

Aus der Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Sergij Goerdts)

Charakterisierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors P2Y₁₄ in
Tumor-assoziierten Makrophagen im In-vitro-Modell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Andreas Krewer

aus
Saarbrücken
2023

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent(in): Frau Prof. Dr. Astrid Schmieder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Makrophagen.....	1
1.1.1 Entstehung und Verteilung	1
1.1.2 Funktionen	3
1.1.3 Aktivierung und Polarisation	4
1.1.4 Makrophagen im Kontext verschiedener Erkrankungen.....	6
1.2 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM).....	8
1.2.1 Tumor-assoziierte Makrophagen im Tumor Microenvironment solider Tumore .	8
1.2.2 Polarisation und Funktionen Tumor-assoziiierter Makrophagen	9
1.2.3 Therapeutische Implikationen.....	12
1.3 P2Y14.....	13
1.3.1 Purinerge Signaltransduktion.....	13
1.3.2 Struktur und Signalweg von P2Y14	16
1.3.3 Verteilung und Funktion von P2Y14.....	17
1.4 Vorarbeiten.....	19
1.5 Ziele der Arbeit	20
2. Methoden	21
2.1 Zellkultur.....	21
2.1.1 Verwendete Zelllinien	21
2.1.2 Kryokonservierung von Zellen	21
2.1.3 Isolation von CD14 ⁺ Zellen aus humanen peripheren Blutproben	22
2.1.4 Lentivirus-Herstellung zur Transduktion eukaryoter Zellen	23
2.1.5 Herstellung transgener Zelllinien	23
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese	24
2.2.2 Klonierung von P2Y14 und Herstellung eines Expressionsvektors	24
2.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)	26
2.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	26
2.2.5 Microarrays	27
2.3 Biochemische Methoden	28
2.3.1 Proteinisolation und -quantifizierung.....	28
2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.3.3 Western Blot (WB).....	29

2.3.4	Immunzytochemie (ICC).....	29
2.3.5	Immunhistochemie (IHC).....	30
2.3.6	Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)	30
2.3.7	Herstellung eines anti-hsP2Y14 Antikörpers.....	31
2.3.8	Calcium-Influx-Assay.....	31
2.4	Statistik.....	31
3.	Materialien.....	32
4.	Ergebnisse	39
4.1	Charakterisierung der P2Y14 Expression in pBMC und U937 Zellen.....	39
4.1.1	Stimulation von pBMC mit MDI führt zur Hochregulation der P2Y14-Genexpression	39
4.1.2	Dexamethason, IFN- γ , TNF- α und LPS sind Induktoren der P2Y14-Genexpression in pBMC.....	41
4.1.3	P2Y14 Genexpression kann in PMA-differenzierten U937-Zellen durch Dexamethason und IL-4 induziert werden	42
4.2	Charakterisierung der Proteinexpression von P2Y14.....	43
4.2.1	Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen P2Y14 und Spezifitätstestung mittels transfizierten U937 und HEK 293	43
4.2.2	MDI-stimulierte pBMC weisen eine höhere Proteinexpression von P2Y14 auf.....	43
4.2.3	Sowohl M1- als auch M2-ähnliche Makrophagen weisen eine erhöhte P2Y14 Proteinexpression auf.....	46
4.2.4	Charakterisierung des Antikörpers in IHC-Färbungen dermatoonkologischer Pathologien	46
4.3	Funktionelle Charakterisierung von P2Y14 in U937 und MDI-behandelten pBMC ...	48
4.3.1	Stimulation mit P2Y14-Agonisten führt zu einem intrazellulären Calcium-Anstieg in transgenen U937 und MDI-stimulierten pBMC	48
4.3.2	Microarray-Analysen von mit P2Y14-Agonisten stimulierten MDI-pBMC	49
5.	Diskussion.....	52
5.1	P2Y14 Genexpression in humanen Makrophagen in vitro.....	52
5.2	P2Y14 Proteinexpression in humanen Makrophagen in vitro	53
5.3	Funktionelle Charakterisierung von P2Y14-Agonisten in humanen Makrophagen ...	54
5.4	Abschließende Bemerkungen.....	56
6.	Zusammenfassung	57
	Literaturverzeichnis	VI
	Abbildungsverzeichnis	XVII
	Lebenslauf	XVIII
	Danksagung.....	XIX

Abkürzungsverzeichnis

ÄF	<i>Änderungsfaktor</i>
aMDM	<i>adult monocytic-derived macrophages</i>
ANXA3	<i>Annexin A3</i>
Arg-1	<i>Arginase 1</i>
ATP	<i>Adenosin-Triphosphat</i>
BMDM	<i>bone marrow-derived macrophages</i>
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCL	<i>Chemokin (C-C Motiv)-Ligand</i>
CCR	<i>C-C chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CED	<i>chronisch-entzündliche Darmerkrankung</i>
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CLEC4F	<i>C-Type lectin domain family 4 member F</i>
COPD	<i>Chronisch obstruktive Lungenerkrankung</i>
CRP	<i>C-reaktives Protein</i>
CSF1R	<i>Colony stimulating factor 1-Rezeptor, Colony stimulating factor 1 receptor</i>
CT316	<i>Antikörper gegen Region 316 bis 338 des C-Terminus der P2Y14-Primärsequenz</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4</i>
CX3CR	<i>C-X3-C motif chemokine receptor</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DC	<i>dendritische Zellen</i>
DMEM	<i>Dulbeccos's modified eagle medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
dNTP	<i>Desoxyribonukleosidtriphosphate</i>
DS-MΦ	<i>Dottersack entstammende Makrophagen</i>
EBSS	<i>Earl's balanced salt solution</i>
ECM	<i>extrazelluläre Matrix</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
E _{Gen}	<i>Primereffizienz</i>
EMP	<i>Erythromyeloide Progenitorzellen</i>
EMT	<i>epithelial to mesenchymal transition</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ER	<i>endoplasmatisches Retikulum</i>
EtOH	<i>Ethanol</i>
EV	<i>Empty vector</i>
F/F0	<i>Fluoreszenzquotient</i>
F4/80	<i>Egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FAP	<i>Fibroblast activation protein</i>
FCRLs	<i>Fc receptor-like molecules</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
fMDM	<i>fetal monocytic-derived macrophages</i>
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
FOLR2	<i>Folate receptor beta encoding gene</i>
FoxP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
FSB	<i>FACS-Surface-Puffer</i>
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
GC	<i>Glukokortikoide</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
HEXB	<i>Hexosaminidase subunit beta</i>

