGYYGMDV	1,41

Tabelle 16: Top10 V-Ketten und CDR3-Regionen der unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden (Makrophagen)



Vergleicht man die jeweiligen Top10 Resultate der gefundenen V-Gene der Schwereketten aller drei Sequenzierungsmethoden, so zeigen sich Unterschiede in der Verteilung. Erwartungsgemäß ist die größte Überschneidung zwischen den beiden Methoden mit Consensus-Primern zu finden. Für diese Methoden stimmen sechs der zehn gefundenen V-Ketten überein, auch wenn sie im Ranking nicht in der gleichen Reihenfolge zu finden waren. Unter den häufigsten zehn V-Ketten aus der RACE-PCR sind nur drei (1-69\*01, 3-30\*01 und 4-59\*01) unter den Top10 der Consensus-Primer. Weiterhin zeigt sich in der RACE-PCR eine leichte Häufung der Ketten der Familie V<sub>H1</sub> sowie ein Fehlen von Mitgliedern der Familie V<sub>H2</sub>.

Vergleicht man die CDR3-Regionen aus den unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden, so zeigt sich eine Überschneidung von drei CDR3-Regionen zwischen den beiden Methoden mit Consensus-Primern (ARALSGGSLPS, AHTHPGGYSRGMDV und ARIPGQRYYYGLDV). Die Top 10 CDR3-Regionen der RACE-PCR hingegen zeigen keine Übereinstimmungen mit denen der anderen Methoden. Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der V-Ketten in den untersuchten Top10 ist dies jedoch nicht überraschend, da bei der Bildung der CDR3-Region noch der Einfluss der D- und J-Ketten hinzukommt.

## 1.6.2. B-Zellen:

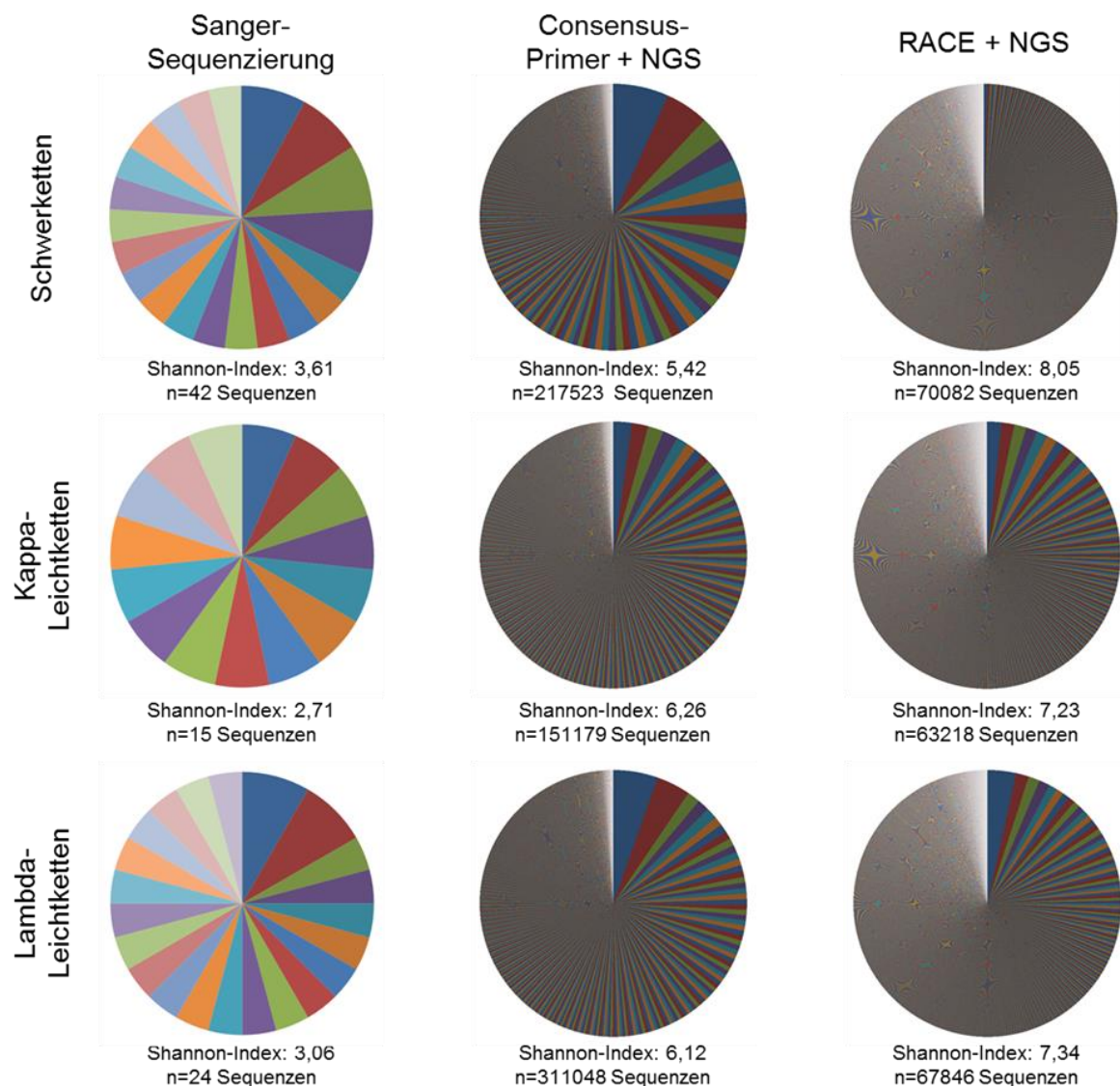


Abbildung 23: Vergleich der unterschiedlichen Sequenzierungen (CDR3 der B-Zellen)

CDR3-Variabilität der jeweiligen V-Ketten der untersuchten Schwerketten, Kappa- und Lambda-Leichtketten in B-Zellen als Ausdruck der Abdeckung des Repertoires durch Primer-basierte Amplifikation von Immunglobulin mRNAs nach allen drei getesteten Sequenzierungs-Methoden.

Um zellspezifische Effekte auszuschließen, wurden die drei verwendeten Methoden auch für die Repertoires CD19-positiver B-Zellen eines gesunden Spenders durchgeführt, welche im Vergleich zu den Makrophagen eine größere Diversität des Immunglobulin-Repertoires aufweisen.

Im Falle der Schwerketten-CDR3s der B-Zellen steigt der Shannon-Index von 3,61 in der Sanger-Sequenzierung (38 verschiedene CDR3-Regionen aus 42 Sequenzen) auf 5,42 beim NGS mit denselben Consensus-Primern (6.967 verschiedene CDR3-Regionen aus 217.523 Sequenzen). Durch die Nutzung der RACE-PCR steigt der Shannon-Index

nochmals auf 8,05, wobei hier 6.901 unterschiedliche CDR3-Regionen aus 140.164 Sequenzen zugrunde liegen.

Ähnliche Verhältnisse finden sich auch bei den Kappa- und Lambda-Leichtketten. Die Sanger-Sequenzierung der Kappa-Leichtketten lieferte 15 verschiedene CDR3-Regionen aus 15 Sequenzen, die Kombination aus NGS und denselben Consensus-Primern hingegen 4.961 CDR3-Regionen in 151.179 Sequenzen. Im Falle der RACE-PCR wurden sogar 5.354 unterschiedliche CDR3-Regionen in 63.218 Sequenzen erkannt. Daher sind für die Kappa-Leichtketten Werte des Shannon-Diversity-Index von 2,71 für die Sanger-Sequenzierung, 6,26 für das NGS mit Consensus-Primern und schließlich 7,23 bei der Kombination aus NGS und RACE-PCR zu finden. Bei den Lambda-Leichtketten liegen die entsprechenden Werte bei 3,06 (22 CDR3-Regionen aus 24 Sequenzen) in der Sanger-Sequenzierung, 6,12 (8.638 CDR3-Regionen aus 311.048 Sequenzen) beim NGS mit vorheriger Amplifikation mit den Consensus-Primern und bei der RACE-PCR bei 7,34 mit 6.646 CDR3-Regionen bei 67.846 Sequenzen.



	Top10 V-Ketten		Top10 CDR3-Regionen	
	V-Kette	% Anteil	CDR3-Region	% Anteil
Sanger-Sequenzierung	IGHV3-30*04	21,43	ARFIGYCSSDSCYRGMDV	4,76
	IGHV3-30-3*01	9,52	ARDRVAWNWFDP	4,76
	IGHV4-59*01	4,76	ARERTSCHGDCIDL	4,76
	IGHV6-1*01	4,76	ARQFSPLGTFDY	4,76
	IGHV3-23*01	4,76	ARDRGPGYYFDY	2,38
	IGHV3-48*03	4,76	ARVSKRGYYDSSGYSYYFDY	2,38
	IGHV3-33*01	4,76	ARGGTVGAILS	2,38
	IGHV3-49*04	2,38	IWDTGHTSTT	2,38
	IGHV3-49*02	2,38	ASKEYYYDSSGYYT	2,38
	IGHV3-30*03	2,38	AKGVWSTKVFDY	2,38
Consensus Primer + NGS	IGHV4-59*01	10,67	ARIPHYDSNGQALDAFDI	6,74
	IGHV2-70*04	7,45	ARQFSPLGTFDY	5,25
	IGHV2-5*02	6,5	AHSSFGSGTYNWFDP	3,07
	IGHV5-51*01	6,37	ARICARGYSYGYRWDYFDY	2,85
	IGHV6-1*01	6,01	ARDSSSWNWYFDL	2,65
	IGHV2-26*01	5,25	ARDRGPGYYFDY	2,1
	IGHV3-30*01	3,62	AITTRGFDY	1,92
	IGHV3-30-3*01	3,56	ARAPITGVIIMPDAFDI	1,88
	IGHV3-23*01	3,23	ARDPTDGIVPRRAGAFDI	1,74
	IGHV3-30*04	3,19	ARRTYDLLVGFYRYGMDV	1,64
RACE + NGS	IGHV4-34*01	15,2	ASRHSSGWYGY	0,43
	IGHV1-69*01	9,32	ARSGSGADYYGTDV	0,311
	IGHV4-39*01	6,68	ARASAWQRLVLYPDY	0,23
	IGHV4-59*01	4,83	ARGDSSRWYEY	0,22
	IGHV1-69*06	4,37	ARMSWRQKSFDY	0,19
	IGHV1-2*02	4,29	ARRQARDSSSWYNDY	0,19
	IGHV1-18*01	4,27	ARQEGFDY	0,19
	IGHV5-51*01	4,27	ARDLGGNWYFDL	0,18
	IGHV6-1*01	3,76	ARGSFHDYFDN	0,18
	IGHV3-23*01	3,33	ARIPGYCSGGSCYSDAFDV	0,17

Tabelle 17: Top10 V-Ketten und CDR3-Regionen der unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden (B-Zellen)

Auch der Vergleich der Top10 V-Ketten der B-Zellen aus den unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden zeigt Überlappungen zwischen den Ergebnissen aller drei Methoden.

Zwischen der Sanger-Sequenzierung und dem NGS mit Consensus-Primern sind fünf der Top10 gefundenen V-Ketten gleich. Die Platzierung innerhalb der zehn häufigsten V-Ketten unterscheidet sich. Betrachtet man die häufigsten zehn V-Ketten der RACE-PCR im NGS, so sind vier davon auch mit den Consensus-Primern zu finden. Auch bei den B-Zellen ist ein Shift hin zu V-Ketten der Familie V<sub>H1</sub> und ein Fehlen der Familie V<sub>H2</sub> zu erkennen.

### 1.6.3. Wiederfindungsrate der V-Ketten

Zum weiteren Vergleich der drei getesteten Sequenzierungsmethoden wurde jeweils die Wiederfindungsrate aller V-Ketten bestimmt. Hierfür wurde wieder die gleiche gesunde Kontrolle genutzt. Tabelle 18 zeigt hierbei die Anzahl der jeweils sequenzierten V-Ketten und die entsprechende Wiederfindungsrate.

Für die Schwerketten IgM und IgG beträgt die Gesamtzahl aller V-Ketten inklusive aller bekannten Allele 374 Gene [68]. Hiervon wurden mit den Consensus-Primern in der Sanger-Sequenzierung 17% (n=64), mit der Kombination aus NGS und Consensus-Primern 55% (n=204) und mit der RACE-PCR mit anschließendem NGS 65% (n=242) aller möglichen Ketten gefunden.

Von den 114 genomischen Kappa-V-Ketten wurden 31% durch Sanger-Sequenzierung, 46% durch Consensus-Primer + NGS sowie 60% durch RACE + NGS durch Sequenzierung erfasst. Bei den V-Ketten der Lambda-Leichtketten wurden mittels Sanger-Sequenzierung 21% der genomischen 128 V-Ketten identifiziert. Die Kombination aus Consensus-Primern und NGS kam auf 48% (61 V-Ketten) und die RACE-PCR mit NGS auf 59% (75 V-Ketten) [68].

Insgesamt wurden bei den Schwerketten durch die Amplifikation mit der RACE-PCR 38 unterschiedliche V-Ketten mehr (242 statt 204 V-Ketten) gefunden als beim NGS nach der Amplifikation mit den Consensus-Primern, was einer Zunahme der Sequenzzahl von 18,6% entspricht. Betrachtet man die V-Ketten ohne ihre Allele, so steigt die Zunahme durch die RACE-PCR sogar auf 22,6% (53 zu 65 verschiedenen V-Ketten).

	<b>Consensus Primer</b>	<b>Consensus Primer + NGS</b>	<b>RACE + NGS</b>	<b>Gesamtzahl unterschiedlicher V-Ketten</b>
<b>Schwerketten</b>	64 V-Ketten (17%)	204 V-Ketten (55%)	242 V-Ketten (65%)	374 V-Ketten
Kappa-Leichtketten	36 V-Ketten (31%)	52 V-Ketten (46%)	68 V-Ketten (60%)	114 V-Ketten
Lambda-Leichtketten	27 V-Ketten (21%)	61 V-Ketten (48%)	75 V-Ketten (59%)	128 V-Ketten

Tabelle 18: Wiederfindungsrate der V-Ketten in den verschiedenen Sequenzierungen

Wiederfindungsrate der Schwerketten, Kappa- und Lambda-Leichtketten in den drei untersuchten Sequenzierungsmethoden – Consensus-Primer, Consensus-Primer in Kombination mit NGS und RACE-PCR mit NGS.

Stellt man die beiden NGS-Methoden genauer gegenüber und vergleicht welche Ketten in nur einer oder in beiden Sequenzierungen gefunden wurden, so ergibt sich die in Abbildung 24 gezeigte Verteilung.

In den CD14+ Zellen wurden insgesamt 62 verschiedene V-Ketten gefunden, 40 davon mit beiden Methoden und die restlichen 21 nur mit der Kombination aus RACE-PCR und NGS. Für die CD19+ Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild. Lediglich eine der insgesamt 61 V-Ketten wurde exklusiv mit den Consensus-Primern gefunden. Zehn V-Ketten hingegen jedoch ausschließlich in der RACE-PCR und 50 Stück mit beiden Methoden. Nimmt man beide Zellpopulationen zusammen, so ergibt sich eine Gesamtzahl von 66 verschiedenen V-Ketten, von denen der Großteil von 52 V-Ketten mit beiden Methoden sequenziert wurde. Eine V-Kette trat nur in der Sequenzierung mit den Consensus-Primern auf, 13 nur nach der RACE-PCR.

Es zeigt sich somit, dass ein Großteil der mit beiden NGS-Methoden gefundenen Repertoires übereinstimmt. Gleichzeitig erhöht die Verwendung von RACE-PCR-NGS die Repertoires spezifischer Immunglobulin-Sequenzen zwischen 20% und 35%.

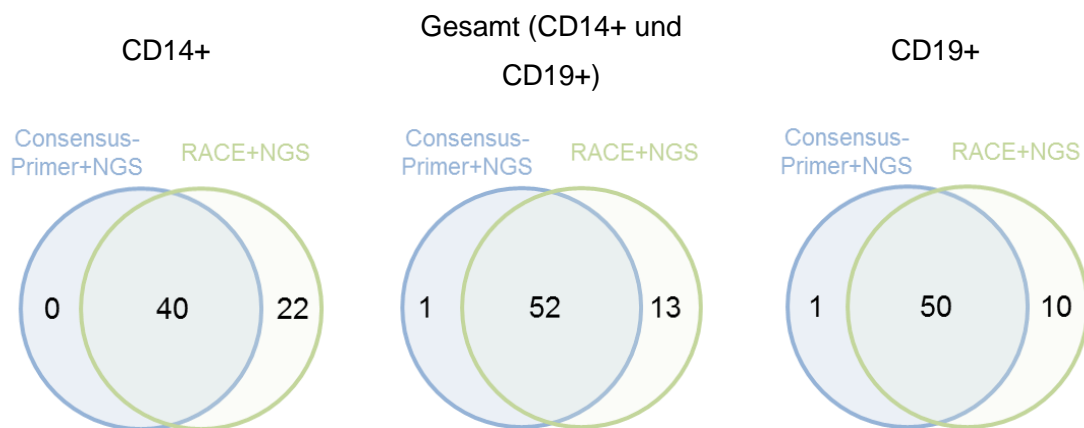


Abbildung 24: Anzahl der gefundenen V-Ketten in den verschiedenen Sequenzierungsmethoden

Zum Vergleich der unterschiedlichen Sequenzierungs-Methoden wurden die jeweils gefundenen V-Ketten der Schwerketten IgM und IgG in beiden Zellfraktionen (CD14 und CD19) sowie in der Gesamtheit verglichen. Links sind jeweils die Ketten dargestellt, die lediglich mit den Consensus-Primern gefunden wurden, rechts die einzigartigen nach der RACE-PCR und mittig die Überschneidungen, die mit beiden Methoden sequenziert wurden.

#### 1.6.4. Verteilung der V-Ketten-Familien

Unter den zehn am häufigsten gefundenen  $V_H$ -Ketten werden verschiedene V-Ketten-Familien in Abhängigkeit von der Sequenzierungsmethode in unterschiedlichen Häufigkeiten gefunden.

Wie in Tabelle 16 und Tabelle 17 bereits zu erkennen war, findet man die Familie  $V_{H1}$  und  $V_{H4}$  vermehrt in Sequenzierungen, welche auf der RACE-PCR beruhen (siehe Abbildung 25). Wenn man davon ausgeht, dass die RACE-PCR frei von Bias ist, sind diese zwei Familien in der PCR mit Consensus-Primern unterrepräsentiert. Somit sind die Familien  $V_{H2}$  und  $V_{H3}$  in der PCR mit Consensus-Primern überrepräsentiert. Im Falle der Familie  $V_{H5}$  ist das Auftreten nahezu ausgeglichen zwischen den beiden getesteten Sequenzierungsmethoden. Die Ketten der Familie  $V_{H6}$  sind im Bereich von unter 5% nach der RACE-PCR zu finden, jedoch nur in verschwindend geringem Maße nach Benutzung der Consensus-Primer, wie auch  $V_{H7}$  nach der RACE-PCR.

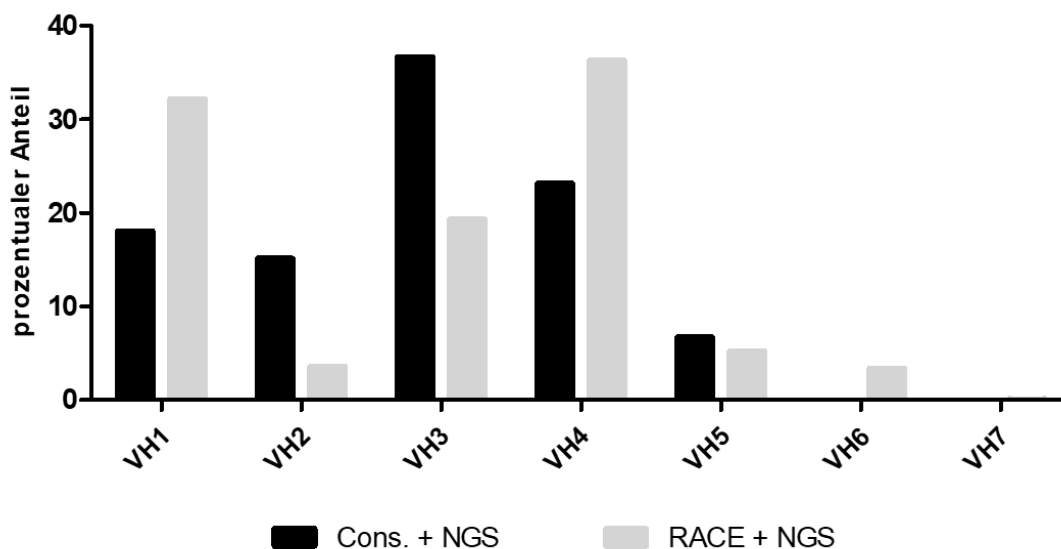


Abbildung 25: Anteil der sequenzierten  $V_H$ -Ketten-Familien mit den unterschiedlichen NGS-Methoden

Sowohl für die Consensus-Primer mit NGS als auch die RACE-PCR in Kombination mit NGS wurden die prozentualen Anteile der verschiedenen  $V_H$ -Ketten-Familien ( $V_{H1}$ - $V_{H7}$ ) ermittelt und aufgetragen. Die Sequenzierung mit Consensus-Primern zeigt ein höheres Vorkommen von  $V_{H2}$  und  $V_{H3}$ , mit der RACE-PCR kommt es hingegen zu einer Erhöhung von  $V_{H1}$  und  $V_{H4}$ .

### 1.6.5. Vergleichbarkeit der getesteten Methoden

Die verwendeten Sequenzierungsmethoden unterliegen jeweils einem unterschiedlichen Bias. Um die Sanger-Sequenzierung mit dem Next-Generation-Sequencing und der RACE-PCR trotz ihrer sehr unterschiedlichen Anzahlen an ermittelten Sequenzen vergleichen zu können, mussten die spezifischen Diversitäten normiert werden. Auf diese Weise konnte der Einfluss der Consensus-Primer auf das Ergebnis der Sanger-Sequenzierung ermittelt werden. Zur Normierung wurde der Shannon-Diversity-Index (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.23.1), welcher mit wachsender Diversität ansteigt, und der bei steigender Diversität abnehmende Simpson-Index (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.23.2) genutzt.

Für einen besseren Vergleich der Methoden wurden die jeweiligen Shannon-Diversity-Indizes der Schwereketten-CDR3s von Makrophagen und B-Zellen aus allen drei untersuchten Sequenzierungsmethoden gegenübergestellt und das Verhältnis gebildet (siehe Tabelle 19). Vergleicht man das Verhältnis von CD14+ zu CD19+ Zellen, so zeigt sich lediglich ein geringer Unterschied zwischen der Sanger-Sequenzierung und dem NGS mit denselben Consensus-Primern. Das Verhältnis sank leicht von 0,7368 auf 0,7103, was bedeutet, dass der Unterschied in der Diversität der Repertoires mit der Sanger-Sequenzierung, wahrscheinlich aufgrund der geringeren Probenzahl, leicht verstärkt wird. Bei steigender Probenzahl durch Anwendung des Next-Generation-Sequencings bleiben jedoch alle vorher ermittelten Zusammenhänge und Tendenzen bestehen. Durch den Einsatz der RACE-PCR und den somit wegfallenden Bias in der Amplifikation der Immunglobulingene, sank das Verhältnis der Shannon-Diversity-Indizes von CD14+ zu CD19+ um etwa 0,06 auf 0,6484, was bedeutet, dass die Differenz der Repertoire Variabilitäten zwischen den beiden Zellpopulationen etwas geringer ist als nach der Sanger-Sequenzierung angenommen.

	<b>Sanger</b>	<b>Consensus Primer + NGS</b>	<b>RACE + NGS</b>
CD14+ (Shannon-Index)	2,66	3,85	5,22
CD19+ (Shannon-Index)	3,61	5,42	8,05
Verhältnis CD14+ / CD19+	0,7368	0,7103	0,6484

Tabelle 19: Verhältnis der Variabilität von Makrophagen zu B-Zellen in den verschiedenen Sequenzierungen (Shannon-Index)

Zur Darstellung der Variabilität der Repertoires wurden die Shannon-Diversity-Indizes der CD14-positiven und CD19-positiven Zellfraktionen sowie deren Verhältnis für alle drei Sequenzierungs-Methoden berechnet und gegenübergestellt.

Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung der Diversität der gefundenen Immunglobulin-Repertoires ist der sogenannte Simpson-Index. Im Gegensatz zum Shannon-Index steht hier ein geringerer Index für eine größere Diversität.

Der Simpson-Index wurde für die Schwerketten-CDR3s der Makrophagen und B-Zellen aus allen drei Sequenzierungsmethoden bestimmt und ebenfalls der CD14+/CD19+ Quotient gebildet. Dieser liegt für die Kombination aus Consensus-Primern und NGS bei einem Wert von 15,42. Ersetzt man diese PCR durch eine RACE-PCR, so steigt der Quotient minimal auf 15,83 an. Die gefundenen Unterschiede zwischen den Immunglobulin-Diversitäten von Makrophagen und B-Zellen unterschieden sich somit kaum voneinander. Lediglich das Verhältnis der beiden Zellpopulationen zueinander, das man durch die Sanger-Sequenzierung erhält, weicht mit einem Quotienten von 18,41 etwas von den beiden NGS-Methoden ab. Dies lässt sich jedoch durch die Berechnungsmethode des Simpson-Index erklären, da hierbei die Sequenzen, die lediglich einmal vorkommen eine stärkere Gewichtung erhalten als beim Shannon-Index.

	<b>Sanger</b>	<b>Consensus Primer + NGS</b>	<b>RACE + NGS</b>
CD14+ (Simpson-Index)	0,0847	0,0586	0,0019
CD19+ (Simpson-Index)	0,0046	0,0038	0,00012
Verhältnis CD14+ / CD19+	18,41	15,42	15,83

Tabelle 20: Verhältnis der Repertoire Variabilität von Makrophagen zu B-Zellen mit den unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden (Simpson-Index)

Zur weiteren Darstellung der Variabilität der Repertoires wurden die Simpson-Indizes der CD14-positiven und CD19-positiven Zellfraktionen sowie deren Verhältnis für alle drei Sequenzierungs-Methoden berechnet und gegenübergestellt.

Trotz der festgestellten Differenzen zwischen den untersuchten Sequenzierungsmethoden, kann man festhalten, dass bei allen drei Methoden ein vergleichbares Verhältnis der Immunglobulin-Diversität zwischen den beiden Zellpopulationen besteht. Dies ist gleichzeitig als Verifikation der größtenteils genutzten Sanger-Sequenzierung mit vorausgegangener PCR mit Consensus-Primern zu sehen.

## 2. CDR3-Variabilität

### 2.1. Vergleich von Makrophagen und B-Zellen

Nach erfolgreichem Vergleich und Validierung der unterschiedlichen genutzten Methoden, konnte mit der Untersuchung der Patientenproben und der Auswertung der Ergebnisse begonnen werden. Im Anschluss an die Analyse der erhaltenen Immunglobulin-Sequenzen aus der Sanger-Sequenzierung erfolgte im ersten Schritt der Vergleich der Repertoires von Makrophagen- und B-Zell-Immunglobulinen.

Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Variabilität der exprimierten Antikörper zwischen den beiden Zelltypen. Bei den Immunglobulinen der Makrophagen war teilweise ein deutlich geringeres Repertoire als bei den B-Zellen zu erkennen. Die Varianz zwischen dem Makrophagen- und dem B-Zell-Repertoire unterschied sich von Patient zu Patient, jedoch war die Komplexität der Antikörper in den B-Zellen stets größer. Beispielhaft zeigt Abbildung 26 die gefundenen CDR3-Regionen der Immunglobulin-Klassen IgM und Igk in Makrophagen aus Tumoren zweier Patienten. Das Verhältnis der verschiedenen gefundenen CDR3-Regionen zwischen Makrophagen und B-Zellen beträgt hier 3:7 bzw. 2:7.

Alle Patienten besitzen sehr variable B-Zell-Repertoires, während die Variabilität der Immunglobuline aus Makrophagen charakteristisch für jeden der Patienten ist und im interindividuellen Vergleich deutlichen Schwankungen unterliegt.

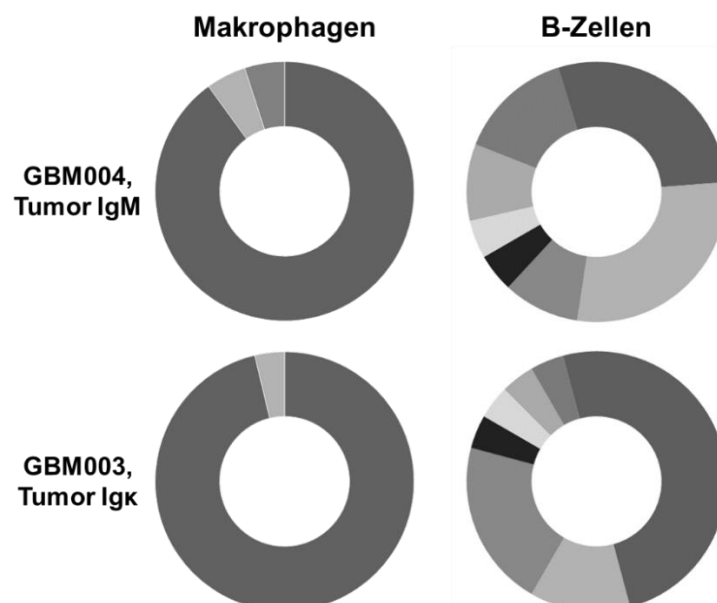


Abbildung 26: Vergleich Makrophagen- und B-Zell-Repertoire

Für zwei repräsentativ ausgewählte Patienten (GBM003 und GBM004) wurden die Repertoires der Makrophagen und B-Zellen, einmal für IgM und einmal für Igk, gegenübergestellt. Jedes Tortenstück steht

hierbei für eine CDR3-Region und die Größe der Tortenstücke sind proportional zur Anzahl der einzelnen CDR3-Sequenzen. Hierbei zeigte sich jeweils ein deutlich diverseres Repertoire in den B-Zellen, verglichen mit den dazugehörigen Makrophagen.

## 2.2. Vergleich zwischen Tumor und Blut

Der Vergleich zwischen dem Repertoire der Makrophagen aus dem Tumor und dem der zirkulierenden Blutzellen zeigt ebenfalls Unterschiede.

Hierfür wurden sowohl die Schwer- als auch Leichtketten, amplifiziert mit IgM- und Igk-Primern, der Zellen beider Kompartimente verglichen. Hierbei zeigt sich ein eingeschränkteres Repertoire bei den Makrophagen aus dem Tumor im Vergleich zu den zirkulierenden Monozyten aus der Peripherie. Dieses Phänomen ist wie in Abbildung 27 dargestellt, nicht bei jedem Studienpatienten gleich stark ausgeprägt, jedoch zeigt sich stets eine größere Immunglobulin-Diversität in den zirkulierenden Monozyten als in den Makrophagen aus dem Tumor. Welche Eigenschaften des Tumors hierfür verantwortlich sind, bleibt jedoch zunächst ungeklärt.

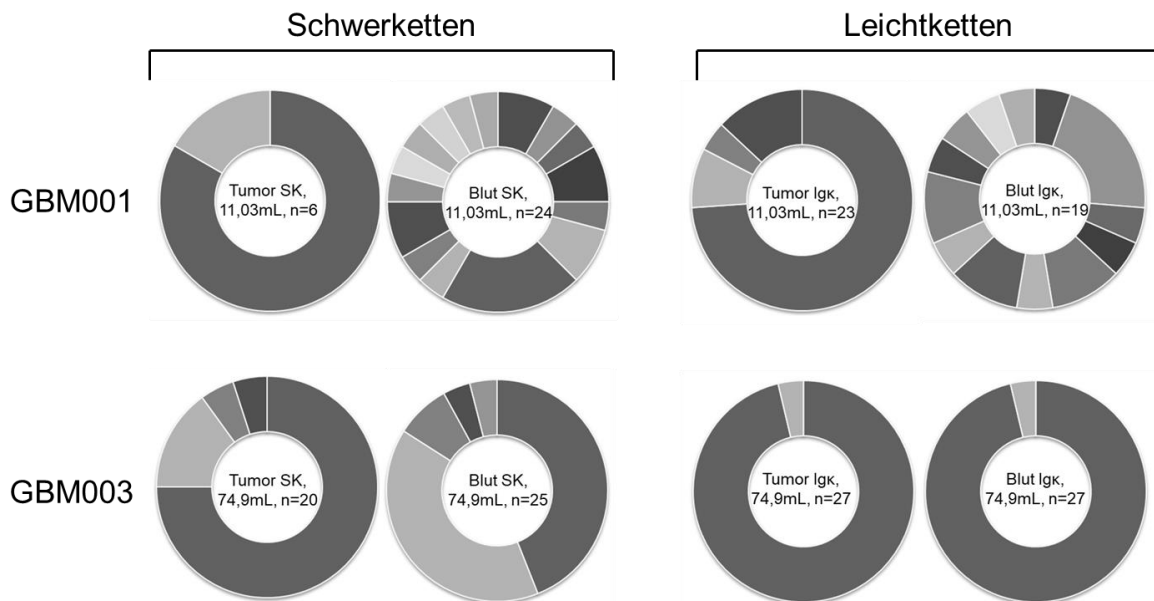


Abbildung 27: Vergleich der Makrophagen-Antikörper Repertoires in Tumor und Blut

Für zwei repräsentativ ausgewählte Patienten (GBM001 und GBM003) werden sowohl die Schwerketten- als auch die Igk-Repertoires aus Tumor und Blut gegenübergestellt. Jedes Tortenstück steht hierbei für eine CDR3-Region und die Größe der Tortenstücke sind proportional zur Anzahl der einzelnen CDR3-Sequenzen. Es zeigt sich jeweils in geringeres Repertoire im Tumor verglichen mit der dazugehörigen Blutprobe.



### 2.3. CDR3-Längenverteilung

Auf der Suche nach der Ursache des deutlich geringeren Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen im Vergleich zu den B-Zellen der gleichen Patienten wurden die Längen der exprimierten CDR3-Regionen untersucht (siehe Abbildung 28). Die Länge der CDR3-Regionen ist definiert von der letzten „C“-Base (GTG) in FW3 bis zur letzten Aminosäure vor „WG“ (TGGGGX).

Im Falle der Schwereketten lässt sich eine sehr breite Verteilung der CDR3-Längen von fünf bis einschließlich 31 Basenpaaren erkennen. Ein Unterschied zwischen den untersuchten Antikörpersequenzen der Makrophagen und B-Zellen lässt sich nur in der absoluten Anzahl der einzelnen CDR3-Längen, jedoch nicht in der Verteilung erkennen. Bei den Leichtkettensequenzen hingegen zeigt sich eine wesentlich schmalere Verteilung von sechs bis 14 Basenpaaren mit einem sehr deutlichen Maximum bei neun Basenpaaren, sowohl bei den Makrophagen als auch bei den B-Zellen.

Da in der CDR3-Längenverteilung kein eindeutiger Unterschied zwischen den Makrophagen und B-Zellen zu erkennen ist, ist dieser Aspekt als Ursache für die unterschiedliche Variabilität der exprimierten Immunglobuline auszuschließen.

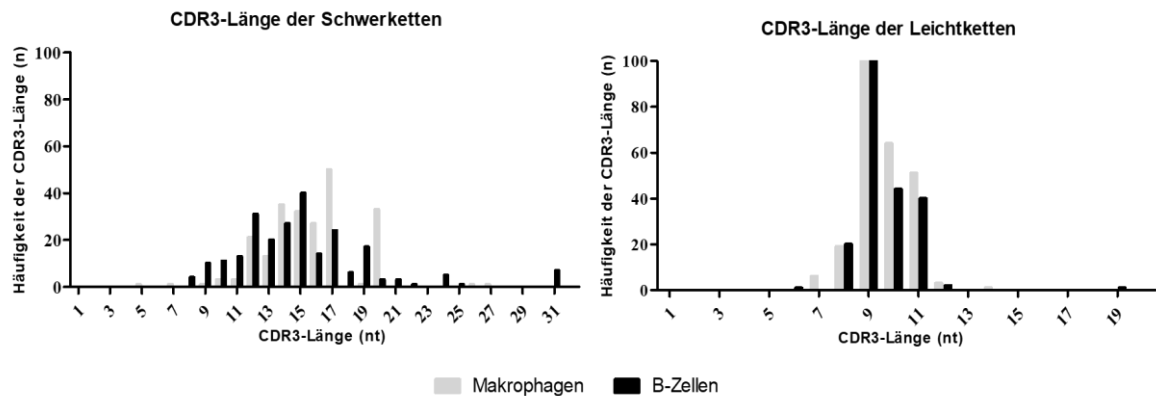


Abbildung 28: CDR3-Längenverteilung

Die Häufigkeit der jeweiligen CDR3-Länge der Schwereketten (links) sowie der Leichtketten (rechts) wurde parallel für die Makrophagen und B-Zellen gegen die Länge als Anzahl der Nukleotide aufgetragen. Hierbei zeigt sich jeweils eine sehr ähnliche Längenverteilung bei Makrophagen und B-Zellen.

## 2.4. Überschneidungen bei den CDR3-Sequenzen in Blut und Tumor

Um einen genaueren Eindruck des Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen zu bekommen, wurden die Repertoires der unterschiedlichen Patienten auf strukturelle Ähnlichkeiten und über CDR3-Regionen untersucht. Ebenfalls wurden Überschneidungen der CDR3-Repertoires von Makrophagen aus Blut und Tumor eines Patienten gesucht.

Bei genauerem Vergleich der gefundenen CDR3-Regionen zeigten sich bei den untersuchten Makrophagen sowohl Überschneidungen innerhalb der einzelnen Patienten zwischen Tumormakrophagen und zirkulierenden Monozyten (intra-individuell) als auch zwischen den Repertoires aus Blut und Tumor zwischen den einzelnen Patienten (inter-individuell). Hierbei wurden mehrere gleiche Sequenzen im Blut und im Tumor desselben Patienten, aber auch im Blut des einen und im Tumor eines anderen Patienten und umgekehrt gefunden. In Tabelle 21 ist eine Darstellung der Schwerkettensequenzen aus Makrophagen von drei ausgewählten Patienten zu finden. Ein ähnliches Bild ist auch für die untersuchten Leichtketten zu erkennen. Die Makrophagen-Repertoires der Glioblastom-Patienten sind also nicht nur im Vergleich zu den B-Zell-Repertoires eingeschränkt, sondern ähneln sich auch zwischen den Patienten.

Im Gegensatz hierzu sind solche Überschneidungen bei den B-Zellen fast ausschließlich bei den kürzeren CDR3-Regionen der Leichtketten zu finden, da nur eine einzige Schwerketten-CDR3-Sequenz im Tumor als auch im Blut eines Patienten gefunden wurde. Aufgrund der großen Antikörper-Vielfalt der B-Zellen sind somit kaum Ähnlichkeiten zwischen den Repertoires der Patienten zu erkennen.

Die Überschneidungen der Makrophagen-CDR3-Sequenzen zwischen den Blut- und Tumorproben eines Patienten, die in den B-Zellen nicht zu finden sind, geben einen Hinweis darauf, dass die Tumormakrophagen womöglich als Monozyten aus dem Blut ins das Tumorgewebe eingewandert und dort weiter proliferiert sind.

CDR3	GBM001	GBM001	GBM002	GBM002	GBM003	GBM003
	TAM SK	Blut SK	TAM SK	Blut SK	TAM SK	Blut SK
ARDAVGDSSGYYYVYSFYYSYGLDV	X	X				
AREGWFCSSSTNCYGNGVDV	X	X				
SRETQWQFDH	X	X				
VRSWAYSLTPAGTGTYFES		X	X			
ARGAGVRYFDWLSPAGY			X		X	X
GRGGTGYYYMDV			X	X		
ARVPINYDILTGDY					X	X

Tabelle 21: Gleiche Schwerketten-CDR3-Regionen in Tumor und Blut

Das Vorkommen von sieben ausgesuchten CDR3-Regionen in drei verschiedenen Patienten wird dargestellt. Hierbei sind Überschneidungen sowohl zwischen den Tumor- und Blutproben einzelner Patienten als auch zwischen unterschiedlichen Patienten zu erkennen. (SK = Schwerkette)

## 2.5. Vergleich von CDR3-Region und VDJ-Kombination

Weiterhin wurde der Zusammenhang der gefundenen CDR3-Sequenzen und der hierbei verwendeten V-, D- und J-Ketten untersucht, um die Existenz des „Convergent recombination“ in Monozyten und Makrophagen zu überprüfen. Dieses Phänomen, bei welchem unterschiedliche VDJ-Kombinationen für gleiche CDR3-Regionen kodieren, ist bei B-Zellen bereits bekannt [235].

Bei der Untersuchung der CDR3-Regionen und ihrer zugehörigen V(D)J-Kombinationen zeigte sich, dass für die Makrophagen drei unterschiedliche Fälle eintraten. Zum einen gab es VDJ-Kombinationen, die in mehreren Patienten für die gleiche CDR3-Region codierten, zum anderen basierten gleiche CDR3-Regionen auf unterschiedlichen VDJ-Kombinationen (siehe Tabelle 22). Interessanterweise waren bei den Makrophagen die Unterschiede in den CDR3-Regionen oft nur sehr gering und betrafen meist nur einzelne Aminosäuren. Bei den B-Zellen zeigten sich hingegen deutlichere Abweichungen zwischen den CDR3-Regionen trotz gleicher VDJ-Kombination.

Zusätzlich konnten sowohl für die Makrophagen als auch die B-Zellen Fälle gezeigt werden, in denen verschiedene VDJ-Kombinationen zu gleichen CDR3-Regionen führten. Ein Beispiel hierfür ist die CDR3-Region AKGRSRTVVDWFDP, die im Blut eines Patienten (GBM001) sowohl durch die VDJ-Kombination 3-23\*04/ 4-23\*01/ 5\*02 als auch durch die Kombination 3-7\*03/ 4-23\*01/ 5\*02 codiert wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Leichtketten-CDR3 QQYYRIPCT (IgK) im Blut des einen Patienten (GBM001) durch die VJ-Kombination 4-1\*01/ 2\*02 und im Tumor eines anderen Patienten (GBM002) durch die Kombination 4-1\*01/ 4\*02 zustande kam (Tabelle 22).

Patient	Blut/ Tumor	Schwer- oder Leichtkette	CDR3	V(D)J-Kombination
GBM001	Blut	Schwerkette	AKGRSRTVVDWFDP	3-23*04/ 4-23*01/ 5*02
				3-7*03/ 4-23*01/ 5*02
GBM001	Blut	Leichtkette	QQYYRIPCT	4-1*01/ 2*02
GBM002	Tumor			4-1*01/ 4*02

Tabelle 22: Vergleich CDR3-Region und V(D)J-Kombination

Sowohl bei den Schwerketten als auch den Leichtketten sind unterschiedliche VDJ-Kombinationen zu finden, die zu einer identischen CDR3-Region führen. Hierbei ist es auch möglich, dass eine identische CDR3-Sequenz in unterschiedlichen Patienten aus zwei verschiedene V(D)J-Kombinationen entsteht.

### 3. Verwendete Ketten

Im Vergleich der Repertoires zwischen Makrophagen und B-Zellen der gleichen Patienten war es auffällig, dass die geringere Variabilität nicht nur an der genutzten Kombination der V-, D- und J-Ketten lag, sondern auch an der Zahl der überhaupt exprimierten Ketten. Basierend auf dieser Feststellung, ergab sich die Frage, warum Makrophagen nur einen kleineren Pool unterschiedlicher Ketten exprimieren. Da bei den Schwerketten signifikantere Unterschiede zwischen den untersuchten Zellpopulationen zu finden waren als bei den Leichtketten, wird im Folgenden schwerpunktmäßig auf die Schwerketten eingegangen.

#### 3.1. Verteilung der verwendeten Immunglobulin V<sub>H</sub>-Kettengene auf dem Locus

Die genetische Information der Immunglobulin-Schwerketten liegt auf Chromosom 14 des menschlichen Genoms. Die beobachtete eingeschränkte Nutzung des im Genom verfügbaren Immunglobulingen-Repertoires durch Makrophagen führte zur Hypothese, dass Makrophagen möglicherweise nur einen bestimmten Teil des Locus und nicht die komplette auf Chromosom 14 codierte Information nutzen können.

Für einen Vergleich standen die Sequenzen von drei Patienten zur Verfügung, für welche die Repertoires sowohl in Makrophagen als auch B-Zellen sequenziert wurden. Trägt man nun wie in Abbildung 29A dargestellt die Häufigkeit der verwendeten V<sub>H</sub>-Gene der Schwerketten gegen die Position der entsprechenden Gene auf dem Locus auf, so zeigt sich für die B-Zellen eine deutlich breitere und gleichmäßigere Verteilung. Es ist zu erkennen, dass bei den Makrophagen im Gegensatz zu den B-Zellen sowohl im vorderen als auch im hinteren Teil des Locus keine Genexpression nachzuweisen ist. Trägt man die sequenzierten V<sub>H</sub>-Ketten der Makrophagen aller untersuchten Patienten auf, so ist eine deutlich breitere, jedoch immer noch geringere Verteilung als in den B-Zellen zu finden (Abbildung 29B). Hier ist nun eine gleichmäßige Nutzung des mittleren und hinteren Drittels des Locus zu erkennen. Aus dem vorderen Drittel werden lediglich die Gene der V<sub>H</sub>-Ketten 3-74, 4-61 und 3-53 in sehr geringem Ausmaß genutzt.

Auch wenn die unterschiedlichen Bereiche des Locus verschieden stark von den Makrophagen genutzt werden, konnte somit die Hypothese widerlegt werden, dass eine eingeschränkte Nutzung des Locus und somit der dort liegenden V<sub>H</sub>-Ketten-Gene zur Einschränkung im Makrophagen-Repertoire führt.

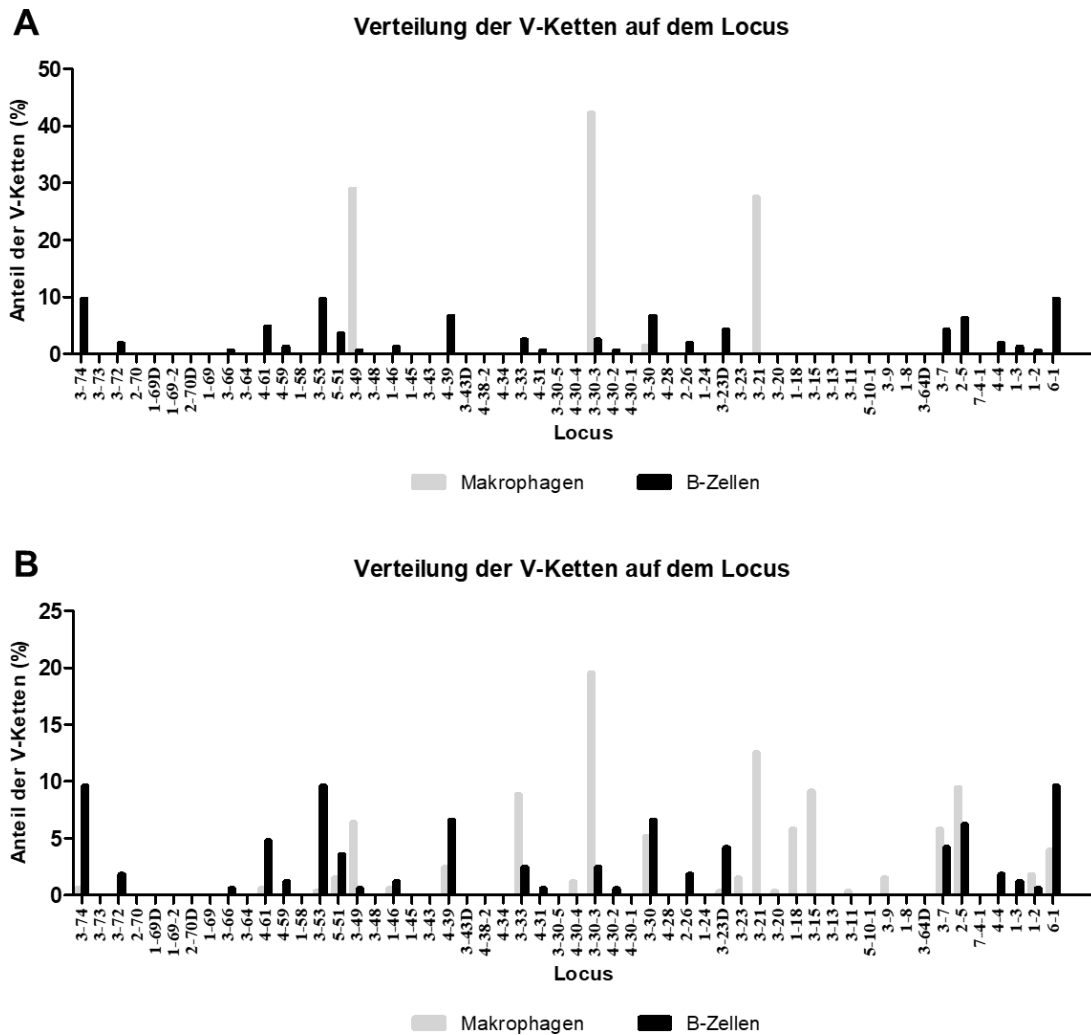


Abbildung 29: Verteilung der verwendeten V<sub>H</sub>-Ketten auf dem Locus

(A) Die Nutzung des Immunglobulin Schwerketten-Locus auf Chromosom 14 ist für die Makrophagen als auch für die B-Zellen dreier repräsentativer Patienten dargestellt. Die Gene der von Makrophagen genutzten V<sub>H</sub>-Ketten befinden sich im mittleren Bereich des Locus, während die von B-Zellen genutzten Gene über den kompletten Locus verteilt sind. (B) Die Nutzung der V<sub>H</sub>-Ketten-Gene aller untersuchten Makrophagen und B-Zellen ist gegenübergestellt. Es zeigt sich eine breitere Verteilung der Makrophagen verglichen mit (A). Es bleibt jedoch eine vermehrte Nutzung der hinteren beiden Drittel des Locus, mit Ausnahme der Kette 3-74, bestehen.

### 3.2. Verteilung der verwendeten $V_H$ - und $J_H$ -Kettengene nach Familien

Da sowohl die  $V_H$ - als auch die  $J_H$ -Ketten aufgrund ihrer Homologien in sogenannte Familien untergliedert sind, wurde untersucht, ob es zwischen Makrophagen und B-Zellen bei der Rekombination der Immunglobulin Schwereketten Unterschiede in der Nutzung der einzelnen Genfamilien gibt.

Hierfür wurde die Häufigkeit der genutzten Genfamilienmitglieder bei Makrophagen und B-Zellen gegeneinander aufgetragen (Abbildung 30). Bei den  $V_H$ -Ketten zeigte sich eine starke Häufung der  $V_{H3}$ -Familie (ca. 90% aller sequenzierten V-Ketten) in beiden untersuchten Zelltypen. In den Makrophagen gab es stärkere Nutzung der  $V_{H2}$ -Ketten im Vergleich zu den B-Zellen.  $V_{H4}$  hingegen konnte in den Makrophagen lediglich in sehr geringem Maße nachgewiesen werden, wird allerdings von den B-Zellen recht deutlich mit etwa 10% aller Sequenzen exprimiert.

Ähnlich wie bei den  $V_H$ -Ketten zeigt sich bei den J-Ketten eine sehr häufige Nutzung (50-60%) einer der Familien in beiden Zelltypen, in diesem Fall  $J_{H4}$ .  $J_{H1}$  wurde von beiden Zellfraktionen nur in sehr geringem Maß exprimiert. Auch für die  $J_H$ -Familien 5 und 6 lag die Expression durch Makrophagen und B-Zellen auf einem ähnlichen Niveau zwischen 10% und 20%. Die am stärksten ausgeprägten Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen sind bei  $J_{H2}$  und  $J_{H3}$  zu erkennen.  $J_{H2}$  wurde hierbei stärker von den Makrophagen genutzt,  $J_{H3}$  mehr von den B-Zellen.

Es sind somit auch bei der Nutzung der einzelnen  $V_H$ - und  $J_H$ -Familien keine signifikanten Unterschiede zu erkennen, die für die Unterschiede der Repertoire-Diversität zwischen Makrophagen und B-Zellen verantwortlich sein könnten.

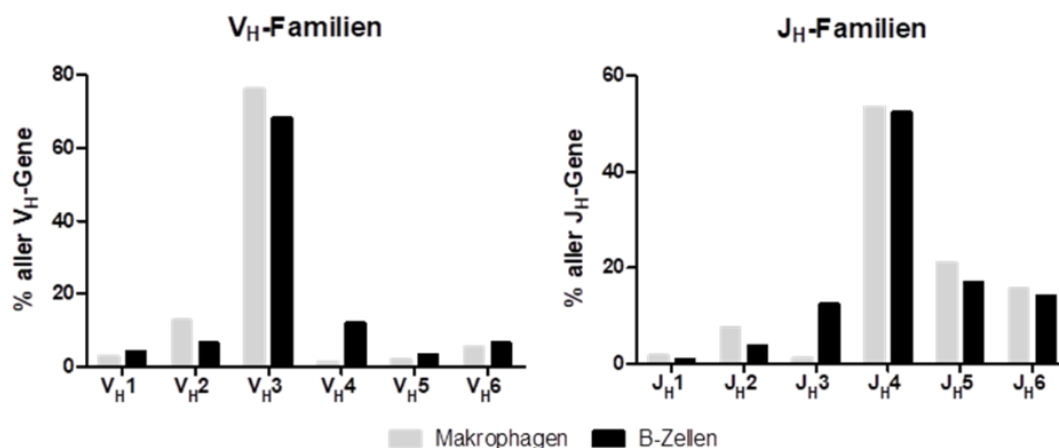


Abbildung 30: Verteilung der verwendeten  $V_H$ - und  $J_H$ -Ketten nach Familien

Die prozentuale Nutzung der einzelnen  $V_H$ - und  $J_H$ -Ketten auf die jeweils sechs Familien von Makrophagen und B-Zellen ist dargestellt. Bis auf geringe Unterschiede zeigen beide Zellfraktionen eine sehr ähnliche Verteilung der Familien-Nutzung.

#### 4. Mutationen

Eine weitere Ebene auf der die Immunglobulin-Expression der Makrophagen mit der der B-Zellen verglichen wurde, waren die in den Sequenzen enthaltenen Mutationen. Die Auswertung der Sequenzen und ihrer Mutationen erfolgte mithilfe der Software CLC Genomics Workbench von Qiagen.

Zur Identifikation der Mutationen wurden Alignments der selbst sequenzierten Immunglobulingene gegen die entsprechenden Germline-Sequenzen erstellt und damit die Anzahl und Lokalisation der Mutationen ermittelt. Abbildung 31 zeigt beispielhaft einen Ausschnitt eines solchen Alignments mit den markierten Mutationen für die untersuchte V<sub>H</sub>-Kette 3-33-3\*01.

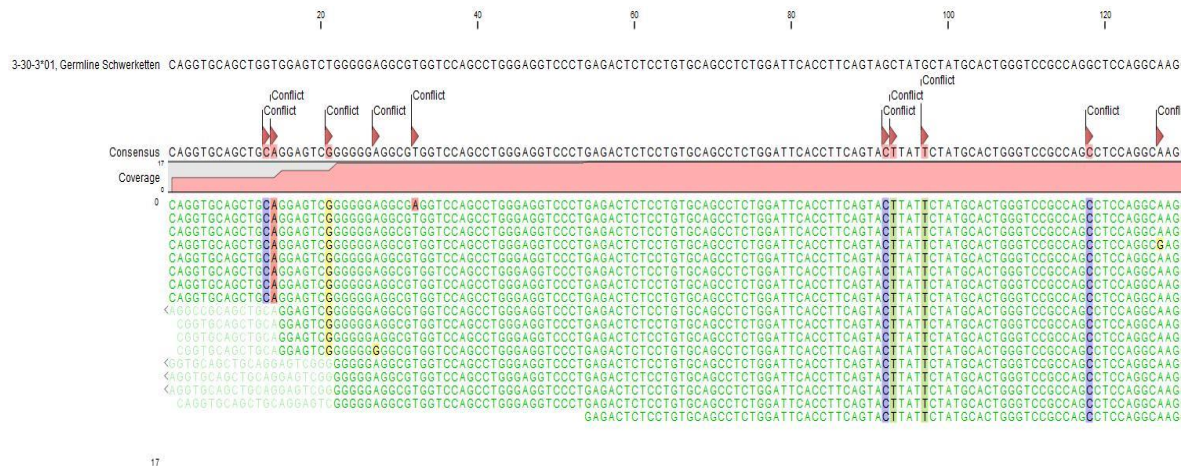


Abbildung 31: Alignment der Makrophagen-Sequenzen

Ein beispielhaftes Alignment der Immunglobulin V<sub>H</sub>-Schwerketten-Sequenzen gegen die entsprechende Germline-Sequenz (3-30-3\*01) wurde in CLC Genomics erstellt. Mutationen bzw. Abweichungen zur Germline-Sequenz sind hierbei farblich markiert und mit „Conflict“ gekennzeichnet.

#### 4.1. Vergleich IgM und IgG

Zunächst wurden die Mutationszahlen der Schwerketten nach Zelltyp und Immunglobulinklasse (IgM und IgG) aufgeschlüsselt und als Mutationsfrequenz (Anzahl Mutationen pro  $10^3$  Basenpaare) dargestellt (Abbildung 32). Es ist deutlich zu erkennen, dass für IgM geringere Mutationsfrequenzen vorliegen als für IgG. Dies ist bei den Makrophagen sowohl im Tumor als auch im Blut der Fall. Vergleicht man die Makrophagen mit den B-Zellen, so zeigt sich hier der gleiche Trend. Die Mutationen für IgM liegen bei den B-Zellen auf einem niedrigeren Niveau als bei den Makrophagen. Für IgG zeigt sich ein gegenteiliges Bild mit mehr Mutationen in den B-Zellen als in den korrespondierenden Makrophagen. Die Abweichungen der Mutationsfrequenz zwischen IgM und IgG sind bei beiden Zellfraktionen statistisch signifikant ( $p < 0,01$ ). Bei den B-Zellen ist zusätzlich ein signifikanter Unterschied zwischen der höheren Mutationsfrequenz von IgM im Tumor zur niedrigeren Mutationsfrequenz von IgM im Blut ( $p < 0,05$ ) zu erkennen (nicht dargestellt).

Weiterhin wurden für drei Patienten zusätzlich zur Frequenz der Mutationen auch die absoluten Anzahlen gegenübergestellt. Auch hierbei sind sowohl für die Makrophagen als auch für die B-Zellen signifikant weniger Mutationen für IgM zu finden als für IgG. Die teilweise hohen Standardabweichungen lassen sich damit erklären, dass für gleiche Ketten in verschiedenen Patienten teilweise stark unterschiedliche Mutationsraten gefunden wurden. Innerhalb der einzelnen Patienten waren die Standardabweichungen hierfür sehr gering. Durch Bildung der Mittelwerte für alle Patienten gemeinsam stiegen jedoch die Standardabweichungen an, ohne die statistische Signifikanz zu beeinträchtigen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in den beiden gegenübergestellten Zelltypen ähnliche Muster der Mutationsfrequenzen zu finden sind und die Mutationsraten als Ursache für die unterschiedlichen Repertoires höchstwahrscheinlich auszuschließen sind.

Die gleichen Untersuchungen wurden auch für die entsprechenden Leichtketten durchgeführt, jedoch waren hier im Gegensatz zu IgG und IgM keine signifikanten Unterschiede zwischen IgK und IgL zu erkennen.



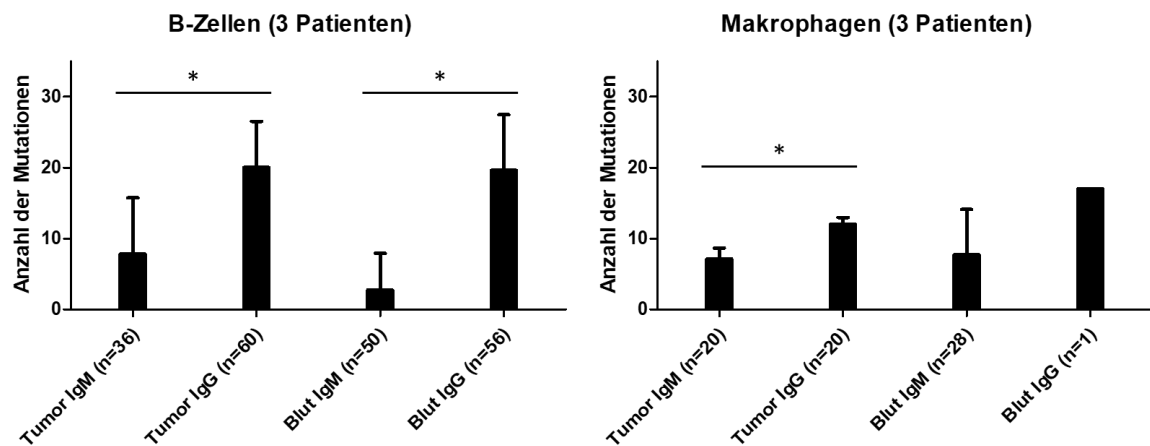
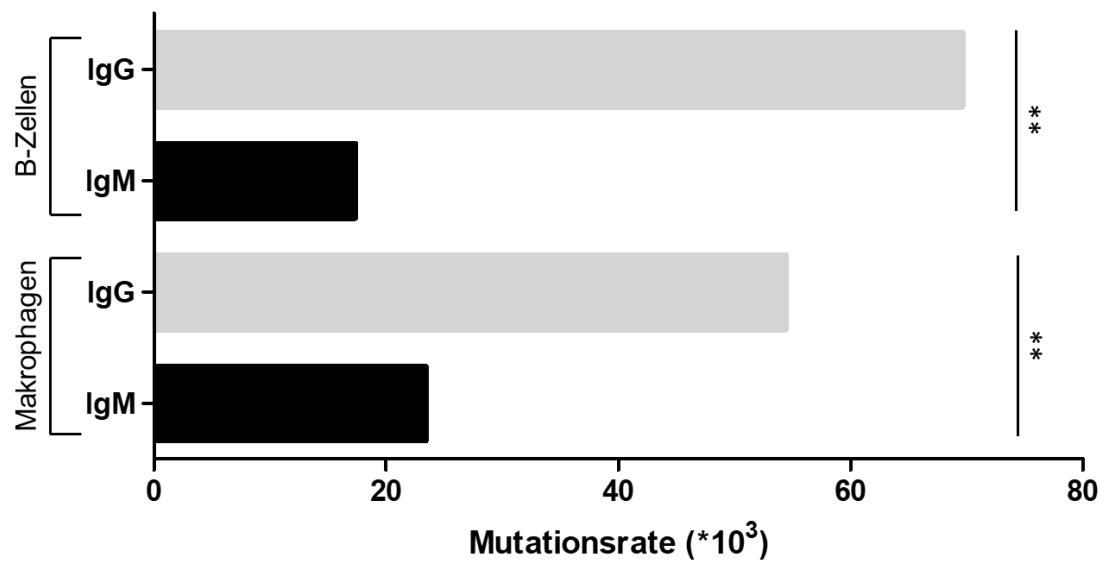


Abbildung 32: Mutationsrate und Anzahl der somatischen Mutationen

Die Mutationsrate (Anzahl Mutationen pro 10<sup>3</sup> Basenpaare) für IgG ist sowohl für bei den Makrophagen als auch bei den B-Zellen signifikant höher als für IgM ( $p > 0,01$ , oben).

Bei genauerer Betrachtung der absoluten Mutationszahlen in IgM und IgG im Blut und Tumor der beiden Zellfraktionen von drei repräsentativen Patienten, zeigt sich erneut ein signifikanter Unterschied zwischen IgG und IgM in Tumor und Blut bei den B-Zellen (links). Bei den Makrophagen ist dieser Unterschied zwar in beiden Proben zu erkennen, jedoch nur für die Tumorprobe statistisch signifikant (rechts).

## 4.2. Clustering der Mutationsrate

Zusätzlich zur Betrachtung der Mittelwerte der Mutationsfrequenzen wurden die Einzelwerte zusätzlich in geclusterter Weise untersucht. Hierfür wurden die Mutationsfrequenzen der Makrophagen und B-Zellen in vier Cluster (0; 0,1-20; 20,1-40 und <40 Mutationen pro Sequenz) eingeteilt und erneut gegenübergestellt. Bei dieser Art der Darstellung ist zusätzlich zum Mittelwert der Mutationsrate auch die gesamte Range der Werte zu erkennen, welcher sich sonst nur in der Standardabweichung des Mittelwertes niederschlägt.

Die in 4.1. gewonnenen Erkenntnisse lassen sich auch mit den Clustern bestätigen. So zeigt sich sowohl für die Makrophagen als auch für die B-Zellen in beiden Kompartimenten (Tumor und Blut) eine höhere Mutationsrate für IgG als IgM. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Mutationsraten der Zellen im Tumor in weniger Cluster eingruppiert sind als in den korrespondierenden Zellen im Blut. Diese Einschränkung der Mutationsfrequenzen im Tumor war in dieser Deutlichkeit nicht aus den Standardabweichungen in Abbildung 32 herauszulesen.

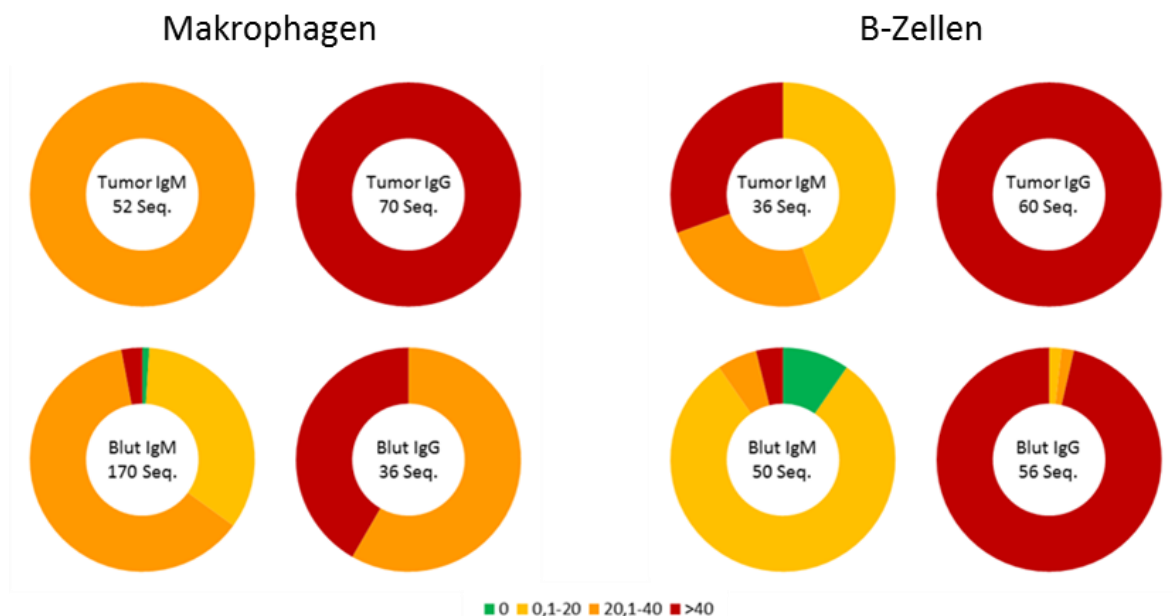


Abbildung 33: Clustering der Mutationsfrequenzen

Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde die Mutationsrate in vier Gruppen (0; 0,1-20; 20,1-40 und >40) geclustert. Hierbei zeigt sich, dass die Mutationsraten sowohl bei den Makrophagen als auch bei den B-Zellen im Tumor höher liegen als in den dazugehörigen Blutproben. Zusätzlich ist erneut die höhere Mutationsrate bei IgG im Vergleich zu IgM zu erkennen.

Erneut wurden auch die Leichtketten Igκ und Igλ untersucht, doch auch in der geclusterten Betrachtung waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Formen der Leichtketten zu erkennen.

### 4.3. Lokalisation der Mutationen

Neben der Zahl der gefundenen Mutationen wurden auch deren jeweilige Lokalisationen innerhalb der rekombinierten Gensequenzen untersucht. Die Sequenzen wurden hierbei nach den einzelnen Framework-Regionen und CDRs getrennt untersucht. Die Untersuchung umfasste hierbei die Framework-Regionen 1, 2 und 3 sowie die CDR 1 und CDR 2. Die Bestimmung der einzelnen Ketten erfolgte durch den Vergleich mit den Germline-Sequenzen aller bekannten Sequenzen. Da es bei der VDJ-Rekombination im Bereich von CDR3 und FWR4 zum zufälligen Einfügen von Nukleotiden kommt, wären Vergleiche zu Germline-Sequenzen hier nicht gesichert möglich und eine Bestimmung wäre rein spekulativ. Zur Vereinfachung der Darstellung wurden hierfür die jeweils am häufigsten exprimierten  $V_H$ -Ketten der Makrophagen und B-Zellen verwendet (Abbildung 34).

Vergleicht man die Lokalisation der Mutationen innerhalb der Schwerketten des Tumors zwischen den Makrophagen und den B-Zellen, so ist eine relativ ähnliche Verteilung, ohne statistisch signifikante Unterschiede zu erkennen. Im Blut hingegen liegen die Mutationen in den Schwerketten bei den B-Zellen sehr stark gehäuft am Ende der Sequenz in der Framework 3 Region, während die meisten Schwerketten-Mutationen bei den Makrophagen am Anfang der Sequenz in Framework 1 zu finden sind.

Auch bei den Leichtketten sind Unterschiede in der Mutationsverteilung zwischen Tumor und Blut zu erkennen. Im Tumor findet man Mutationen im B-Zell-Immunglobulin-Repertoire ausschließlich am Anfang und Ende der Sequenz in Framework 1 und CDR1 sowie Framework 3. Die meisten Mutationen in den Leichtketten der Tumormakrophagen hingegen liegen im mittleren Bereich der Sequenz in Framework 2. Bei den Leichtketten im Blut ist genau die entgegengesetzte Tendenz zu finden. Hier liegen die Mutationen der Makrophagen-Sequenzen hauptsächlich in den Randbereichen, während die meisten Mutationen der B-Zellen in Framework 2 zu finden sind.

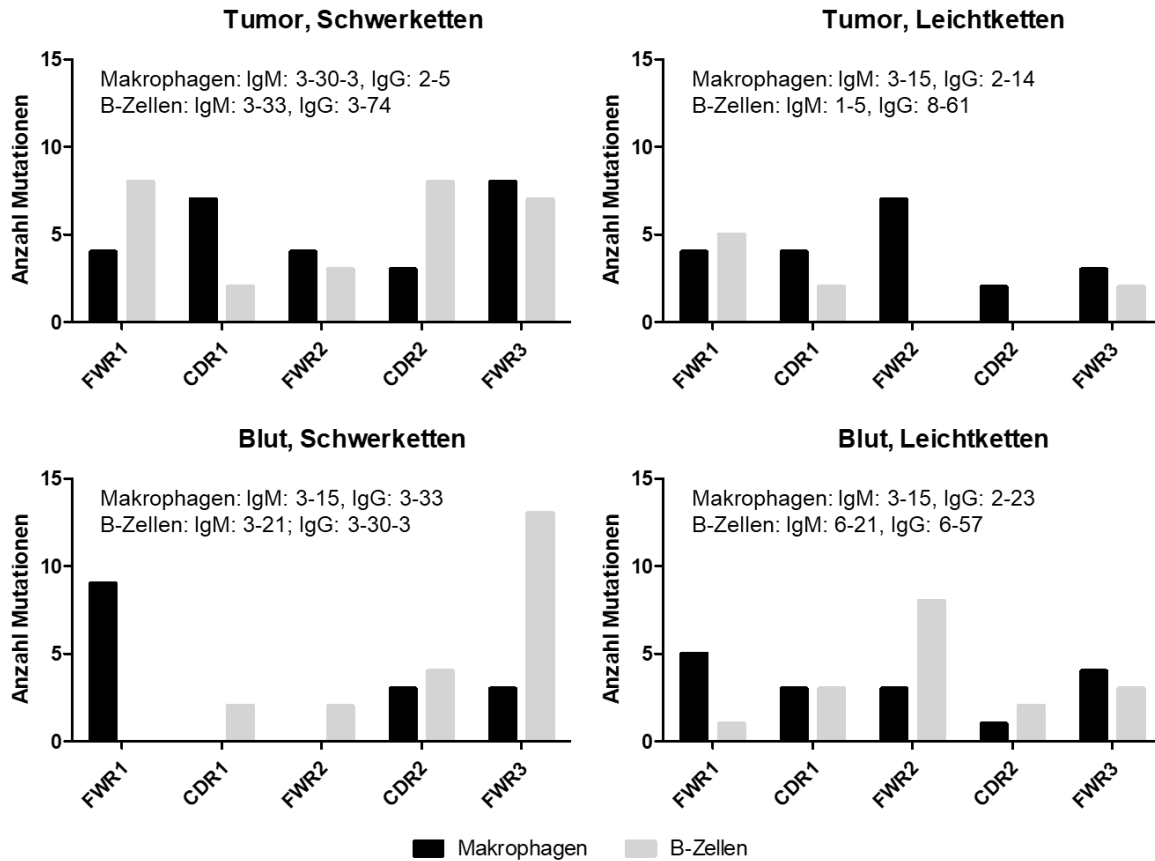


Abbildung 34: Lokalisation der Mutationen

Sowohl für die Immunglobulin Schwer- als auch die Leichtketten aus Tumor und Blut wurden die jeweils häufigsten Ketten für IgM und IgG auf die genaue Lokalisation ihrer Mutationen untersucht. Die Anzahl der Mutationen ist für die Framework-Regionen1-3 und die CDRs 1 und 2 getrennt nach Makrophagen und B-Zellen aufgetragen.

#### 4.4. Zusammenhang zwischen Mutationen und Locus

In 3.1. wurde bereits der Zusammenhang zwischen der Verwendung der einzelnen V-Ketten und ihrer Position auf dem chromosomalen Genlocus gezeigt. Um zu untersuchen, ob es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen der Position auf dem Locus und der Anzahl der Mutationen gibt, wurden diese gegen die Position der Ketten auf dem Locus aufgetragen. Wie in Abbildung 35 zu sehen ist, erhält man dabei eine ähnliche Verteilung wie bei der Nutzung der jeweiligen Ketten. Für die Schwerketten des Tumors ist eine leichte Häufung bei den letzten acht Positionen des Locus zu erkennen, bei den Schwerketten im Blut eine sehr breite Verteilung mit zwei stärkeren Peaks nach etwa einem Viertel und etwa in der Mitte des Locus.

Man kann also davon ausgehen, dass die Position innerhalb des Locus keinen Einfluss auf das jeweilige Ausmaß der Mutationen hat, da die stärker und schwächer mutierten Ketten gleichmäßig verteilt sind.

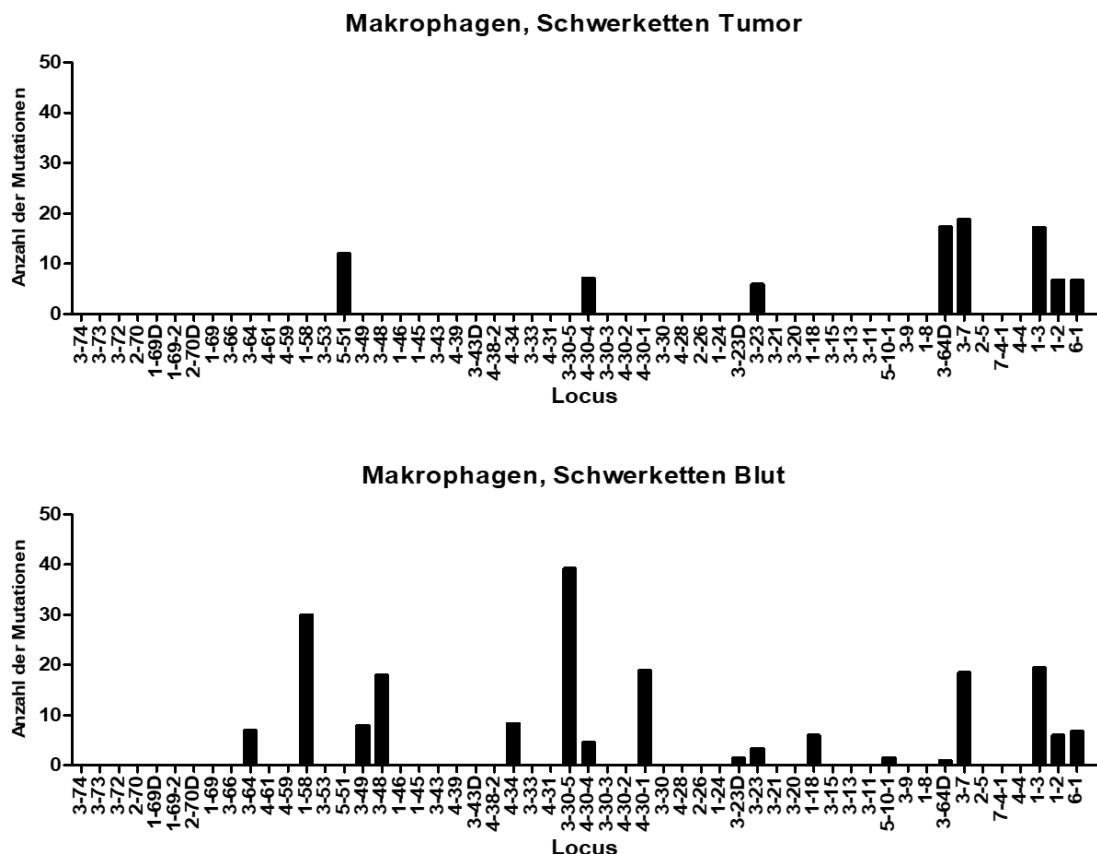


Abbildung 35: Zusammenhang zwischen Mutationen und Position auf dem Locus

Um auszuschließen, dass die Anzahl der Mutationen mit der Lokalisation der jeweiligen Gene auf Chromosom 14 zusammenhängt, wurde sowohl für die Schwerketten der Makrophagen im Tumor als auch im Blut die Anzahl der Mutationen gegen die Position auf dem Locus aufgetragen.

#### 4.5. Vergleich der Mutationszahlen zwischen Blut und Tumor

Um einen genaueren Überblick über die Häufigkeit und Verteilung der Mutationen zu bekommen, wurde ein Vergleich der Schwerketten zwischen Tumor und Blut angestellt. Hierbei ging es hauptsächlich darum, zu erkennen, ob gleiche Ketten in verschiedenen Zellpopulationen bzw. Ursprungsgeweben unterschiedlich stark mutiert sind.

Im ersten Schritt wurden hierfür die Makrophagen untersucht. Trägt man nun die Anzahl der Mutationen der Immunglobulin  $V_H$ -Ketten, die sowohl im Tumor als auch im Blut gefunden wurden, gegeneinander auf, so ergibt sich - mit einer Ausnahme - eine gleichmäßige Verteilung der Mutationen in beiden Zelltypen (Abbildung 36). Lediglich für eine der sechs untersuchten V-Ketten (3-7\*01) ist hier ein deutlicher Unterschied zu sehen, da diese in den Makrophagen aus dem Tumor deutlich mehr Mutationen aufweist als in den Monozyten aus dem Blut. Bei den anderen fünf V-Ketten liegen die Mutationszahlen der Makrophagen aus Tumor und Blut jeweils auf dem gleichen Niveau.

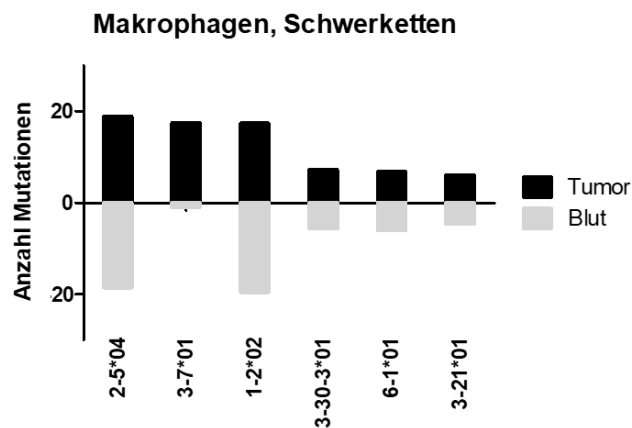


Abbildung 36: Vergleich der Mutationszahlen in Blut und Tumor bei Makrophagen (n=133 Sequenzen)

Die Mutationszahlen der  $V_H$ -Ketten, die von Makrophagen sowohl im Tumor als auch im Blut exprimiert wurden, wurden gegeneinander aufgetragen. Bis auf die  $V_H$ -Kette 3-7\*01 zeigen sich sehr ähnliche Mutationszahlen in beiden untersuchten Proben.

Wiederholt man diese Gegenüberstellung für die Schwerketten der B-Zellen aus Tumor und Blut der Patienten, so zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zellfraktionen (Abbildung 37). Die Mutationshäufigkeit der Ketten unterscheidet sich stark zwischen den B-Zellen aus Tumor und Blut, jedoch ist kein Trend in Richtung einer Zellfraktion zu erkennen, da ein Teil der Immunglobulin  $V_H$ -Ketten deutlich stärker bei den B-Zellen aus dem Tumor mutiert ist, während für andere  $V_H$ -Ketten eine höhere Mutationszahl der B-Zellen aus dem Blut zu finden ist.

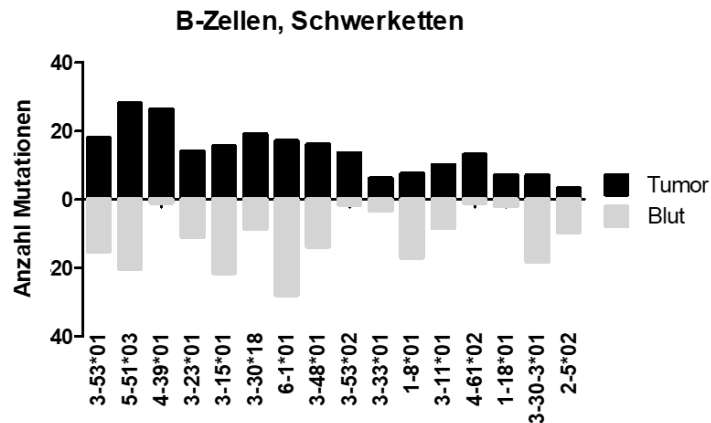


Abbildung 37: Vergleich der Mutationszahlen in Blut und Tumor bei B-Zellen (n=128 Sequenzen)

Die Mutationszahlen der  $V_H$ -Ketten, die von B-Zellen sowohl im Tumor als auch im Blut exprimiert wurden, wurden gegeneinander aufgetragen.

Auch bei diesem Vergleich zwischen Makrophagen und B-Zellen zeigt sich erneut eine größere Ähnlichkeit der Makrophagen-Sequenzen aus Tumor und Blut als bei denen der B-Zellen. Dies spricht erneut für die Hypothese der aus dem Blut in den Tumor einwandernden und dort ausdifferenzierenden zirkulierenden Monozyten.