Abkürzungsverzeichnis

HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
hs	<i>homo sapiens</i>
HSC	<i>Hämatopoetische Stammzellen</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
ICC	<i>Immunzytochemie</i>
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
Ig	<i>Immunglobulin</i>
IHC	<i>Immunhistochemie</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IL2RB	<i>Interleukin 2 receptor subunit beta</i>
iNOS	<i>induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase</i>
IP ₃	<i>Inositol-1,4,5-trisphosphat</i>
KEGG	<i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
LDL	<i>low-density Lipoprotein</i>
LF	<i>Leberfibrose</i>
LFA	<i>Lymphocyte function-associated antigen</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
Ly6C	<i>Lymphocyte antigen 6 family member C</i>
LYVE-1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i>
MACS	<i>magnetic associated cell sorting</i>
MAP	<i>mithogen-activated protein</i>
MARCO	<i>Macrophage receptor with collagenous structure</i>
MCSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MDI	<i>MCSF + Dexamethason + IL-4</i>
MERTK	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER</i>
MFI	<i>median of fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIF	<i>MCSF + INF-γ</i>
MIFT	<i>MCSF + IFN-γ + TNF-α</i>
MIL	<i>MCSF + IL-4</i>
MIR	<i>microRNA</i>
MIT	<i>MCSF + TNF-α</i>
MMP	<i>Matrix-Metalloproteinase</i>
MMT	<i>macrophage-to-myofibroblast transition</i>
MPS	<i>Mononukleär-Phagozytäres System</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSR1	<i>macrophage scavenger receptor</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
PAGE	<i>Polyacrylamid Gel-Elektrophorese</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
pBMC	<i>periphere Blutmonozyten</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-5M	<i>PBS + 5% Magermilchpulver</i>
PBST	<i>PBS + 0,1% Tween 20</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDI	<i>PMA + Dexamethason + IL-4</i>
PDI + M	<i>PDI + Mifepriston</i>
PFA	<i>Perfluoralkoxy-Polymere</i>
PI3K/Akt	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase/Protein Kinase B</i>
PIFT	<i>PMA + IFN-γ + TNF-α</i>
PIL	<i>PMA + IL-4</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PMA	<i>Phorbol-12-myristat-13-acetat</i>
pMacs	<i>prä-Makrophagen</i>
PPT	<i>Palmitoyl-Protein-Thioesterase</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PVDF	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>

Abkürzungsverzeichnis

RANK	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
RANK-L	<i>Receptor Activator of NF-κB - ligand</i>
RIPA-Puffer	<i>Radioimmunoprecipitation assay Puffer</i>
RPL7	<i>Ribosomal Protein L7</i>
Runx1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SALL1	<i>spalt like transcription factor 1</i>
scRNA-seq	<i>Single cell RNA sequencing</i>
SD	<i>Standarddeviation</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
Siglec	<i>Sialic acid binding Ig-like lectin</i>
SIGNR1	<i>specific intracellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin homolog-related 1</i>
SIRP α	<i>Signal regulatory protein α</i>
SLAM	<i>Signaling lymphocyte activation molecule</i>
SO	<i>Secondary antibody only</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	<i>TRIS-Acetat-EDTA-Puffer</i>
TAM	<i>tumor-assoziierte Makrophagen</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGS	<i>Tris-Glycine-SDS Puffer</i>
Tie2	<i>Tyrosine-protein kinase receptor TIE-2</i>
TIM4	<i>T-cell membrane protein 4</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMEM119	<i>Transmembrane protein 119</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
UBE	<i>ubiquitin-conjugating enzymes</i>
UDP	<i>Uridindiphosphat</i>
UDP-NAG	<i>UDP-N-Acetyl-Glukosamin</i>
VCAM1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VISTA	<i>V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation</i>
WB	<i>Western Blot</i>
ZNS	<i>Zentrales Nervensystem</i>

1. Einleitung

1.1 Makrophagen

Makrophagen sind eine stark heterogene Zellpopulation mit unterschiedlichsten Aufgaben und Funktionen¹. Von Nobelpreisträger Elie Metchnikoff 1883 erstmals in ihrer Funktion als Phagozyten beschrieben², sind sie neben dendritischen Zellen, Granulozyten und natürlichen Killerzellen ein wichtiges Element der angeborenen Immunabwehr. Als gewebständige Makrophagen sind sie darüber hinaus aber auch ein wichtiger Faktor für den Erhalt der Homöostase verschiedener Gewebe¹. Aus in-vitro- und in-vivo-Differenzierungsstudien von Monozyten, entstand in den 70er-Jahren des vergangenen Jahrhunderts das Konzept des mononukleär-phagozytären Systems (MPS)³. Hiernach werden die in der Blutbahn zirkulierenden Monozyten aus myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks gebildet, wandern auf inflammatorische Stimuli hin in verschiedene Gewebe aus und differenzieren dort zu Makrophagen⁴. Während dies für einen Teil der gewebständigen Makrophagen, insbesondere im inflammatorischen Kontext zutrifft, so stellt es für einen großen Anteil dieses Zelltypus dennoch eine übermäßige Vereinfachung der biologischen Vorgänge dar. Seit der Entdeckung von Makrophagen-spezifischen Oberflächenmarkern wie F4/80 in der Maus und CD68 im Menschen wurde die weite Verbreitung und Heterogenität der unterschiedlichen Makrophagen-Unterarten mehr und mehr offenkundig⁵⁻⁷. Neuere Untersuchungsmethoden wie Einzelzell-RNA-Sequenzierungen (scRNA-seq) und Transkriptionsfaktor-basiertes Fate-Mapping im Maus-Modell zeigen in nahezu allen Gewebearten die Koexistenz verschiedener Makrophagen-Unterpopulationen unterschiedlichen ontogenetischen Ursprungs.