#### 4.6. Vergleich der Mutationszahlen zwischen Makrophagen und B-Zellen im Tumor

Nachdem gezeigt werden konnte, dass für die B-Zellen im Gegensatz zu den Makrophagen deutliche Unterschiede in der Mutationszahl zwischen Tumor und Blut vorliegen, galt es die im Tumor gefundenen Schwerketten der beiden Zellpopulationen zu vergleichen. Hier gab es jedoch nur drei verschiedene V-Ketten, die sowohl von den Makrophagen aus dem Tumor als auch von den im Tumor befindlichen B-Zellen exprimiert wurden. Im direkten Vergleich der beiden Zelltypen ist keine gleiche Tendenz wie in Abbildung 36 zu erkennen. Eine der drei V-Ketten (3-30-3\*01) enthält sowohl in den Makrophagen als auch in den B-Zellen nahezu die gleiche Anzahl an Mutationen. Bei den anderen beiden untersuchten V-Ketten ist eine stärker in den Makrophagen aus dem Tumor, die andere stärker in den B-Zellen mutiert (Abbildung 38). Es lässt sich somit keine eindeutige Tendenz der Mutationshäufigkeit im Vergleich von Makrophagen und B-Zellen im Tumor der Patienten erkennen.

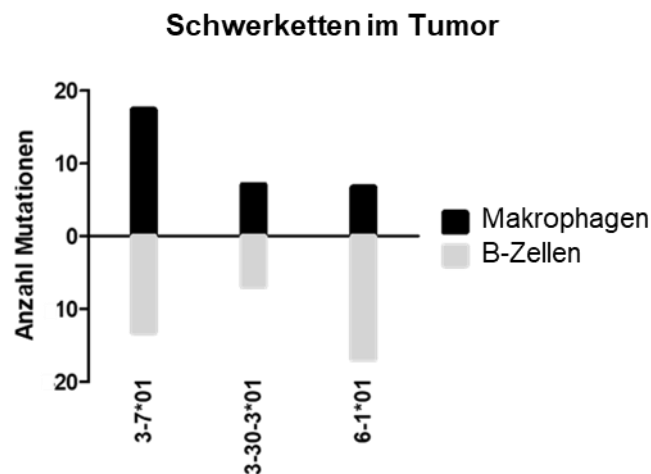


Abbildung 38: Vergleich der Mutationen zwischen Makrophagen und B-Zellen im Tumor (n=77 Sequenzen)

Die Mutationszahlen der drei V-Ketten, die sowohl von Makrophagen als auch B-Zellen im Tumor exprimiert wurden, wurden gegeneinander aufgetragen.



#### 4.7. Vergleich der Mutationszahlen zwischen Makrophagen und B-Zellen im Blut

Der Vergleich der Mutationszahlen zwischen Makrophagen und B-Zellen wurde wie in 4.6. auch für die Zellen im Blut der Patienten durchgeführt. Hier war der Vergleich aufgrund der höheren Zahl von elf verglichenen  $V_H$ -Ketten jedoch deutlich aussagekräftiger. Wie in Abbildung 39 zu sehen ist, ist jedoch auch hier kein eindeutiger Trend in der Häufigkeit der Mutationen bei beiden Zelltypen zu erkennen. Lediglich bei den vier  $V_H$ -Ketten 1-2\*02, 3-21\*01, 3-33\*01 und 1-18\*01 liegen die Mutationshäufigkeiten in Makrophagen und B-Zellen in etwa auf gleichem Niveau. Bei allen anderen Ketten ist eine deutlich höhere Anzahl von Mutationen in einer der beiden Zellfraktionen zu finden. Besonders auffällig ist dies für die  $V_H$ -Ketten 3-15\*01, 3-30-3\*01 und 6-1\*01, die sehr stark in B-Zellen und kaum in den Makrophagen mutiert sind. In Gegenzug hierzu gibt es allerdings auch  $V_H$ -Ketten, die in den Makrophagen eine deutlich höhere Mutationszahl aufweisen als in den B-Zellen. Hierzu zählen die  $V_H$ -Ketten 3-53\*01, 1-46\*01 und 3-30\*18.

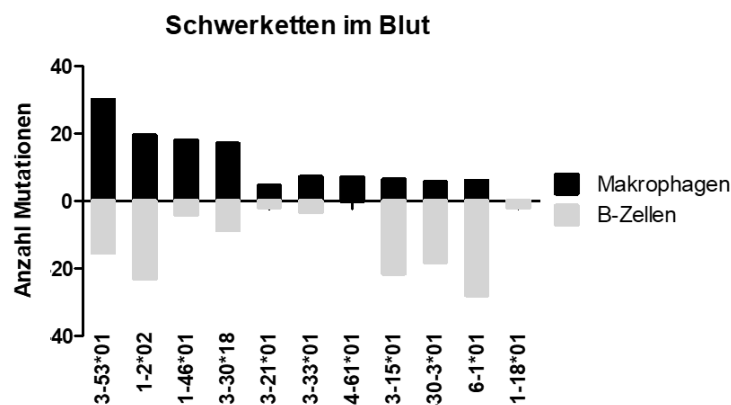


Abbildung 39: Vergleich der Mutationen zwischen Makrophagen und B-Zellen im Blut (n=171 Sequenzen)

Die Mutationszahlen der  $V_H$ -Ketten, die sowohl von Makrophagen als auch B-Zellen im Blut exprimiert wurden, wurden gegeneinander aufgetragen.

## 5. Korrelation des Repertoires mit dem Tumorzvolumen

### 5.1. Inverse Korrelation des Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen mit dem GBM-Tumorzvolumen

Neben den bisher beschriebenen intra-individuellen Unterschieden der Immunglobulin-Variabilitäten zwischen Makrophagen und B-Zellen bzw. zwischen Tumor und Blut, waren auch deutliche inter-individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten zu erkennen. Um diesem Phänomen auf den Grund zu gehen, wurden mehrere individuelle Faktoren der Patienten, wie das Alter, das Level des Tumormarkers Ki67, das Vorhandensein von Mutationen in den zur GBM-Diagnose genutzten Genen *ATRX* und *IDH*, sowie die individuelle Tumorzgröße auf eine Korrelation mit der Immunglobulin-Repertoire-Diversität hin untersucht.

Sowohl beim Alter als auch dem Tumormarker und den Genmutationen konnte weder eine positive noch eine negative Korrelation mit der Diversität der Immunglobulin-Repertoires gezeigt werden. Trägt man jedoch die Anzahl der jeweils gefundenen unterschiedlichen CDR3-Regionen der Makrophagen aus Blut und Tumor der Patienten gegen das Tumorzvolumen in Milliliter auf, so ergibt sich eine deutliche inverse Korrelation zwischen diesen beiden Größen (Abbildung 40). Dies bedeutet, dass die Anzahl der verschiedenen CDR3-Regionen bei steigender Tumorzgröße kleiner wird. Dieser Effekt ist sowohl bei den Schwer- als auch bei den Leichtketten zu beobachten. Das Ausmaß dieser Korrelation unterscheidet sich jedoch zwischen den Zellen aus dem Tumor und den untersuchten Zellen aus dem peripheren Blut. Da das Immunglobulin-Repertoire der Makrophagen im Tumor generell weniger divers ist als im Blut, ist auch der Rückgang bei steigender Tumorzgröße schwächer ausgeprägt. So ist die Variabilität bei den Makrophagen aus dem Tumor mit zehn verschiedenen Schwerketten-CDR3 bzw. 15 verschiedenen Leichtketten-CDR3 bei kleinen Tumoren und bei größeren Tumoren nur noch bei drei bzw. fünf unterschiedliche gefundene CDR3-Sequenzen. Bei den zirkulierenden Monozyten hingegen liegt das Ausgangsniveau bei kleinem Tumorzvolumen bei 22 bzw. 24 verschiedenen CDR3-Regionen in den Schwer- bzw. Leichtketten, wodurch auch ein stärkerer Abfall der Kurve möglich ist.

Für die Leichtketten ist die inverse Korrelation mit  $p=0,029$  (Tumor) und  $p=0,014$  (Blut) statistisch signifikant. Im Falle der Schwerketten wurde die statistische Signifikanz mit  $p$ -Werten von 0,051 sowohl im Blut als auch im Tumor sehr knapp verfehlt, was wohl durch das niedrigere Ausgangsniveau bedingt ist.

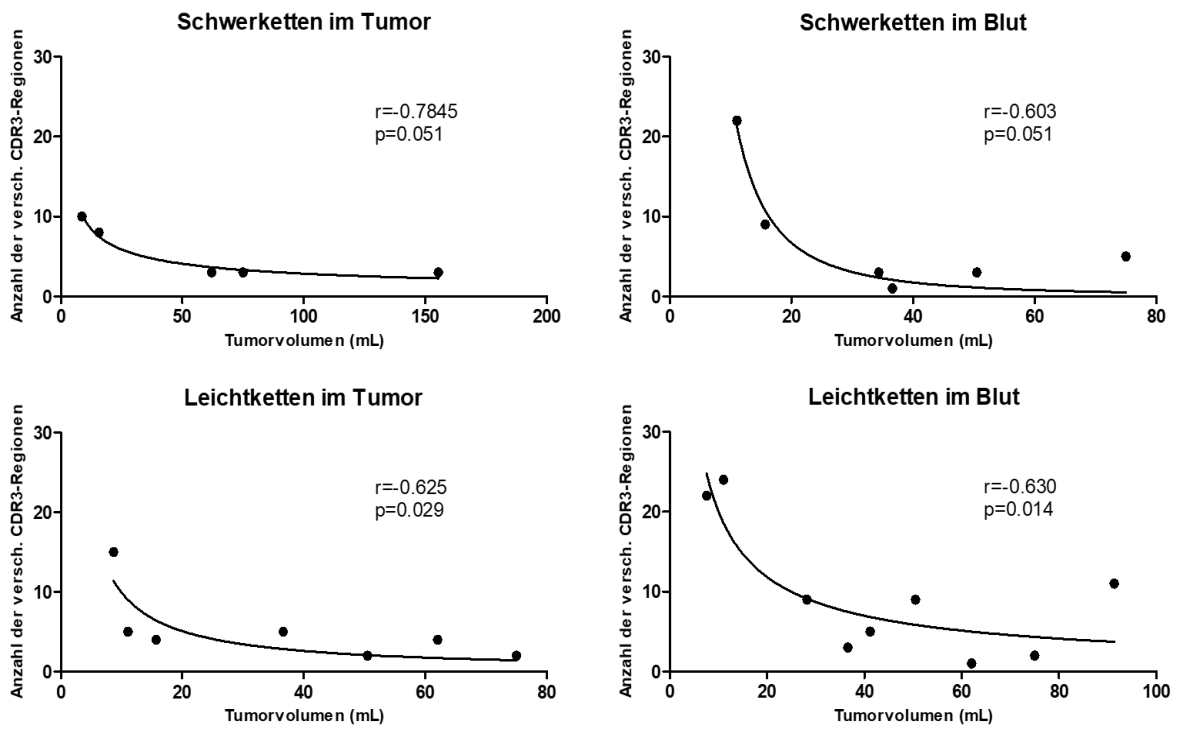


Abbildung 40: Korrelation des Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen mit der Tumorgröße

Zur Darstellung der Korrelation der Immunglobulin-Repertoire-Diversität und der Tumorgröße wurden die Anzahl der unterschiedlichen gefundenen CDR3-Regionen gegen das Tumolvolumen in Millilitern aufgetragen. Dies erfolgte getrennt für die Schwer- und Leichtketten, jeweils für die Tumor- und Blutproben. Zusätzlich sind der Korrelationseffizient  $r$  und das berechnete Signifikanzniveau des T-Tests angegeben.

## 5.2. Korrelation des Immunglobulin-Repertoires der B-Zellen mit dem Tumolvolumen

Aufgrund der statistisch signifikanten inversen Korrelation der Immunglobulin-Variabilität der Makrophagen und der korrespondierenden Tumorgroße der Patienten wurden auch die zugehörigen B-Zellen diesbezüglich untersucht, um festzustellen, ob diese Eigenschaft charakteristisch für Makrophagen oder auch bei anderen Zelltypen zu finden ist.

Hierfür wurden exemplarisch die Immunglobulin-Repertoires von B-Zellen und Makrophagen im Blut eines Patienten mit kleinem Tumor (7,56mL) mit denjenigen eines Patienten mit einem großen Tumor (62,01mL) verglichen.

Wie in Abbildung 41 gezeigt, liegen die Immunglobulin-Repertoires der B-Zellen beider Patienten auf dem gleichen Niveau mit 20 und 22 verschiedenen CDR3-Regionen für den kleinen beziehungsweise den großen Tumor. Zum Vergleich wurden zusätzlich auch die Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen der gleichen Patienten dargestellt, um nochmals den Zusammenhang mit der Tumorgroße zu verdeutlichen. Im Falle des kleineren Tumors konnten hier 13 verschiedene CDR3-Regionen gefunden werden. Beim Patienten mit dem großen Tumor war es hingegen nur noch eine CDR3-Region. Zusätzlich lässt sich auch wie in 2.1. beschrieben erkennen, dass die Variabilität des Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen auf einem niedrigeren Level liegt als das der korrespondierenden B-Zellen.

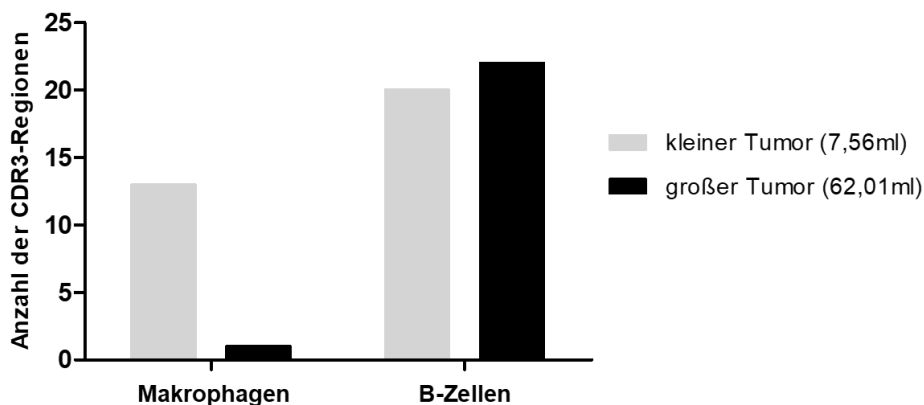


Abbildung 41: Korrelation des Immunglobulin-Repertoires der B-Zellen mit der Tumorgroße

Der Vergleich der Immunglobulin-Repertoire-Diversität von Makrophagen und B-Zellen von Patienten mit kleinem bzw. großem Tumor zeigt, dass das Repertoire der B-Zellen unabhängig von der Tumorgroße ist.

### 5.3. Korrelation der CD14-positiven Zellen mit dem Tumorzellen

Für alle Patienten wurde während der Aufreinigung die Anzahl der isolierten CD14-positiven Zellen aus Blut und Tumor bestimmt.

Trägt man diese nun gegen die individuelle Tumorzellen auf, so ist eine Korrelation der beiden Faktoren zu erkennen (Abbildung 42). Die Zahl der CD14-positiven Zellen - sowohl im Blut als auch im Tumor - steigt also bei zunehmender Tumorzellen an. Die in 5.1 beschriebene inverse Korrelation ist somit kein Effekt einer sinkenden Zahl und Dichte CD14-positiver Zellen im Tumor, sondern reflektiert den Rückgang der Antikörperdiversität in Makrophagen in größeren Tumoren gemessen an der CDR3-Variabilität.

Zwischen der Anzahl der CD14-positiven Zellen und der jeweiligen CDR3-Diversität ist keine signifikante Korrelation zu erkennen. Es zeigt sich lediglich eine Tendenz zu einer geringeren Diversität bei steigender Zellzahl.

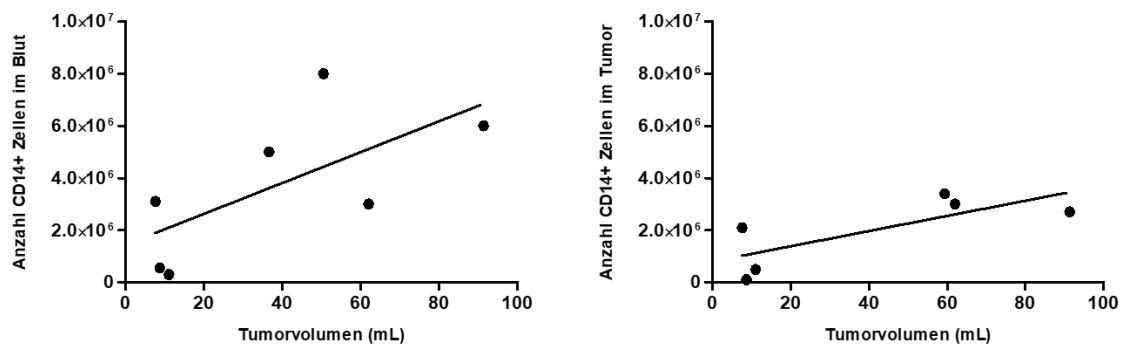


Abbildung 42: Korrelation der CD14-positiven Zellen und der Tumorzellen

Die Anzahl der CD14-positiven Zellen aus dem Blut (links) und dem Tumorgewebe (rechts) korreliert mit dem jeweiligen Tumorzellen der Patienten.

## 6. Veränderung des Repertoires im Blut nach Tumorresektion

Um beurteilen zu können, ob das Tumorwachstum einen Einfluss auf die Immunglobulin-Repertoires von Makrophagen und B-Zellen hat, wurde ein Teil der Patienten auch im Verlauf nach der Tumorresektion weiter untersucht. Hierfür erfolgten Blutabnahmen zum Zeitpunkt der OP, 3-4 Tage nach der OP sowie 4-5 Monate nach der Tumorresektion im Rahmen eines Nachsorgetermins mit MRT-Untersuchung. Die Analyse der Repertoires dieser Proben erfolgte mittels RACE-PCR und NGS. Für den Vergleich der Diversitäten wurden sowohl die V-Ketten als auch die gefundenen CDR3-Regionen zweier Patienten gegenübergestellt.

### 6.1. Patient mit Rezidiv

Verlaufspatient 01 litt zum Zeitpunkt der dritten Blutabnahme bereits an einem Rezidiv seines Primärtumors.

Ein Blick auf das Immunglobulin-Repertoire im Primärtumor zeigt wie bei den bisherigen Patienten eine höhere Diversität in den B-Zellen verglichen mit den Makrophagen mit einem Verhältnis von 51 zu 35 unterschiedlichen  $V_H$ -Ketten (Abbildung 43). Auch in den drei Blutproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten fällt das Immunglobulin-Repertoire der Makrophagen im Vergleich zu den B-Zellen kleiner aus. Im Verlauf verhalten sich die Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen und B-Zellen allerdings sehr ähnlich. Vier Tage nach der Tumorresektion kommt es zu einem leichten Rückgang der Diversität. Bis zur dritten Blutabnahme kommt es zwar in beiden Zellpopulationen zu einem erneuten Anstieg der Zahl gefundener  $V_H$ -Ketten, jedoch wird das Ausgangsniveau zum Zeitpunkt der OP nicht mehr erreicht.

Ein sehr ähnliches Bild zeigt sich auch für die untersuchten CDR3-Regionen der gleichen Proben (Abbildung 44). Auch hier zeigt sich eine Einschränkung des Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen im Vergleich mit den korrespondierenden B-Zellen. Des Weiteren zeigt sich die geringste Diversität erneut im Tumor. Nach der Tumorresektion ist für die Makrophagen ein starker Abfall in der Diversität nach vier Tagen zu erkennen. Bis zur nächsten Blutentnahme nach 5 Monaten erfolgt lediglich ein sehr geringer Anstieg der Diversität (Shannon-Indizes: 5,087 bei OP, 2,56 nach 4 Tagen und 2,63 nach 5 Monaten), während die Diversität der B-Zellen sowohl nach 4 Tagen als auch nach 5 Monaten das Ausgangsniveau zum Zeitpunkt der Tumorresektion übersteigt (Shannon-Indizes: 6,078 bei OP, 6,29 nach 4 Tagen und 6,94 nach 5 Monaten).

VP01, V-Ketten der Schwerketten:

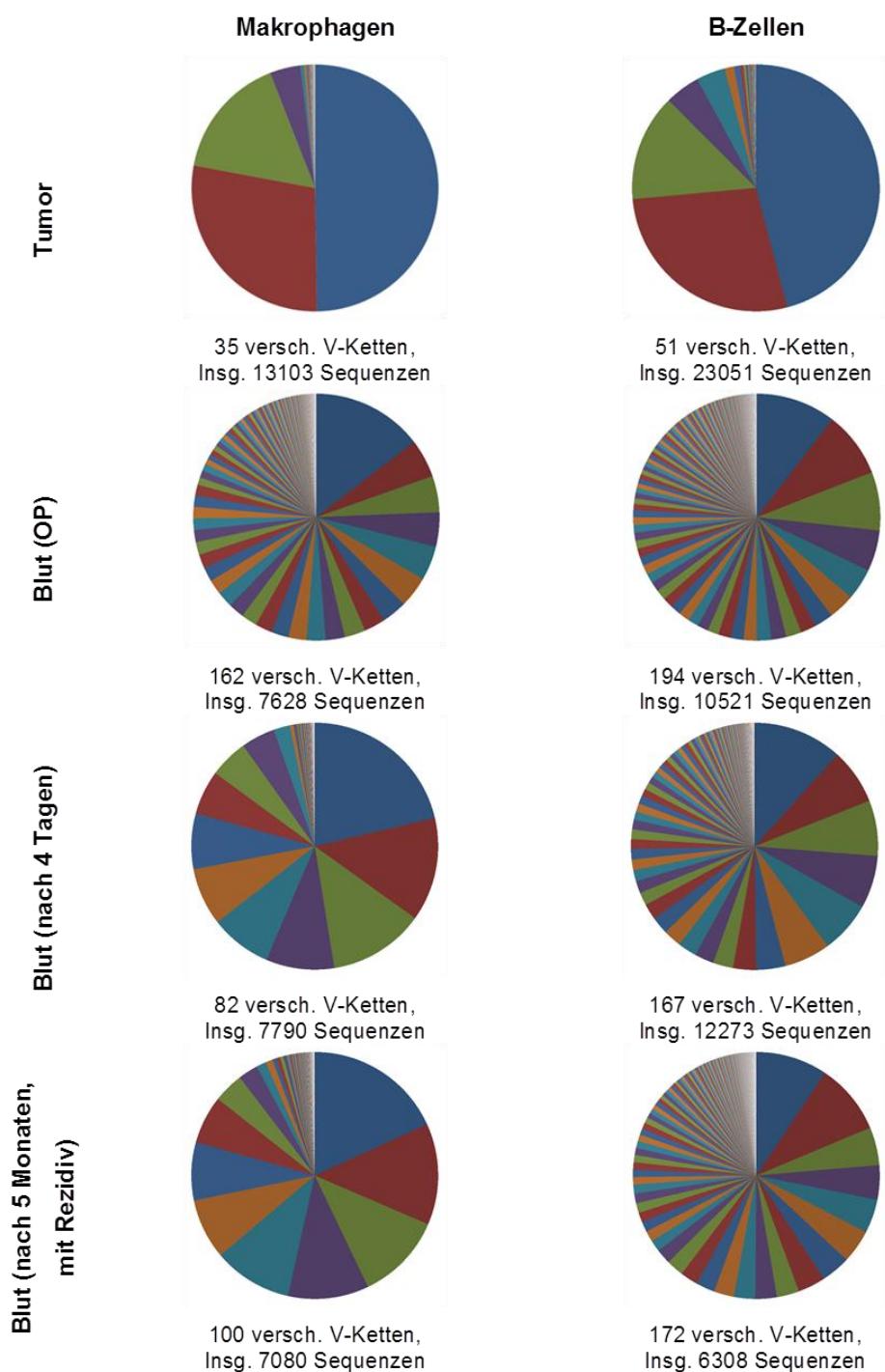


Abbildung 43:  $V_H$ -Ketten-Variabilität nach Tumorresektion (Schwerketten VP01)

Die gefundenen  $V_H$ -Ketten des ersten Verlaufspatienten wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Tumorresektion, vier Tage nach OP und fünf Monate nach OP) sowohl für die Makrophagen als auch für die B-Zellen verglichen. Es zeigt sich erneut ein geringeres Repertoire im Tumor verglichen mit dem Blut, sowie eine durchgängig geringere Vielfalt der V-Ketten bei den Makrophagen als bei den B-Zellen.

VP01, CDR3-Regionen der Schwerketten:

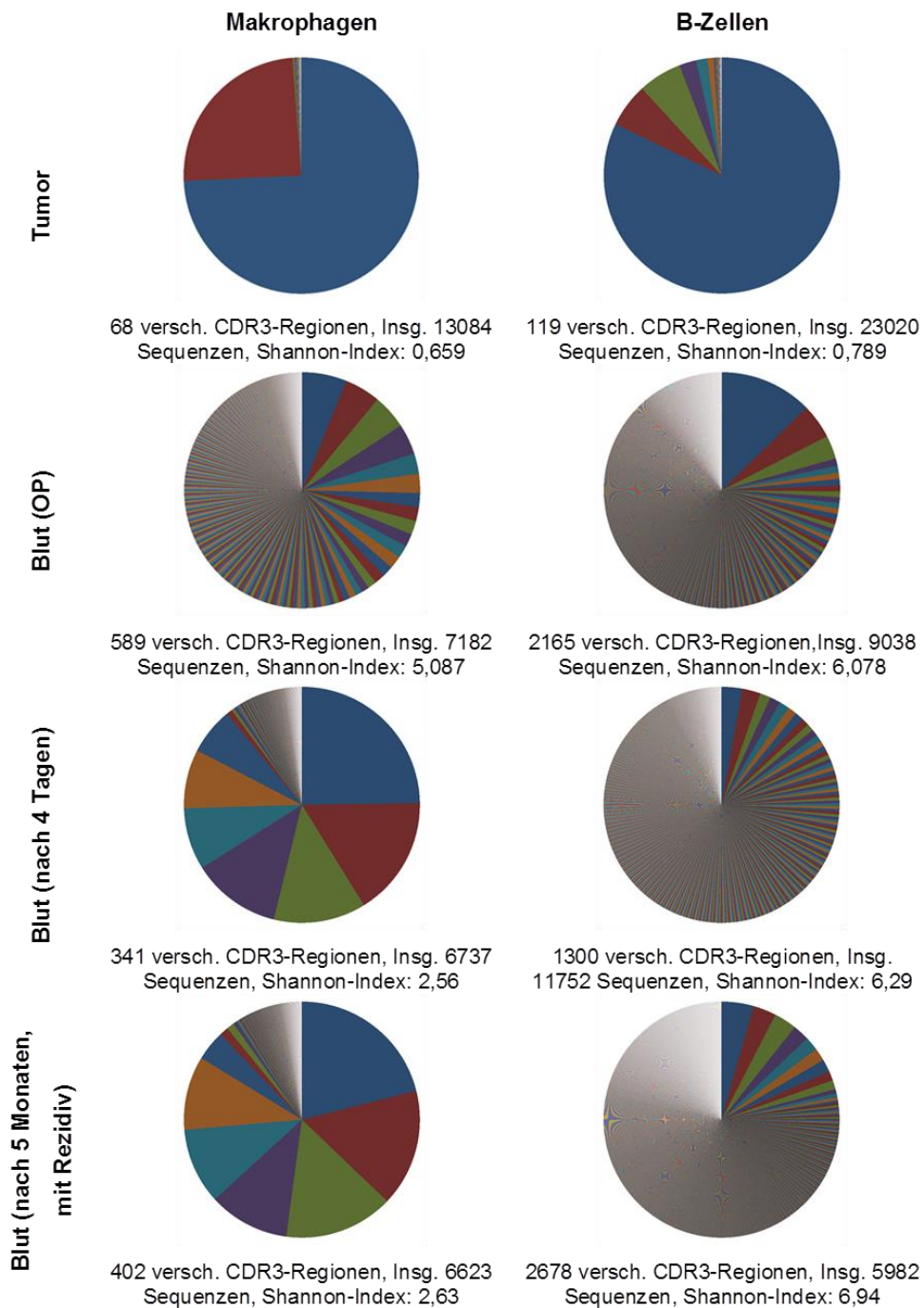


Abbildung 44: CDR3-Variabilität nach Tumorresektion (Schwerketten VP01)

Die gefundenen CDR3-Regionen des ersten Verlaufspatienten wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Tumorresektion, vier Tage nach OP und fünf Monate nach OP) sowohl für die Makrophagen als auch für die B-Zellen verglichen. Es zeigt sich ein geringeres Repertoire im Tumor verglichen mit dem Blut, genauso wie eine durchgängig geringere Vielfalt des CDR3-Repertoires bei den Makrophagen als bei den B-Zellen.



Zusätzlich zur reinen Anzahl der unterschiedlichen Immunglobulin V<sub>H</sub>-Ketten und CDR3-Regionen wurden auch die jeweiligen fünf am häufigsten gefundenen CDR3-Regionen und V<sub>H</sub>-Ketten (Top5) zu allen untersuchten Zeitpunkten detaillierter untersucht.

Hierbei ist auffällig, dass die zum OP-Zeitpunkt im Blut gefundenen V<sub>H</sub>-Ketten nach 4 Tagen und 5 Monaten nicht mehr zu finden sind. Zwischen den Top5 V<sub>H</sub>-Ketten der beiden Zeitpunkte im Verlauf besteht allerdings eine höhere Übereinstimmung mit drei von fünf V<sub>H</sub>-Ketten (3-30\*04, 3-33\*01 und 4-61\*01). Eine dieser Ketten, 3-33\*01, war die häufigste gefundene V<sub>H</sub>-Kette des Tumors.

Bei den Top5 CDR3-Regionen fällt besonders die Ähnlichkeit der im Tumor gefundenen Sequenzen auf. Diese enthalten alle die konservierte Teilsequenz „AGEGSVV“, welche auch in der Blutprobe zum OP-Zeitpunkt einmal gefunden wurde. Sogar in den spezifischeren CDR3-Regionen stimmen drei der fünf CDR3-Regionen (ARDFGSGDYEGYYFDY, AKGRIRGYNYVFDY und AREVDYNFHSGSKVGM DV) zwischen den letzten beiden Zeitpunkten überein (siehe Abbildung 45).

	Top5 V-Ketten		Top5 CDR3-Regionen	
	V-Kette	% Anteil	CDR3-Regionen	% Anteil
Tumor	IGHV3-33*01	49,75	AGEGSVWLTSTFDI	74,29
	IGHV3-30*07	28,17	AGEGSVWMTTSTFDI	24,53
	IGHV3-11*04	16,14	AGEGSVWLTSTLIS	0,24
	IGHV1-3*01	4,04	VAGEGSVWLTSTFDI	0,11
	IGHV3-66*01	0,46	AGEGSVWMTTSTLIS	0,07
Blut OP-Zeitpunkt	IGHV3-23*01	14,56	AKTGQLDF	6,09
	IGHV1-46*01	5,03	AGEGSVWLTSTFDI	4,93
	IGHV3-69-1*01	4,76	ARDHAGGRGIAARPGDY	4,72
	IGHV3-7*01	4,51	GFGWGGGLDV	4,19
	IGHV1-2*02	4,49	GKDRDPGGMDV	2,79
Blut nach 4 Tagen	IGHV2-5*01	21,32	ARINSLNYFDY	24,76
	IGHV3-30*04	13,58	ARDFGSGDYEGYYFDY	16,42
	IGHV1-2*01	12,55	AREVDYNFHSGSKVGM DV	12,66
	IGHV4-61*01	8,95	AKGRIRGYNYVFDY	12,2
	IGHV3-33*01	8,05	ARDGQHLASYGM DV	8,49
Blut nach 5 Monaten	IGHV3-30*04	18,18	ARDFGSGDYEGYYFDY	21,06
	IGHV3-30*01	13,29	AKGRIRGYNYVFDY	16,08
	IGHV3-33*01	11,43	AREVDYNFHSGSKVGM DV	14,98
	IGHV4-61*01	10,61	ARDGQHLASYGM DV	11,08
	IGHV3-9*01	10,32	TRDGGDGYNAYGM DV	10,42

Tabelle 23: Top5 der Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Ketten und CDR3-Regionen von Verlaufspatient 1 (Makrophagen)

Bei den Makrophagen wurden zusätzlich zur Variabilität der V<sub>H</sub>-Ketten und CDR3-Regionen auch die jeweiligen Top5 im Zeitverlauf nach der Tumorsektion verglichen.

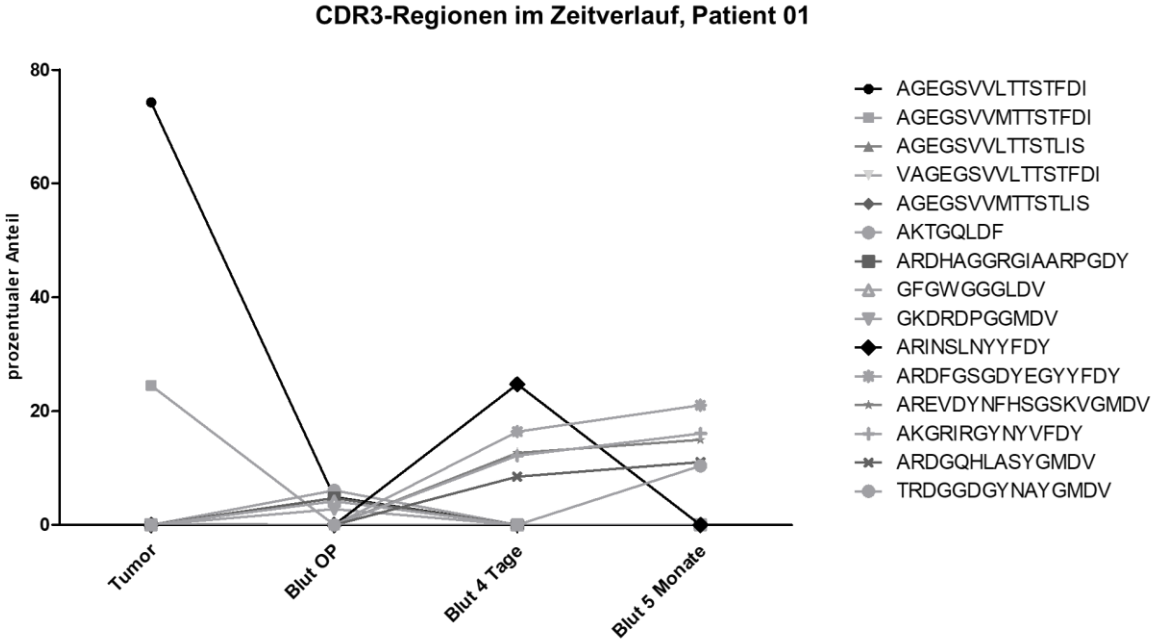


Abbildung 45: CDR3-Regionen im Zeitverlauf, Patient 01  
Verlauf des prozentualen Anteils der jeweiligen Top5 CDR3-Regionen bei Verlaufspatient 01 nach der Tumorresektion.

## 6.2. Patient ohne Rezidiv

Wie für den ersten Verlaufspatienten wurden auch für Verlaufspatient 02 die Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Ketten und CDR3-Regionen zu allen drei Zeitpunkten zwischen Makrophagen und B-Zellen verglichen. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Patienten liegt jedoch in der individuellen Krankengeschichte, da Verlaufspatient 02 zum Zeitpunkt der dritten Blutabnahme noch kein Rezidiv erlitten hatte. Das Auftreten des ersten Rezidivs wurde etwa zwei Monate nach der letzten Untersuchung im Rahmen dieser Studie festgestellt.

Für die V<sub>H</sub>-Ketten von Verlaufspatient 02 - sowohl für die Makrophagen der Tumorprobe als auch der Blutproben der ersten beiden Zeitpunkte - ist die starke Präsenz einer V<sub>H</sub>-Kette besonders auffällig. Im Tumor steht diese Kette für 57% aller Sequenzen, im Blut für 70% zum Zeitpunkt der Tumorresektion und sogar 80% drei Tage danach. Bei den B-Zellen sind die beiden häufigsten V<sub>H</sub>-Ketten im Tumor ebenfalls ungewöhnlich stark vertreten. In den Blutproben hingegen ist dieses Phänomen nicht festzustellen. Im Gegensatz zu Verlaufspatient 01 ist hier jedoch eine Zunahme der Vielfalt an exprimierten V<sub>H</sub>-Ketten für die Makrophagen und B-Zellen im Verlauf nach der Tumorresektion zu erkennen. Für die Makrophagen sind somit zum Zeitpunkt der OP 86 unterschiedliche V<sub>H</sub>-Ketten sequenziert worden, während nach vier Monaten wieder 116 verschiedene Ketten gefunden wurden (Abbildung 46).

In den CDR3-Regionen ist der bei den V<sub>H</sub>-Ketten entdeckte Trend, noch deutlicher zu erkennen. Erneut ist die häufigste CDR3-Region der Makrophagen im Tumor und den ersten beiden Blutproben mit um die 75% sehr häufig exprimiert. Insgesamt wurden zum Zeitpunkt der Operation im Tumor 129 und im Blut 441 unterschiedliche CDR3-Regionen gefunden. Bis zum letzten untersuchten Zeitpunkt stieg die Zahl im Blut sogar auf 504 CDR3-Regionen an. Bei den B-Zellen ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Repertoire-Diversität im Tumor und im Blut zu erkennen. Im Tumor konnten 471 CDR3-Regionen identifiziert werden. Im Blut hingegen waren zum OP-Zeitpunkt 3625 CDR3-Regionen zu finden. Deren Zahl stieg innerhalb von vier Monaten auf 6420 an (Abbildung 47).

VP02, V-Ketten der Schwerketten:

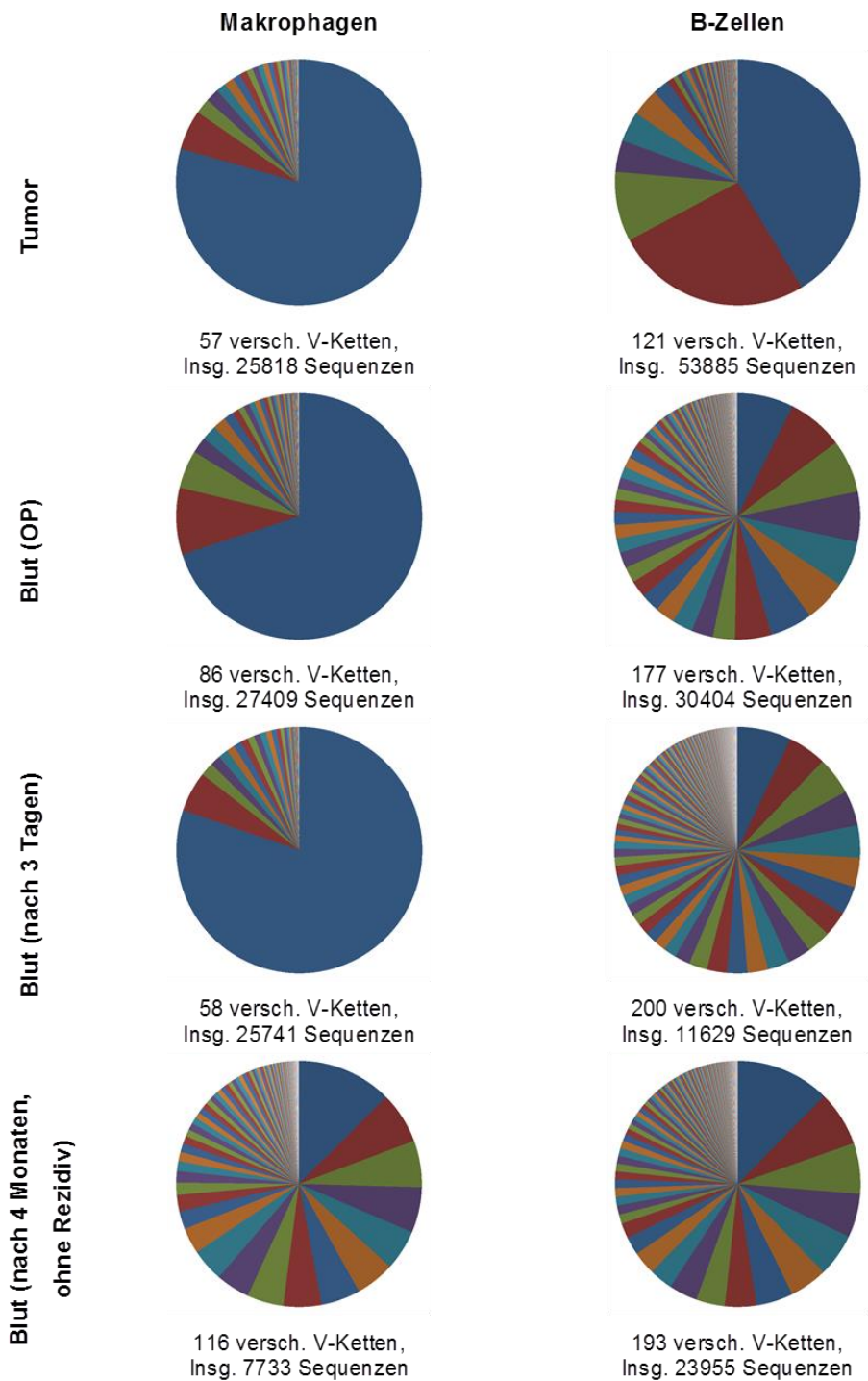


Abbildung 46: Immunglobulin-V<sub>H</sub>-Ketten-Variabilität nach Tumorresektion (Schwerketten VP02)

Die gefundenen V<sub>H</sub>-Ketten des zweiten Verlaufspatienten wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Tumorresektion, drei Tage nach OP und vier Monate nach OP) sowohl für die Makrophagen als auch für die B-Zellen verglichen. Es zeigt sich erneut ein geringeres Repertoire im Tumor verglichen mit dem Blut, sowie eine durchgängig geringere Vielfalt der V<sub>H</sub>-Ketten bei den Makrophagen als bei den B-Zellen.

VP02, CDR3-Regionen der Schwerketten:

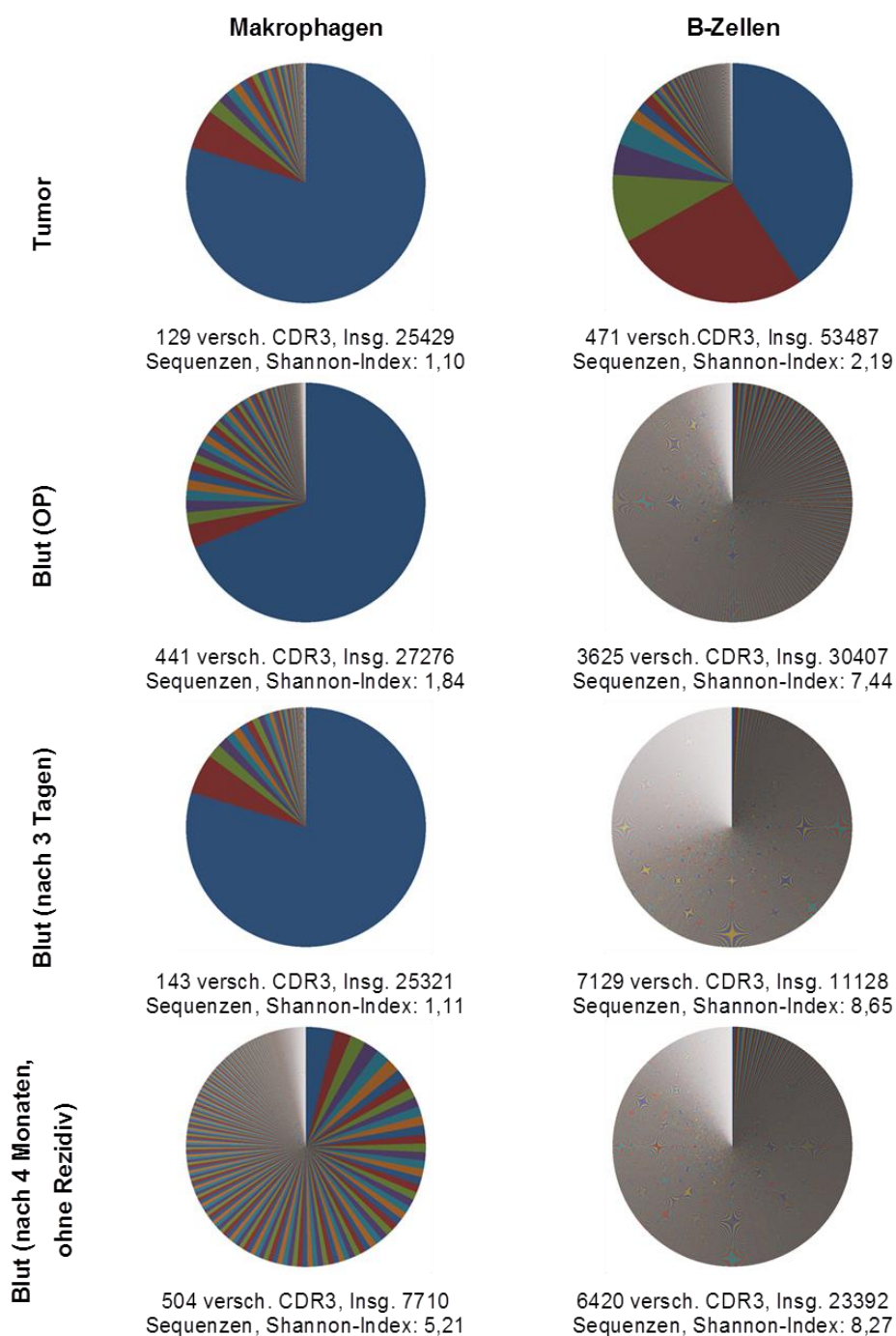


Abbildung 47: CDR3-Variabilität nach Tumorresektion (Schwerketten VP02)

Die gefundenen Immunglobulin-CDR3-Regionen des zweiten Verlaufspatienten wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten (Tumorresektion, drei Tage nach OP und vier Monate nach OP) sowohl für die Makrophagen als auch für die B-Zellen verglichen. Es zeigt sich ein geringeres Repertoire im Tumor verglichen mit dem Blut, genauso wie eine durchgängig geringere Vielfalt des CDR3-Repertoires bei den Makrophagen als bei den B-Zellen.

Vergleicht man nun die jeweiligen fünf am häufigsten gefundenen Immunglobulin V<sub>H</sub>-Ketten und CDR3-Regionen (Top5) aller untersuchten Zeitpunkte, so ist besonders die jeweils häufigste V<sub>H</sub>-Kette und CDR3-Region auffällig.

Sowohl im Tumor als auch im Blut zum Zeitpunkt der Tumorresektion und drei Tage danach ist die V<sub>H</sub>-Kette 3-33\*01 mit 57%, 70% und 80% auffallend häufig vertreten. Die dazugehörige CDR3-Region AGE<sup>G</sup>SVLTTSTFDI zeigt mit ca. 58%, 69% und 80% den gleichen Trend. Nach vier Monaten hingegen ist die V<sub>H</sub>-Kette 3-33\*01 nicht mehr unter den Top5 zu finden, ebenso die CDR3-Region AGE<sup>G</sup>SVLTTSTFDI. Die häufigste V<sub>H</sub>-Kette 4-39\*01 macht nur noch 12,5% aller V<sub>H</sub>-Ketten aus und die häufigste CDR3-Region ARSIVGARSTRFDY steht sogar nur noch für knapp 4% aller identifizierten CDR3-Regionen (siehe Tabelle 24 und Abbildung 48).

Die Entfernung des Tumors geht bei Verlaufspatient 02 somit mit dem Verschwinden der häufigsten V<sub>H</sub>-Kette und sehr prominenten CDR3-Region AGE<sup>G</sup>SVLTTSTFDI und einem gleichzeitigen Anstieg der Repertoire-Diversität einher.

	Top5 V-Ketten		Top5 CDR3-Regionen	
	V-Kette	% Anteil	CDR3-Regionen	% Anteil
Tumor	IGHV3-33*01	57,07	AGE <sup>G</sup> SVLTTSTFDI	57,62
	IGHV4-30-2*01	3,98	ATYGDYEKSFYD	3,84
	IGHV1-8*01	2,34	ARDQGYAFDI	1,38
	IGHV1-2*02	1,91	ARGREIPDY	0,95
	IGHV5-51*01	1,82	ARVQSGYFDY	0,84
Blut OP-Zeitpunkt	IGHV3-33*01	69,99	AGE <sup>G</sup> SVLTTSTFDI	68,89
	IGHV4-39*01	8,76	VRYELPFRRIA	3,16
	IGHV4-31*01	5	ARHSSVTSFPVSY	1,65
	IGHV1-18*01	2,14	ARGSGWFNAFDI	1,56
	IGHV1-2*02	1,99	ARGPGIAVAGPKVT	1,43
Blut nach 3 Tagen	IGHV3-3*01	80,24	AGE <sup>G</sup> SVLTTSTFDI	79,69
	IGHV4-30-2*01	5,31	ATYGDYEKSFYD	5,39
	IGHV3-48*02	1,76	ARDQGYAFDI	1,92
	IGHV1-8*01	1,37	ARGREIPDY	1,38
	IGHV3-7*01	1,32	ARVQSGYFDY	1,12
Blut nach 4 Monaten	IGHV4-39*01	12,53	ARSIVGARSTRFDY	3,89
	IGHV4-34*01	6,78	ARPGYSYGFGFGY	2,27
	IGHV5-51*01	6,12	AHKKWAAAGTDWFDP	2,04
	IGHV1-8*01	6	AGGGSVLTTSTFDI	2,01
	IGHV4-59*01	5,31	ARSWGKHSYFDY	1,88

Tabelle 24: Top5 der Immunglobulin V<sub>H</sub>-Ketten und CDR3-Regionen von Verlaufspatient 2 (Makrophagen)

Bei den Makrophagen wurden zusätzlich zur Variabilität der V<sub>H</sub>-Ketten und CDR3-Regionen auch die jeweiligen Top5 im Zeitverlauf nach der Tumorresektion verglichen.

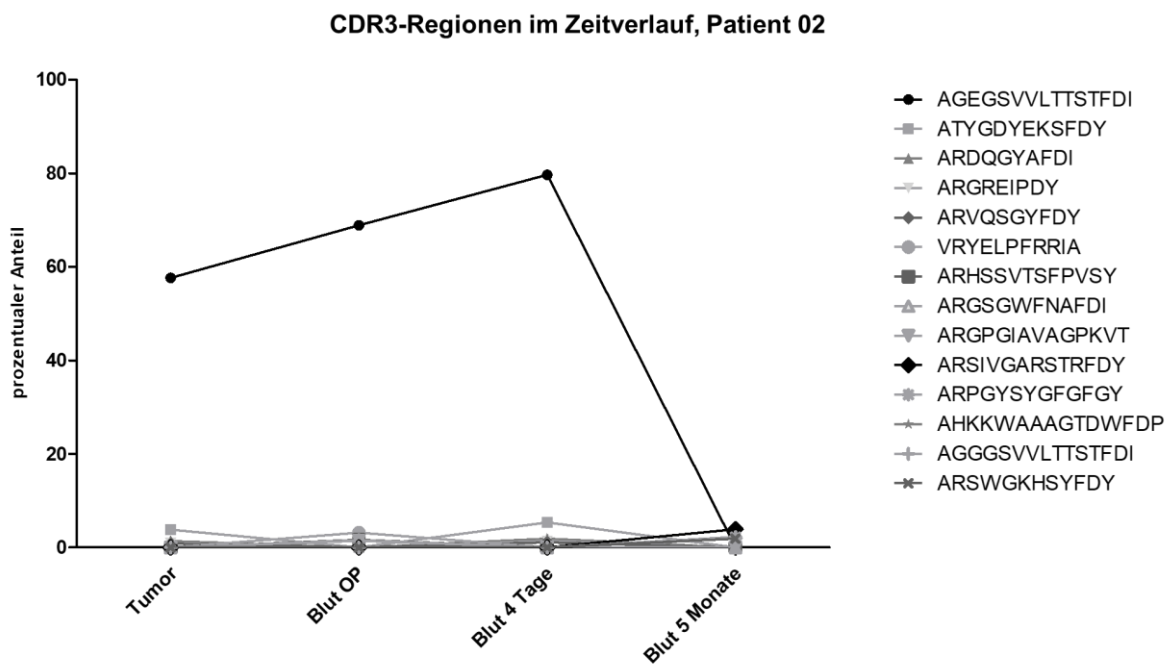


Abbildung 48: CDR3-Regionen im Zeitverlauf, Patient 02

Verlauf des prozentualen Anteils der jeweiligen Top5 CDR3-Regionen bei Verlaufspatient 01 nach der Tumorresektion.

### 6.3. Diversität des Repertoires im Verlauf

Um den Verlauf der Diversität der Immunglobulin-Repertoires zwischen den beiden Patienten besser vergleichen zu können, wurde für die Schwerketten aller Proben der Shannon-Diversity-Index bestimmt und gegen den jeweiligen Zeitpunkt der Blutabnahme aufgetragen.

Für den Verlaufspatienten 01 (Abbildung 49, links) zeigt sich für die B-Zellen ein niedriger Wert um 1 für die Zellen im Tumor und ein ziemlich konstanter Wert zwischen 6 und 7 für die Blutproben zu allen drei untersuchten Zeitpunkten. Dieser liegt jedoch unter dem Durchschnittswert einer gesunden Kontrollperson von 8, bei welcher an mehreren Zeitpunkten der Shannon-Diversity-Index bestimmt wurde (siehe Kapitel 6.5). Bei den Makrophagen hingegen ist eine Abnahme der Diversität mit der Zeit zu erkennen. Der Wert der Tumormakrophagen entspricht dem der B-Zellen im Tumor, jedoch liegt der Shannon-Diversity-Index der zirkulierenden Monozyten bereits zum Zeitpunkt der OP unter dem der B-Zellen und fällt im Verlauf nach der Tumoresektion noch weiter ab.

Bei Verlaufspatient 02 hingegen lassen sich etwas höhere Werte im Tumor, besonders bei den B-Zellen, erkennen. Auch die Werte aus den Blutproben sind für die B-Zellen deutlich höher und liegen auf einem etwa gleichbleibenden Niveau ähnlich der gesunden Kontrollperson. Ein gegensätzliches Bild zu Verlaufspatient 01 ist allerdings für die zirkulierenden Monozyten im Verlauf zu erkennen, da die Diversität des Repertoires bei Verlaufspatient 02 im Laufe der Zeit nach der Tumoresektion deutlich ansteigt.

Verlaufspatient 01, dessen Repertoire-Diversität der Makrophagen rückläufig ist und die der B-Zellen unter dem Niveau der gesunden Kontrolle liegt, leidet zum dritten untersuchten Zeitpunkt bereits an einem Rezidiv seines Glioblastoms. Verlaufspatient 02, dessen B-Zell-Diversität ähnlich hoch ist wie die der gesunden Kontrolle und dessen Makrophagen-Diversität im Zeitverlauf ansteigt, ist zum letzten untersuchten Zeitpunkt tumorfrei und weist kein Rezidiv auf.

Auch hier ist erneut anhand der aktuellen Datenlage nicht festzustellen, ob das Wachstum des Rezidivs das Repertoire beeinflusst oder umgekehrt.



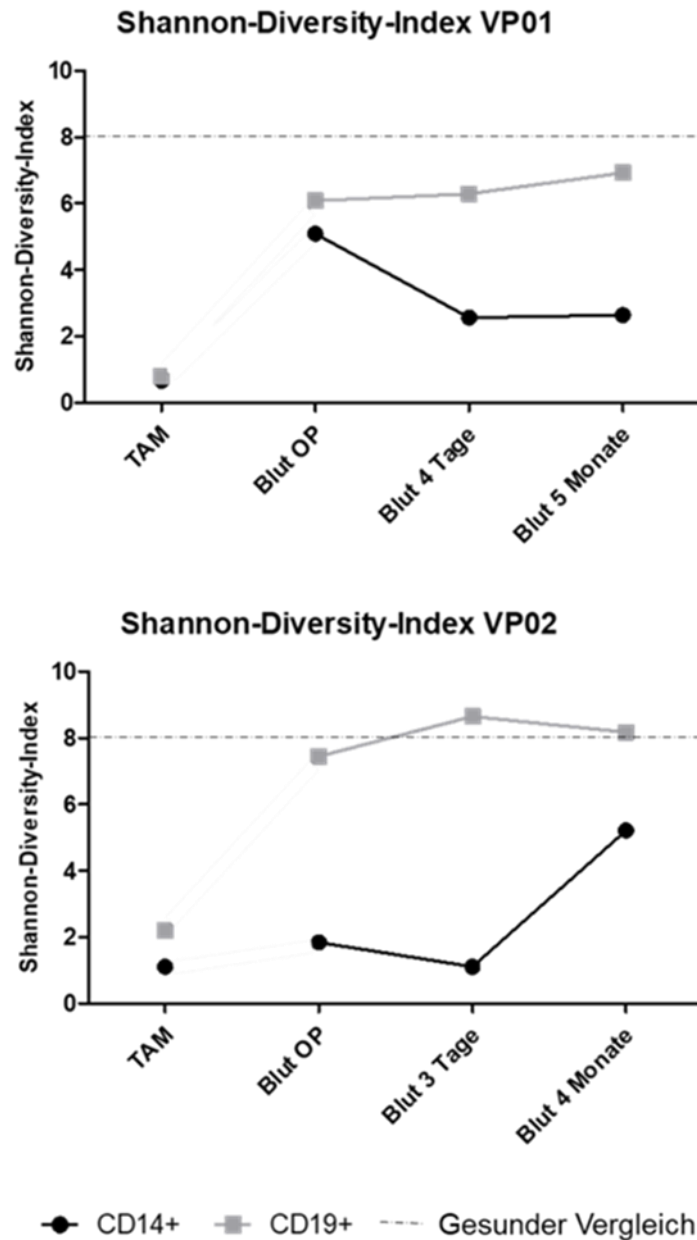


Abbildung 49: Shannon-Diversity-Index VP01 und VP02

Die Veränderungen der Diversität des Repertoires von Makrophagen und B-Zellen im Verlauf der Behandlung nach der Tumorresektion wurden als Shannon-Diversity-Index dargestellt. Für Patient 01, bei dem zum dritten Zeitpunkt bereits ein Rezidiv festgestellt wurde, liegen die Shannon-Indizes der B-Zellen durchgehend auf etwa einem Niveau, während der Index der Monozyten abfällt. Bei Patient 02, der nach vier Monaten noch frei von einem Rezidiv war, sind für die B-Zellen durchgehend höhere Shannon-Diversity-Indizes festzustellen als beim Vergleichspatienten mit Rezidiv. Des Weiteren ist ein starker Anstieg des Makrophagen-Repertoires festzustellen. Zum Vergleich ist das durchschnittliche Niveau der B-Zellen einer gesunden Kontrollperson als hellgraue gestrichelte Linie gezeigt.

#### 6.4. Immunkompetenz der Makrophagen im Verlauf nach der Tumorresektion

Die HLA-DR-Expression, die vor allem in der Sepsis-Diagnostik als Marker für die Immunkompetenz von Zellen genutzt wird, wurde in zwei gesunden Kontrollen sowie in beiden Verlaufspatienten zu allen drei Zeitpunkten mittels PCR untersucht.

In Abbildung 50 ist zu erkennen, dass sich für die beiden gesunden Kontrollen vergleichbare Banden für die GAPDH-Kontrollbande und die HLA-DR-Bande zeigen. Bei den Proben beider Patienten sind sowohl für die jeweilige Tumorprobe als auch die Blutproben von allen drei Zeitpunkten eindeutige Expressionen für GAPDH und das zu untersuchende HLA-DR zu erkennen.

Das Auftreten beziehungsweise Nicht-Auftreten eines Rezidives bei den beiden untersuchten Glioblastom-Patienten ist somit nicht mit einer fehlenden oder einer vorhandenen Expression des Markers HLA-DR verknüpft. Um eine genaue Aussage über die Expressionshöhe von HLA-DR treffen zu können, ist eine quantitative PCR nötig, da dies mit den vorliegenden PCR-Ergebnissen nicht möglich ist.

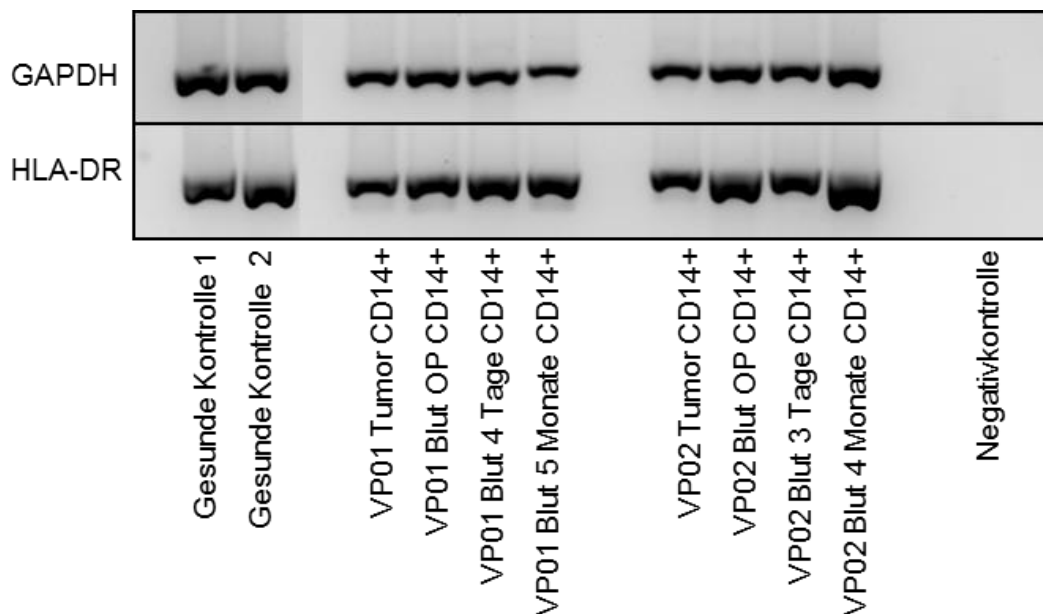


Abbildung 50: Immunkompetenz der Makrophagen im Verlauf nach Tumorresektion

HLA-DR ist ein Marker der Immunkompetenz von Zellen und wird hauptsächlich in der Sepsis-Diagnostik eingesetzt. Die HLA-DR-Expression der Makrophagen wurde für zwei gesunde Kontrollen sowie für die beiden Verlaufspatienten zu allen drei Zeitpunkten im Vergleich zu GAPDH untersucht. Es zeigt sich für alle untersuchten Proben der Tumorpatienten eine eindeutige HLA-DR-Expression.

## 6.5. Gesunde Kontrollen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Um zu zeigen, dass die bei den Patienten im Verlauf nach der Tumorresektion festgestellten Veränderungen durch die Glioblastom-Erkrankung und die Entfernung des Tumors bedingt sind und nicht auch auf natürlichen Schwankungen des Immunsystems beruhen können, wurde zusätzlich eine gesunde Kontrolle zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert.

Sowohl für die V-Ketten als auch für die CDR3-Regionen der Schwerketten zeigten sich lediglich sehr geringe Abweichungen, die deutlich unter denen der Tumorpatienten im Verlauf ihrer Behandlung lagen (Abbildung 51).

Es ist daher anzunehmen, dass alle bei den Patienten festgestellten Änderungen im Repertoire nach ihrer Tumorresektion durch diese hervorgerufen wurden und keine normalen Schwankungen des Immunsystems darstellen.

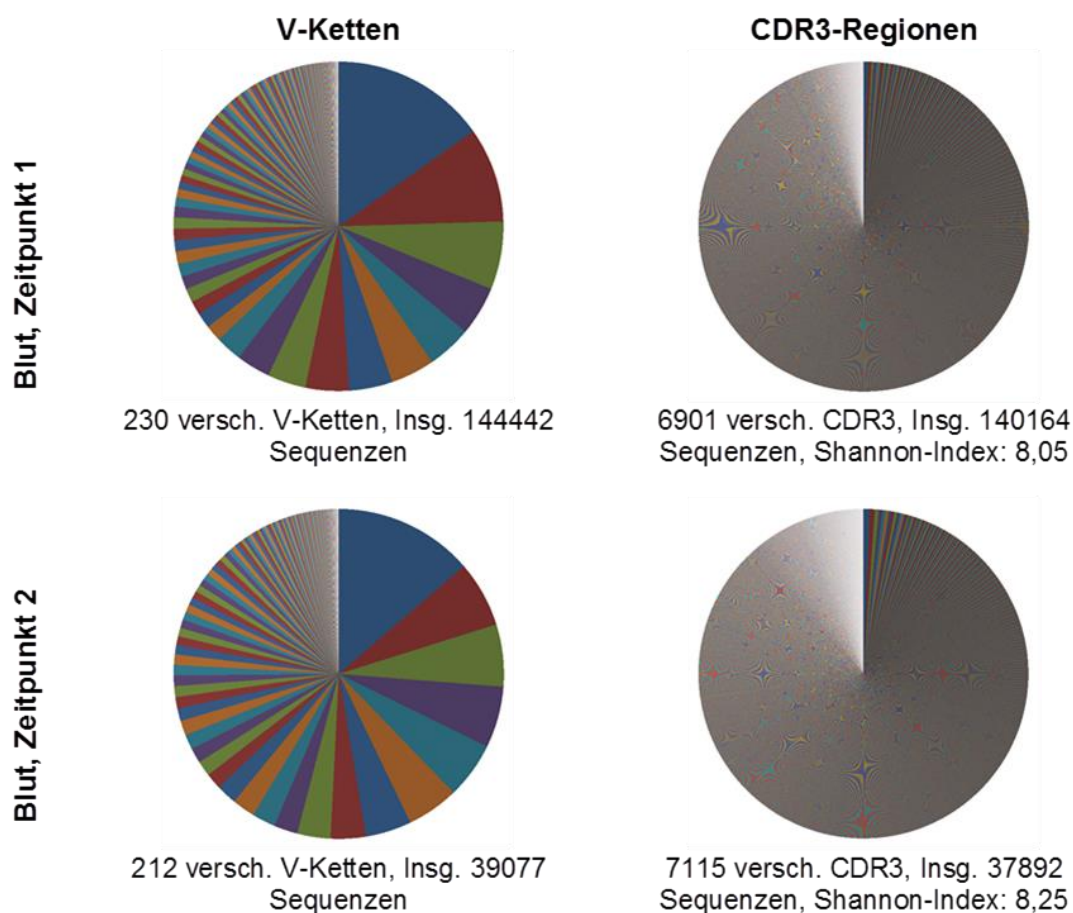


Abbildung 51: Immunglobulin-Schwerketten-Repertoires der gesunden Kontrolle (B-Zellen) zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Um die natürlichen Schwankungen im Immunglobulin-Repertoire der Makrophagen mit denen der Patienten vergleichen zu können, wurde eine gesunde Kontrolle zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Sowohl die  $V_H$ -Ketten (links) als auch die CDR3-Regionen (rechts) unterscheiden sich zu den beiden Zeitpunkten kaum.

## 7. Zytokin-Status der Patienten

### 7.1. Vergleich der gesunden Kontrollen und GBM-Patienten

Die Analyse der Zytokinkonzentrationen zeigte, dass die drei Zytokine MCP-1, sCD40L und MDC im Serum der Glioblastom-Patienten (n=13) signifikant stärker exprimiert werden als in den gesunden Kontrollen (n=7).

Zwei der drei Zytokine werden tumorfördernde Eigenschaften nachgesagt, da sie die Infiltration des Tumorgewebes mit Makrophagen fördern (MCP-1) und die Immunsuppression durch den Tumor induzieren (sCD40L), was erklären könnte, warum sie von den untersuchten Glioblastom-Patienten so deutlich überexprimiert werden. MDC hingegen kann in diesem Zusammenhang als eine Art Marker für die Menge der vorhandenen Monozyten und Makrophagen gesehen werden, da es zum größten Teil direkt nach der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen exprimiert und von den Zellen sezerniert wird. Die hohen MDC-Levels im Serum der Glioblastom-Patienten stehen somit in Einklang mit der großen Anzahl CD14-positiver Zellen in Blut und Tumor der Patienten (siehe Kapitel 5.3.).

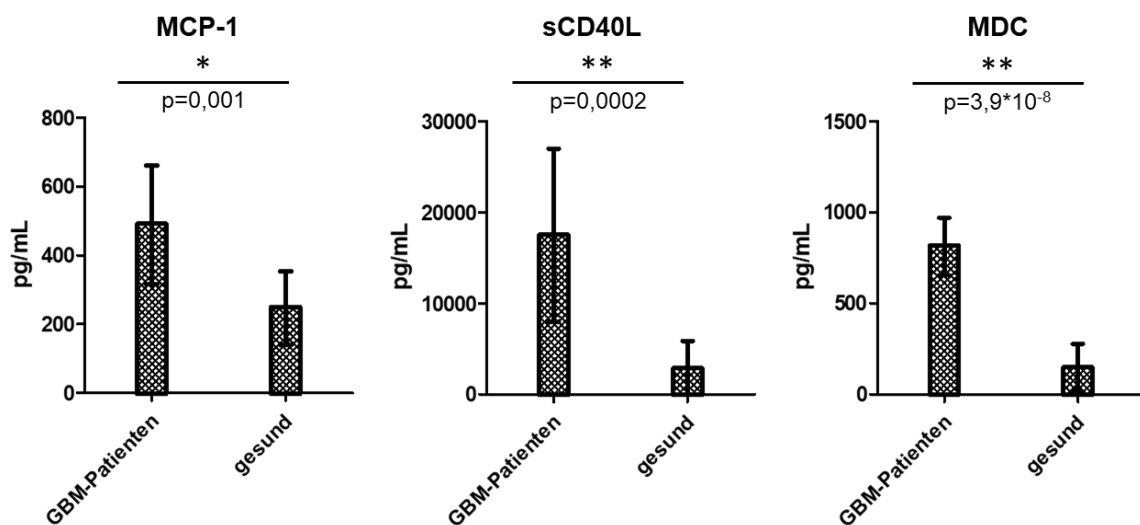


Abbildung 52: Zytokinkonzentrationen im Vergleich gesund vs. GBM-Patient

Für die drei Zytokine MCP-1, sCD40L und MDC zeigte sich eine signifikant höhere Expression in den untersuchten Glioblastom-Proben als in gesunden Kontrollen.

## 7.2. Im Verlauf nach Tumorresektion

Auch für die beiden Verlaufspatienten wurde die Zytokin-Expression im Serum untersucht. Hierbei zeigten sich bei den nachfolgenden vier Zytokinen Unterschiede zwischen den beiden Patienten.

Sowohl für EGF, dessen Expressionslevel mit progressivem Tumorwachstum und Metastasierung korreliert, als auch für VEGF, das eine Schlüsselrolle in der Tumorangiogenese spielt, wurden für Verlaufspatient 01 (mit Rezidiv) am dritten untersuchten Zeitpunkt deutlich höhere Werte als für Verlaufspatient 02 (ohne Rezidiv) gemessen (siehe Abbildung 53).

Auch für TNF- $\alpha$ , das ebenfalls in die Entstehung und das Wachstum von Tumoren involviert ist und als Hauptmediator Entzündungs-assoziierten Tumoren gilt, wurden bei Verlaufspatient 01 (mit Rezidiv) höhere Werte gemessen. Diese liegen allerdings nicht so weit über dem Durchschnittswert der gesunden Kontrollen, der als graue Linie dargestellt ist, als bei EGF und VEGF. Im Falle von TNF- $\alpha$  ist für Verlaufspatient 02 (ohne Rezidiv) sogar eine abnehmende Konzentration im Verlauf nach der Tumorresektion zu erkennen.

IL-8, das in gesundem Gewebe nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt, spielt eine kritische Rolle in der Tumorangiogenese, dem Tumorwachstum sowie der Proliferation von Tumorzellen. Der gemessene Durchschnittswert der gesunden Kontrollen liegt unter 4pg/mL. Lediglich die Messung von Verlaufspatient 01 (mit Rezidiv) nach 5 Monaten ergab einen höheren Wert von über 8pg/mL, alle anderen Proben lagen darunter.

Die Untersuchung der Zytokine der beiden Verlaufspatienten zeigte somit deutlich höhere Werte der tumor-fördernden Zytokine im Serum des Patienten mit Rezidiv als beim Patienten, der zum letzten in die Studie eingeschlossenen Zeitpunkt noch tumorfrei war, was auch mit den Erwartungen übereinstimmte.

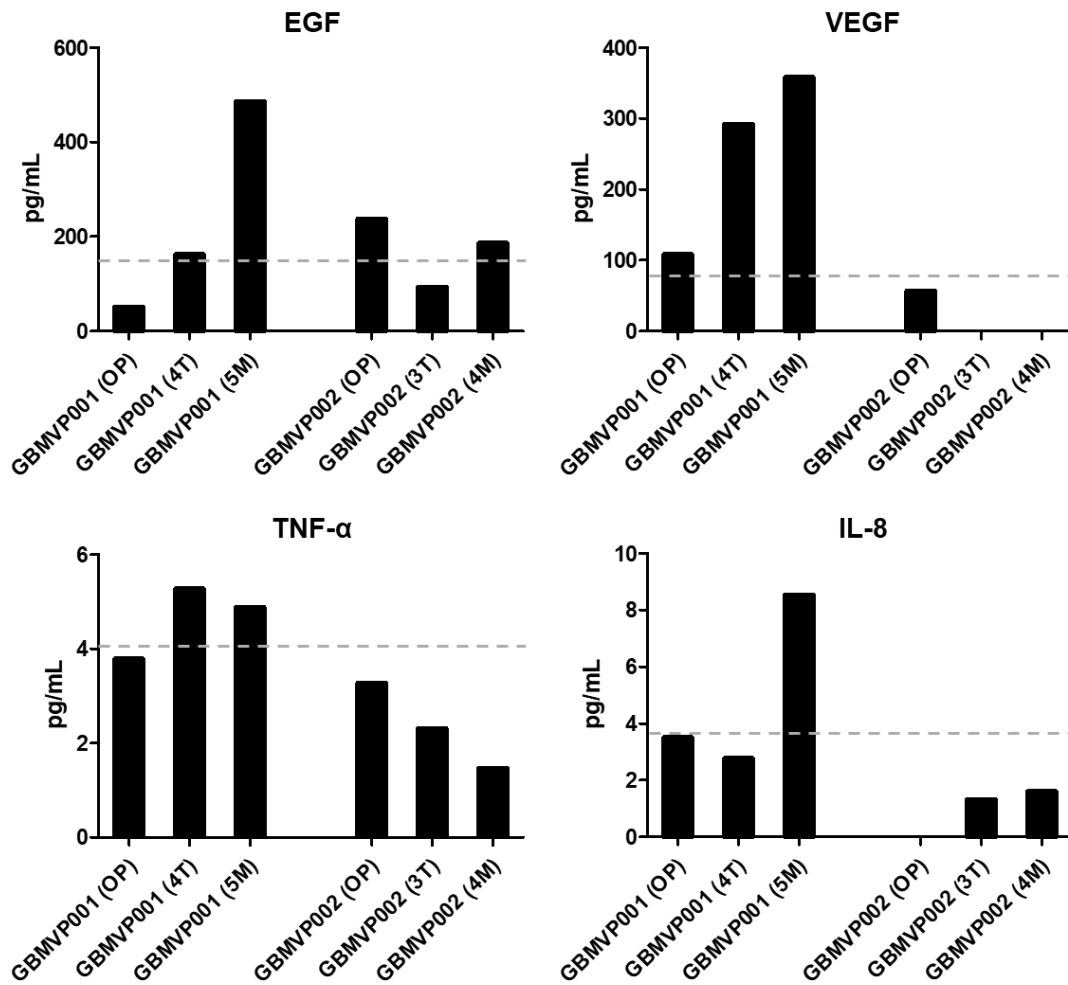


Abbildung 53: Zytokinkonzentrationen der Verlaufspatienten

Die vier Zytokine EGF, VEGF, TNF- $\alpha$  und IL-8 wurden bei beiden Verlaufspatienten zu allen drei Zeitpunkten untersucht und dem Durchschnitt der gesunden Kontrollen (graue Linie) gegenübergestellt.

---

## Diskussion

### 1. Glioblastom

Das Glioblastom ist das hochgradigste Gliom und bringt stets sehr schlechte Prognosen für die betroffenen Patienten mit sich. Der Goldstandard in der Behandlung des Glioblastoms besteht aktuell in einer Kombination aus der größtmöglichen chirurgischen Tumorresektion gefolgt von adjuvanter Radiotherapie und Chemotherapie mit Temozolomid. Trotz alledem ist die Behandlung von Glioblastom-Patienten zum jetzigen Zeitpunkt nur palliativ [191, 196, 197]. Aufgrund dessen ist der Bedarf an neuen Behandlungsmethoden, vor allem Formen der vielversprechenden Immuntherapie, groß. Da bereits gezeigt werden konnte, dass tumor-infiltrierende Microglia und periphere Makrophagen die wichtigsten Immunzellen im Tumorgewebe sind und bis zu 30% der Tumormasse von Glioblastomen ausmachen können, sind diese Makrophagen der Glioblastom-Patienten der Ansatzpunkt dieser Studie [118]. Aufgrund der durchgeführten Charakterisierung der Immunglobuline dieser Makrophagen, der peripheren Monozyten und der jeweils korrespondierenden B-Zellen ist ein erster Schritt in eine neue immunologische Richtung getan, der in Zukunft hoffentlich noch weiterentwickelt werden wird.

### 2. Immunglobuline in Nicht-Lymphozyten

Basierend auf den klassischen Dogmen der Immunologie wurde die Expression variabler Immunrezeptoren stets ausschließlich den Lymphozyten zugeschrieben. In den vergangenen zwanzig Jahren konnten jedoch immer mehr Arbeitsgruppen diese traditionelle Meinung widerlegen und die Expression von Immunglobulinen und T-Zellrezeptoren in diversen anderen Zelltypen nachweisen.

So gelang es bereits im Jahre 1998 Kimoto et al. Immunglobuline und T-Zellrezeptoren in den Gentranskripten von fünf humanen, nicht-hämatopoetischen Tumorzelllinien zu zeigen. Mittels RT-PCR konnten sie die Schwereketten der Immunglobulin-Klassen IgM, IgD, IgG1, IgG3 und IgA sowie die Schwerekette von TCR- $\alpha$  nachweisen [236]. Mithilfe der cDNA-Microarray-Technologie konnten im Anschluss im Jahre 2001 die konstanten Regionen der IgG3 und IgA-Schwereketten in Primärzellen humaner Leberkarzinome nachgewiesen werden [237]. Im gleichen Jahr war es Li et al. ebenfalls möglich die Schwereketten in Zellen des Nasopharynxkarzinoms nachzuweisen [238]. Per Einzelzell-PCR untersuchten Qiu et al. im Jahr 2003 humane Krebszellen epithelialen Ursprungs, Zellen des korrespondierenden Normalgewebes sowie unterschiedliche epitheliale Zelllinien auf die Expression von Immunglobulinen. Hierbei konnten sie IgG im Zytoplasma und sekretierter

Form in Brust-, Lungen-, Leber- und Colon-Karzinomen sowie in den jeweils zugehörigen Zelllinien belegen [120]. Bestätigt wurde dies später von Chen und Gu [127]. Eine genauere Untersuchung der Ig-Schwerketten-Expression in verschiedenen Brustkrebs-Zelllinien durch Babbage et al. in 2006 ergab, dass vier der getesteten Zelllinien unterschiedliche Kombinationen von IgG-, IgM- und IgA-Schwerketten exprimierten. In einer weiterführenden Einzelzell-Untersuchung der gleichen Zelllinien zeigte sich, dass jedoch lediglich 32% der analysierten Zellen die zuvor gefundenen Immunglobulin-Schwerketten exprimierten [126]. Der Nachweis von T-Zellrezeptoren in Neutrophilen-, Monozyten- und Makrophagen-Populationen gelang darüber hinaus auch in unserer Arbeitsgruppe [106, 108, 109].

In weiteren Studien stellte sich heraus, dass die exprimierten Immunglobuline in Nicht-Lymphozyten sowohl im Zytoplasma als auch in der Zellmembran zu finden sind, was den Befürchtungen von Kontaminationen der untersuchten Zellpopulationen widerspricht. Chen und Gu zeigten mittels nested RT-PCR das Vorkommen von IgG und IgK in beiden Kompartimenten in sechs unterschiedlichen Krebs-Zelllinien [127]. Durch die Anwendung von *in situ* Hybridisierung konnte zusätzlich die Präsenz der konstanten Regionen von IgG in entferntem Tumorgewebe aus Brust, Lunge, Cervix, Leber und Prostata nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich ein niedrigeres Expressionslevel der Immunglobuline in den Tumorzellen als in den infiltrierenden B-Zellen und Plasmazellen, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie übereinstimmt. In der Immunhistochemie, welche jedoch nicht zwischen selbst exprimierten und an den FC-Rezeptoren haftenden Immunglobulinen unterschieden kann, konnte die IgG- und IgK-Expression im Zytoplasma und der Zellmembran bei etwa der Hälfte der untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Verglichen mit den fünf bis acht Prozent der T-Zellrezeptor-produzierenden humanen und murinen Neutrophilen und Monozyten in gesunden Individuen ist dies eine deutlich höhere Quote [106, 109]. 2007 gelang es Zheng et al. in fünf Krebs-Zelllinien zusätzlich die Expression der konstanten Bereiche von IgA in der RT-PCR zu zeigen und diese im Anschluss auch per Western Blot, FACS und ELISA zu bestätigen. Zusätzlich wurde IgA nicht nur im Zytoplasma, sondern auch in der Plasmamembran und sekretiert in den Zellkulturüberständen aller untersuchten Zelllinien gefunden [239]. Auch die IgK-Expression wurde weiter untersucht und für Nasopharynxkarzinom-Zelllinien [240], abnormale Epithelzellen des Uterus und Cervix [121], Colorektal-Karzinomzellen [241] und Zellen des Magenkrebs [242] gezeigt. 2015 gelang es Wang et al. zusätzlich eine Expression von IgK-Leichtketten in sechs AML-Zelllinien, primären Myoblasten als auch reifen Monozyten und Neutrophilen von Patienten mit nicht-hämatopoetischen Tumoren nachzuweisen. Die passenden gesunden Kontrollen zeigten, wenn überhaupt, nur eine



sehr geringen Expression [116]. Im Zuge der Untersuchung der Leichtketten gelang es Yang et al. auch eine Ko-Expression von Lambda- und Kappa-Leichtketten in Magentumoren zu finden [242]. 2013 wurde die IgG-Expression in sechs AML-Zelllinien und primären Myeloblasten von Qiu et al. bestätigt. In dieser Studie gelang es ihnen jedoch nicht, dieselben Immunglobuline in den Monozyten und Neutrophilen der Patienten mit nicht-hämatopoetischen Neoplasien sowie gesunden Kontrollen zu finden [118]. Im darauf folgenden Jahr konnte die gleiche Gruppe dann jedoch rekombinierte IgM-Transkripte sowie IgM-Proteine in sieben von sieben AML-Zelllinien, der Hälfte der untersuchten primären Myeloblasten der AML-Patienten, sowie Monozyten und Neutrophilen von Patienten mit nicht-hämatopoetischen als auch gesunden Spendern zu identifizieren [115]. Im Jahr 2015 kam eine weitere Methode zum Nachweis der Immunglobuline mit nicht-lymphozytären Ursprungs hinzu als Liao et al. die Expression von IgG in epithelialen Krebszellen mithilfe von monoklonalen IgG-spezifischen Antikörpern nachwies [243].

Dem ursprünglichen Dogma, dass die Immunglobulin-Expression nur den Lymphozyten vorbehalten ist und lediglich die myeloiden Zellen Phagozytose betreiben können, stehen zusätzlich zu allen bisher beschriebenen Immunglobulin-exprimierenden myeloiden Zellen die Tatsachen entgegen, dass weitere spezielle Effektorzellen wie B1-Zellen [244], NKB-Zellen [245] und B1-Phagozyten [246] entdeckt wurden. Sie stärken die Vermutung, dass Immunglobulin-exprimierende phagozytische Zellen von B1-Zellen abstammen und deren CD11b-positive Subpopulation bilden [247].