1.1.1 Entstehung und Verteilung

Während der Embryonalentwicklung gehören Makrophagen neben den Erythrozyten zu den ersten hämatopoetischen Zellen, beginnend bereits mit der Bildung primitiver Makrophagen in den Blutinseln des Dottersacks⁸. Im weiteren Verlauf durch erythromyeloide Progenitorzellen (EMP)⁹ gebildet, wandern diese prä-Makrophagen (pMacs) schon ab Tag 9 der Embryonalentwicklung C-X3-C motif chemokine receptor (CX3CR1)-vermittelt in nahezu alle Organanlagen ein und orchestrieren die jeweilige Organogenese als differenzierte, gewebständige Makrophagen mit¹⁰. Diese Differenzierung findet bereits früh durch den Colony stimulating factor 1-Rezeptor (CSF1R) vermittelt statt, gewebeabhängig ausgelöst durch die Agonisten Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) oder Interleukin-34 (IL-34) (s. Tab. 1)¹¹. Nach Übernahme der definitiven Hämatopoese durch hämatopoetische Stammzellen (HSC), zunächst in der aorto-gonadalen-mesonephrischen Region, dann zunehmend abgelöst durch die fetale Leber, werden im weiteren Verlauf auch Monozyten gebildet, welche sich als ausgewanderte, gewebständige Makrophagen an der Kolonisation der Organe beteiligen (fMDM; fetal monocyctic-derived macrophages)¹². Dieser Vorgang persistiert auch nach der Geburt und im adulten Organismus weiter (aMDM, adult monocytic-derived macrophages). Ursprünglich dem Dottersack entstammende Makrophagen (DS-MΦ), fMDM und aMDM bilden eng miteinander in wechselseitiger Beziehung stehende Unterpopulationen der Gesamtheit der Makrophagen des jeweiligen Gewebes^{9, 13, 14}. Ausgehend von der Homöostase des jeweiligen Organismus, findet sich dabei ein jeweils organspezifisches Aufteilungsverhältnis dieser Zellen¹⁴. So sind beispielsweise Mikroglia des ZNS nahezu ausschließlich aus Makrophagen des Dottersacks hervorgegangen und können sich nach Depletion auch ohne Unterstützung durch einwandernde Monozyten innerhalb weniger Tage eigenständig rekonstituieren^{15, 16}. Dagegen werden intestinale Makrophagen der Darmwand und die des Uterus kontinuierlich durch einwandernde Monozyten erneuert^{17, 18}. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte drei über diverse Gewebe der Maus – inklusive Leber, Gehirn, Niere, Herz und Lunge – konservierte Expressionsklassen von Makrophagen feststellen:

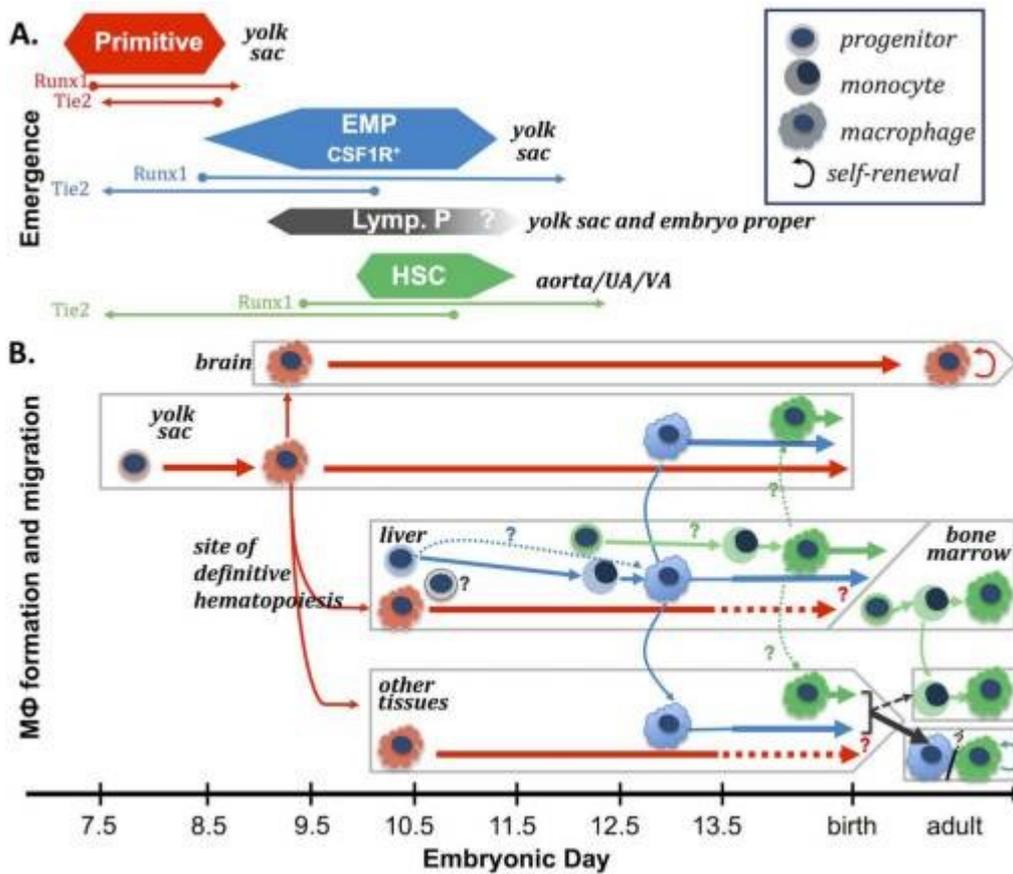


Abb. 1 – Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Makrophagen-Ontogenese in der Maus und der Expression der zur Abstammungsverfolgung (Lineage Tracing) herangezogenen Promoter Runx1 (Runt-related transcription factor 1) und Tie2 (Tyrosine-Protein Kinase Receptor TIE-2). Nach McGrath et al. (2015)

TLF⁺ (TIM4⁺ und/oder LYVE-1⁺ und/oder FOLR2⁺) Makrophagen-Populationen erhielten sich eigenständig mit nur minimaler Monozyten-Einwanderung, wohingegen CCR2⁺ (TIM4⁻LYVE-1⁻FOLR2⁻) Makrophagen nahezu vollständig durch zirkulierende Makrophagen ersetzt wurden. Als dritte Untergruppe identifizierten die Forscher MHC-II^{hi} (TIM4⁻LYVE-1⁻FOLR2⁻CCR2⁻) Makrophagen, die nur einen moderaten Zustrom von aMDM erhielten¹⁴. Auch wenn lokal ansässige Makrophagen-Populationen der meisten Gewebe sich in physiologischem Zustand durch Proliferation selbst erhalten, so können sie dennoch durch auswandernde adulte Monozyten in Fällen ersetzt werden, in denen durch Gewebeuntergang oder gezielte Makrophagen-Depletion diese Regeneration eingeschränkt ist. Diese Re-Kolonisation ist dabei ein meist dauerhafter Ersatz und von dem auf inflammatorische Stimuli hin eher kurzweiligen Verbleib von zu Makrophagen differenzierten Monozyten abzugrenzen¹⁹.

Die große Diversität der gewebständigen Makrophagen ist dabei nicht ausschließlich anhand ontogenetischer Faktoren zu erklären. Vielmehr ist zusätzlich von einer Vielzahl unterschiedlicher Stimuli aus der jeweiligen Mikroumgebung auszugehen, die auf transkriptioneller, epigenetischer und/oder metabolischer Ebene Wirkung zeigen²⁰. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass sich Monozyten und Makrophagen an vergangene Begegnungen mit mikrobiellen als auch nicht-mikrobiellen Einflüssen „erinnern“ können²¹. Zudem ist neben den Makrophagen auch bei den Monozyten eine große Heterogenität zu beobachten. Diese werden anhand diverser Expressionsmarker in klassische oder inflammatorische (Ly6C⁺CCR2⁺CX3CR1⁻ in der Maus, CD14⁺CD16⁻ im Menschen) und nicht-klassische oder patrouillierende Monozyten (Ly6C⁻CCR2⁻ CX3CR1⁺ in der Maus, CD14⁻ CD16⁺ im Menschen) eingeteilt²². Klassische Monozyten haben dabei eine eher geringe Lebensspanne, zirkulieren in der Blutbahn, bis sie auf inflammatorische Stimuli hin auswandern und zu Makrophagen oder dendritische Zellen (DC) differenzieren^{18, 23}. Nicht-klassische Monozyten können aus klassischen hervorgehen und sind maßgeblich am Erhalt der endothelialen Homöostase der Blutgefäße beteiligt²².

Hierbei patrouillieren diese Monozyten LFA1/ICAM1-vermittelt mit oder auch gegen den Blutstrom am Endothel entlang, vermitteln die Nekrose alter oder strukturschwacher Endothelzellen durch neutrophile Granulozyten und phagozytieren die Zellreste²⁴. Auch wenn diese Zellen unter physiologischen Bedingungen vor allem durch ihre prohomöostatischen und antiinflammatorischen Eigenschaften auffallen, so gibt es eine zunehmende Zahl an Studien, die auf eine Beteiligung an der Pathophysiologie meist autoimmun geprägter Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, Atherosklerose oder dem systemischen Lupus erythematoses schließen lassen²⁶. Obschon diese Heterogenität von Monozyten und Makrophagen die Erforschung populationspezifischer Funktionsprofile erschwert, so ist doch von gewissen funktionellen Synergien in dem jeweiligen Gewebe auszugehen. Zusätzlich dazu bedingen die proliferative Kapazität einzelner Unterpopulationen sowie die Regeneration über die Einwanderung und Ausdifferenzierung adulter Monozyten die hohe Plastizität des Systems.

1.1.2 Funktionen

Die nahezu ubiquitäre Verbreitung und große Heterogenität der Makrophagen bilden den Hintergrund für eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen. Grob können hierbei zwei Hauptfunktionen voneinander abgegrenzt werden: gewebspezifische – meist homöostatische – und inflammatorische Funktionen. Letztere umfassen Reaktionen als Teil des angeborenen Immunsystems, ausgelöst beispielsweise durch mikrobielle Infektionen oder Gewebeuntergang. Auf zellulärer Ebene greifen Makrophagen hierfür auf eine Reihe konservierter, durch Transkriptom-Analysen bereits in pMacs nachgewiesener Kernfunktionen zurück: Efferozytose mittels TIM4, MERTK und/oder SIRP α , opsonierungsabhängige Phagozytose über CD64, CD16, CD16.2 und/oder CD11b, opsonierungs-unabhängige Phagozytose mittels der Rezeptoren CD14, CD36, Dektin-1 und/oder CD206 sowie Komplement-vermittelte Immunreaktionen mittels C1qB, C1qC und dem C3a-Rezeptor^{10, 12}. Diese zellulären Kompetenzen spielen eine zentrale Rolle im Erhalt der jeweiligen Gewebekomöostase, da sie u. a. die Entfernung abgestorbener Zellreste, die Reinigung und den Erhalt der extrazellulären Matrix sowie die Wiederverwertung körperl wichtiger Substanzen wie Eisen in der Milz oder Calcium im Knochen

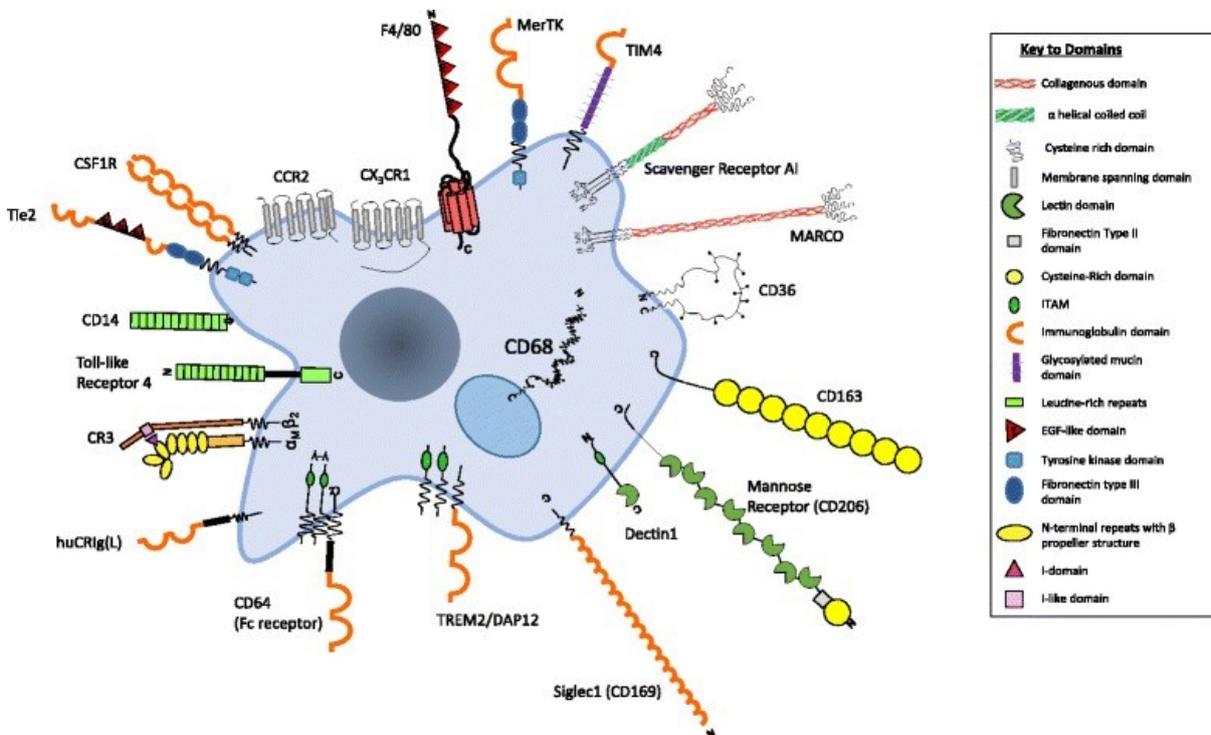


Abb. 2 – Schematische Darstellung der wichtigsten Oberflächenrezeptoren auf Makrophagen und ihren Unterarten. Nach Gordon et al. (2017)

ermöglichen. Einen Überblick über die prominentesten Makrophagen-Unterarten und ihre jeweiligen Funktionen gibt hierbei Tabelle 1.