Unsere Arbeitsgruppe konnte in der Vergangenheit die generelle Expression von T-Zellrezeptoren und Immunglobulinen durch Makrophagen in unterschiedlichen Geweben mit einem eingeschränkten Repertoire zeigen. [117]. Die große Ausnahme in diesem Zusammenhang bildeten die AML-Patienten, deren Repertoire der Monozyten näher an dem der B-Zellen als an dem der TAM ist [248].

In unserer aktuellen Studie konnte nun zum ersten Mal die Expression von hoch diversen und individual-spezifischen Immunglobulinen in zirkulierenden Monozyten und Tumormakrophagen bei Glioblastom-Patienten nachgewiesen werden. Hierbei wurde sowohl die lösliche als auch die transmembrane Form der Immunglobuline gefunden, wodurch es sich eindeutig um von den Makrophagen exprimierte und keine von außen aufgenommenen Immunglobuline handelt. Das Repertoire der myeloiden Zellen zeigt deutliche Restriktionen im Vergleich zu dem der korrespondierenden B-Zellen, was mit den bisherigen Ergebnissen der T-Zellrezeptor-Expression in myeloiden Zellen in Einklang steht [42, 46, 109, 116].

### 3. Molekulare Mechanismen der Ig-Rekombination

Der molekulare Mechanismus, dem die Immunglobulin-Expression der Nicht-Lymphozyten folgt, ist trotz vieler bisheriger Untersuchungen noch immer unklar.

1980 konnten Kemp et al. in vier von neun untersuchten T-Zell-Lymphomen die RNAs für den konstanten Bereich von IgG nachweisen. Jedoch waren diese etwas kleiner als bei den korrespondierenden B-Zelllinien und IgM-sekretierenden Plasmazytomen, wodurch sie einen anderen Mechanismus in den Nicht-Lymphozyten als in den B-Zellen vermuteten [249].

Als zwei der wichtigsten und unersetzlichen Faktoren der V(D)J-Rekombination gelten RAG1 und RAG2, da diese für den benötigten DNA-Bruch verantwortlich sind [81]. In diesem Zusammenhang konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass RAG1 und RAG2 mRNA sowie die dazugehörigen Proteine in Immunglobulin-exprimierenden Krebszelllinien wie dem Lungen-, Colon-, Uterus- und Cervix- [120], Leber- und Prostata- [127], sowie Magen- als auch Mammakarzinom [122] vorhanden sind. Des Weiteren konnte die Existenz des RAG-Komplexes per RT-PCR und Immunhistochemie auch in mehreren epithelialen Krebszelllinien nachgewiesen werden [241]. Im weiteren Verlauf der Erforschung der RAG-Proteine in Nicht-Lymphozyten, zeigten Fuchs et al. die Expression von RAG1 und RAG2 in Makrophagen mittels Western Blot [108].

Der zweite wichtige Faktor neben dem RAG1/2-Komplex bei der Immunglobulin-Expression ist die aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase (AID), welche nach früheren Vermutungen nur in B-Zellen exprimiert wird. Sie ist sowohl für den Klassenwechsel als auch für die somatische Hypermutation verantwortlich wie auch an der DNA-Methylierung beteiligt [97, 250-253]. Babbage et al. konnten jedoch eine AID-Expression in sechs von sechs untersuchten unterschiedlichen Brustkrebs-Zelllinien nachweisen und diese bisherige Annahme somit widerlegen [126]. Selbst in murinen Monozyten konnte bereits eine AID-Expression gezeigt werden, welche vermutlich eine Rolle in der Zelldifferenzierung spielt [254].

Im Jahr 2006 konnte in einer Studie mittels Einzelzell-Analyse gezeigt werden, dass etwa 32% der Krebszellen Immunglobuline exprimierten und hierbei unterschiedliche Zellen auch verschiedene Immunglobulinklassen produzierten. Dies zeigt, dass ein Klassenwechsel stattgefunden haben muss [126]. Dieses Ergebnis konnte auch von mehreren Gruppen, unter anderem unserer Arbeitsgruppe, bestätigt werden, indem ebenfalls in einer Zellpopulation mehrere verschiedene Immunglobulin-Klassen gefunden wurden [117, 118,

120, 126, 236]. Etwa gleichzeitig zu dieser Studie gelang es einer anderen Gruppe die AID-Expression genauer zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass AID nicht in allen epithelialen Krebszelllinien nachweisbar ist, unabhängig von der eingesetzten Analysemethode (RT-PCR und Western Blot) [122]. Bestätigt wurde diese Erkenntnis von einer anderen Studie, bei der die AID-Expression nur in einer von sechs untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden konnte [127].

Zeng et al. stellten basierend auf diesen Erkenntnissen die Hypothese auf, dass AID von Krebszellen nicht zur Immunglobulin-Expression benötigt wird [125]. Eine zweite denkbare Konstellation wäre jedoch, dass das Vorhandensein der AID-Expression den entscheidenden Unterschied zwischen den nicht-lymphoiden Zelllinien, die Immunglobuline exprimieren, und denen, die diese Fähigkeit nicht besitzen, ausmacht.

Unserer Arbeitsgruppe gelang es, das für die Rekombination notwendige TdT in Monozyten nachzuweisen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass RAG-defiziente Mäuse nicht in der Lage sind, T-Zellrezeptoren in Monozyten zu exprimieren. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Rekombination in den Monozyten nach einem ähnlichen Mechanismus abläuft wie in den Lymphozyten [109]. Zusätzlich ist dieser Nachweis im Tiermodell als weitaus verlässlicher als vorherige, schwerer zu deutende PCR-Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zu werten. Es konnte somit gezeigt werden, dass die molekularen Voraussetzungen vorhanden sind, damit eine Expression von variablen Immunrezeptoren in Nicht-Lymphozyten stattfinden kann.

#### **4. Mögliche biologische Funktion der von nicht-lymphoiden Zellen exprimierten Immunglobuline**

Da es sich bei den Immunglobulinen mit nicht-lymphoidem Ursprung um eine relativ neue Entdeckung handelt, ist bisher wenig über die mögliche biologische Funktion der rekombinierten Immunrezeptoren bekannt.

Auf der Suche nach der biologischen Funktion konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der Immunglobuline, z.B. durch antisense Oligonukleotide oder anti-humane Immunglobuline, zum Start der Apoptose und der Inhibition von Proliferation und Migration der Tumorzellen führte. Dieser Zusammenhang nährt die Vermutung, dass die Aufgabe der Antikörper aus Tumorzellen in der Förderung des Tumorwachstums und vor allem dem Tumorüberleben besteht [118, 120, 239, 255]. Hierbei kommt natürlich die Frage auf, ob es sich bei Immunglobulinen von Tumormakrophagen ähnlich verhält oder ob diese vielleicht sogar eine gegenteilige Wirkung haben. Dies konnten wir auf der Basis der aktuell

vorliegenden Ergebnisse noch nicht klären, da hierfür funktionelle Untersuchungen im gerade erstellten Mausmodell notwendig sind. In diesem Mausmodell sind die monozytären Zellen nicht in der Lage RAG2 zu bilden, welches für die Rekombination von Immunglobulinen essentiell ist. Somit wird es möglich sein zu zeigen, welche Auswirkungen es – besonders im Zusammenhang mit der Entstehung und Progression von Tumoren - hat, wenn lediglich die monozytären und nicht auch die lymphozytären Immunglobuline im Organismus der Maus fehlen.

Liao et al. konnten allerdings bereits zeigen, dass epitheliale Stammzellen und Vorläuferzellen eine hohe Zahl oberflächengebundener IgG aufweisen, die zu einer hohen Migration, gesteigertem invasivem Wachstum, Metastasierung und einer erhöhten Selbsterneuerung führen. Nachgewiesen wurde dies durch eine Abreicherung von IgG, welche eine Reduktion der Adhäsion, des invasiven Wachstums, sowie eine Erhöhung der Apoptose zur Folge hatte [243]. Bestärkt wurden diese Ergebnisse durch die Untersuchungen von Schreiber et al., die nachweisen konnten, dass die Stimulation von Immunreaktionen wie beispielsweise der Antikörperproduktion zum verstärkten Wachstum von Tumor-Grafts führte [256]. Diese Feststellung basiert auf der Tatsache, dass die produzierten Antikörper Epitope blocken können, die sonst vom Immunsystem genutzt werden [257]. Während der durchgeführten Studie entstand anhand dieser Literaturergebnisse die Hypothese, dass die Makrophagen ihre Fc Rezeptoren mit den selbst exprimierten Immunglobulinen beladen und somit eine spezifische Aktivierung von ADCC und/ oder ADCP ermöglicht wird. Aus eigenen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die Aktivierung myeloider T-Zellrezeptoren zur Sekretion von MCP-1 führt und die Phagozytose erhöht. Solche spezifischen funktionellen Untersuchungen sollen in Zukunft auch für die myeloiden Immunglobuline durchgeführt werden.

## **5. Validierung der Methoden**

Der Hauptteil der Untersuchungen basierte auf der Klonierung der per PCR gewonnenen DNA-Fragmente der Immunglobulin-Ketten aus Makrophagen und B-Zellen. Diese PCRs wurden mit Konsensus-Primern durchgeführt, die aufgrund ihrer Wobble-Basen mehr als nur eine Sequenz amplifizieren können, wodurch immer ein gewisser Amplifikationsbias vorhanden ist. Dieser Bias liegt allerdings für alle untersuchten Zellpopulationen im gleichen Maßstab vor. Grundsätzlich kann eine Repertoire-Untersuchung mittels Klonierung kritisch gesehen werden, da sich nicht alle DNA-Fragmente mit gleicher Effizienz in den Vektor integrieren und anschließend klonieren lassen. Da die Einschränkung in der Repertoire-Diversität jedoch nur in einer der beiden untersuchten Zellpopulationen zu finden war, ist auszuschließen, dass dieser Effekt auf einen systematischen Bias aufgrund der

Konsensus-Primer zurückzuführen ist. Es handelt sich somit um die Abbildung eines qualitativen Unterschiedes in den Immunglobulin-Repertoires der beiden analysierten Zellpopulationen. Des Weiteren wurden die Untersuchungen mehrmals pro Probe durchgeführt, was eine Reproduktion der Ergebnisse erlaubte.

Die PCR-Untersuchungen dieser Studie wurden mit zwei unterschiedlichen PCR-Systemen durchgeführt. Die Standard-RT-PCR, mit der ein Großteil der Analysen ausgeführt wurde, hat das Potential aufgrund der genutzten Konsensus-Primer, einen systematischen Bias und einzelne Lesefehler zu produzieren. Da die gefundenen Differenzen zwischen den Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen und B-Zellen jedoch signifikant und die Differenzen in der Repertoire-Diversität von Makrophagen und B-Zellen für jeden Patienten individuell waren, ist der Primer-Bias als Ursache hierfür auszuschließen. Des Weiteren sprechen die fehlenden Unterschiede in der Anzahl der somatischen Mutationen, der chromosomalen Lokalisation der exprimierten  $V_H$ -Gene, der CDR3-Länge und der Nutzung der einzelnen  $V_H$ - und  $J_H$ -Gene dagegen. Dies lässt zusätzlich darauf schließen, dass der Weg der V(D)J-Rekombination in den myeloiden Zellen dem der B-Zellen sehr ähnelt oder sogar identisch ist.

Nach der Umstellung auf das modernere Next-Generation-Sequencing galt es zu zeigen, in wie weit man die Ergebnisse aus beiden Methoden miteinander vergleichen konnte. Hierfür wurde die Blutprobe einer gesunden Kontrolle mit Konsensus-Primern und anschließender Sanger-Sequenzierung, Konsensus-Primern und NGS als auch mit RACE-PCR und folgendem NGS untersucht. Für die RACE-PCR in Kombination mit NGS konnte bereits gezeigt werden, dass es sich um eine nahezu Bias-freie Amplifikation handelt [258, 259]. Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede wodurch auch die Ergebnisse, die mit den unterschiedlichen Methoden erhalten wurden, miteinander verglichen werden können. Des Weiteren zeigte sich durch den Vergleich der PCR mit den Konsensus-Primer und der RACE-PCR, dass die ursprünglich genutzten Konsensus-Primern einen so geringen Bias aufwiesen, dass dieser bei der Betrachtung der erhaltenen Sequenzen vernachlässigt werden konnte. Die Nutzung des Next-Generation-Sequencing erhöhte jedoch in deutlichem Maß die Wiederfindungsrate der potentiell vorhandenen Schwer- und Leichtkettensequenzen und ermöglichte durch die hohe Anzahl analysierter Proben statistisch signifikantere Aussagen.

## 6. CDR3-Variabilität und Nutzung der V-Ketten

Der Vergleich der CDR3-Variabilität und  $V_H$ -Ketten-Nutzung zeigte eine starke Einschränkung des Makrophagen-Repertoires im Gegensatz zu den korrespondierenden B-Zellen.

Diese geringere Repertoire-Diversität ist ein weit verbreitetes Phänomen unter den nicht-lymphoiden Immunglobulin-exprimierenden Zellen, was bereits von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt werden konnten [115, 116, 118, 125, 243, 260]. In diesem Zusammenhang gibt es mehrere Vermutungen was die Ursache des geringeren Repertoires betrifft. So wurde zum Beispiel bereits eine geringere Zellmenge im Tumor verglichen mit dem Blut dafür verantwortlich gemacht. Eine weitere Hypothese war, dass Tumor-assoziierte Makrophagen und andere nicht-lymphoide Zellen nur auf einen geringeren Pool an funktionellen V(D)J-Kombinationen zurückgreifen können, welche gegen stark konservierte Epitope gerichtet sind [261]. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bestätigen diese Vermutung zum Teil. Es konnte gezeigt werden, dass die Makrophagen im Vergleich zu den B-Zellen kaum eine Einschränkung in der Expression der einzelnen Ketten besitzen, jedoch nicht alle V(D)J-Kombinationen exprimiert werden und die geringere Diversität ihren Ursprung somit in der eingeschränkten Rekombination der verschiedenen Segmente findet. Die geringere Menge an CD14-positiven Zellen im Tumor konnte als Ursache jedoch ausgeschlossen werden.

Zusätzlich zur Einschränkung des Makrophagen-Repertoires im Vergleich zu den korrespondierenden B-Zellen zeigt sich auch eine deutliche Einschränkung der Repertoires der Tumor-Makrophagen verglichen mit den zirkulierenden Monozyten des gleichen Patienten bzw. gesunden Kontrollen. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch in einer Studie gezeigt werden, die die Repertoires von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten mit denen im Blut verglichen hat [262, 263]. Hierbei zeigte sich eine klonale Restriktion des Repertoires durch eine oligoklonale Expansion der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, welche eine Adaption an das Mikroumfeld des Tumors oder eine Modifikation desselben vermuten lässt. So konnte in diesem Zusammenhang ebenfalls bereits gezeigt werden, dass die Tumor-infiltrierenden Lymphozyten eine Antigen-induzierte Aktivierung durchliefen und so zu einer zytotoxischen anti-Tumor-Reaktion führen können [263]. Gleichzeitig steht die Vermutung im Raum, dass eine Tumor-spezifische Selektion der Tumor-assoziierten Makrophagen zur Limitation der Immunglobulin-Diversität und so zu einer spezifischen Immunglobulin-Expression führt. Auf diesem Weg hätte der Tumor die Möglichkeit den zuvor beschriebenen anti-Tumor-Reaktionen entgegenzuwirken.

Genauere Untersuchungen der Makrophagen-Repertoires zeigten, dass die exprimierten Immunglobulin-CDR3s intra-individuelle Overlaps zwischen dem Blut- und Tumor-Kompartiment, sowie inter-individuelle Overlaps zwischen den Repertoires der verschiedenen untersuchten Patienten aufweisen. Die Überschneidungen zwischen den CDR3s der Blutmonozyten und Tumormakrophagen wurden in etwa der Hälfte der Studienpatienten gefunden. Diese Tatsache führt zur Hypothese, dass die Monozyten aus der Peripherie in das Tumorgewebe migrieren und dort *in situ* selektioniert werden, um anschließend weiter zu proliferieren. Diese klonale Expansion der Tumormakrophagen basiert auf dem sogenannten Homing-Phänomen, bei dem Zellen aufgrund spezifischer Chemoattraktoren in das Zielgewebe einwandern [264]. Bei den zirkulierenden Monozyten sorgen die Chemoattraktoren MCP-1 oder IL-8 für die Anziehung der Zellen und deren Einwanderung ins Gewebe. Diese Einwanderung der Monozyten ins Tumorgewebe wie auch die dortige klonale Expansion sind bisher noch nicht nachweisbar, sondern lediglich eine naheliegende Hypothese. Die NGS-Analyse der beiden Verlaufspatienten stärkt diese Vermutung jedoch, da auch bei einer deutlich größeren Anzahl untersuchter Sequenzen die gleiche Verteilung der CDR3-Regionen in den zirkulierenden Monozyten und den Tumor-assoziierten Makrophagen gefunden wurde. Da diese Untersuchung mithilfe der RACE-PCR durchgeführt wurde, ist es ausgeschlossen, dass diese Ähnlichkeiten auf einem Bias der PCR basieren und somit sichergestellt, dass sie die real vorliegende Verteilung der CDR3-Regionen darstellen. Die Existenz von sogenannten „public clones“, also allgemein vorkommenden Sequenzen, wurde auch bereits in kolorektalen Karzinomen und Adenomen gezeigt [265]. Besonders interessant sind diese Overlaps, da sie in Zukunft mögliche Biomarker oder therapeutische Targets darstellen könnten. Hierfür ist jedoch eine größere systematische Studie notwendig, um die genauen Eigenschaften und die Ursache der Overlaps zwischen den zirkulierenden Monozyten und Tumor-assoziierten Makrophagen zu untersuchen.

Die CDR3-Regionen der untersuchten Makrophagen und B-Zellen wurden mit ihren zugrundeliegenden V(D)J-Kombinationen verglichen. Hierbei zeigte sich, dass in beiden untersuchten Zellpopulationen unterschiedliche V(D)J-Kombinationen für gleiche CDR3-Regionen kodieren können. Dieses Phänomen des „convergent recombination“ war bisher nur für B-Zellen beschrieben und konnte in der vorliegenden Studie nun auch in Makrophagen und Monozyten nachgewiesen werden, was erneut für einen sehr ähnlichen Mechanismus der Rekombination in beiden Zelltypen spricht [235].

## 7. Mutationen

Einen wichtigen Beitrag zur Diversität der Immunglobulin-Repertoires – unabhängig aus welchem Zelltyp sie stammen – bringen die Mutationen innerhalb der Immunglobulin-Ketten. Die somatische Hypermutation ist gemeinsam mit dem Klassenwechsel eines der wichtigsten Werkzeuge zur Anpassung der Feinspezifität der exprimierten Immunglobuline. Basierend auf den gefundenen Unterschieden in der Diversität zwischen Makrophagen und B-Zellen stellt sich die Frage, wie es sich mit den Mutationen bei den Immunglobulinen der Makrophagen verhält.

Grundsätzlich ist bekannt, dass bei B-Zellen signifikant mehr Mutationen in Immunglobulinen vom Typ IgG als denen von IgM zu finden sind [266, 267]. Dies konnte auch in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden (Abbildung 32). Der gleiche signifikante Unterschied in der Mutationsfrequenz von IgG und IgM konnte auch in den untersuchten Immunglobulinen der Makrophagen festgestellt werden. Betrachtet man diesen Fakt getrennt für die beiden Kompartimente Blut und Tumor, so ist der Unterschied bei den B-Zellen in beiden Kompartimenten signifikant ( $p < 0,01$ ), bei den Makrophagen jedoch nur im Tumor ( $p < 0,05$ ) und nicht im Blut. In einer zweiten Analyse wurden die erhaltenen Mutationsfrequenzen in vier Cluster eingeteilt und auch hierbei blieben die Unterschiede zwischen IgM und IgG in allen untersuchten Zellpopulationen erhalten. In der geclusterten Auswertung ist ebenfalls erneut die höhere Mutationsfrequenz im Tumor, verglichen mit dem Blut zu erkennen. Dies gilt neuerlich sowohl für die untersuchten Makrophagen als auch deren korrespondierende B-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die Reifung in den Makrophagen weniger stark ausgeprägt ist als es bei den B-Zellen der Fall ist.

Auf der Suche nach der Ursache für die beschriebenen Unterschiede zwischen den Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen und B-Zellen brachte die reine Anzahl an Mutationen keine Erklärung. Daher wurden in einem weiteren Schritt auch deren Lokalisation innerhalb der Ketten untersucht.

Um die Lokalisation der Mutationen genauer untersuchen zu können, wurden die jeweils häufigsten V-Ketten der Leicht- und Schwereketten aus Tumor und Blut miteinander verglichen. Bei den Schwereketten aus dem Tumor zeigte sich hierbei kaum ein Unterschied zwischen den Immunglobulinen der Makrophagen und denen der B-Zellen, die eine sehr ähnliche Verteilung aufwiesen. Im Blut hingegen waren bei den Schwereketten deutliche Unterschiede zwischen den Immunglobulinen der beiden Zelltypen zu erkennen. In der FR1 waren bei den B-Zellen keine Mutationen zu finden, während dort prozentual die meisten Mutationen der Makrophagen stattfanden. In CDR1 und FR2 wurden hingegen nur



Mutationen in B-Zellen gefunden. Die größte Zahl der Mutationen in B-Zell-Immunglobulinen befinden sich in FR3, wo jedoch nur wenige Mutationen in den Makrophagen-Immunglobulinen stattfanden. Bei den Leichtketten verhielt es sich konträr zu den Schwereketten. Hier zeigten sich im Tumor mehr Unterschiede zwischen den Zellpopulationen als im Blut. So waren bei den B-Zellen in der FR2 und der CDR2 keine Mutationen zu finden, während die meisten Mutationen der Immunglobuline aus den Makrophagen in FR2 zu finden waren. Bei den Leichtketten im Blut sind in beiden Zellpopulationen in allen Regionen Mutationen zu finden. In FR1 überwiegen jedoch die Mutationen der Makrophagen, bei FR2 verhält es sich genau umgekehrt mit mehr Mutationen in den Immunglobulinen der B-Zellen. Beim Vergleich der Lokalisation der Mutationen innerhalb der Kette zwischen den beiden Zelltypen zeigten sich zwar Unterschiede, jedoch waren diese nicht signifikant und zeigten keine eindeutigen Tendenzen in eine bestimmte Richtung. Sie kann somit auch als Ursache für die eingeschränkte Diversität der Makrophagen-Immunglobuline ausgeschlossen werden.

Ein weiterer hypothetischer Erklärungsansatz bei der Suche nach der Ursache der unterschiedlichen Diversität war die Verteilung der gefundenen Mutation auf dem Locus. Hierfür wurde die Anzahl der Mutationen gegen die Lokalisation der jeweiligen Kette auf Chromosom 14 aufgetragen wie dies auch für die Nutzung der einzelnen Ketten durchgeführt worden war. Dies führte zu einer ähnlichen Verteilung wie bei der generellen Nutzung der Ketten. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Lokalisation der Ketten auf dem Locus keinen Einfluss auf die Ausbildung von Mutationen in den einzelnen Zelltypen hat.

Vergleicht man nun die Mutationsfrequenzen der einzelnen Makrophagen-Immunglobuline aus Blut und Tumor, so zeigt sich, dass gleiche Ketten stets gleiche Mutationsfrequenzen aufweisen, unabhängig davon, wo sie exprimiert und sezerniert wurden. Dies ist spezifisch für die Zellpopulation der Monozyten, da bei B-Zellen deutliche Unterschiede zwischen den Mutationsfrequenzen zwischen Blut und Tumor zu erkennen sind, jedoch ohne Tendenz zu einer höheren Frequenz in einem der beiden Kompartimente. Dieser Aspekt der gleichen Mutationsfrequenzen bei Makrophagen und Monozyten spricht erneut für die Hypothese, dass beide Zellpopulationen den gleichen Ursprung haben, heißt, dass zirkulierende Monozyten in das Tumorgewebe einwandern und dort proliferieren. Dies kann anhand der aktuellen Datenlage jedoch nicht nachgewiesen werden und muss in zukünftigen Experimenten genauer untersucht werden.

## 8. Korrelation zwischen Repertoire und Tumolvolumen

Eine Haupterkennnis dieser Arbeit ist die inverse Korrelation zwischen der Variabilität des Makrophagen-Repertoires und der individuellen Tumorgöße der Glioblastom-Patienten. Je größer der Tumor war, desto weniger verschiedene  $V_H$ -Ketten und CDR3-Regionen wurden sequenziert. Im Gegensatz zur bereits bekannten generellen Einschränkung der Diversität der Immunglobulin-Repertoires aus Nicht-Lymphozyten im Vergleich zu B-Zellen, ist dieser Fakt bisher nicht anderweitig publiziert worden.

Die inverse Korrelation zwischen der Immunglobulin-Diversität und dem Tumolvolumen wurde für die Schwer- als auch die Leichtketten im Tumor und im Blut gefunden. Für die Leichtketten konnte auch eine statistische Signifikanz mit  $p=0,029$  und  $p=0,014$  nachgewiesen werden. Im Falle der Schwereketten wurde das Signifikanzlevel von 0,05 nur knapp verfehlt. In beiden Fällen lag  $p$  bei 0,051. Die Diversität ist Ausdruck der Zahl der beteiligten Rekombinationsevents/-elemente sowie der Rate der somatischen Hypermutationen. Die Unterschiede benötigen daher wahrscheinlich größere Datensätze, um auch für die komplexeren Schwereketten signifikant zu werden. Demgegenüber sind für die einfacheren Leichtketten schneller signifikante Differenzen zu erreichen. Die inverse Korrelation ist eine spezifische Charakteristik der myeloiden Zellen, da die Immunglobulin-Repertoires der B-Zellen vollkommen unabhängig von der Tumorgöße sind, was darauf hindeutet, dass Makrophagen und B-Zellen bezüglich ihrer spezifischen Immunglobulin-Produkte unterschiedliche Funktionen im Tumor haben könnten. Die Immunglobulin-Repertoires der B-Zellen wurden in bisherigen Publikationen auch nur mit der Prognose der Patienten, jedoch nicht mit dem Tumolvolumen in Verbindung gebracht. So konnte gezeigt werden, dass eine hohe Klonalität der gefundenen Immunglobuline, eine Dominanz des IgG1-Isotypen sowie eine hohe Rate an Hypermutationen mit einer positiven Prognose korrelieren [268].

Da die Anzahl der CD14+ Zellen im Tumor und Blut der Glioblastom-Patienten mit dem Tumolvolumen korreliert, ist die inverse Korrelation der Immunglobulin-Vielfalt ein wirklich qualitativer und kein quantitativer Effekt, der auf einer sinkenden Zellzahl beruht. Basierend auf der inversen Korrelation zwischen Tumorgöße und Diversität des Immunglobulin-Repertoires stellt sich die Frage, nach den Ursachen des reduzierten Repertoires in größeren Tumoren. Bricht die Variabilität der exprimierten Immunglobuline bei wachsendem Tumor ein oder ermöglicht ein geringes Antikörper-Repertoire der Makrophagen ein stärkeres Tumorstadium? Diese Frage kann jedoch rein aufgrund der in Abbildung 40 gezeigten Daten aktuell nicht beantwortet werden, wodurch auch die biologische Relevanz dieses Ergebnisses derzeit nicht zu bewerten ist. Hierzu bedarf es

systematischer Untersuchungen in einem geeigneten experimentellen Tiermodell, das genauere Untersuchungen während der Tumorentstehung und der Tumorprogression ermöglicht.

## 9. Veränderungen nach der Tumorresektion

Das deutlich eingeschränkte Immunglobulin-Repertoire der Makrophagen im Vergleich zu dem der korrespondierenden B-Zellen beruht vermutlich auf der immunsuppressiven Wirkung des Tumors. Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurde die Diversität der Repertoires bei zwei Patienten auch im Verlauf nach der Tumorresektion untersucht. Hierbei handelte es sich um einen Patienten, der zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung bereits an einem ersten Rezidiv litt, und einen, der bei der letzten Untersuchung noch tumorfrei war und sein Rezidiv erst etwa drei Monate danach entwickelte. Im Verlauf nach der Tumorresektion wurden unter anderem das Repertoire der V<sub>H</sub>-Ketten und CDR3-Regionen, die Immunkompetenz der Patienten gemessen an der HLA-DR-Expression und die Expressionslevel diverser Zytokine im Serum untersucht [269].

Im Falle des Patienten mit Rezidiv zum Ende des Untersuchungszeitraums zeigte sich ein weiterer Rückgang der Repertoire-Diversität im Zeitverlauf, welcher sowohl bei den V<sub>H</sub>-Ketten als auch den CDR3s zu erkennen war. Die häufigsten fünf V<sub>H</sub>-Ketten, die zum Zeitpunkt der OP im Blut zu finden waren, stimmen nicht mehr mit denen überein, die zu den beiden folgenden Zeitpunkten nach wenigen Tagen und fünf Monaten gefunden wurden. Im Zeitverlauf waren untereinander ähnlichere Sequenzen zu finden.

Entgegengesetzt verhielt es sich beim zweiten Studienpatienten ohne Rezidiv. Sein Immunglobulin-Repertoire der Makrophagen lag zum Zeitpunkt der Tumorresektion und wenige Tage danach etwa auf dem gleichen Level. Um dies unabhängig von der jeweiligen Sequenzzahl darstellen zu können, wurde hierfür der Shannon-Diversity-Index berechnet. Zum letzten untersuchten Zeitpunkt vier Monate nach der Entfernung des Tumors, zeigte sich ein deutlicher Anstieg in der Diversität der Makrophagen-Immunglobuline. Trotz des deutlichen Anstiegs der Variabilität lag diese immer noch unter der der korrespondierenden B-Zellen. Diese Schwankungen sind auch ausschließlich bei den Immunglobulinen der Makrophagen zu erkennen. Die Repertoires der B-Zellen sind auf einem durchgehend hohen Niveau, welches auch über dem der B-Zellen des anderen Verlaufspatienten mit Rezidiv liegt. Auch in Bezug auf die gefundenen V<sub>H</sub>-Ketten und CDR3-Regionen sind Unterschiede zum anderen untersuchten Patienten zu erkennen. Sowohl im Tumor als auch im Blut zum OP-Zeitpunkt und drei Tage danach ist jeweils die gleiche V<sub>H</sub>-Kette und CDR3-Region am häufigsten zu finden. Nach vier Monaten wurden diese V<sub>H</sub>-Kette bzw. CDR3-

Region nicht mehr als eine der jeweils häufigsten sequenziert. All diese Aspekte der Repertoire-Veränderung nach der Tumorresektion sprechen dafür, dass der Tumor immunsuppressiv wirkt und so zur geringeren Diversität der Makrophagen-Repertoires führt.

Um sicher zu gehen, dass jegliche hier verglichenen Unterschiede im Shannon-Diversity-Index der verschiedenen Zellpopulationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten auch wirklich auf der Wirkung des Tumors basieren und keine natürlichen Schwankungen des Immunsystems darstellen, wurde eine gesunde Kontrolle an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Hierbei wurde kein Unterschied zwischen den jeweiligen Repertoires der Makrophagen und B-Zellen festgestellt, was die Hypothese der immunsuppressiven Wirkung des Tumors weiter untermauert.

Da die Expression von HLA-DR bei Sepsis-Patienten ein Marker für die Immunkompetenz ist, wurde sie bei den Glioblastom-Patienten durch rtPCR untersucht. Es zeigten sich für alle untersuchten Proben der Patienten und der gesunden Kontrollen eindeutige Banden sowohl für die GAPDH-Kontrolle als auch das zu untersuchende HLA-DR. Die Wahrscheinlichkeit eines Glioblastom-Rezidivs ist somit nicht von einer fehlenden oder vorhandenen HLA-DR-Expression abhängig. Um eine genaue Aussage über die Expressionsstärke des Markers treffen zu können, ist eine quantitative PCR nötig. Anhand dieser Ergebnisse kann zukünftig überprüft werden, ob die HLA-DR-Konzentration in Blut der Patienten und somit deren Immunkompetenz in Zusammenhang mit dem Entstehen eines Rezidives steht.

Ein Blick auf die Zytokin-Level im Serum der Patienten und gesunden Kontrollen zeigte, dass drei Zytokine mit tumorfördernden Eigenschaften in den Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen deutlich erhöht waren. Hierbei handelte es sich um MCP-1, das die Infiltration des Tumorgewebes durch Makrophagen fördert, sCD40L, welches die Immunsuppression durch den Tumor induziert, und MDC mit seiner Eigenschaft die Proliferation von Makrophagen im Gewebe anzuregen. Im Anschluss an die Tumorresektion waren vier weitere Zytokine im Zeitverlauf auffällig. EGF, dessen Expressionslevel mit progressiverem Tumorwachstum korreliert, TNF- $\alpha$ , das zur Entstehung und dem Wachstum vom Tumoren beiträgt, VEGF, das eine Schlüsselrolle in der Tumorangiogenese spielt, und IL-8, welches eine kritische Rolle im Tumorwachstum sowie in der Proliferation von Tumorzellen spielt, sind im Serum des Patienten mit Rezidiv beim letzten untersuchten Zeitpunkt in deutlich höheren Konzentrationen zu finden als beim Vergleichspatienten ohne Rezidiv. Diese Zytokine sind bereits für die Bildung von Rezidiven und ihre tumorfördernde Wirkung in anderen Krebserkrankungen bekannt. So steht EGF

beispielsweise im Zusammenhang mit Rezidiven beim Prostatakarzinom [270, 271] und TNF- $\alpha$  beim Mammakarzinom [272]. Für VEGF konnte bereits der Zusammenhang einer erhöhten Zytokinkonzentration mit dem Auftreten von Rezidiven bei Nicht-kleinzelligem Lungenkrebs und Blasenkrebs gezeigt werden [273, 274].

Auch im Zusammenhang mit Glioblastomen sind die in der vorliegenden Studie auffälligen Zytokine nicht unbekannt. So ist bereits bekannt, dass EGF zu Glioblastom-Metastasen führen kann [275]. Auch im Zellkulturmodell zeigten sich bei Glioblastom-Zelllinien signifikant höhere EGF-Werte in den Zellkulturüberständen als bei den Kontroll-Zelllinien [276]. Eine Studie von Albulescu et al. aus dem Jahr 2013 zeigte, dass TNF- $\alpha$  im Serum von Glioblastom-Patienten mit einer mehr als 3-fachen Konzentration signifikant erhöht ist und stark mit der Erkrankung korreliert. Des Weiteren wurde eine etwa doppelt so hohe IL-8-Konzentration im Serum von Glioblastom-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen [277]. Somit decken sich die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit der bisherigen Literatur.

Die Erkenntnisse der Zytokin-Untersuchungen sprechen für die bisherige Hypothese des starken Einflusses des Tumorgewebes auf das Mikromilieu des Tumorbetts und die Rekrutierung von Zellen des innatens Immunsystems, die Immunkompetenz und somit die Immunglobulin-Expression der Tumormakrophagen und zirkulierenden Monozyten, wenngleich die untersuchten Zytokine allgemeine Faktoren der Chemotaxis und Angiogenese sind. Die nachgewiesene Rekrutierung der Immunglobulin-positiven Zellen ist somit eventuell nur ein Epiphänomen, was anhand der vorhandenen Möglichkeiten nicht weiter untersucht werden konnte.

## 10. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass die Tumor-assoziierten Makrophagen und peripheren Monozyten von Glioblastom-Patienten entgegen der alten Paradigmen Immunglobuline exprimieren können. Diese Immunglobuline weisen im Vergleich zu den entsprechenden B-Zellen ein eingeschränktes Repertoire auf, dessen Diversität invers mit dem jeweiligen Tumolvolumen korreliert. Des Weiteren zeigte sich im Zeitverlauf nach der Tumorresektion ein deutlicher Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv zum letzten eingeschlossenen Untersuchungszeitpunkt. Somit steht das Immunglobulin-Repertoire der Makrophagen in direktem Zusammenhang mit der Tumorerkrankung des Patienten. Dies wird es in Zukunft nach weiteren Untersuchungen und Charakterisierungen im besten Fall möglich machen, die Repertoire-Diversität der Makrophagen als diagnostischen Marker im Krankheitsverlauf nach der primären

Tumorresektion einzusetzen. Wenn durch zukünftige Analysen die genaue Funktion der Makrophagen-Immunglobuline geklärt werden kann, wäre somit auch ein Einsatz in der Therapie von Glioblastom-Patienten denkbar.

Für die genauere Charakterisierung der Immunglobuline und deren Funktion ist es erforderlich, in Zukunft weitere Immunparameter im Verlauf nach der Entfernung des Primärtumors zu beobachten. Um Aussagen über die funktionelle Bedeutung der nicht-lymphoiden Antikörper und ihre Rolle in der Tumorentstehung treffen zu können, bedarf es eines Mausmodells, welches den selektiven Knock-Out dieser innate Teilfunktion ermöglicht und seine Konsequenzen auf Tumorwachstum und Immunfunktionen untersucht.

Die für die Antigenpezifität erforderliche Kopplung von Leicht- und Schwereketten setzt für eine funktionelle Untersuchung Makrophagen-assoziiierter Immunglobuline den Einsatz von Single-Cell-Techniken voraus. Nur so ist eine rekombinante Herstellung von Immunglobulinen aus Monozyten und Makrophagen möglich, um die spezifischen Antigene zu identifizieren und weiteren Aufschluss über deren Funktion zu geben. Gegebenenfalls ergibt sich aus der Identifikation dieser Antigene ein Hinweis auf die Natur des eingeschränkten Makrophagen-Repertoires.

Zusätzlich bleibt zu klären, in welchem Verwandtschaftsverhältnis die untersuchten Tumor-assoziierten Makrophagen und die aktuell sehr intensiv untersuchten myeloiden Suppressorzellen (MDSC) stehen, da diese besonders gehäuft bei Glioblastom-Patienten nachgewiesen werden konnten und laut ersten eigenen PCR-Analysen ebenfalls in der Lage sind Immunglobuline zu exprimieren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in den vorliegenden Ergebnissen ein großes Potenzial für die Diagnostik sowie die Behandlung von Glioblastom-Patienten liegt.

## Quellen

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. 2008: Garland Press.
2. Millet, A.C. and J.J. Ewbank, *Immunity in Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(1): p. 4-9.
3. Kim, D.H. and F.M. Ausubel, *Evolutionary perspectives on innate immunity from the study of Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(1): p. 4-10.
4. Dangl, J.L. and J.D. Jones, *Plant pathogens and integrated defence responses to infection*. *Nature*, 2001. **411**(6839): p. 826-33.
5. Cohn, J., G. Sessa, and G.B. Martin, *Innate immunity in plants*. *Curr Opin Immunol*, 2001. **13**(1): p. 55-62.
6. Murphy, K.M.T., P.; Walport, M., *Janeway Immunologie*. 7 ed. 2009: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
7. Metcalf, D., *Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro*. *J Cell Physiol*, 1971. **77**(2): p. 277-80.
8. van Furth, R. and M.M. Diesselhoff-Den Dulk, *The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow*. *J Exp Med*, 1970. **132**(4): p. 813-28.
9. Whitelaw, D.M., *The intravascular lifespan of monocytes*. *Blood*, 1966. **28**(3): p. 455-64.
10. Dustin, M.L., et al., *Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)*. *The Journal of Immunology*, 1986. **137**(1): p. 245.
11. Jenkins, S.J., et al., *Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation*. *Science*, 2011. **332**(6035): p. 1284-8.
12. Hashimoto, D., et al., *Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes*. *Immunity*, 2013. **38**(4): p. 792-804.
13. Chávez-Galán, L., et al., *Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages*. *Frontiers in Immunology*, 2015. **6**: p. 263.
14. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 197-216.
15. Metchnikoff, E., *Immunity in infective diseases*. University Press, 1905.
16. Burke, B.L., C.E., *The Macrophage*. 2 ed. 2002: Oxford University Press.
17. Vieira, O.V., R.J. Botelho, and S. Grinstein, *Phagosome maturation: aging gracefully*. *Biochem J*, 2002. **366**(Pt 3): p. 689-704.
18. Fadeel, B. and V.E. Kagan, *Apoptosis and macrophage clearance of neutrophils: regulation by reactive oxygen species*. *Redox Report*, 2003. **8**(3): p. 143-150.
19. Ramachandra, L., D. Simmons, and C.V. Harding, *MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes*. *Curr Opin Immunol*, 2009. **21**(1): p. 98-104.
20. Adams, D.O. and T.A. Hamilton, *The cell biology of macrophage activation*. *Annu Rev Immunol*, 1984. **2**: p. 283-318.
21. Pollard, J.W., *Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(1): p. 71-8.
22. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 453-61.
23. Verreck, F.A., et al., *Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(13): p. 4560-5.
24. Bonnotte, B., et al., *Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system*. *J Immunol*, 2001. **167**(9): p. 5077-83.