Diese Kernfunktionen und ihre weite Verbreitung machen Makrophagen aber auch zu einem wichtigen Teil des angeborenen Immunsystems und bilden eine erste Barriere, die es für eindringende Erreger zu überwinden gilt. Durch die Expression einer großen Zahl von „Pattern recognition receptors“ (PRR) werden Makrophagen einerseits mittels Erkennung von pathogen-assoziierten Molekülmustern („pathogen-associated molecular patterns, PAMP) aktiviert – Moleküle, die nicht von höheren Eukaryoten produziert werden, aber etwa typische Bestandteile viraler Nukleinsäuren oder der Zellmembran von Bakterien oder Pilzen sind – andererseits auch von Zellschaden-assoziierten Molekülmustern („damage-associated molecular patterns“; DAMP) – typischerweise intrazellulär vorkommende Moleküle, deren extrazelluläres Vorkommen damit als Warnsignal eines nahegelegenen Zelluntergangs interpretiert wird²⁷. PRRs werden von allen Zellen in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Zu ihnen zählen die große Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR), die nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)- Leucin Rich Repeats (LRR)-containing receptors (NLR), die retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1) -like receptors (RLR) und die C-Typ Lektinrezeptoren (CLR)²⁷. Die Aktivierung von PRRs in Makrophagen zieht dabei unterschiedliche Zellreaktionen nach sich, dazu zählen die parakrin vermittelte Chemotaxis, oxidative Bursts über reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies sowie Phagozytose mit anschließender Antigen-prozessierung und -präsentation mit darüber vermittelter Aktivierung der adaptiven Immunabwehr.

1.1.3 Aktivierung und Polarisation

Makrophagen besitzen die Fähigkeit, sich durch einen charakteristischen Wechsel ihres Expressionsprofils dynamisch an verschiedene Stimuli in ihrer Umgebung anzupassen, um so teils sehr unterschiedliche Aufgaben erfüllen zu können. Dieser Vorgang wird im Allgemeinen als Polarisation bezeichnet und ist als eher kurzfristiger und reversibler Vorgang von der weitgehend unumkehrbaren Zelldifferenzierung abzugrenzen. In Anlehnung an die Th1/Th2-Dichotomie findet das Modell der M1/M2-Polarisation breite Verwendung in der Literatur. Dieses beschreibt ein Kontinuum unterschiedlicher Makrophagen-Phänotypen mit M1 und M2 als sich gegenüberliegende Extreme. Hierbei beschreiben M1-Makrophagen einen überwiegend proinflammatorischen Makrophagentyp nach Aktivierung durch Lipopolysaccharide (LPS) und Interferon- γ (IFN- γ) oder Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α). M1-Makrophagen waren lange Zeit der einzig bekannte Phänotyp von Makrophagen, so dass sie auch als klassisch-aktivierte Makrophagen bezeichnet werden. Auf Aktivierung produzieren diese Zellen, hauptsächlich NF- κ B und STAT1-vermittelt, große Mengen proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-23 und IL-12 und exprimieren vermehrt MHC-II, CD80 und CD68. In Mausexperimenten konnte zudem gezeigt werden, dass diese Zellen eine vermehrte Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) aufweisen, die über die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) einen Immunmechanismus gegen Pathogene darstellt^{28, 29}. Mit diesem Expressionsprofil und der erhöhten Endozytosekapazität stellen M1-Makrophagen Schlüsselfiguren in der Abwehr mikrobieller Bedrohungen dar. M2-Makrophagen dagegen werden auch als alternativ-aktivierte Makrophagen bezeichnet und beschreiben einen überwiegend antiinflammatorischen Subtyp nach Aktivierung durch die Th2-Zytokine IL-4 oder IL-13^{29, 30}. Der M2-Phänotyp wird dabei über die Induktion der Transkriptionsfaktoren STAT6, IRF4, JMJD3, PPAR δ , und PPAR γ vermittelt²⁹ und ist charakterisiert durch eine vermehrte Expression antiinflammatorischer Zytokine wie Transforming growth factor beta (TGF- β) und IL-10 sowie Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Überdies exprimieren diese Zellen geringere Mengen MHC-II, dafür finden sich vermehrt CD206, CD163 und Stabilin-1²⁸. Funktionell sind M2-Makrophagen an der Bekämpfung von Parasiten und Pilzen beteiligt, aber auch an Angiogenese und Matrix-Umbau und werden häufig als Schlüsselfiguren zum Erhalt der Gewebeintegrität und Wundheilung angesehen. Über die höhere Expression von Arginase 1 (Arg-1) beteiligen sich M2-Makrophagen zudem an der Immunsuppression von T-Zellen. Ein M2-ähnlicher Phänotyp wurde auch

Tabelle 1: Makrophagen-Unterarten und ihre Funktionen

MΦ Unterart	Lokalisation	Typische Marker	Funktion	Ontogenese
Kupfer-Zellen	Leber / Sinusoide	F4/80, CD169, CLEC4F	Phagozytose von Pathogenen und blutständigen Partikeln, Beteiligung am Lipidmetabolismus	Überwiegend DS-MΦ
Rote Pulpa-MΦ	Milz / Rote Pulpa	F4/80, VCAM1, SIRPα	Phagozytose alter Erythrozyten, Häm-Abbau und Eisenrecycling	gemischt, überwiegend DS-MΦ
Marginalzonen-MΦ	Milz / Marginalzone	SIGNR1, MARCO	Immunfunktion, enge funktionelle Verflechtung mit Marginalzonen B-Zellen	monozytär
Metallophile MΦ	Milz / Marginalzone	CD169	Phagozytose von Pathogenen, indirekte T Zell-Aktivierung	monozytär
Alveolar-MΦ	Lunge / Alveolen	Siglec-F, MARCO	Surfactant Homöostase	fetal monozytär
Interstitielle MΦ	Lunge / Interstitium	CD68, F4/80, CD11c	Immunfunktion, Toleranzentwicklung ggü. Allergenen der Luft durch DC-Modulation	gemischt
Langerhans-Zellen	Haut / Epidermis	CD11c, MHC-II, EpCAM	Immunfunktion, Toleranzentwicklung ggü. Kontaktallergenen	fetal monozytär; IL34-vermittelt
Osteoklasten	Knochen	RANK	Mehrkernige Zellen, Knochenresorption	Myeloide Progenitorzellen, Monozyten, Fusion differenzierter Makrophagen; MCSF+RANK-L-vermittelt
Intestinale-MΦ	Darm / Lamina Propria	F4/80, CX3CR1	Immunfunktion, Toleranzentwicklung ggü. endoluminalen Allergenen	monozytär
Mikroglia	ZNS / Parenchym	CX3CR1, CD45, FCRL5, Siglec-H, P2Y12, HEXB, TMEM119, ANXA3, SALL1	Immunfunktion, Förderung von Gehirnentwicklung und neuronaler Funktion, beteiligt an synaptischem Remodeling	DS-MΦ ; IL-34-abhängig
ZNS-assoziierte MΦ ("Border-associated macrophages")	ZNS / perivaskulär, meningeal, Plexus choroideus	CD206, CD38, LYVE1, CD36, CD163, CD169	Immunfunktion, Antigenpräsentation, perivaskuläre MΦ an Regulation der Blut-Hirn-Schranken Permeabilität beteiligt.	monozytär

Quellen: 31-34

nach Stimulation der Makrophagen mit TGF- β , Glukokortikoiden (GC), IL-6 und IL-10 beobachtet. Um der steigenden Zahl beschriebener Makrophagen-Subtypen Rechnung zu tragen, wurde das M1/M2-Modell um eine zusätzliche Unterteilung der M2 Makrophagen in M2a, M2b, M2c und M2d erweitert (s. Abb. 3)^{35, 36}. Einen weiteren Versuch zur Unterteilung von Makrophagen erarbeiteten Mosser und Edwards. Sie unterschieden dabei klassisch-aktivierte, regulatorische und Wundheilungs-Makrophagen und betrachteten diese als Ankerpunkte eines mehrdimensionalen Modells, das eine Fülle von Hybridformen ermöglicht³⁷. Die bislang entwickelten theoretischen Modelle und insbesondere das M1/M2-Schema können dabei allerdings die große Diversität der in vivo vorgefundenen Expressionsformen von Makrophagen³⁸ nur unzureichend abbilden, so dass eine enge Limitation des Modells auf definierte in-vitro-Versuchsumgebungen festzustellen ist³⁹.

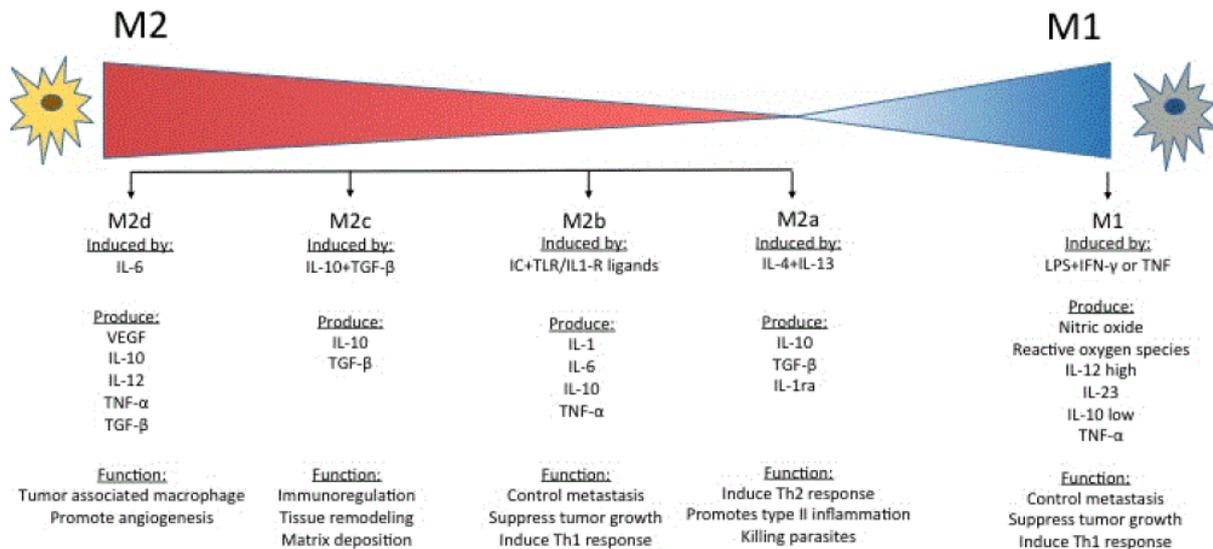


Abb. 3 – M1/M2-Polarisations-Modell zur Unterteilung unterschiedlicher Expressionsformen von Makrophagen. Nach Curren Smith et al. (2015)

1.1.4 Makrophagen im Kontext verschiedener Erkrankungen

Die große Diversität im Kontext von Ontogenese und Polarisation sowie die nahezu ubiquitäre Verbreitung und funktionelle Beteiligung von Makrophagen an unterschiedlichsten Körperprozessen bedingen ihre große Bedeutsamkeit für eine Reihe von Erkrankungen. Dies erstreckt sich nicht nur auf primär infektiöse Erkrankungen, sondern auch auf chronisch-entzündliche Erkrankungen, die charakteristisch durch eine Dysregulation immunmodulatorischer Mechanismen gekennzeichnet sind. Da es nicht dem Rahmen dieser Arbeit entsprechen würde, alle hierzu zählenden Erkrankungen vorzustellen, ist der folgende Abschnitt nur als eine Auswahl zu betrachten.

Atherosklerose und metabolisches Syndrom

Folgeerkrankungen einer Atherosklerose wie die koronare Herzkrankheit, Myokardinfarkte und ischämisch bedingte Schlaganfälle zählen weiterhin zu den Haupttodesursachen in Deutschland⁴⁰. Im Entstehungsprozess der Atherosklerose dringen erhöhte Mengen von low-density Lipoprotein (LDL) im Blut durch Intimaläsionen in die Blutgefäßwand ein, oxidieren und führen dort zu einem sterilen Entzündungsprozess durch die Induktion und Rekrutierung patrouillierender Monozyten und Makrophagen. Durch die übermäßige Phagozytose des oxidierten LDL immobilisieren diese Zellen und tragen durch Akkumulation zur Plaquebildung bei⁴¹. TLR4-Aktivierung durch das oxidierte LDL polarisiert diese zu M1 Makrophagen, die u. a. durch Sekretion von IL-1 β den fortschreitenden Entzündungsprozess fördern, der durch nekrotisierende Prozesse und die Aktivität von MMPs zur

Plaueinstabilität und schlussendlich Plaqueruptur führt. Klinische Versuche eines IL-1 β Antikörpers führten entsprechend zu einer geringeren Rate kardiovaskulärer Ereignisse⁴¹. Nach Plaqueruptur und hieraus folgendem kardialen Gefäßverschluss sind M1-Makrophagen darüber hinaus an der Aufrechterhaltung der Inflammation und dem fibrotischen Umbau des Myokards nach einem ischämischen Ereignis beteiligt⁴². Zu den Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose zählen u. a. die arterielle Hypertonie, Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels wie Diabetes mellitus Typ II, Dyslipoproteinämie und Adipositas – häufig auch zusammengefasst zum metabolischen Syndrom. Diesem liegt eine chronisch-systemische Inflammation zugrunde, mit charakteristischer, niederschwelliger Erhöhung zirkulierender inflammatorischer Zytokine oder Akut-Phase-Proteine wie IL-6, TNF- α , C-reaktivem Protein (CRP) und Fibrinogen. Dies korreliert mit einer höheren Anzahl M1-polarisierter Makrophagen im Fettgewebe adipöser Erwachsener sowie einer mit dem Body-Mass-Index (BMI) steigenden Anzahl an Makrophagen pro 100 Adipozyten⁴³. Diese M1-Makrophagen produzieren proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF- α und iNOS und unterhalten somit einen chronischen Entzündungszustand des Fettgewebes, der mit einer Reduktion der mitochondrialen oxidativen Kapazität sowie einer Zunahme der peripheren Insulinresistenz in Verbindung gebracht werden konnte⁴⁴. In normal-gewichtigen Individuen ist dagegen ein M2-Phänotyp vorherrschend, mit Sekretion antiinflammatorischer Moleküle wie IL-4, IL-5, und IL-10⁴⁴⁻⁴⁶. Der Phänotypwechsel und die erhöhte Makrophagenanzahl im Fettgewebe sind dabei durch Gewichtsabnahme (z. B. nach Magenbypass), aber auch durch regelmäßige sportliche Betätigung reversible Vorgänge^{43, 47}.