25. Mytar, B., et al., *Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumour cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity*. British Journal Of Cancer, 1999. **79**: p. 737.
26. Stuehr, D.J. and C.F. Nathan, *Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells*. J Exp Med, 1989. **169**(5): p. 1543-55.
27. Urban, J.L., et al., *Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(14): p. 5233-7.
28. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(12): p. 6166.
29. Taylor, P.R., et al., *MACROPHAGE RECEPTORS AND IMMUNE RECOGNITION*. Annual Review of Immunology, 2005. **23**(1): p. 901-944.
30. de Visser, K.E., A. Eichten, and L.M. Coussens, *Paradoxical roles of the immune system during cancer development*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 24-37.
31. Goerdts, S. and C.E. Orfanos, *Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells*. Immunity, 1999. **10**(2): p. 137-42.
32. Gough, M.J., et al., *Macrophages Orchestrate the Immune Response to Tumor Cell Death*. Cancer Research, 2001. **61**(19): p. 7240.
33. Gratchev, A., et al., *Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 473-486.
34. Brys, L., et al., *Reactive oxygen species and 12/15-lipoxygenase contribute to the antiproliferative capacity of alternatively activated myeloid cells elicited during helminth infection*. J Immunol, 2005. **174**(10): p. 6095-104.
35. Loke, P., et al., *Alternatively activated macrophages induced by nematode infection inhibit proliferation via cell-to-cell contact*. Eur J Immunol, 2000. **30**(9): p. 2669-78.
36. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
37. Guiducci, C., et al., *Redirecting &em>In vivo&em> Elicited Tumor Infiltrating Macrophages and Dendritic Cells towards Tumor Rejection*. Cancer Research, 2005. **65**(8): p. 3437.
38. Rodriguez, P.C., et al., *Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5839-49.
39. Sica, A., et al., *Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 762-7.
40. Toomey, D., et al., *Phenotyping of immune cell infiltrates in breast and colorectal tumours*. Immunol Invest, 1999. **28**(1): p. 29-41.
41. Chang, C.-I., J.C. Liao, and L. Kuo, *Macrophage Arginase Promotes Tumor Cell Growth and Suppresses Nitric Oxide-mediated Tumor Cytotoxicity*. Cancer Research, 2001. **61**(3): p. 1100.
42. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
43. Lewis, C.E. and J.W. Pollard, *Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments*. Cancer Research, 2006. **66**(2): p. 605.
44. Kodolija, V., et al., *Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages*. Immunobiology, 1997. **197**(5): p. 478-493.
45. Mantovani, A., et al., *Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion*. Cancer and Metastasis Reviews, 2006. **25**(3): p. 315-322.
46. Hagemann, T., et al., *Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases*. Carcinogenesis, 2004. **25**(8): p. 1543-9.



47. van der Bij, G.J., et al., *The role of macrophages in tumor development*. Cell Oncol, 2005. **27**(4): p. 203-13.
48. Tanaka, Y., et al., *Thymidine phosphorylase expression in tumor-infiltrating macrophages may be correlated with poor prognosis in uterine endometrial cancer*. Hum Pathol, 2002. **33**(11): p. 1105-13.
49. Porta, C., A. Sica, and E. Riboldi, *Tumor-associated myeloid cells: new understandings on their metabolic regulation and their influence in cancer immunotherapy*. Febs j, 2018. **285**(4): p. 717-733.
50. Noy, R. and J.W. Pollard, *Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 49-61.
51. Bingle, L., N.J. Brown, and C.E. Lewis, *The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies*. J Pathol, 2002. **196**(3): p. 254-65.
52. Hanada, T., et al., *Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer*. Int J Urol, 2000. **7**(7): p. 263-9.
53. Helm, O., et al., *Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis*. Int J Cancer, 2014. **135**(4): p. 843-61.
54. Biswas, S.K., A. Sica, and C.E. Lewis, *Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2011-7.
55. Chavez-Galan, L., et al., *Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169(+) and TCR(+) Macrophages*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 263.
56. Leek, R.D., et al., *Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast*. British Journal of Cancer, 1999. **79**(5-6): p. 991-995.
57. Burton, J.L., et al., *Macrophages accumulate in avascular, hypoxic areas of prostate tumours: implications for targeted therapeutic gene delivery to such sites*. Journal of Pathology, 2000. **192**: p. 8A-8A.
58. Schoppmann, S.F., et al., *Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis*. Am J Pathol, 2002. **161**(3): p. 947-56.
59. Leek, R.D., et al., *Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma*. Cancer Res, 1996. **56**(20): p. 4625-9.
60. Oosterling, S.J., et al., *Macrophages direct tumour histology and clinical outcome in a colon cancer model*. J Pathol, 2005. **207**(2): p. 147-55.
61. Elgert, K.D., D.G. Alleva, and D.W. Mullins, *Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(3): p. 275-90.
62. Ben-Baruch, A., *Inflammation-associated immune suppression in cancer: the roles played by cytokines, chemokines and additional mediators*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(1): p. 38-52.
63. Trinchieri, G. and F. Gerosa, *Immunoregulation by interleukin-12*. J Leukoc Biol, 1996. **59**(4): p. 505-11.
64. Mitsuhashi, M., et al., *Regulation of interleukin-12 gene expression and its anti-tumor activities by prostaglandin E(2) derived from mammary carcinomas*. Journal of leukocyte biology, 2004. **76**(2): p. 322-332.
65. Ahmad-Zadeh, C., J.D. Piguet, and L. Colli, *Molecular weight estimation of immunoglobulin subunits on polyacrylamide gel*. Immunology, 1971. **21**(6): p. 1065-1071.
66. Amzel, L.M. and R.J. Poljak, *Three-dimensional structure of immunoglobulins*. Annu Rev Biochem, 1979. **48**: p. 961-97.
67. D R Davies, a. E A Padlan, and D.M. Segal, *Three-Dimensional Structure of Immunoglobulins*. Annual Review of Biochemistry, 1975. **44**(1): p. 639-667.
68. Lefranc, M.P., *IMGT, the international ImMunoGeneTics database*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(1): p. 307-10.

69. Reth, M., *Antigen receptors on B lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 97-121.
70. Kurosaki, T., *Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 555-92.
71. van de Winkel, J.G. and C.L. Anderson, *Biology of human immunoglobulin G Fc receptors*. J Leukoc Biol, 1991. **49**(5): p. 511-24.
72. Daëron, M., *Fc RECEPTOR BIOLOGY*. Annual Review of Immunology, 1997. **15**(1): p. 203-234.
73. Unkeless, J.C., E. Scigliano, and V.H. Freedman, *Structure and function of human and murine receptors for IgG*. Annu Rev Immunol, 1988. **6**: p. 251-81.
74. Raghavan, M. and P.J. Bjorkman, *Fc receptors and their interactions with immunoglobulins*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 181-220.
75. Lefranc, M.P., *Nomenclature of the human immunoglobulin heavy (IGH) genes*. Exp Clin Immunogenet, 2001. **18**(2): p. 100-16.
76. Lefranc, M.P., *Nomenclature of the human immunoglobulin kappa (IGK) genes*. Exp Clin Immunogenet, 2001. **18**(3): p. 161-74.
77. Lefranc, M.P., *Nomenclature of the human immunoglobulin lambda (IGL) genes*. Exp Clin Immunogenet, 2001. **18**(4): p. 242-54.
78. Winter, E.R., A.; Krawinkel, U., *Members of novel VH gene families are found in VDJ regions of polyclonally activated B-lymphocytes*. The EMBO Journal, 1985. **4**(11): p. 2861-2867.
79. Brodeur, P.H.R., Roy, *The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) locus in the mouse. I. One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes*. European Journal of Immunology, 1984. **14**(10): p. 922-930.
80. Korsmeyer, S.J., et al., *Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(11): p. 7096-100.
81. McBlane, J.F., et al., *Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps*. Cell, 1995. **83**(3): p. 387-95.
82. van Gent, D.C., et al., *Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system*. Cell, 1995. **81**(6): p. 925-34.
83. Leu, T.M. and D.G. Schatz, *rag-1 and rag-2 are components of a high-molecular-weight complex, and association of rag-2 with this complex is rag-1 dependent*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(10): p. 5657-70.
84. Spanopoulou, E., et al., *Localization, interaction, and RNA binding properties of the V(D)J recombination-activating proteins RAG1 and RAG2*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 715-26.
85. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
86. Shinkai, Y., et al., *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement*. Cell, 1992. **68**(5): p. 855-67.
87. Gellert, M., *Recent Advances in Understanding V(D)J Recombination*, in *Advances in Immunology*, F.J. Dixon, Editor. 1997, Academic Press. p. 39-64.
88. Tonegawa, S., *Somatic generation of antibody diversity*. Nature, 1983. **302**: p. 575.
89. Eastman, Q.M., T.M. Leu, and D.G. Schatz, *Initiation of V(D)J recombination in vitro obeying the 12/23 rule*. Nature, 1996. **380**(6569): p. 85-8.
90. Sawchuk, D.J., et al., *V(D)J Recombination: Modulation of RAG1 and RAG2 Cleavage Activity on 12/23 Substrates by Whole Cell Extract and DNA-bending Proteins*. The Journal of Experimental Medicine, 1997. **185**(11): p. 2025-2032.
91. Ma, Y., et al., *Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination*. Cell, 2002. **108**(6): p. 781-794.
92. Jacob, J., et al., *Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres*. Nature, 1991. **354**: p. 389.

93. Liu, Y.J., et al., *Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation*. *Immunity*, 1996. **4**(3): p. 241-50.
94. Di Noia, J.M. and M.S. Neuberger, *Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation*. *Annu Rev Biochem*, 2007. **76**: p. 1-22.
95. Neumann, J., *Immunobiologie*. 2008: Springer-Verlag.
96. Muramatsu, M., et al., *Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(26): p. 18470-6.
97. Petersen, S., et al., *AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching*. *Nature*, 2001. **414**(6864): p. 660-665.
98. Takara. *Tech Note: Rapid cloning of antibody variable regions using SMART technology*. 2018; Available from: <https://www.takarabio.com/learning-centers/cdna-synthesis/cloning-antibody-variable-regions#solns>.
99. Glick, B., *Normal Growth of the Bursa of Fabricius in Chickens*. Vol. 35. 1956. 843-851.
100. Mitchell, G.F. and J.F. Miller, *Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes*. *J Exp Med*, 1968. **128**(4): p. 821-37.
101. Hirano, M., et al., *The evolution of adaptive immunity in vertebrates*. *Adv Immunol*, 2011. **109**: p. 125-57.
102. Wood, G.W., et al., *Association between immunoglobulin and macrophages in primary methylcholanthrene-induced sarcomas*. *Cancer Res*, 1979. **39**(11): p. 4588-93.
103. Kaminski, W.E., A.W. Beham, and K. Puellmann, *Extralympocytic flexible immune recognition: a new angle on inflammation and aging*. *Aging Dis*, 2012. **3**(5): p. 404-13.
104. Kaminski, W.E., et al., *On the horizon: flexible immune recognition outside lymphocytes*. *Immunobiology*, 2013. **218**(3): p. 418-26.
105. Puellmann, K., A.W. Beham, and W.E. Kaminski, *Cytokine storm and an anti-CD28 monoclonal antibody*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(24): p. 2592-3; author reply 2593-4.
106. Puellmann, K., et al., *A variable immunoreceptor in a subpopulation of human neutrophils*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(39): p. 14441-6.
107. Fuchs, T., et al., *The neutrophil recombinatorial TCR-like immune receptor is expressed across the entire human life span but repertoire diversity declines in old age*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **419**(2): p. 309-15.
108. Fuchs, T., et al., *A second combinatorial immune receptor in monocytes/macrophages is based on the TCR $\gamma$ delta*. *Immunobiology*, 2013. **218**(7): p. 960-8.
109. Beham, A.W., et al., *A TNF-Regulated Recombinatorial Macrophage Immune Receptor Implicated in Granuloma Formation in Tuberculosis*. *PLOS Pathogens*, 2011. **7**(11): p. e1002375.
110. Legrand, F., et al., *A Functional  $\gamma\delta$ TCR/CD3 Complex Distinct from  $\gamma\delta$ T Cells Is Expressed by Human Eosinophils*. *PLOS ONE*, 2009. **4**(6): p. e5926.
111. Fuchs, T., et al., *An autoimmune double attack*. *Lancet*, 2012. **379**(9823): p. 1364.
112. Lakschevitz, F.S., G.M. Aboodi, and M. Glogauer, *Oral neutrophils display a site-specific phenotype characterized by expression of T-cell receptors*. *J Periodontol*, 2013. **84**(10): p. 1493-503.
113. Fuchs, T., et al., *The macrophage-TCR $\alpha$ beta is a cholesterol-responsive combinatorial immune receptor and implicated in atherosclerosis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015. **456**(1): p. 59-65.
114. Fuchs, T., et al., *A combinatorial  $\alpha$ beta T cell receptor expressed by macrophages in the tumor microenvironment*. *Immunobiology*, 2017. **222**(1): p. 39-44.
115. Huang, J., et al., *Rearrangement and expression of the immunoglobulin mu-chain gene in human myeloid cells*. *Cell Mol Immunol*, 2014. **11**(1): p. 94-104.

116. Wang, C., et al., *IGK with conserved IGKV/IGKJ repertoire is expressed in acute myeloid leukemia and promotes leukemic cell migration*. *Oncotarget*, 2015. **6**(36): p. 39062-39072.
117. Fuchs, T., Hahn, M., Ries, L., Giesler, S., Busch, S., Wang, C., Han, J., Schultze, T., Püllmann, K., Beham, A.W., Kaminski, W.E., Neumaier, M., *Expression of combinatorial immunoglobulins in macrophages in the tumor microenvironment*. 2018.
118. Qiu, X., et al., *Immunoglobulin gamma heavy chain gene with somatic hypermutation is frequently expressed in acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2013. **27**(1): p. 92-9.
119. Ha, K., et al., *Immunoglobulin gene rearrangement in acute myelogenous leukemia*. *Cancer Res*, 1984. **44**(10): p. 4658-60.
120. Qiu, X., et al., *Human epithelial cancers secrete immunoglobulin g with unidentified specificity to promote growth and survival of tumor cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(19): p. 6488-95.
121. Li, M., et al., *Expression of immunoglobulin kappa light chain constant region in abnormal human cervical epithelial cells*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**(11): p. 2250-7.
122. Zheng, H., et al., *Expression and secretion of immunoglobulin alpha heavy chain with diverse VDJ recombinations by human epithelial cancer cells*. *Mol Immunol*, 2007. **44**(9): p. 2221-7.
123. Zhu, X., et al., *Immunoglobulin mRNA and protein expression in human oral epithelial tumor cells*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2008. **16**(3): p. 232-8.
124. Zhu, X., et al., *Distinct regulatory mechanism of immunoglobulin gene transcription in epithelial cancer cells*. *Cell Mol Immunol*, 2010. **7**(4): p. 279-86.
125. Zheng, J., et al., *Immunoglobulin Gene Transcripts Have Distinct VHDJH Recombination Characteristics in Human Epithelial Cancer Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. **284**(20): p. 13610-13619.
126. Babbage, G., et al., *Immunoglobulin heavy chain locus events and expression of activation-induced cytidine deaminase in epithelial breast cancer cell lines*. *Cancer Res*, 2006. **66**(8): p. 3996-4000.
127. Chen, Z. and J. Gu, *Immunoglobulin G expression in carcinomas and cancer cell lines*. *The FASEB Journal*, 2007. **21**(11): p. 2931-2938.
128. Cohen, S., *Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal*. *J Biol Chem*, 1962. **237**: p. 1555-62.
129. Fisher, D.A., E.C. Salido, and L. Barajas, *Epidermal growth factor and the kidney*. *Annu Rev Physiol*, 1989. **51**: p. 67-80.
130. Mimura, Y., et al., *Epidermal growth factor affects the synthesis and degradation of type I collagen in cultured human dermal fibroblasts*. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 2006. **25**(4): p. 202-212.
131. Márquez, E.B., et al., *Epidermal growth factor receptor in corneal damage: update and new insights from recent reports*. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 2011. **30**(1): p. 7-14.
132. Hardwicke, J., et al., *Epidermal growth factor therapy and wound healing--past, present and future perspectives*. *Surgeon*, 2008. **6**(3): p. 172-7.
133. Tiaka, E.K., et al., *Epidermal growth factor in the treatment of diabetic foot ulcers: an update*. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther*, 2012. **24**(1): p. 37-44.
134. Arda-Pirincci, P. and S. Bolkent, *The role of epidermal growth factor in prevention of oxidative injury and apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats*. *Acta Histochem*, 2014. **116**(1): p. 167-75.
135. Lorita, J., M. Soley, and I. Ramirez, *Epidermal growth factor protects the heart against low-flow ischemia-induced injury*. *J Physiol Biochem*, 2010. **66**(1): p. 55-62.
136. Hussein, A.E.A.M.S., Ahmed A.; Sarhan, Mohammed E.; El-Menabawy, Fayza R.; Abd-Elmoneim, Hanaa A.; El-Nashar, Eman M.; Barakat, Nashwa M., *Effects of*

- combined erythropoietin and epidermal growth factor on renal ischaemia/reperfusion injury: a randomized experimental controlled study.* BJU International, 2011. **107**(2): p. 323-328.
137. Gomez, G.G., et al., *Therapeutic resistance in cancer: microRNA regulation of EGFR signaling networks.* Cancer Biol Med, 2013. **10**(4): p. 192-205.
  138. Galvez-Contreras, A.Y., A. Quiñones-Hinojosa, and O. Gonzalez-Perez, *The role of EGFR and ErbB family related proteins in the oligodendrocyte specification in germinal niches of the adult mammalian brain.* Frontiers in Cellular Neuroscience, 2013. **7**: p. 258.
  139. De Jong, K.P., et al., *Clinical relevance of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, p53, and Ki67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors.* Hepatology, 1998. **28**(4): p. 971-9.
  140. Lo, H.W. and M.C. Hung, *Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival.* Br J Cancer, 2006. **94**(2): p. 184-8.
  141. Bracher, A., et al., *Epidermal Growth Factor Facilitates Melanoma Lymph Node Metastasis by Influencing Tumor Lymphangiogenesis.* Vol. 133. 2012.
  142. Del Vecchio, C.A., G. Li, and A.J. Wong, *Targeting EGF receptor variant III: tumor-specific peptide vaccination for malignant gliomas.* Expert Rev Vaccines, 2012. **11**(2): p. 133-44.
  143. Zeng, F. and R.C. Harris, *Epidermal growth factor, from gene organization to bedside.* Semin Cell Dev Biol, 2014. **28**: p. 2-11.
  144. Roebuck, K.A., *Regulation of interleukin-8 gene expression.* J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(5): p. 429-38.
  145. Holmes, W.E., et al., *Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor.* Science, 1991. **253**(5025): p. 1278-80.
  146. Chuntharapai, A. and K.J. Kim, *Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor.* The Journal of Immunology, 1995. **155**(5): p. 2587.
  147. Li, A., M.L. Varney, and R.K. Singh, *Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials.* Clin Cancer Res, 2001. **7**(10): p. 3298-304.
  148. Kuai, W.-X., et al., *Interleukin-8 associates with adhesion, migration, invasion and chemosensitivity of human gastric cancer cells.* World Journal of Gastroenterology : WJG, 2012. **18**(9): p. 979-985.
  149. Li, M., et al., *Interleukin-8 increases vascular endothelial growth factor and neuropilin expression and stimulates ERK activation in human pancreatic cancer.* Cancer Sci, 2008. **99**(4): p. 733-7.
  150. Hoffmann, E., et al., *Multiple control of interleukin-8 gene expression.* J Leukoc Biol, 2002. **72**(5): p. 847-55.
  151. Sun, Q., et al., *Interleukin-8 promotes cell migration through integrin alphavbeta6 upregulation in colorectal cancer.* Cancer Lett, 2014. **354**(2): p. 245-53.
  152. Rot, A. and U.H. von Andrian, *Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells.* Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 891-928.
  153. Menten, P., A. Wuyts, and J. Van Damme, *Monocyte chemotactic protein-3. European cytokine network,* 2001. **12**(4): p. 554-560.
  154. Bottazzi, B.P.N.B., Andrea; Boraschi, Diana; Ghezzi, Pietro; Salmons, Mario; Mantovani, Alberto, *Chemotactic activity for mononuclear phagocytes of culture supernatants from murine and human tumor cells: Evidence for a role in the regulation of the macrophage content of neoplastic tissues.* International Journal of Cancer, 1983. **31**(1): p. 55-63.
  155. Graves, D.T., et al., *Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells.* Science, 1989. **245**(4925): p. 1490-3.

156. Mantovani, A., et al., *The origin and function of tumor-associated macrophages*. Immunol Today, 1992. **13**(7): p. 265-70.
157. Van Damme, J., et al., *Identification by sequence analysis of chemotactic factors for monocytes produced by normal and transformed cells stimulated with virus, double-stranded RNA or cytokine*. Eur J Immunol, 1989. **19**(12): p. 2367-73.
158. Okada, M., et al., *Tumor-associated macrophage/microglia infiltration in human gliomas is correlated with MCP-3, but not MCP-1*. Int J Oncol, 2009. **34**(6): p. 1621-7.
159. Platten, M., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas*. Ann Neurol, 2003. **54**(3): p. 388-92.
160. Takeshima, H., et al., *Expression and localization of messenger RNA and protein for monocyte chemoattractant protein-1 in human malignant glioma*. Journal of Neurosurgery, 1994. **80**(6): p. 1056-1062.
161. Desbaillets, I.T., Mitsuhiro; De Tribolet, Nicolas; Diserens, Annie-Claire; Hamou, Marie-France; Van Meir, Erwin G., *Human astrocytomas and glioblastomas express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in vivo and in vitro*. International Journal of Cancer, 1994. **58**(2): p. 240-247.
162. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
163. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis: past, present and the near future*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 505-15.
164. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
165. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 4-25.
166. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. Faseb j, 1999. **13**(1): p. 9-22.
167. Krauss, G., *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. WILEY-VCH Verlag, 2003. **3rd ed.**
168. Liang, X., et al., *VEGF Signal System: The Application of Antiangiogenesis*. Vol. 21. 2013.
169. Jenabian, M.A., et al., *Soluble CD40-ligand (sCD40L, sCD154) plays an immunosuppressive role via regulatory T cell expansion in HIV infection*. Clin Exp Immunol, 2014. **178**(1): p. 102-11.
170. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
171. Old, L.J., *Tumor necrosis factor (TNF)*. Science, 1985. **230**(4726): p. 630-2.
172. Bazzoni, F. and B. Beutler, *The tumor necrosis factor ligand and receptor families*. N Engl J Med, 1996. **334**(26): p. 1717-25.
173. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
174. Bemelmans, M.H., L.J. van Tits, and W.A. Buurman, *Tumor necrosis factor: function, release and clearance*. Crit Rev Immunol, 1996. **16**(1): p. 1-11.
175. Tartaglia, L.A. and D.V. Goeddel, *Two TNF receptors*. Immunol Today, 1992. **13**(5): p. 151-3.
176. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-56.
177. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
178. Lejeune, F.J., *Clinical use of TNF revisited: improving penetration of anti-cancer agents by increasing vascular permeability*. The Journal of Clinical Investigation, 2002. **110**(4): p. 433-435.
179. van Horssen, R., T.L.M. ten Hagen, and A.M.M. Eggermont, *TNF- $\alpha$  in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility*. The Oncologist, 2006. **11**(4): p. 397-408.

180. Manusama, E.R., et al., *Synergistic antitumour effect of recombinant human tumour necrosis factor  $\alpha$  with melphalan in isolated limb perfusion in the rat*. *BJS*, 1996. **83**(4): p. 551-555.
181. van der Veen, A.H., et al., *TNF- $\alpha$  augments intratumoural concentrations of doxorubicin in TNF- $\alpha$ -based isolated limb perfusion in rat sarcoma models and enhances anti-tumour effects*. *Br J Cancer*, 2000. **82**(4): p. 973-80.
182. de Wilt, J.H., et al., *Tumour necrosis factor  $\alpha$  increases melphalan concentration in tumour tissue after isolated limb perfusion*. *Br J Cancer*, 2000. **82**(5): p. 1000-3.
183. Balkwill, F., *TNF- $\alpha$  in promotion and progression of cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. **25**(3): p. 409-16.
184. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* *Lancet*, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
185. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
186. Balkwill, F., K.A. Charles, and A. Mantovani, *Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(3): p. 211-7.
187. Richter, J.R., et al., *Macrophage-derived chemokine (CCL22) is a novel mediator of lung inflammation following hemorrhage and resuscitation*. *Shock* (Augusta, Ga.), 2014. **42**(6): p. 525-531.
188. Mantovani, A., et al., *Macrophage-derived chemokine (MDC)*. *J Leukoc Biol*, 2000. **68**(3): p. 400-4.
189. Ostrom, Q.T., et al., *Epidemiology of gliomas*. *Cancer Treat Res*, 2015. **163**: p. 1-14.
190. McNeill, K.A., K.; Fine, H.A., *Adult High-Grade (Diffuse) Glioma.*, in *Molecular Pathology of Nervous System Tumors*, Z.D. Karajannis MA, Editor. 2015, Springer New York: New York. p. 77-93.
191. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(10): p. 987-96.
192. Wen, P.Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(5): p. 492-507.
193. Seystahl, K., W. Wick, and M. Weller, *Therapeutic options in recurrent glioblastoma-An update*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016. **99**: p. 389-408.
194. Martinez, R., et al., *Frequent hypermethylation of the DNA repair gene MGMT in long-term survivors of glioblastoma multiforme*. *J Neurooncol*, 2007. **83**(1): p. 91-3.
195. Ohgaki, H., *Epidemiology of brain tumors*. *Methods Mol Biol*, 2009. **472**: p. 323-42.
196. Pearson, J.R.D. and T. Regad, *Targeting cellular pathways in glioblastoma multiforme*. *Signal Transduct Target Ther*, 2017. **2**: p. 17040.
197. Krex, D., et al., *Long-term survival with glioblastoma multiforme*. *Brain*, 2007. **130**(Pt 10): p. 2596-606.
198. Aldape, K., et al., *Glioblastoma: pathology, molecular mechanisms and markers*. *Acta Neuropathol*, 2015. **129**(6): p. 829-48.
199. Olar, A. and K.D. Aldape, *Using the molecular classification of glioblastoma to inform personalized treatment*. *J Pathol*, 2014. **232**(2): p. 165-77.
200. Colman, H., et al., *A multigene predictor of outcome in glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(1): p. 49-57.
201. Hartmann, C., et al., *Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas*. *Acta Neuropathol*, 2010. **120**(6): p. 707-18.
202. Lieberman, F., *Glioblastoma update: molecular biology, diagnosis, treatment, response assessment, and translational clinical trials [version 1; referees: 2 approved]*. Vol. 6. 2017.
203. Nduom, E.K., M. Weller, and A.B. Heimberger, *Immunosuppressive mechanisms in glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 2015. **17 Suppl 7**: p. vii9-vii14.

204. Wing, K. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 7-13.
205. de Martin, R., et al., *Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family*. The EMBO Journal, 1987. **6**(12): p. 3673-3677.
206. Fontana, A., et al., *Glioblastoma cells release interleukin 1 and factors inhibiting interleukin 2-mediated effects*. The Journal of Immunology, 1984. **132**(4): p. 1837.
207. Wrann, M., et al., *T cell suppressor factor from human glioblastoma cells is a 12.5-kd protein closely related to transforming growth factor-beta*. The EMBO Journal, 1987. **6**(6): p. 1633-1636.
208. Frei, K., et al., *Transforming growth factor-beta pathway activity in glioblastoma*. Oncotarget, 2015. **6**(8): p. 5963-77.
209. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
210. Alterman, R.L. and E.R. Stanley, *Colony stimulating factor-1 expression in human glioma*. Molecular and Chemical Neuropathology, 1994. **21**(2): p. 177-188.
211. Pyonteck, S.M., et al., *CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1264-72.
212. Deryugina, E.I., L. Soroceanu, and A.Y. Strongin, *Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Membrane-type 1 Matrix Metalloproteinase Stimulates Human Glioma Xenograft Growth and Angiogenesis*. Cancer Research, 2002. **62**(2): p. 580.
213. Goldman, C.K., et al., *Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology*. Mol Biol Cell, 1993. **4**(1): p. 121-33.
214. Ke, L.D., Y.-X. Shi, and W.K.A. Yung, *VEGF(121), VEGF(165) Overexpression Enhances Tumorigenicity in U251 MG but not in NG-1 Glioma Cells*. Cancer Research, 2002. **62**(6): p. 1854.
215. Shweiki, D., et al., *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 843-5.
216. Gabrilovich, D.I., et al., *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells*. Nat Med, 1996. **2**(10): p. 1096-103.
217. Kohanbash, G., et al., *GM-CSF Promotes the Immunosuppressive Activity of Glioma-Infiltrating Myeloid Cells through Interleukin-4 Receptor- $\alpha$* . Cancer Research, 2013. **73**(21): p. 6413.
218. Berghoff, A.S., et al., *Programmed death ligand 1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in glioblastoma*. Neuro Oncol, 2015. **17**(8): p. 1064-75.
219. Doucette, T., et al., *Immune Heterogeneity of Glioblastoma Subtypes: Extrapolation from the Cancer Genome Atlas*. Cancer immunology research, 2013. **1**(112): p. 10.1158/2326-6066.CIR-13-0028.
220. Parsa, A.T., et al., *Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma*. Nat Med, 2007. **13**(1): p. 84-8.
221. Avril, T., et al., *Distinct effects of human glioblastoma immunoregulatory molecules programmed cell death ligand-1 (PDL-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on tumour-specific T cell functions*. J Neuroimmunol, 2010. **225**(1-2): p. 22-33.
222. Bloch, O., et al., *GLIOMAS PROMOTE IMMUNOSUPPRESSION THROUGH INDUCTION OF B7-H1 EXPRESSION IN TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2013. **19**(12): p. 3165-3175.
223. Liu, Y., et al., *PD-L1 expression by neurons nearby tumors indicates better prognosis in glioblastoma patients*. J Neurosci, 2013. **33**(35): p. 14231-45.
224. Butte, M.J., et al., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 111-22.
225. Qiagen, *Protokoll "RNeasy Kit"*.



- 
226. ThermoFisher, *Protokoll "TOPO TA Cloning Kit for Sequencing"*.
227. Jena, A., *Protokoll „innuPREP Gel Extraction Kit“*.
228. Agilent.
229. Aouinti, S., et al., *IMGT/HighV-QUEST Statistical Significance of IGH Clonotype (AA) Diversity per Gene for Standardized Comparisons of Next Generation Sequencing Immunoprofiles of Immunoglobulins and T Cell Receptors*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142353.
230. Shannon, C.E., *The mathematical theory of communication*. 1963. MD Comput, 1997. **14**(4): p. 306-17.
231. Potts, S.J., et al., *Evaluating tumor heterogeneity in immunohistochemistry-stained breast cancer tissue*. Lab Invest, 2012. **92**(9): p. 1342-57.
232. Simpson, E., *Measurement of diversity*. Nature, 1949. **163**:688.
233. Zhuang, Y., et al., *Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of sepsis*. Front Biosci (Landmark Ed), 2017. **22**: p. 1344-1354.
234. Lim, T.S., et al., *V-gene amplification revisited - An optimised procedure for amplification of rearranged human antibody genes of different isotypes*. N Biotechnol, 2010. **27**(2): p. 108-17.
235. Venturi, V., et al., *Sharing of T cell receptors in antigen-specific responses is driven by convergent recombination*. 2006. **103**(49): p. 18691-18696.
236. Chen, Z., X. Qiu, and J. Gu, *Immunoglobulin expression in non-lymphoid lineage and neoplastic cells*. The American journal of pathology, 2009. **174**(4): p. 1139-1148.
237. Okabe, H., et al., *Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 2129-37.
238. Li, J., et al., *Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by NGX6 transfected in human nasopharyngeal carcinoma cells*. J Protein Chem, 2001. **20**(3): p. 265-71.
239. Zheng, H., et al., *Immunoglobulin alpha heavy chain derived from human epithelial cancer cells promotes the access of S phase and growth of cancer cells*. Cell Biol Int, 2007. **31**(1): p. 82-7.
240. Liu, H.D., et al., *Upregulated expression of kappa light chain by Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma cells via NF-kappaB and AP-1 pathways*. Cell Signal, 2007. **19**(2): p. 419-27.
241. Geng, L.Y., et al., *Expression of SNC73, a transcript of the immunoglobulin alpha-1 gene, in human epithelial carcinomas*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(16): p. 2305-11.
242. Yang, S., M. Wang, and W. You, *Co-expression of immunoglobulin light chain kappa and lambda in gastric carcinoma cell*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2002. **24**(5): p. 465-6.
243. Liao, Q., et al., *Aberrant high expression of immunoglobulin G in epithelial stem/progenitor-like cells contributes to tumor initiation and metastasis*. Oncotarget, 2015. **6**(37): p. 40081-94.
244. Hayakawa, K., et al., *The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice*. J Exp Med, 1983. **157**(1): p. 202-18.
245. Wang, S., et al., *Natural Killer-like B Cells Prime Innate Lymphocytes against Microbial Infection*. Immunity, 2016. **45**(1): p. 131-44.
246. Popi, A.F., *B-1 phagocytes: the myeloid face of B-1 cells*. Ann N Y Acad Sci, 2015. **1362**: p. 86-97.
247. Griffin, D.O. and T.L. Rothstein, *A small CD11b(+) human B1 cell subpopulation stimulates T cells and is expanded in lupus*. J Exp Med, 2011. **208**(13): p. 2591-8.
248. Hahn M., e.a., *unpublished data*.

249. Kemp, D.J., et al., *Expression of the immunoglobulin C mu gene in mouse T and B lymphoid and myeloid cell lines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(5): p. 2876-80.
250. Okazaki, I.M., et al., *The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts*. Nature, 2002. **416**(6878): p. 340-5.
251. Morgan, H.D., et al., *Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52353-60.
252. Sanz, L.A., S.K. Kota, and R. Feil, *Genome-wide DNA demethylation in mammals*. Genome Biol, 2010. **11**(3): p. 110.
253. Popp, C., et al., *Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency*. Nature, 2010. **463**(7284): p. 1101-5.
254. Karpurapu, M., et al., *Kruppel like factor 4 promoter undergoes active demethylation during monocyte/macrophage differentiation*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93362.
255. Ueno, T., et al., *Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3282-9.
256. Schreiber, H., et al., *Immunological enhancement of primary tumor development and its prevention*. Semin Cancer Biol, 2000. **10**(5): p. 351-7.
257. Manson, L.A., *Anti-tumor immune responses of the tumor-bearing host: the case for antibody-mediated immunologic enhancement*. Clin Immunol Immunopathol, 1994. **72**(1): p. 1-8.
258. He, L., et al., *Toward a more accurate view of human B-cell repertoire by next-generation sequencing, unbiased repertoire capture and single-molecule barcoding*. Scientific Reports, 2014. **4**(1): p. 6778.
259. Choi, N.M., et al., *Deep Sequencing of the Murine  $\langle em \rangle$ Igh $\langle /em \rangle$  Repertoire Reveals Complex Regulation of Nonrandom V Gene Rearrangement Frequencies*. 2013. **191**(5): p. 2393-2402.
260. Liu, J., et al., *Immunoglobulin gene expression in umbilical cord blood-derived CD34(+) hematopoietic stem/progenitor cells*. Gene, 2016. **575**(1): p. 108-17.
261. Gronwall, C., J. Vas, and G.J. Silverman, *Protective Roles of Natural IgM Antibodies*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 66.
262. Deng, Y.Q., et al., *Immunoglobulin expression in colon cancer cell line HT-29 and its biological activities*. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi, 2006. **28**(2): p. 88-91.
263. Kimoto, Y., *Expression of heavy-chain constant region of immunoglobulin and T-cell receptor gene transcripts in human non-hematopoietic tumor cell lines*. Genes Chromosomes Cancer, 1998. **22**(1): p. 83-6.
264. Ghaffari-Nazari, H. *The known molecules involved in MSC homing and migration*. 2018.
265. Zhang, W., et al., *Characterization of the B Cell Receptor Repertoire in the Intestinal Mucosa and of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Colorectal Adenoma and Carcinoma*. J Immunol, 2017. **198**(9): p. 3719-3728.
266. Kitaura, K., et al., *Different Somatic Hypermutation Levels among Antibody Subclasses Disclosed by a New Next-Generation Sequencing-Based Antibody Repertoire Analysis*. Frontiers in immunology, 2017. **8**: p. 389-389.
267. Hu, X., et al., *Landscape of B cell immunity and related immune evasion in human cancers*. Nat Genet, 2019. **51**(3): p. 560-567.
268. Sharonov, G.V., et al., *B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment*. Nature Reviews Immunology, 2020. **20**(5): p. 294-307.
269. Mittelkötter, U., et al. *Stellenwert der monozytären HLA-DR-Expression für die Indikation großer abdominalchirurgischer Eingriffe*. 2002. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
270. Harris, A.L., et al., *Epidermal growth factor receptor and other oncogenes as prognostic markers*. J Natl Cancer Inst Monogr, 1992(11): p. 181-7.

- 
271. Di Lorenzo, G., et al., *Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(11): p. 3438-44.
  272. Liu, W., et al., *TNF- $\alpha$  increases breast cancer stem-like cells through up-regulating TAZ expression via the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 1804.
  273. Yuan, A., et al., *Correlation of total VEGF mRNA and protein expression with histologic type, tumor angiogenesis, patient survival and timing of relapse in non-small-cell lung cancer*. Int J Cancer, 2000. **89**(6): p. 475-83.
  274. Crew, J.P., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor Is a Predictor of Relapse and Stage Progression in Superficial Bladder Cancer*. 1997. **57**(23): p. 5281-5285.
  275. Chen, X.C., et al., *EGF stimulates glioblastoma metastasis by induction of matrix metalloproteinase-9 in an EGFR-dependent mechanism*. Oncotarget, 2017. **8**(39): p. 65969-65982.
  276. Fries, G., A. Perneczky, and O. Kempski, *Glioblastoma-associated circulating monocytes and the release of epidermal growth factor*. J Neurosurg, 1996. **85**(4): p. 642-7.
  277. Albuлесcu, R., et al., *Cytokine Patterns in Brain Tumour Progression*. Mediators of Inflammation, 2013. **2013**: p. 979748.