COPD und Asthma bronchiale

Ebenfalls eine Erkrankung, die Folge einer chronischen Entzündungsreaktion darstellt und bei der Makrophagen eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie spielen, ist die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD). Hauptrisikofaktor für die Entstehung dieser Erkrankung ist die Langzeitexposition gegenüber inhalativen Noxen, vor allem Zigarettenrauch. Sie ist maßgeblich durch die Obstruktion der chronisch entzündeten Bronchialwege sowie durch Ausbildung eines Emphysems infolge der fortschreitenden Gewebeerstörung im Lungenparenchym gekennzeichnet. Makrophagen sind in ihrer Barrierefunktion früh durch die Inhalation gesundheitsschädlicher Partikel betroffen⁴⁸. Im Sputum und Lungenbiopsaten von COPD-Patienten findet sich eine bis zu 20-fach höhere Zahl an Makrophagen, die mit fortschreitender Erkrankung jedoch deutlich in ihren Fähigkeiten zur Phagozytose bakterieller Erreger und Efferozytose abgestorbener Zellen beeinträchtigt sind⁴⁸. Gleichzeitig sezernieren diese Makrophagen hohe Mengen an IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF und MMPs und unterhalten damit die pathologischen Prozesse durch Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Zerstörung oder Umbau der extrazellulären Matrix (ECM) mit daraus folgender Gewebedestruktion⁴⁹. Hierbei finden sich interessanterweise Makrophagen, die M1-, M2-, beide oder keine Markermoleküle aufweisen, weshalb es derzeit die Auffassung gibt, dass möglicherweise die dauerhaft unterschwellige Inflammation, die zur Entstehung und Aufrechterhaltung der COPD führt, als Folge dieser Koexistenz pro- und antiinflammatorischer Einflüsse angesehen werden kann⁴⁹. Neben der COPD zählt auch das allergische Asthma bronchiale zu den obstruktiven Lungenerkrankungen. Hierbei kommt es hauptsächlich Immunglobulin-E (IgE)-vermittelt zu einer Mastzelldegranulation mit Ausschüttung von Histamin, Bradykinin und Leukotrienen und anschließender Rekrutierung von Makrophagen, eosinophiler Granulozyten und Th2-Lymphozyten ins Lungenparenchym. Die vorherrschenden antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13 polarisieren Makrophagen in Richtung eines M2-Phänotyps, der durch Expression weiterer Zytokine und Chemokine die Rekrutierung zusätzlicher Th2-Zellen und eosinophiler Granulozyten positiv verstärkt^{50, 51}.

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Leberfibrose

Intestinale Makrophagen sind im physiologischen Zustand an der Erkennung und Diskriminierung potenziell pathogener Partikel und Bakterien, der Beseitigung abgestorbener Endothelzellen und der intestinalen Wundheilung beteiligt. Dabei sind PRRs – insbesondere TLRs – mechanistisch zentral für die Unterscheidung probiotischer von schädlichen Mikrobiota⁵². Durch die erhöhte Sekretion von IL-10 kommt es dabei jedoch zu einer verringerten TLR-vermittelten proinflammatorischen Reaktion als in

anderen Geweben. Dieser leicht antiinflammatorische Phänotyp von intestinalen Makrophagen vermeidet somit eine bakteriell induzierte Entzündungsreaktion im physiologischen Zustand⁵³. Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED) zeigen dagegen eine höhere Anzahl proinflammatorischer intestinaler Makrophagen, die eine erhöhte Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, und iNOS aufweisen^{54, 55}. Eine Beteiligung des IL-10-IL10R-Signalwegs ist hierbei anzunehmen, angesichts der schweren bereits im Kindesalter einsetzenden CED bei ererbtem Funktionsverlust dieses Signalwegs^{52, 56}. Eine häufige Komplikation im Rahmen einer CED stellen außerdem intestinale Strikturen dar, die auf dem Boden einer überschießenden Fibrosierung entstehen. Dies entsteht hauptsächlich durch die inadäquate Aktivierung von Makrophagen im Rahmen der chronischen Inflammation, die dadurch mittels Sekretion von TGF- β , Connective tissue growth factor (CTGF) und Fibroblast activation protein (FAP) zur Akkumulation und übermäßigen Aktivierung von intestinalen Myofibroblasten führen oder selbst zu Myofibroblasten umdifferenzieren (macrophage-to-myofibroblast transition, MMT)^{52, 57, 58}. Im gesunden Zustand dagegen kontrollieren Makrophagen die ECM-Produktion durch Induktion der zellulären Seneszenz von Myofibroblasten und ECM-Degradierung mittels MMPs⁵⁹. Ebenfalls durch überschießende ECM-Produktion gekennzeichnet ist die Leberfibrose (LF). Hierbei handelt es sich hauptsächlich um einen komplexen, überschießend-reparativen Prozess auf dem Boden einer chronischen Schädigung des Lebergewebes durch verschiedene Pathogene. Zentrale Schlüsselfiguren im Entstehungsprozess einer LF sind die hepatischen Sternzellen (Ito-Zellen), die nach Aktivierung hauptsächlich für die überschießende ECM-Produktion verantwortlich zeichnen^{60, 61}. Hepatische Makrophagen und Ito-Zellen zeigen sich dabei funktionell eng verstrickt. Durch Einflussnahme auf Ito-Zellen können Makrophagen die Produktion oder Degradation von ECM und damit die Aggravation oder Regression einer LF direkt beeinflussen^{62, 63}. Umgekehrt induzieren Ito-Zellen mittels des CCL2/CCR2-Signalweges die Rekrutierung und M2-Polarisation von Makrophagen und damit die Exazerbation der LF^{64, 65}. Eine M1-Polarisation der Makrophagen konnte dagegen mit der Regression einer LF in Verbindung gebracht werden⁶⁵.