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der verschiedenen Blutzellen (adaptiert von [6]) .....	7
Abbildung 2: Klassische und alternative Aktivierung von Makrophagen (adaptiert von [42]) .....	11
Abbildung 3: Aufbau eines Antikörpers [68] .....	14
Abbildung 4: Diversität der CDR [6] .....	16
Abbildung 5: Sekundäre Diversifikation der Antikörper.....	19
Abbildung 6: Mechanismus der SMARTer RACE-PCR [98] .....	21
Abbildung 7: Ficoll-Gradient.....	40
Abbildung 8: MACS-Aufreinigung (Miltenyi) .....	41
Abbildung 9: RNA-Extraktion mit Trizol .....	42
Abbildung 10: RNA-Isolation mit RNeasy Kit [225].....	43
Abbildung 11: TOPO-Vektor [226].....	47
Abbildung 12: DNA-Isolation aus Gel [227].....	48
Abbildung 13: Bioanalyser [228] .....	53
Abbildung 14: Workflow der Library-Erstellung.....	54
Abbildung 15: Verdünnungsreihe des Zytokin-Standards (Luminex-Assay) .....	58
Abbildung 16: Plattenbelegung Luminex-Assay .....	59
Abbildung 17: Reinheit der untersuchten Zellfraktionen .....	64
Abbildung 18: Sensitivität der CD19-PCR.....	65
Abbildung 19: lösliches und transmembranöses IgM .....	66
Abbildung 20: Immunkompetenz der Makrophagen .....	67
Abbildung 21: HE- und CD14-Färbungen der Glioblastome. Die Angabe des Tumorumfanges in mL wurde radiologisch bestimmt. ....	69
Abbildung 22: Vergleich der unterschiedlichen Sequenzierungen (CDR3 der Monozyten/ Makrophagen).....	72
Abbildung 23: Vergleich der unterschiedlichen Sequenzierungen (CDR3 der B-Zellen)...	75
Abbildung 24: Anzahl der gefundenen V-Ketten in den verschiedenen Sequenzierungsmethoden .....	79
Abbildung 25: Anteil der sequenzierten V <sub>H</sub> -Ketten-Familien mit den unterschiedlichen NGS- Methoden.....	80
Abbildung 26: Vergleich Makrophagen- und B-Zell-Repertoire.....	83
Abbildung 27: Vergleich der Makrophagen-Antikörper Repertoires in Tumor und Blut .....	84
Abbildung 28: CDR3-Längenverteilung.....	85
Abbildung 29: Verteilung der verwendeten V <sub>H</sub> -Ketten auf dem Locus .....	89
Abbildung 30: Verteilung der verwendeten V <sub>H</sub> - und J <sub>H</sub> -Ketten nach Familien .....	90

Abbildung 31: Alignment der Makrophagen-Sequenzen .....	91
Abbildung 32: Mutationsrate und Anzahl der somatischen Mutationen .....	93
Abbildung 33: Clustering der Mutationsfrequenzen .....	94
Abbildung 34: Lokalisation der Mutationen .....	96
Abbildung 35: Zusammenhang zwischen Mutationen und Position auf dem Locus .....	97
Abbildung 36: Vergleich der Mutationszahlen in Blut und Tumor bei Makrophagen (n=133 Sequenzen).....	98
Abbildung 37: Vergleich der Mutationszahlen in Blut und Tumor bei B-Zellen (n=128 Sequenzen).....	99
Abbildung 38: Vergleich der Mutationen zwischen Makrophagen und B-Zellen im Tumor (n=77 Sequenzen).....	100
Abbildung 39: Vergleich der Mutationen zwischen Makrophagen und B-Zellen im Blut (n=171 Sequenzen).....	101
Abbildung 40: Korrelation des Immunglobulin-Repertoires der Makrophagen mit der TumorgroÙe .....	103
Abbildung 41: Korrelation des Immunglobulin-Repertoires der B-Zellen mit der TumorgroÙe .....	104
Abbildung 42: Korrelation der CD14-positiven Zellen und der TumorgroÙe .....	105
Abbildung 43: V <sub>H</sub> -Ketten-Variabilität nach Tumorresektion (Schwerketten VP01) .....	107
Abbildung 44: CDR3-Variabilität nach Tumorresektion (Schwerketten VP01).....	108
Abbildung 45: CDR3-Regionen im Zeitverlauf, Patient 01 .....	110
Abbildung 46: Immunglobulin-V <sub>H</sub> -Ketten-Variabilität nach Tumorresektion (Schwerketten VP02) .....	112
Abbildung 47: CDR3-Variabilität nach Tumorresektion (Schwerketten VP02).....	113
Abbildung 48: CDR3-Regionen im Zeitverlauf, Patient 02 .....	115
Abbildung 49: Shannon-Diversity-Index VP01 und VP02.....	117
Abbildung 50: Immunkompetenz der Makrophagen im Verlauf nach Tumorresektion....	118
Abbildung 51: Immunglobulin-Schwerketten-Repertoires der gesunden Kontrolle (B-Zellen) zu unterschiedlichen Zeitpunkten .....	119
Abbildung 52: Zytokinkonzentrationen im Vergleich gesund vs. GBM-Patient .....	120
Abbildung 53: Zytokinkonzentrationen der Verlaufspatienten .....	122

---

Abbildung S 1: Vergleich der V-Ketten aus den unterschiedlichen Sequenzierungen (Makrophagen) .....	181
Abbildung S 2: Vergleich der V-Ketten aus den unterschiedlichen Sequenzierungen (B-Zellen) .....	182
Abbildung S 3: V-Ketten-Variabilität nach Tumorresektion (Kappa-Leichtketten VP01)..	183
Abbildung S 4: CDR3-Variabilität nach Tumorresektion (Kappa-Leichtketten VP01).....	184
Abbildung S 5: V-Ketten-Variabilität nach Tumorresektion (Kappa-Leichtketten VP02)..	185
Abbildung S 6: CDR3-Variabilität nach Tumorresektion (Kappa-Leichtketten VP02).....	186
Abbildung S 7: V-Ketten-Variabilität nach Tumorresektion (Lambda-Leichtketten VP01) .....	187
Abbildung S 8: CDR3-Variabilität nach Tumorresektion (Lambda-Leichtketten VP01) ...	188
Abbildung S 9: V-Ketten-Variabilität nach Tumorresektion (Lambda-Leichtketten VP02) .....	189
Abbildung S 10: CDR3-Variabilität nach Tumorresektion (Lambda-Leichtketten VP02) .	190

---



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika von M1- und M2-Makrophagen (adaptiert von [55]).....	12
Tabelle 2: Geräte .....	32
Tabelle 3: Kits .....	32
Tabelle 4: Enzyme .....	33
Tabelle 5: FACS-Antikörper .....	33
Tabelle 6: Reagenzien .....	34
Tabelle 7: Puffer .....	35
Tabelle 8: Allgemeine Primer .....	35
Tabelle 9: CD-Primer .....	36
Tabelle 10: Immunglobulin-Primer .....	36
Tabelle 11: Immunglobulin-Repertoire- und RACE-Primer .....	37
Tabelle 12: Software / Datenbanken .....	37
Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien.....	38
Tabelle 14: Patientenkollektiv .....	39
Tabelle 15: Bedingungen Sanger-Sequenzierung.....	49
Tabelle 16: Top10 V-Ketten und CDR3-Regionen der unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden (Makrophagen) .....	73
Tabelle 17: Top10 V-Ketten und CDR3-Regionen der unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden (B-Zellen).....	77
Tabelle 18: Wiederfindungsrate der V-Ketten in den verschiedenen Sequenzierungen ...	78
Tabelle 19: Verhältnis der Variabilität von Makrophagen zu B-Zellen in den verschiedenen Sequenzierungen (Shannon-Index) .....	81
Tabelle 20: Verhältnis der Repertoire Variabilität von Makrophagen zu B-Zellen mit den unterschiedlichen Sequenzierungsmethoden (Simpson-Index).....	82
Tabelle 21: Gleiche Schwerketten-CDR3-Regionen in Tumor und Blut.....	86
Tabelle 22: Vergleich CDR3-Region und V(D)J-Kombination.....	87
Tabelle 23: Top5 der Immunglobulin-V <sub>H</sub> -Ketten und CDR3-Regionen von Verlaufspatient 1 (Makrophagen) .....	109
Tabelle 24: Top5 der Immunglobulin V <sub>H</sub> -Ketten und CDR3-Regionen von Verlaufspatient 2 (Makrophagen) .....	114

Tabelle S 1: Schwerketten in Makrophagen (V <sub>H</sub> -Ketten).....	163
Tabelle S 2: Leichtketten in Makrophagen (V <sub>L</sub> -Ketten) .....	165
Tabelle S 3: Schwerketten in B-Zellen (V <sub>H</sub> -Ketten) .....	166
Tabelle S 4: Leichtketten in B-Zellen (V <sub>L</sub> -Ketten) .....	167
Tabelle S 5: Gesunde Kontrolle (V-Ketten).....	168
Tabelle S 6: IgM in Makrophagen (CDR3-Regionen).....	169
Tabelle S 7: IgG in Makrophagen (CDR3-Regionen).....	170
Tabelle S 8: Leichtketten in Makrophagen (CDR3-Regionen).....	172
Tabelle S 9: IgM in B-Zellen (CDR3-Regionen) .....	173
Tabelle S 10: IgG in B-Zellen (CDR3-Regionen) .....	174
Tabelle S 11: Leichtketten in B-Zellen (CDR3-Regionen) .....	176
Tabelle S 12: Gesunde Kontrolle (CDR3-Regionen).....	177
Tabelle S 13: Verteilung der CDR3-Regionen in den einzelnen Patienten.....	180
Tabelle S 14: Vergleich der V-Ketten-Familien aus den unterschiedlichen Sequenzierungen (Makrophagen).....	181
Tabelle S 15: Vergleich der V-Ketten-Familien aus den unterschiedlichen Sequenzierungen (B-Zellen) .....	182

## Publikationen, Vorträge, Poster und Auszeichnungen

### Publikationen

Busch S, Talamini M, Brenner S, Abdulazim A, Hänggi D, Neumaier M, Seiz-Rosenhagen M\*, Fuchs T\*, *Circulating monocytes and tumor-associated macrophages express recombined immunoglobulins in glioblastoma patients*, Clin Transl Med, 2019

*\*geteilte Senior-Autorenschaft*

Fuchs T, Hahn M, Ries L, Giesler S, Busch S, Wang C, Han J, Schultze T, Püllmann K, Beham AW, Kaminski WE, Neumaier M, *Expression of combinatorial immunoglobulins in macrophages in the tumor microenvironment*, PLOS One, 2018

Fuchs T, Hahn M, Riabov V, Yin S, Kzhyshkowska J, Busch S, Püllmann K, Beham AW, Neumaier M, Kaminski WE, *A combinatorial  $\alpha\beta$  T cell receptor expressed by macrophages in the tumor microenvironment.*, Immunobiology, 2017

### Vorträge

Deutscher Kongress der Laboratoriumsmedizin 2016, 28.-30.09.16, Mannheim,  
„*Characterization of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) and the expression of immunoglobulins by tumor-associated macrophages (TAM) in glioblastomas*“

Tagung der Sektion Neuroonkologie der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, 21.-22.10.16, Düsseldorf,  
„*Charakterisierung von myeloiden Suppressorzellen (MDSC) und die Expression von Immunglobulinen durch tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) in Glioblastomen*“

68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), 14.-17.05.17, Magdeburg,  
„*Tumor volume of glioblastoma correlates inverse with immunoglobulin repertoires of tumor-associated macrophages*“

## **Poster**

67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), 12.-15.06.16, Frankfurt/Main,

*„Immunological characterization of myeloid derived suppressor cells, monocytes and TAM in glioblastomas“*

## **Auszeichnungen**

67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC), 12.-15.06.16, Frankfurt/Main: 3. Posterpreis

Deutscher Kongress der Laboratoriumsmedizin 2016, 28.-30.09.16, Mannheim:

Preis für den besten wissenschaftlichen Vortrag

## Danksagung

Von ganzem Herzen danken möchte ich

- Prof. Michael Neumaier für die Bereitstellung des Themas und meines Arbeitsplatzes sowie für die uneingeschränkte Unterstützung, wann immer ich diese benötigte
- Prof. Thomas Wieland für die Übernahme der Gutachterschaft
- PD Dr. Tina Fuchs für die tolle Betreuung, das ständig offene Ohr für meine Fragen, die vielen inspirierenden Diskussionen und das freundschaftliche Miteinander
- dem Rest der AG Fuchs, bestehend aus Marina Talamini und Dr. Eileen Reinz, für die tatkräftige Unterstützung und sehr viel Spaß im Labor
- meinen „Mit-Doktoranden“ Sophie Giesler, Lukas Ries und Max Strauß für die tolle Zusammenarbeit und noch viel mehr für die vielen lustigen Abwechslungen vom Arbeitsalltag
- der Neurochirurgischen Klinik, stellvertretend Prof. Marcel Seiz-Rosenhagen, Dr. Amr Abdulazim und Dr. Steffen Brenner, für die Kooperation und Bereitstellung der Patientenproben
- allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie für die großartige Unterstützung und die tolle Zeit am Institut
- meiner Familie, meinen Freunden und besonders meinem Freund Michael, die mich während der ganzen Zeit bedingungslos unterstützt und mir den Rücken freigehalten haben

---

## Anhang

### 1. Sequenzierte V-Ketten

#### 1.1. Schwerketten in Makrophagen

	TAM IgM		Blut IgM		TAM IgG		Blut IgG	
GBM001	5-51*01	5	3-21*01	5			3-33*01	19
	3-20*01	1	3-33*01	5			1-46*01	2
			1-2*02	2			2-5*04	2
			3-9*01	2			3-23*04	2
			3-23*04	2			4-61*01	2
			1-18*01	1			3-53*01	1
			3-7*01	1				
			3-15*01	1				
			3-30*07	1				
			3-33*01	1				
			3-48*03	1				
			3-49*04	1				
		4-59*01	1					
GBM002	3-30-3*01	16	3-30-3*01	18	2-5*04	29		
	6-1*01	10	6-1*01	1				
GBM003	3-30-3*01	19	3-21*01	15				
	3-21*01	1	3-30-3*01	10				
GBM004					3-49*04	20		
GBM005			3-15*01	29	1-2*02	3		
GBM006	6-1*02	1						
GBM007	3-47*01	1						
GBM008			3-21*01	3			3-30*18	1
GBM009	3-21*01	1						
GBM010	1-2*02	1						
GBM011							3-23D*02	1
GBM012	3-33*01	5	3-21*01	16	3-7*01	18	1-18*01	12
	3-30*18	2	3-33*01	2	1-18*01	5	6-1*02	1
	1-69*01	1	3-74*01	2				
			3-11*04	1				
GBM013	3-30*18	4	3-30*18	5			4-30-4*01	4
			3-30*02	1			3-9*01	3
GBM015			4-39*01	8				
			3-30*07	4				
			3-23*01	1				

Tabelle S 1: Schwerketten in Makrophagen (V<sub>H</sub>-Ketten)

## 1.2. Leichtketten in Makrophagen

	TAM Igκ		Blut Igκ		TAM Igλ		Blut Igλ	
GBM001	6-21*02	20	2-30*01	4	4-60*01	1	2-23*02	5
	2-30*01	3	3-11*01	4			1-47*01	3
			3-20*01	3			3-1*01	3
			1-5*03	2			7-46*01	3
			1-39*01	2			3-21*03	2
			1-17*01	1			1-44*01	1
			2D-40*01	1			2-14*02	1
			3-11*01	1			6-57*01	1
			4-1*01	1			7-43*01	1
GBM002	4-1*01	26	6-21*02	4	2-14*01	23		
	1-27*01	5	2-30*01	1	2-11*01	18		
	1-5*03	3						
	1D-33*01	1						
GBM003	1-17*01	27	4-1*01	27				
GBM004	3-11*01	20	1-39*01	22	2D-26*01	7		
	2D-26*01	3						
	2-30*01	1						
GBM005	3-15*01	36	3-15*01	21				
	1-39*01	1	1-39*01	1				
GBM006			2D-40*01	10				
GBM007	6-21*02	2	6-21*02	7				
GBM008	2-30*01	1	3-20*01	11				
			1-8*01	8				
			2-28*01	3				
			4-1*01	3				
			1-39*01	2				
			6-21*02	2				
			1D-13*01	1				
			1-5*03	1				
			1-16*02	1				
			1-39*01	1				
			1-39*02	1				
			2-24*01	1				
			2-28*01	1				
		3-11*01	1					
GBM009			1-5*03	7				
			3-15*01	7				
			1-17*01	1				
			1-39*01	1				
			2-28*01	1				
GBM010	6-21*02	3	3-15*01	21				
			5-2*01	1				
			2-30*01	1				



GBM011			6-21*02	14		
			3-15*01	6		
			1-9*01	1		
			1D-33*01	1		
			1-39*01	1		
			1-9*01	1		
GBM012	1-6*01	19			3-32*01	1
GBM013	4-1*01	15	1-39*01	10		
	1-5*03	3	4-1*01	4		
			1-5*03	3		
			1-33*01	1		
			2D-29*02	1		
			2-28*01	1		
			3-20*01	1		
GBM014			1-2*01	4	3-1*01	2
			3-20*01	3		
			1-8*01	2		
			1-17*01	1		
			2-24*01	1		

Tabelle S 2: Leichtketten in Makrophagen (VL-Ketten)

## 1.3. Schwerketten in B-Zellen

	TAM IgM		Blut IgM		TAM IgG		Blut IgG	
GBM003	3-33*01	2	3-33*01	10	3-74*03	11	2-5*09	3
	3-23*01	1	3-23D*02	3	3-33*01	8	5-51*03	2
	3-23*04	1	3-30*18	5	1-3*01	2	2-5*02	2
			1-18*01	1			3-33*04	2
			3-7*03	1			1-46*03	1
							2-26*01	1
							2-26*01	1
							3-11*01	1
							3-46*01	1
							3-72*01	1
							4-59*01	1
							4-61*02	1
							5-10*01	1
							5-51*03	1
						6-1*01	1	
GBM004	3-33*01	10	3-21*01	10	4-39*01	8	3-30-3*01	6
	3-11*01	2	3-11*01	7	3-53*01	5	3-53*01	3
	1-8*01	1	4-61*01	5	6-1*02	3	3-74*02	2
	3-7*01	1			3-11*01	2	3-15*02	2
					3-53*02	1	3-23D*02	2
					4-30-2*01	1	2-5*09	2
					5-51*03	1	3-21*01	1
							3-23*01	1
							3-49*03	1
							3-71*01	1
							4-39*01	1
							4-4*07	1
						4-61*03	1	
						5-51*01	1	
GBM008	2-5*02	3	3-30*18	2	6-1*01	8	6-1*01	4
	3-7*01	3	3-53*02	2	3-23*01	2	1-8*01	2
	3-7*03	2	4-39*01	2	1-8*01	1	3-30*18	2
	3-74*01	2	1-46*01	1	3-15*01	1	1-2*02	1
	1-18*01	1	2-26*01	1	3-23D*02	1	3-15*01	1
	3-13*01	1	2-70*01	1	3-30*18	1	3-33*01	1
	3-15*01	1	3-21*01	1	3-33*01	1	3-48*01	1
	3-23*01	1	3-23*01	1	3-48*01	1	3-48*02	1
	3-30*16	1	3-23D*01	1	3-48*02	1	3-53*01	1
	3-30-3*01	1	3-30-3*01	1	3-53*01	1	3-72*01	1
	3-53*01	1	4-31*03	1	3-74*03	1	4-4*07	1
	3-53*02	1	5-51*03	1	4-61*02	1	4-59*02	1
	3-66*02	1						

Tabelle S 3: Schwerketten in B-Zellen (V<sub>H</sub>-Ketten)

## 1.4. Leichtketten in B-Zellen

	TAM Igκ		Blut Igκ		TAM Igλ		Blut Igλ	
GBM003	1-5*03	18	6-21*02	10	8-61*01	17	1-44*01	1
	1-17*01	3	4-1*01	4	1-44*01	3	6-57*01	1
	4-1*01	2	1-39*01	3	7-43*01	2	8-61*01	1
	6-21*02	1	2-28*01	2	6-21*02	1		
			1-12*01	1				
			1-17*01	1				
			1-5*03	1				
		1D-33*01	1					
GBM004	1D-33*01	7	4-1*01	4	1-44*01	11	3-1*01	7
	2-11*01	3	1-5*03	3	2-11*01	2	6-57*02	4
	1-16*02	2	3-15*01	3	1-5*03	2	1-44*01	2
	1-5*03	2	1-16*01	2	1-17*01	1	7-46*01	2
	1-39*01	2	3-20*01	2	1D-33*01	1	1-47*01	1
	1-17*01	2	1-39*01	2	2-11*03	1	6-21*02	1
	1-44*01	1	1-17*01	1	2-8*01	1	6-57*01	1
			1-27*01	1	4-1*01	1	9-49*01	1
			1-9*01	1				
			2-24*01	1				
			5-2*01	1				
			6-21*02	1				
GBM008	4-1*01	7	4-1*01	5	1-47*01	3	3-1*01	5
	3-20*01	3	1-39*01	4	3-15*01	1	1-44*01	4
	1-27*01	2	2-28*01	3	2-8*01	1	2-11*01	3
	1-5*03	1	1D-33*01	2			2-14*01	3
	1-8*01	1	1-17*01	2			3-21*02	3
	1D-12*01	1	1-16*02	2			1-47*01	2
	1D-12*01	1	1-5*03	1			2-11*03	2
	2-29*02	1	1-6*01	1			6-57*01	2
	2-30*02	1	1-6*02	1			6-57*02	2
			1-9*01	1			1-47*02	1
			1D-16*01	1			2-18*02	1
			1D-33*01	1			2-8*01	1
			1D-43*01	1			7-43*01	1
			2-24*01	1			8-61*01	1
		3D-20*01	1					

Tabelle S 4: Leichtketten in B-Zellen (VL-Ketten)

## 1.5. Gesunde Kontrolle

	IgM	IgG	Igκ	Igλ				
CD14+	2-5*02	6	3-73*01	10	1-8*01	4	8-61*01	8
	4-59*01	2	4-61*01	6	1-9*01	4	2-11*01	7
	3-30-3*01	2	1-69*01	3	1-5*03	2	2-14*01	3
	2-26*01	1	4-31*03	1	1-39*01	2	1-47*01	2
	3-74*01	1	3-73*01	1	4-1*01	1	1-36*01	1
	3-64D*06	1			1-12*01	1	3-21*01	1
	3-48*03	1			1-33*01	1	3-1*01	1
	1-18*04	1					2-23*03	1
	1-46*01	1						
	5-51*01	1						
	4-30-2*01	1						
	3-30*04	1						
	3-21*01	1						
	3-9*01	1						
CD19+	3-30-3*01	3	3-30*04	8	1-33*01	7	6-57*01	7
	4-59*01	2	3-23*01	2	1-5*03	2	2-8*01	4
	6-1*01	2	3-48*03	2	1-16*02	2	3-1*01	4
	3-49*04	1	3-33*01	2	1-16*01	2	1-47*01	2
	3-49*02	1	4-4*07	1	1-27*01	1	2-11*01	2
	3-30*03	1	3-15*01	1	1-8*01	1	1-44*01	2
	3-30*04	1	3-21*01	1			3-21*01	1
	3-23*04	1	1-3*01	1			7-43*01	1
	2-26*01	1	3-9*01	1			3-19*01	1
	1-69*06	1	3-33*06	1				
	2-26*01	1	3-30-3*01	1				
	2-70*04	1						
	3-23*04	1						
	5-51*01	1						
	3-49*04	1						
	2-5*02	1						
4-30-4*01	1							

Tabelle S 5: Gesunde Kontrolle (V-Ketten)

## 2. Sequenzierte CDR3-Regionen

### 2.1. Schwerketten in Makrophagen

	TAM IgM		Blut IgM	
GBM001	ARHGEIGGTIKYDY	5	ARDRRGTVVNIFDY	5
	RVLTGKLPGLW	1	AKWMATITAWFSFDY	2
			ARCLGIAAAGILWDYYYYGMDV	2
			ARGDQQSGWFDP	2
			AKDGFSGSYEGVYYYYGMDV	2
			ARDSPYPYSGSYNWyGDYYYYGMDV	1
			AREMGYYDSRKAYLTT	1
			TGSRLGGFSGYYDIDY	1
			ARDGGPRRWAFENPDC	1
			ARDRAVGAFDH	1
			AKDSGWSSLALDY	1
			ARDRAVGAFDY	1
			TRGYSYGYPEY	1
			AREGTGGYSSSWYYFDY	1
			ARDQDCSSTSLDY	1
		ARANRVMYPPCFDL	1	
GBM002	ARGAGVRYFDWLSPAGY	16	ARASGSGWYFDY	17
	GRGGTGYYYYMDV	7	GRGGTGYYYYMDV	1
	GRGGTGYYYSMDV	2	TRASGSGWYFDY	1
	ARGAGVRYFDWLSPAGC	1		
	GGGGTGYYYYMDV	1		
GBM003	ARGAGVRYFDWLSPAGY	11	ARVPINYDILTGTDY	11
	ARGAGVRYFDWLPPAGY	8	ARGAGVRYFDWLSPAGY	10
	ARVPINYDILTGTDY	1	ARIPINYDILTGTDY	2
			ARVPVNYDILTGTDY	1
			AKIPINYHILTGTDY	1
GBM005			TYYYDSSGYGRFDYWG	29
GBM006	CEQAS	1		
GBM007	PHWDFLPDS	1		
GBM008			ARDEKQLVRNYYYYYGMDV	3
GBM009	ARDEKQLVRNYYYYYGMDV	1		
GBM010	AREGHDCGGDCSPFDY	1		
GBM012	AGEGSWLTTSTFDI	5	ARDEKQLVRNYYYYYGMDV	14
	AKTLMVRGVRNAFDI	2	ARDEKQLVRNSLYGMDV	2
	ARDVSSSPAVFDY	1	AGEGSWLTTSTFDI	2
			ARELTVSPGES	2
			ARDERQLVRSYYYYYGMTS	1
GBM013	AKTLMVRGVRNAFDI	4	AKTLMVRGVRNAFDI	6
GBM015			ARHLGNGVRGALGFDY	8
			AGEGSWLTTSTFDI	4
			AKSPEVAVAGNRPLREILFDY	1

Tabelle S 6: IgM in Makrophagen (CDR3-Regionen)

	<b>TAM IgG</b>	<b>Blut IgG</b>
GBM001		ARDAVGDSSGYYYVYSFYYSYGLDV 19 VRSWAYSLTPAGTGTYFES 2 AKGRSRTVDFWDFP 2 AREGWFCSSSTNCYGNGVDV 2 SRETQWQFDH 2 ARDKGLG 1
GBM002	VRSWAYSLTPAGTGTYFES 25 VRSWAYSWTPAGTGTYFES 1 VGSWAYSLTPAGTGTYFES 1 VQSWAYSLTPAGTGTYFES 1 VRGWAYSLTPAGTGTYFES 1	
GBM004	SRSYLAATPTNFDY 18 SRSYLAPTPTNFDY 1 SRSYLASTLTNFDY 1	
GBM005	ARELSGFYQRMDDAFDI 3	
GBM008		TKDLYCNDWYNYFDP 1
GBM011		ARHNGARIVGAHPALDF 1
GBM012	ARLWVTATRWFYDL 18 ARDWRSGGSCYYY 2 ARDWRVWVAALY 1 ARDWRSGGSCFFF 1 ARDWRSGGSCYFF 1	ARDWRSGGSCYYY 10 FYNVVTGKTLALPNLIALQHIPLSP 1 ARDWRSGELLFS 1 ARDWRSGGSCYFY 1
GBM013		ASFTLDWNSDS 4 TKETAKHQQRDYGMVDV 3

Tabelle S 7: IgG in Makrophagen (CDR3-Regionen)

## 2.2. Leichtketten in Makrophagen

	TAM Igκ		Blut Igκ		TAM Igλ		Blut Igλ	
GBM001	HQSSNLPWT	17	MQGTHWPPTWT	4	GACCTG	1	CSYAGRV	5
	MQGTHWPPTWT	3	QQYNSYPWT	2			LLSYSGARV	3
	IRVVIYLGR	2	QSYSYTPPIT	2			QAWDSSTW	3
	RQSSNLPWT	1	QQYGSSPCS	2			QVWDTTDDHPAV	2
			QRYGNSRFT	1			AAWDDSLNGQV	1
			QQRSNGQVL	1			SSYTSSTFEV	1
			LQHNSYPWT	1			TAWGDNLSGV	1
			QQRSNWPST	1			TAWDDNLSGV	1
			QQRSNWPST	1			QSYDSSILWV	1
			MQRIEFPP	1			AAWDDSLSARCV	1
			QQYYRIPCT	1			LLSCSGARV	1
			QQRSNWPPR	1				
			QQRSNWPPR	1				
	GBM002	QQYYSTPLT	18	HQSSNLPWT			3	CSYISGNTLWV
QQCYSTPLT		6	MQGTHWPPTWT	1	CSYAGSYLCG	15		
QKYNAPQIT		4	IRVVIYLGR	1	CPYAGSYLCG	2		
QQYHDLTLLT		2			CSYISGNALWV	1		
QRYNAPQIT		1			CSYAGSYLSG	1		
QQYYRIPCT		1			CSYVSGNTLWV	1		
QQCDNVPYT		1						
QQYYSFPYT		1						
QQYNSYSWT		1						
GBM003	LQHNTYPWT	26	QQYYSTPYT	26				
	LQHNAYPWT	1	QQYYSTLYT	1				
GBM004	QQRSNWPPGFT	19	QSYSYTPPFT	22	ASSQGRRLGKDGYT	7		
	ASSQGRRLGKDGYT	3						
	QQRSNWLRVSL	1						
	MQGTHWPPTWT	1						
GBM005	QHYNWPWT	32	NTIMPGLRGR	11				
	QQSYSAPLS	2	QHYNWPWT	10				
	QHYNWPWT	1	QSYSYTPNT	1				
	QHYNWPWT	1						
	QHYNWPWT	1						
GBM006			MQRIEFPSVH	10				
GBM007	IRVVIYLGR	2	IRVVIYLGR	7				
GBM008	MQGTHWPPTWT	1	QQYYNSWT	7				
			QQYGSSPRT	6				
			MQALQTLLP	3				
			IRVVIYLGR	2				
			QSYSYTPRT	2				
			QQYYNSLH	1				
			QQYASSPRT	1				
			QHYGSSPQT	1				
			QQFNNYPFT	1				
			QQSSITWT	1				
			QSYSYTPLT	1				
			EQYSSSPRT	1				
			QQYGSSSRT	1				
			QQYNTYVT	1				
			MQALQTPQT	1				
			QQYYRTPPT	1				
			QQYANSPT	1				
		QQRSNWPHV	1					

			MQAKQFPVT 1 QHYKTYPLT 1 QQYYSTPRT 1 QQFYAAPFT 1		
GBM009			QHYNDWPWT 4 QQYKSSPWT 3 QHYNWPPWT 2 LQHNTYPLT 1 QHYKDYTS 1 QQYKRLSS 1 QQSYTVPT 1 QQYKSSPWT 1 NTIMPGLRGR 1 MQLQTPWT 1 NSIKNIPP 1		
GBM010	IRVWYLGR	3	QHYNWPWT 18 QHYNWPWM 2 LQHDNFPLT 1 QHYNWPWA 1 MQGTHWLLT 1		
GBM011			IRVWYLGR 13 QHYNWPWT 4 QQFNSYPNT 1 QQYDNLPT 1 ITVWYLGR 1 QHYNWPWT 1 QHPHNWRWT 1 QQTSTLMYT 1 QELNSFPRT 1		
GBM012	LQDHSFPYS LQDHSFPYG LQDHSFPCS	17 1 1		LNLSNQIFSCARKFV- AIFLTPDKYAA	1
GBM013	QQYYDKPYT QQYQSLWA	15 3	QQSYETPWT 8 MQGLQTPYT 4 QQYNSYPYS 3 QQSYSTPLT 1 QQSYETPRT 1 QQYESLSALS 1 MQSIQLGLT 1 MQALETPYT 1 QQYGSSPS 1		
GBM014			QKYDSAPFT 4 QQYSDSPFT 3 QQYYSPYT 2 LQHDSFPPWT 1 LQATQFPRT 1	QAWDSSTAV 2	QAWDSSTAV 1 QAWDSSIAV 1

Tabelle S 8: Leichtketten in Makrophagen (CDR3-Regionen)



## 2.3. Schwerketten in B-Zellen

	TAM IgM		Blut IgM	
GBM003	ARDRGAVAGHFDY	2	ARGWGSDFWSGYPFDY	6
	AKADYDFWSGSSWVYYYY- YMDV	2	AKDRSGDFGSYGKTTPL	5
			ARDAPPYEGCSSTSCYALSNYFDY	4
			AKDLYDFWSGYYASNAFDI	3
			ARVNRKWLLPDWGMDV	1
			ARDPGATRKYCSSTSCFYGGMDV	1
GBM004	ARVAATVFYGGMDV	10	ARGKRGYSSGWLFDY	9
	ARAGYCSGGSCYPGWFDP	1	ARDMIRAFTYCTNGVCSTMGAMYY- YYYGMDV	4
	ARGVTMVRGAPGPY	1	ARERAYYGDYIFRAFDI	4
	ARDYRQVVRATTGDLGY	1	ARVMIRAFTYCTNGVCSTMGAMYY- YYYGMDV	3
	ARARTTVNY	1	ARIAVAGSH	1
			RGGRGVIAVAGYLTT	1
GBM008	ARFHLQSFQWTEPFDS	2	ARMSGYCSGGSCWGYAFDI	2
	ARDADGVLDS	2	AKDSPGYCGGDCSNWFDP	1
	AHIGSGYEPFER	2	ARESMSPNYSGGNAFDI	1
	ARDLGGWLQYGGFDY	1	ARLRHSYGALDY	1
	TRGGRGTGCDY	1	ARIRGYGLYFDY	1
	ARNPLSLEYGDPGPDS	1	ARDPGIAVAGTQRGDDY	1
	ARGGGGGTNLLWYDP	1	ARGHYDSSGYSSGLWNWFDP	1
	TTDLMKIAQPD	1	TKDQDPIAAAGDFDY	1
	AKGSSESYYDAYDY	1	ARALTSTAAAGTLGY	1
	ARFSGGSYLYFDY	1	ANSIVGDTFHYYGMDV	1
	ATFPGTGY	1	TRAVATTFDY	1
	ARDATLDV	1	ARSHRWRGFRKSGNWYFDL	1
	ARGPFCSSSTSCPIDDAFDI	1	AKDLGSSGWYFIY	1
	AHRPAYTDTWYPDWYFDL	1	ARGTGDCSSTSCYEGPYYYYYGMD	1
	ARVPITVADFDY	1	ARLPSYYDILTGYLAPYFDY	1
	ARDPGDHGVFGGD	1		

Tabelle S 9: IgM in B-Zellen (CDR3-Regionen)

	<b>TAM IgG</b>		<b>Blut IgG</b>	
GBM003	AREIYGGYGADF	10	ARLGHNYDISGQALDF	2
	ARIRSYWGPQDAFNI	8	ASDLHYSDAGVY	2
	ARDPWGIGAAGPTDY	2	AYRRKSGFFDH	2
	AREICGGYGADF	1	AGSGRTVEWRAFDI	1
			ARGVHDFSYYFYMDV	1
			AHSSHYFDF	1
			ARTFYLLYCNGDCPAGAFDI	1
			ARAGSGYAAWIDQ	1
			ARDSTSNWDTMGPTHFDT	1
			ARGPPTIPRYFFEY	1
			ARETTCLGGYCPFDY	1
			RDSDIITMILVAKPLTS	1
			ASGRELRN	1
			AHDRGANSRDDAFDI	1
			ATSAGGCSRRSCYWYFDL	1
			AHRIRSGGWYTFDY	1
			ARCSEATILGALDI	1
GBM004	ARDHRTVFGKIDP	6	AREGLTDWGPPLRGLDH	4
	ARDLVGATPVGFDY	5	ARGTGSSSVRQS	3
	SRGDMATFPYYFDY	3	ARDLNWKLYDY	2
	ARPLGSGDNYYYGMNV	2	ARDAEYKFGSYFDY	2
	ERPSYGFWEEDRP	2	AWSGLTWFAS	2
	ATRMVVRGAFDV	1	ARFGGNGWLHP	2
	ARDLVGATPVGFDC	1	AKHPSIYCSGENCRGD	1
	VRARVWGYYYDMDV	1	AKGTTDVQS	1
			AKDVLFWDYGSGNYFDS	1
			ARPKYSHVFRESYD	1
			ARAQGFCTNGVCYRGEYFDQ	1
			ARDMFAGAGTTSRFDY	1
			AKGTTDVQS	1
			ARDRWFAP	1
			SRVQGPFGVAPLDY	1
			EARYCGRTSCNQGY	1
	GBM008	VRENGEVGTSNWKTRYFGL	6	ARDFWSPLGY
GRGLRWSDY		2	VRELGQLVGFDF	2
ARDLPGGYCSDY		1	ATSIAVGPT	2
ARNLYGTGEFDF		1	ARDGGSGLDYDY	2
ARDLKSGCSGITCSDASDV		1	TAMVDVGLLIGDY	1
TAMVDVGLLIGDY		1	AKDLYESGWYNYFDP	1
AKEASGSSAVSYYYGLDV		1	ARVASARGYGDRADD	1
ARGGMVTAKYFQF		1	ATSNSGWSRSRIYHYGMDV	1
VRDFGGPNEY		1	ARETFQDSSNRRWYLFDP	1
VRELGQLVGFDF		1	ATNTTRGFGGAFDV	1
VRELGQLVGFDF		1	AREPQDALHALDI	1
GTFGGDVPPGY		1	AEDAGLPNGVDV	1
AREGDYYGMDV		1	AKDPAVTTTPAGSFDI	1
SKDGSEWELVRGRDFDD		1	SRGGSGSYLEY	1
			VRDHDWAFDN	1

Tabelle S 10: IgG in B-Zellen (CDR3-Regionen)

## 2.4. Leichtketten in B-Zellen

	TAM Igk		Blut Igk		TAM Igλ		Blut Igλ	
GBM003	QQYNSDWT	11	IRVWYLGR	9	VLYMGSGYWV	16	HLVVGSGIWV	1
	LQHNSYPRT	5	QQYHNTPLT	1	AAWDDSLNGQV	3	AAWDDSLNGPV	1
	LQHNSYPQT	3	MQALQTPLT	1	LLYYGGTWV	2	QSHHMNMLT	1
	HQYYNTPPWT	1	MQALQTPYT	1	HQSSNLPWT	1		
	IRVWYLGR	1	QQYYSVPWT	1	CCIWVVAIG	1		
	QQYYSTPPT	1	QQTYTPTL	1				
	QQYNSYSYT	1	QQHYDTPLT	1				
	QQHNTAWT	1	QQYYTYPWT	1				
			ITWYLGR	1				
			QQSYSTPYT	1				
			QQYDNLWLT	1				
			LQYHLYST	1				
			QQSYSTPRT	1				
			QQSYSTPWT	1				
			LHHDSYPLT	1				
			QQYYSTPPVYT	1				
			LQHDFPLEDT	1				
GBM004	QQYYVLPLA	6	IRVWYLGR	2	AVWDDSLNGRV	10	QAWDSSTVW	5
	LQHNTYPLT	2	NSIIVRGR	1	SSYVGTSHVI	2	QSYDGSNWV	4
	CLYAGTYTYWV	2	QQSYGAPRT	1	SSYAGSFNYV	1	QAWDNAAGGA	2
	QQYSSSRT	1	QQYNSYCS	1	AAWGDSLNGPV	1	LLSYSGARGV	2
	QQYNSFPWT	1	QQYNNWPPWT	1	CLYAGTYTYWV	1	IRVWYLGR	1
	QQSYATPWT	1	QEYNNHGRT	1	QQYYVLPLA	1	AAWDDSLKEGL	1
	QQSYSSPLT	1	QQYNSYPVT	1	QQYNEYPWT	1	AAWDDSLSGRV	1
	QQSYNTPWT	1	QQYNSYYTWT	1	LQHNTYPLT	1	GADHGSGSNSNG-	
	NTIIFGGR	1	QHYDGSQCS	1	QQYHTYWT	1	GTKLTVL	1
	SSYVGTSHVI	1	QQTYSPLT	1	HQYYSSPRS	1	QSYDSSIG	1
	AVWDDSLNGRV	1	QQLNNYPPDT	1			AAWDDSLNGW	1
	RQYNSFPWT	1	MQATQFPGK	1				
			QQYKFYPVT	1				
			QQYYSSLPT	1				
			QKYNAPFT	1				
			LQHNSYPLT	1				
			QQANTFPLT	1				
		QQYGSS	1					
		QQYSSPPYT	1					
		QQYYTTPIT	1					
		QQYYSTPRT	1					
GBM008	QQYGSSPRT	2	QQYYTFPWT	2	AAWDDSLSGWV	1	ASWDDSLNGWV	1
	QKYNAPPT	2	QQTHNTPRT	2	QHYNWPPWT	1	QAWDSSTGV	1
	QQHYNPPMYT	2	QQYDDVPPTT	2	AAWDDSLSGAV	1	CSYAGFYWV	1
	QQYYSYPWT	1	QQYDTPVRT	1	AAWDDSLSGPV	1	LLHYDDSTWM	1
	MQGIHLPRT	1	QQSIHKPWT	1	SSYGGSENLL	1	QAWDSSTVL	1
	MQGTHWYT	1	QQSYDTTWT	1			SSYAGSFTLI	1
	QQTKTFPIN	1	QHFYSSPFT	1			CSYAGIYTLV	1
	HQYGTFGGK	1	LQDHSFPYS	1			QASESSTLV	1
	QQYHTFPLT	1	QQYYNTPIT	1			QWGGSSSDHW	1
	QQYHSPPYT	1	QQSSITWT	1			CSYGGKYNWI	1
	QQTKTFPIN	1	QQCAHAPLT	1			SSYAGSNLVI	1
	LQYYTAPRT	1	QQLNSFPRT	1			QSYDSSTWV	1
	SNILLGR	1	LQDYNYPQT	1			AAWDDSLNAVL	1

	QQYYTTPYT	1	QQHYSTPRT	1	QWWDGSSDIYV	1
	QQYVTSPWT	1	QQHYNPPPMYT	1	QTWDSRTEVL	1
			MQALHPVPT	1	QWWDSTIDHSVI	1
			MQALQTPIT	1	TSYTTSYIWV	1
			PQHNTYPLT	1	QSYDSSRWV	1
			QQYKTPYT	1	NSYTSSDTVM	1
			MQALQTPLT	1	QSYDSSNHNWV	1
			QQYYSTLLT	1	SSYTTSYIWV	1
			MQASQFPHT	1	AAWDDSLSGPYV	1
			QQYNSYPLT	1	CSYAGSYTEI	1
			LQHNSNPRT	1	ATSADTLGWM	1
					QAWDSSTV	1
					AAWDDSLSGVI	1
					AGWDDTVNRRV	1
					LSSDSNNEGV	1
					SLYLGGGTWV	1
					CSSFAGTYTLV	1
					AAWDDNLYGPV	1

Tabelle S 11: Leichtketten in B-Zellen (CDR3-Regionen)









## 2.5. Gesunde Kontrolle

	IgM	IgG	Igκ	Igλ	
CD14+	AHTHPGGYSRGM DV	5 TRQSPVWGDLDYFRFFGM DV	10 QQYYSYPYT	3 VLYMGSGFWV	7
	ARIPGQRYYYGLDV	1 ARALSGGSLPS	6 QQLNSYPLT	3 CSYAGSYTYV	7
	AREGAGPRQQIDALDI	1 ARGIEQLRYHYGM DV	3 QQYNSYPET	2 AAWDDSLSGRL	1
	VKDAWLQFFGY	1 AREMGGHAFDI	1 QQYYSTLWT	1 SSYTSSSTPV	1
	AAAVRLGMGY	1 TRQSPVWGDLDYFRFFGMAS	1 QQANSFPPT	1 AAWDDSLNGWV	1
	ARDLEGSSSSHYGMDV		1 QQLNSYPPT	1 SSYTSSISWV	1
	AREGGAVDTAMVTTWYFDY	1	1 QQSYSTPWT	1 SSYTSSSVV	1
	ARGSYIILGATMGGFDP	1	1 NSIIVRTL	1 QVWDSSIDRVI	1
	ARDWSGNPVEFGY	1	1 QQYDNLPPVH	1 VLYMGSGISV	1
	ARDWVGGIAARPCPGY	1	1 QQTSSNSWT	1 QAWDSSTV	1
	ARGCSRTSTTCYDY	1		1 CSYAGSSTFR	1
	ARDNSGGSYGLDY	1		1 AAWDDSLTW	1
	ARESGVSSTVGDY	1			
	AHTHPGGLLTGYDV	1			
	ARGGDWICSGGSCYSGTIDY	1			
	AKGPGEVGVNNYYYYGMDV	1			
	ARGSYIILGATMGGFDP	1			
CD19+	ARDRGPGYFDY	1 ARFIGYCSSDSCYRGM DV	2 QKYNSAPIT	1 QAWDSSTV	2
	ARVSKRGYDSSGYSYFDY	1 ARDRVAWNWFDP	2 QQYNSYPLT	1 QAWDSSTS	2
	ARGGTVGAILS	1 ARERTSCHGDCIDL	2 QQYDNL PFT	1 AAWDDSLSGYV	1
	IWDTGHTSTT	1 AREPGYSNSLYYYYAMDV	1 QQYNSYGT	1 QSYDSSNQGV	1
	ASKEYYYDSSGYT	1 ARDFGSGDYEGYFDY	1 QQYNNYPAH	1 QSYDSSNLYV	1
	AKGVWSTKVFDY	1 ATAVTTSRNRNFAFI	1 QQYDNLPLT	1 QSYDSSNWV	1
	ARDEETWEWLVPGY	1 ARDDIVHLSMTFGMDV	1 QQYDNL SYT	1 NSYAGGNTWV	1
	AKDRVYSRLFYYYYGMDV	1 AKVCCTSGVGGLGYGMDV	1 QQYNSYPVT	1 SSYAGSNNLV	1
	ARILDRDGYNNYYYYGMDV	1 AKDQNSDYDFWSSGSAFDP	1 QQYYSYPLT	1 QSYDSSNQDWW	1
	ASTTGYCTNGVCRKYYYGMDV	1 ARELYYGPGEYYYYYGMDV	1 QQYNSYLYT	1 CSYAGRYV	1
	ARICARGYSYGYRWDYFDY	1 TRDGGDGYNAYGMDV	1 QQYDRLPVT	1 QSFDRWV	1
	ARHSSGSYPDY	1 ARDQHLASYGMDV	1 QQYDNL PVT	1 QSYHSSSTFWV	1
	AKTIAAAGRYFDY	1 ARDQHLASYGIF	1 QQYKTYPLT	1 AAWDDSLNGVL	1
	AVQNWNDGDGDAFDI	1 ARDRVAWNWFDT	1 QQYNSYSST	1 SSYAGSNNFV	1
	ARQFSPLGTFDY	1 AKRWSAPGLTVWYCSGRQGTVT	1 QHYDNLPRSP	1 QWESDSDHRGV	1
	VFYDSSGWYGMDV	1 ARDFGSGDYEGYVLYS	1	1 LLYHGVAPV	1
	ARVPMPDGWYGYYYYGMDV	1 AKGRIRGYNYVDFD	1	1 QSSDSRYQV	1
	TRDRSLPGYNYGEVDY	1 ARDSYRYSSRHEYRTYYYYGMDV	1	1 NSRDSGPNPWV	1
	AHRPYSYEFQH	1		1 CSYAGSYE	1
	ARQFSPLGTFDY	1		1 SSYAGSNT	1
	ARKLDSGDYHIDY	1		1 AAWDDSLNGPYV	1
				1 AAWDDSLSGWV	1

Tabelle S 12: Gesunde Kontrolle (CDR3-Regionen)

2.6. Verteilung der CDR3-Regionen in den einzelnen Patienten

	TAM IgM	TAM IgG	TAM Igk	TAM Igλ	Blut IgM	Blut IgG	Blut Igk	Blut Igλ
GBM001	n=6		n=23		n=24	n=26	n=19	n=20
GBM002	n=27	n=29	n=35	n=41	n=19		n=5	
GBM003	n=20		n=27		n=25		n=27	
GBM004		n=20	n=24				n=22	
GBM005		n=3	n=37		n=29		n=22	

	TAM IgM	TAM IgG	TAM Igk	TAM Igλ	Blut IgM	Blut IgG	Blut Igk	Blut Igλ
GBM006							 n=10	
GBM007			 n=2				 n=7	
GBM008					 n=3		 n=37	
GBM009							 n=17	
GBM010			 n=3				 n=23	














	TAM IgM	TAM IgG	TAM Igk	TAM Igλ	Blut IgM	Blut IgG	Blut Igk	Blut Igλ
<b>GBM011</b>							 n=24	
<b>GBM012</b>	 n=8	 n=23	 n=19		 n=21	 n=13		
<b>GBM013</b>	 n=4		 n=18		 n=6	 n=7	 n=21	
<b>GBM014</b>							 n=11	
<b>GBM015</b>					 n=13			

Tabelle S 13: Verteilung der CDR3-Regionen in den einzelnen Patienten



### 3. Vergleich Consensus-Primer + NGS und RACE + NGS nach Makrophagen und Monozyten getrennt

Makrophagen:

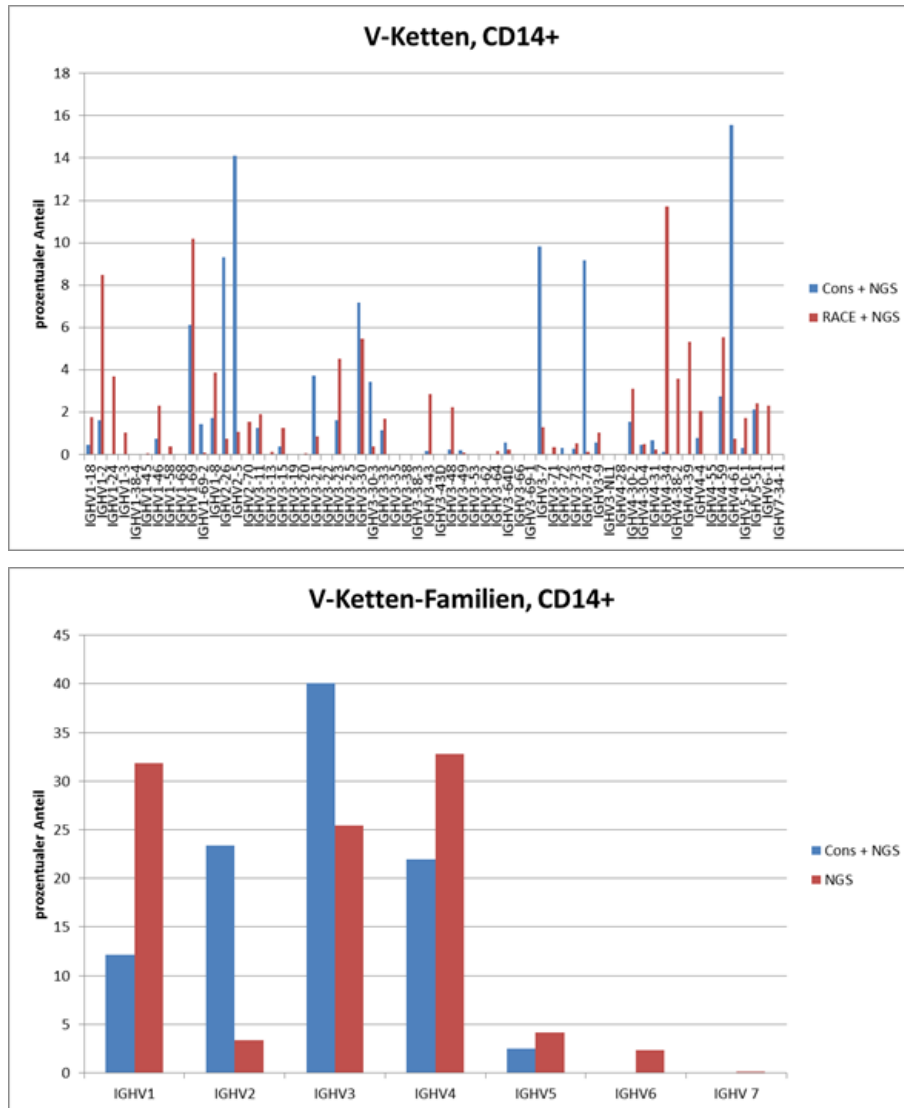


Abbildung S 1: Vergleich der V-Ketten aus den unterschiedlichen Sequenzierungen (Makrophagen)

	Cons. + NGS (%)	RACE + NGS (%)
<b>VH1</b>	12,11	31,87
<b>VH2</b>	23,40	3,39
<b>VH3</b>	40,07	25,43
<b>VH4</b>	21,95	32,82
<b>VH5</b>	2,46	4,17
<b>VH6</b>	0	2,31
<b>VH7</b>	0	0,01

Tabelle S 14: Vergleich der V-Ketten-Familien aus den unterschiedlichen Sequenzierungen (Makrophagen)

B-Zellen:

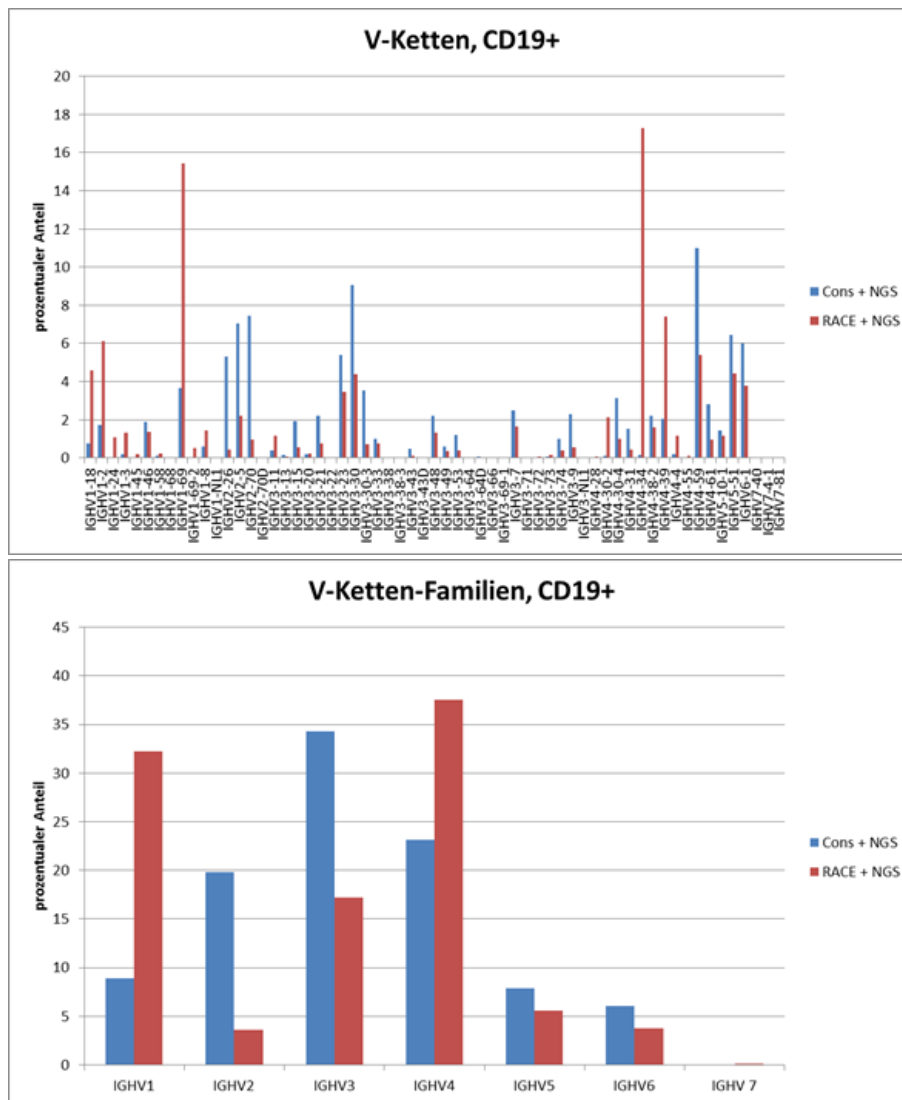


Abbildung S 2: Vergleich der V-Ketten aus den unterschiedlichen Sequenzierungen (B-Zellen)

	Cons. + NGS (%)	RACE + NGS (%)
<b>VH1</b>	8,89	32,26
<b>VH2</b>	19,78	3,60
<b>VH3</b>	34,32	17,21
<b>VH4</b>	23,13	37,54
<b>VH5</b>	7,85	5,57
<b>VH6</b>	6,01	3,76
<b>VH7</b>	0	0,046

Tabelle S 15: Vergleich der V-Ketten-Familien aus den unterschiedlichen Sequenzierungen (B-Zellen)

#### 4. Verlauf der V-Ketten- und CDR3-Variabilität nach Tumorresektion

##### 4.1. VP01, V-Ketten der Kappa-Leichtketten

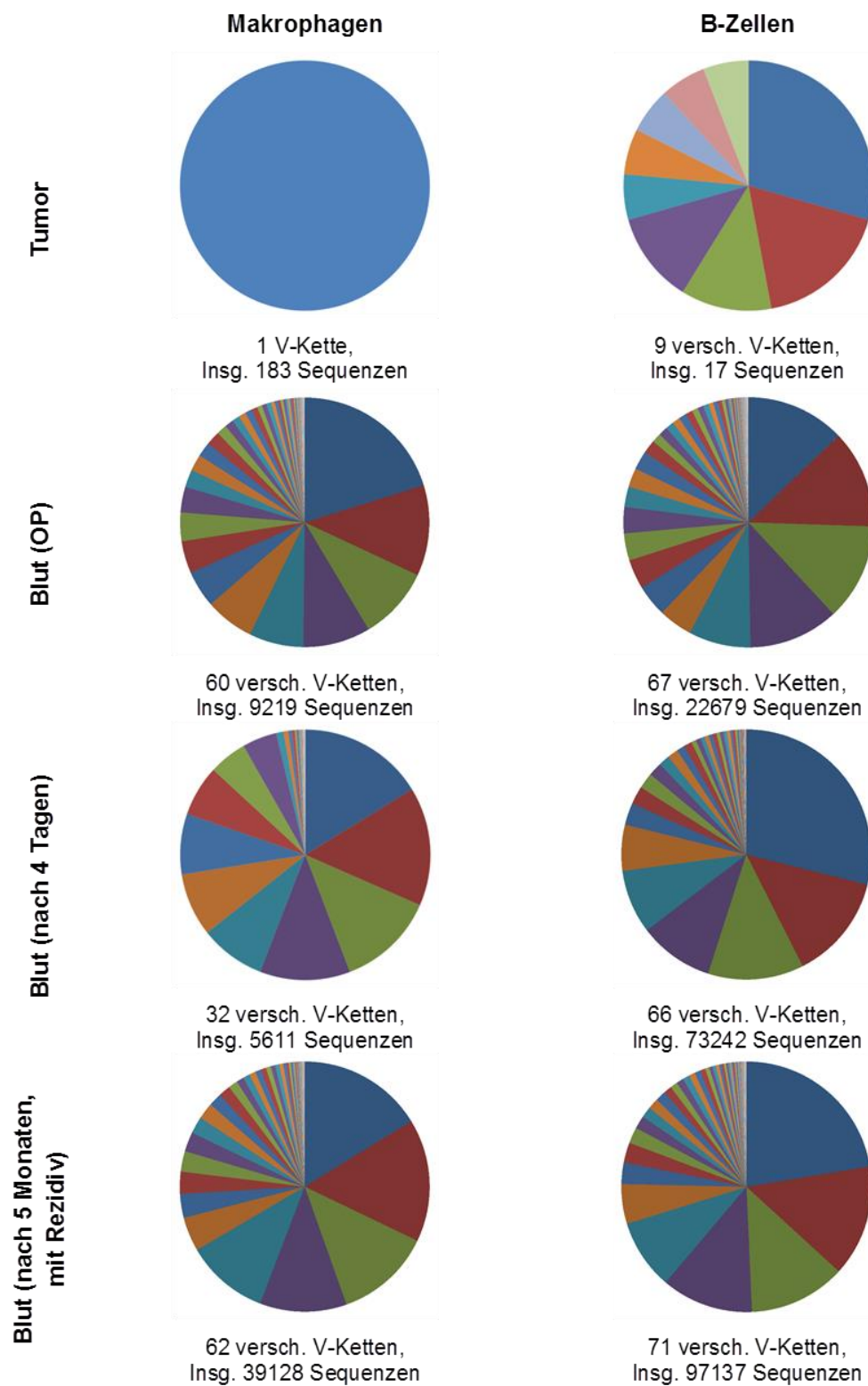


Abbildung S 3: V-Ketten-Variabilität nach Tumorresektion (Kappa-Leichtketten VP01)

4.2. VP01, CDR3-Regionen der Kappa-Leichtketten

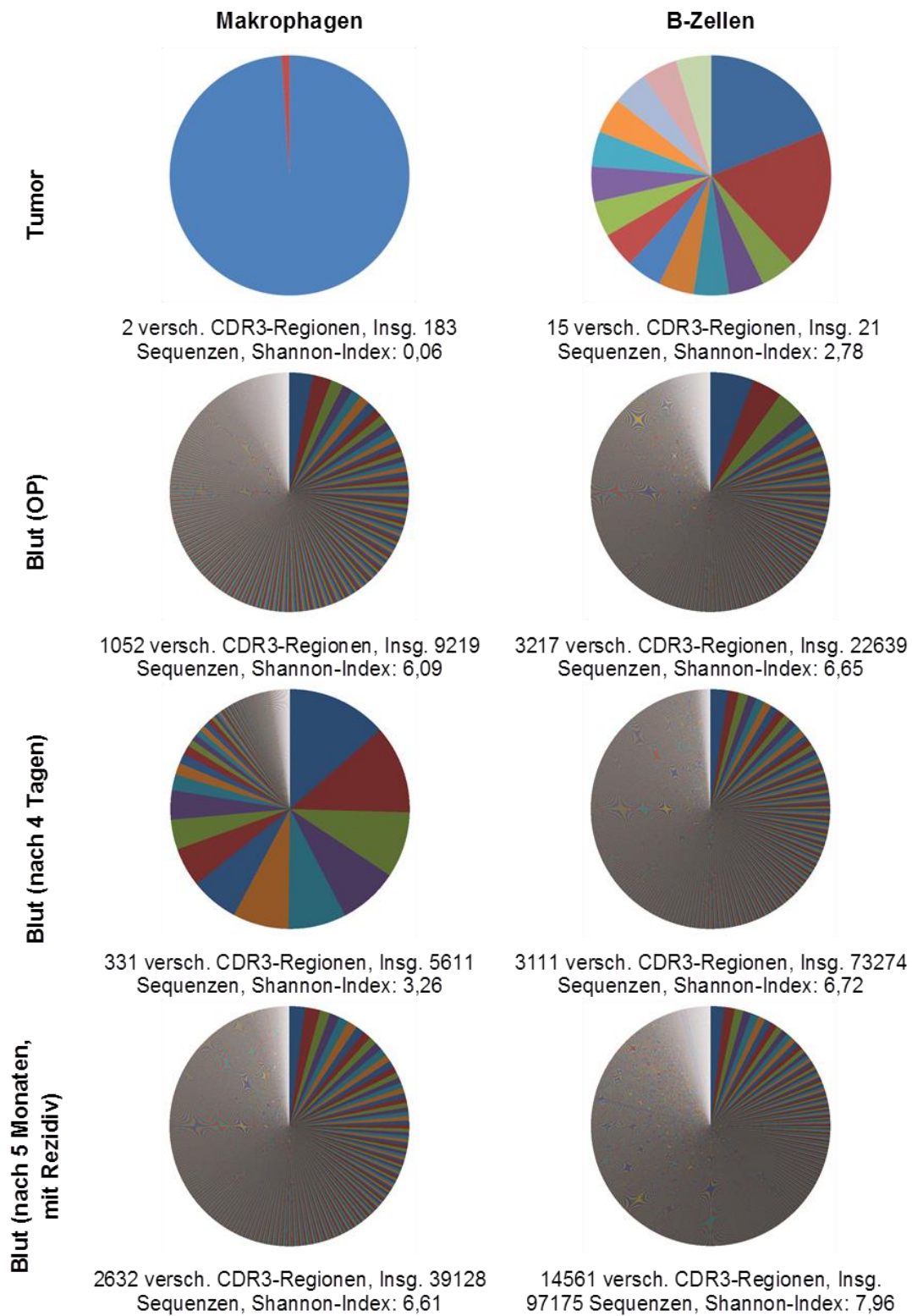


Abbildung S 4: CDR3-Variabilität nach Tumorresektion (Kappa-Leichtketten VP01)

## 4.3. VP02, V-Ketten der Kappa-Leichtketten

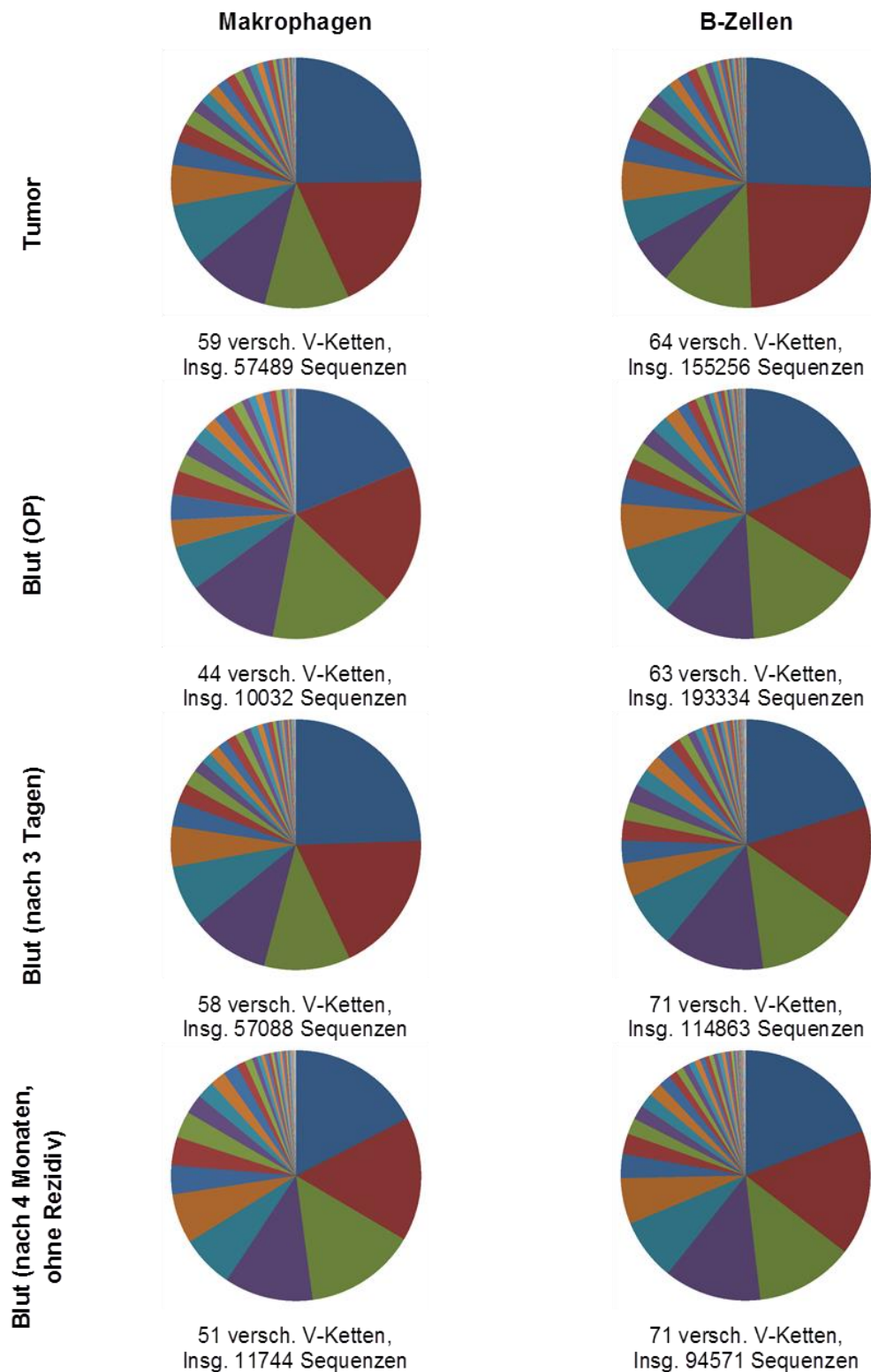


Abbildung S 5: V-Ketten-Variabilität nach Tumorresektion (Kappa-Leichtketten VP02)



4.4. VP02, CDR3-Regionen der Kappa-Leichtketten

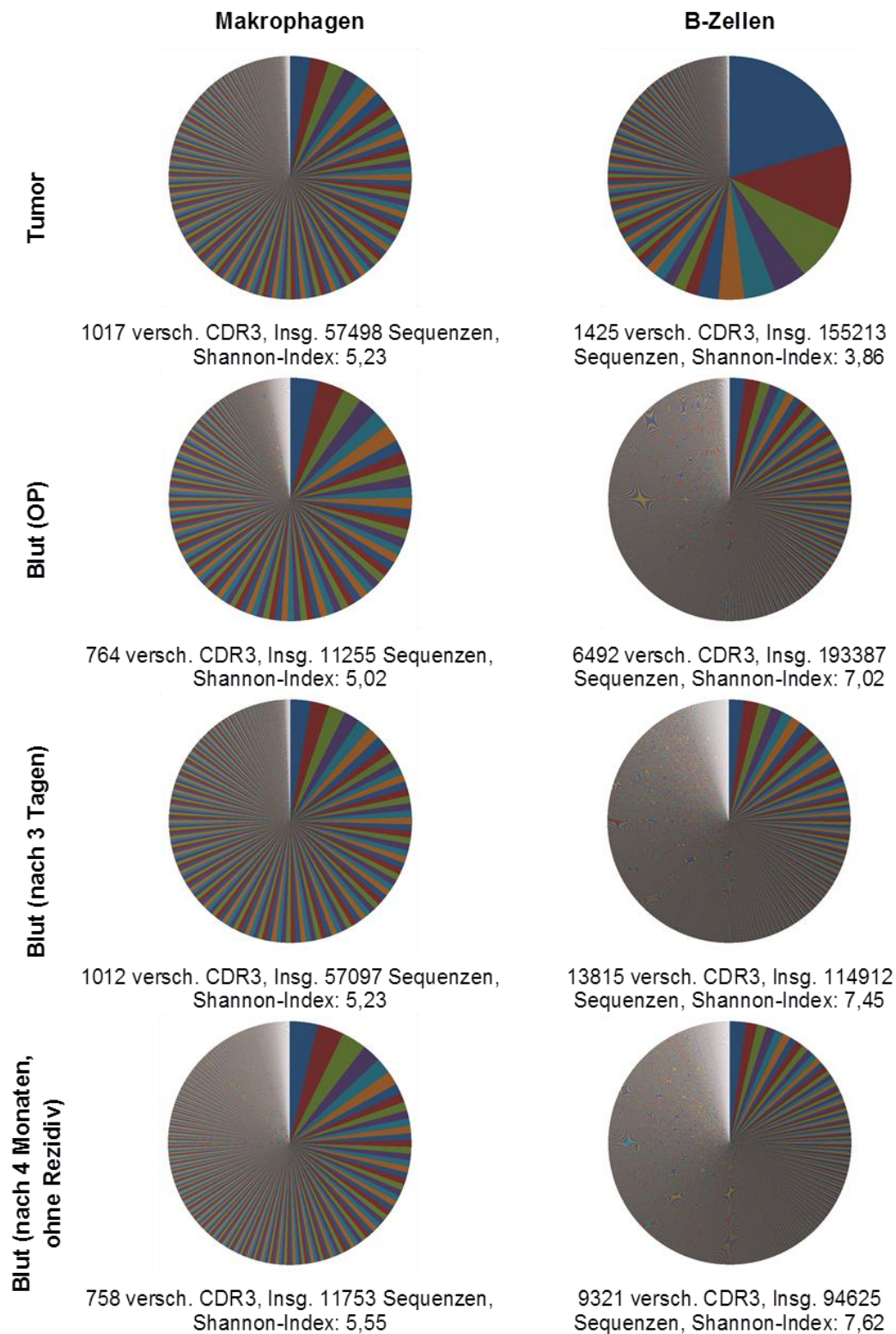


Abbildung S 6: CDR3-Variabilität nach Tumorresektion (Kappa-Leichtketten VP02)

## 4.5. VP01, V-Ketten der Lambda-Leichtketten

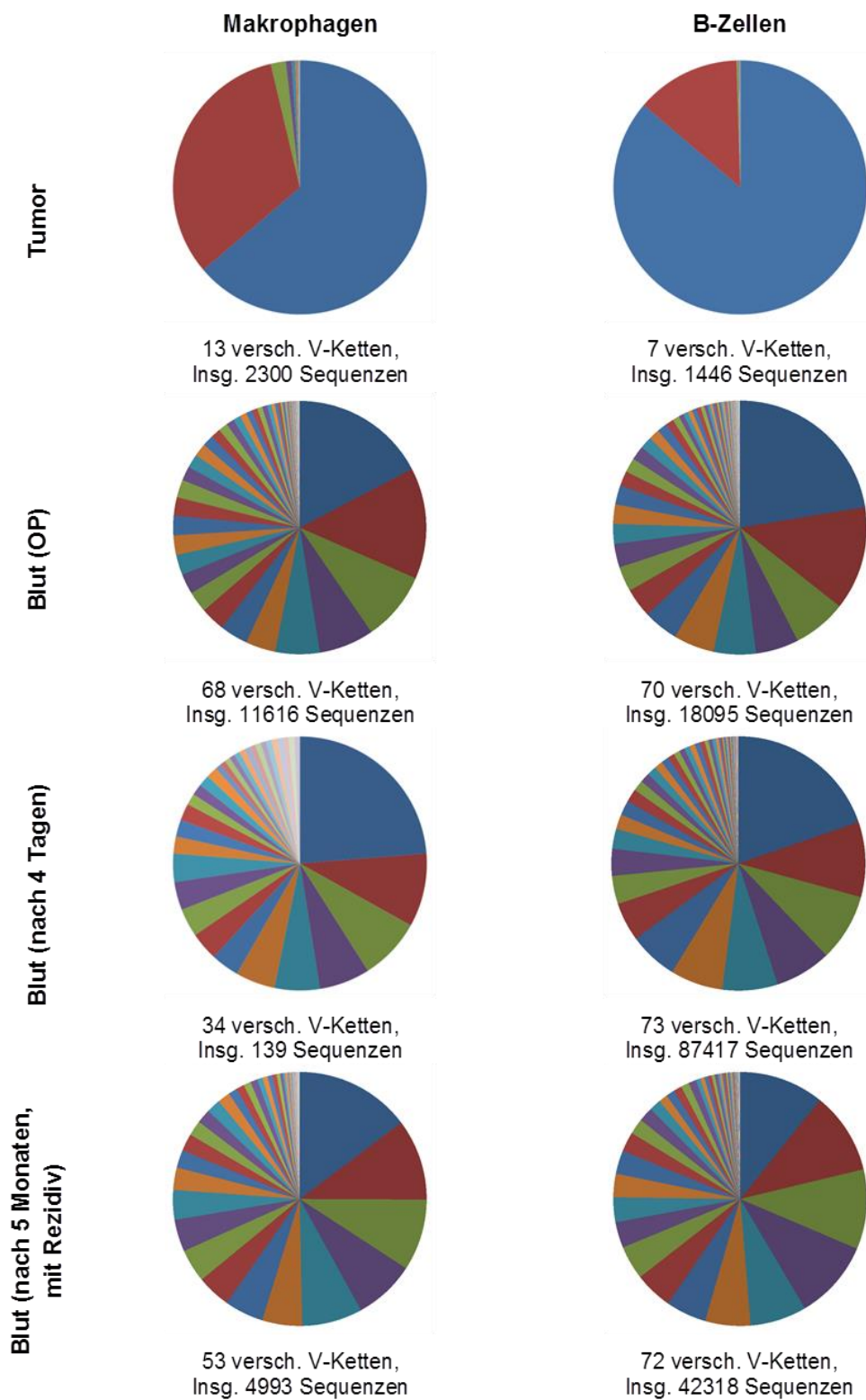


Abbildung S 7: V-Ketten-Variabilität nach Tumorresektion (Lambda-Leichtketten VP01)

4.6. VP01, CDR3-Regionen der Lambda-Leichtketten

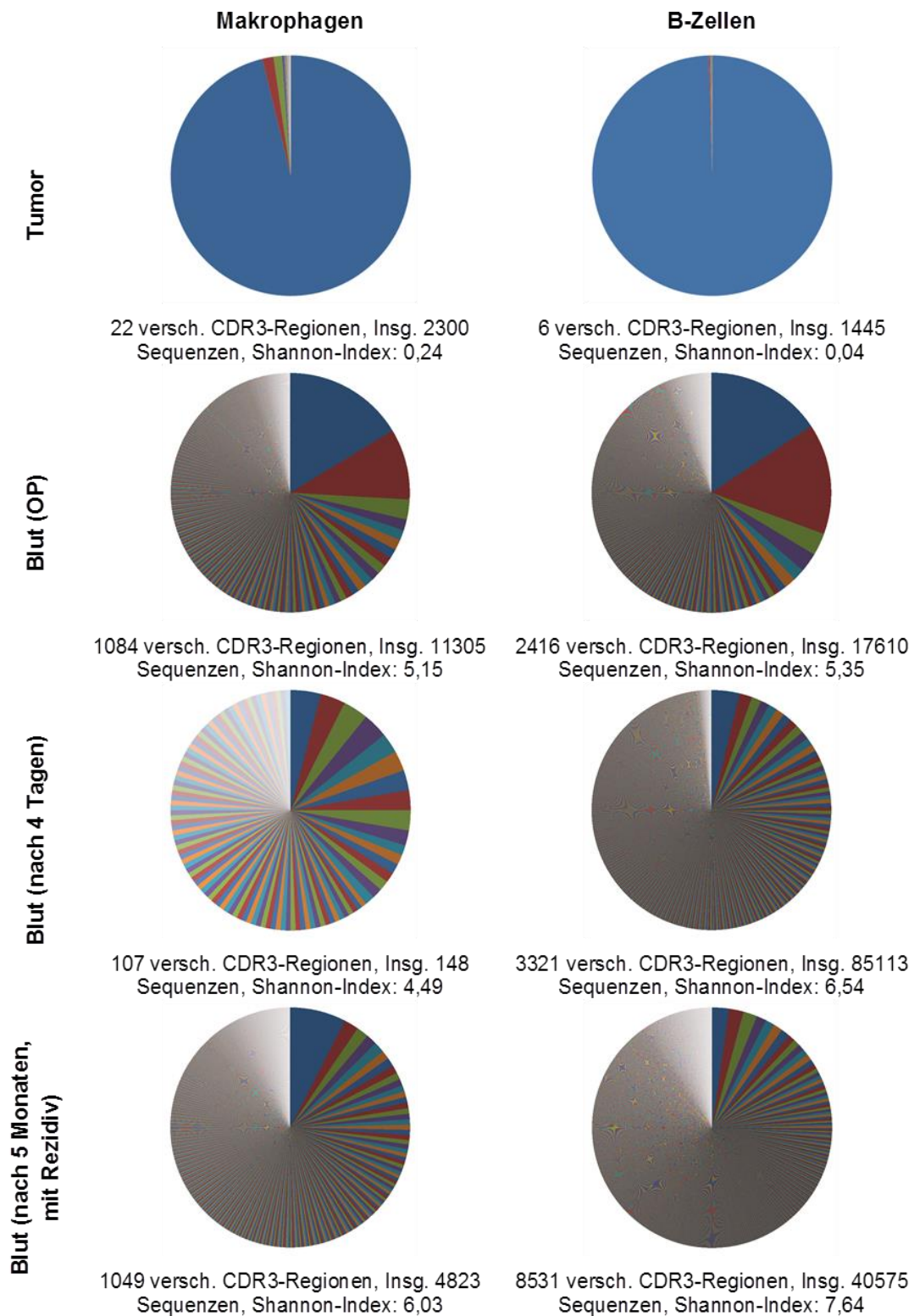


Abbildung S 8: CDR3-Variabilität nach Tumorresektion (Lambda-Leichtketten VP01)



## 4.7. VP02, V-Ketten der Lambda-Leichtketten

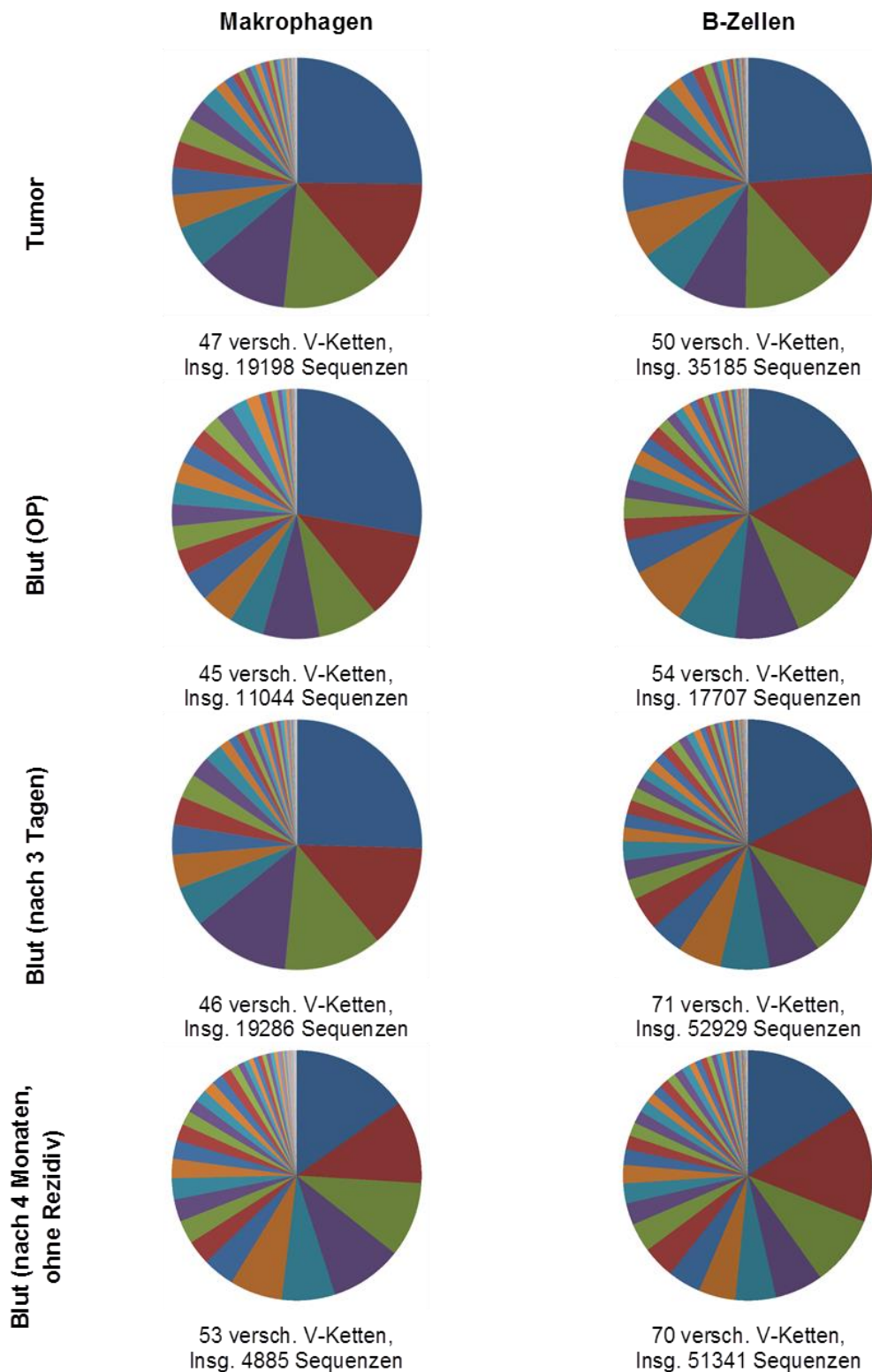


Abbildung S 9: V-Ketten-Variabilität nach Tumorresektion (Lambda-Leichtketten VP02)

4.8. VP02, CDR3-Regionen der Lambda-Leichtketten

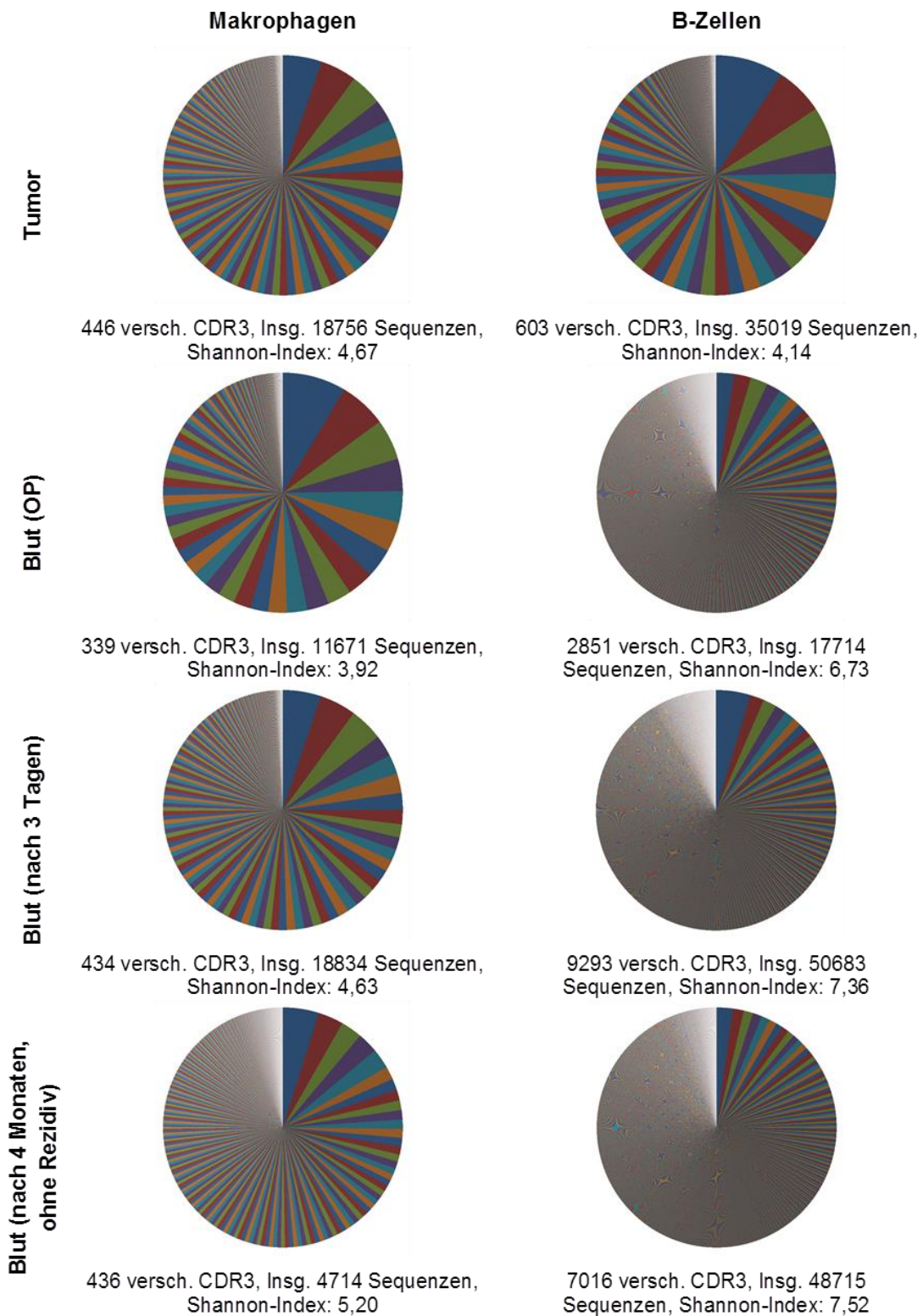


Abbildung S 10: CDR3-Variabilität nach Tumorresektion (Lambda-Leichtketten VP02)