Neben den dargestellten Erkrankungen wird eine nachgewiesene oder vermutete Beteiligung von Makrophagen aktuell ebenfalls bei der Entstehung oder Unterhaltung von Atemwegs- oder Nahrungsmittelallergien, chronischer Nierenerkrankungen, Sepsis, Synovialitiden u. a. aktiv untersucht^{50, 53, 66-69}. Insbesondere aber Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) im Rahmen solider Tumorerkrankungen sind aufgrund ihrer vielfältigen tumor-fördernden Eigenschaften und damit als potenzieller therapeutischer Ansatzpunkt von zentraler Bedeutung für die Forschung.

1.2 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM)

1.2.1 Tumor-assoziierte Makrophagen im Tumor Microenvironment solider Tumore

Nach kardiovaskulären Ereignissen stellen Krebserkrankungen die häufigste Todesursache in Deutschland dar⁴⁰. Aufgrund der enormen Heterogenität in Bezug auf Ursprungsgewebe, Zellzusammensetzung, Risikofaktoren, zugrundeliegender genetischer, epigenetischer und metabolischer Mechanismen, Immunogenität, Metastasierungstendenz, Suszeptibilität gegenüber unterschiedlichen Therapieformen u. a. bleibt ihre Erforschung nach wie vor eine schwierige Aufgabe. In den vergangenen Jahrzehnten zunehmend in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückte Faktoren bilden die tumor-induzierte Immunsuppression und Immunevasion von Tumorzellen, spätestens jedoch seit ihrer Aufnahme in die „Hallmarks of Cancer“⁷⁰. Dabei konzentriert sich ein großer Teil der Arbeit auf die tumor-induzierte Suppression von T-Zellen, vorwiegend CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen als den hauptverantwortlichen Wächtern zur Erkennung und Zerstörung entarteter oder infizierter Zellen. Mit der klinischen Anwendung der daraus entwickelten „Checkpoint-Inhibitoren“ konnte ein großer Erfolg im Kampf gegen verschiedene Krebsformen verzeichnet werden. Im Kontext dieser Forschungen fand

die in jedem Tumor einzigartig vorherrschende Mikroumgebung (Tumor microenvironment; TME) mehr und mehr Beachtung. Je nach Zusammensetzung kann von einem tumor-begünstigenden oder tumor-supprimierenden TME gesprochen werden⁷¹. Charakteristisch für ein tumor-begünstigendes TME sind eine hohe Anzahl M2 oder M2-ähnlicher tumor-assoziiertes Makrophagen, Th2-Zellen, Myeloid-derived suppressor cells (MDSC), N2 neutrophile Granulozyten, tolerogene dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen (Tregs) sowie erhöhte Konzentrationen der Zytokine und Chemokine IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , CCL2, angiogener Faktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF) und verschiedener Wachstumsfaktoren, darunter epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF) und fibroblast growth factor (FGF)⁷². Innerhalb eines tumor-supprimierenden TMEs dagegen sind Th1-Zellen, M1 Makrophagen, N1 neutrophile Granulozyten, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und dendritische Zellen sowie bioaktive Moleküle wie IL-2, IL-12, CXCL9 und CXCL10 vorherrschend⁷². IFN- γ und GM-CSF werden sowohl fördernde wie supprimierende Eigenschaften im TME zugeordnet und demonstrieren damit die Komplexität der unterschiedlichen TME⁷². Wichtig ist zudem festzustellen, dass hierbei nicht von einer binären Gegensätzlichkeit tumor-fördernder und tumor-supprimierender TME's ausgegangen werden kann, sondern dass tumor-individuelle Phänotypkombinationen und die daraus resultierenden Immunzellinteraktionen und Immunzell-Stroma-Interaktionen das jeweilige Gesamtbild determinieren⁷¹. Hierbei spielen insbesondere die Tumor- und Stromazellen eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Immunzellkomposition, insbesondere in Bezug auf Rekrutierung, Polarisierung und Funktion der einzelnen Zelltypen⁷¹.

Tumor-assoziierte Makrophagen spiegeln die in Abschnitt 1.1 dargelegte Heterogenität des makrophagozytären Systems wider. Analog zu den funktionellen Unterschieden von Makrophagen in verschiedenen gesunden Geweben, findet sich eine große Bandbreite von Expressionsformen von TAM zwischen den unterschiedlichen Tumorentitäten. Im Vergleich zum gesunden Gewebe weisen entartete Gewebe häufig eine deutlich höhere Zahl tumor-infiltrierender Makrophagen auf, wobei diese in vielen Tumorentitäten in Korrelation mit einer schlechteren Prognose der Tumorerkrankung steht²⁸. Je nach Tumor werden diese dabei aus rekrutierten zirkulierenden Monozyten und/oder der Expansion gewebständiger Makrophagen gebildet^{72, 73}. Beispielsweise konnte so in einem Mausmodell des duktales Pankreasadenokarzinoms die Expansion der gewebständigen Makrophagen um das 29-fache beobachtet werden⁷⁴. Dagegen waren in einer weiteren Studie 85 % der TAM im Glioblastom monozytären Ursprungs⁷⁵. Zentrale Rollen in der TAM-Rekrutierung, -Differenzierung und -Polarisierung spielen dabei die Signalwege der Ligand/Rezeptor-Konstellationen MCSF/CSF1R, CCL2/CCR2, CCL3/CCR1, CCL3/CCR5, CCL5/CCR5 und CX3CL1/ CX3CR1⁷². Diese Zytokine werden dabei entweder durch die Tumorzellen selbst oder infiltrierende Immunzellen sezerniert und vermitteln die Rekrutierung, Differenzierung und Polarisation von TAM. Einen weiteren Faktor bildet eine durch schnelles Tumorwachstum begünstigte Hypoxie des TME, in deren Folge durch die hohe Sekretion von VEGF-A, endothelin-2 und EMAPII ebenfalls TAM rekrutiert werden. So aktiviert, bilden diese die Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF)-1 α und -2 α , die als positive Feedback-Schleife die weitere TAM-Infiltration und die TAM-induzierte Angiogenese vorantreiben.

1.2.2 Polarisierung und Funktionen Tumor-assoziiertes Makrophagen

Die Polarisierung und damit auch die Funktion tumor-infiltrierender Makrophagen unterliegt einem merklichen Wandel im Laufe der Entwicklung eines Tumors. In der Initiationsphase und häufig auch darüber hinaus ist Tumorgewebe durch einen chronischen Entzündungszustand des Gewebes gekennzeichnet. Dies kann entweder Folge von Mutationen in Onkogenen wie RET, RES oder cMYC, (Über-)Aktivierung von NF- κ B- oder STAT3-involvierender Signalwege, aber auch Ursache der Tumorentstehung selbst sein – beispielsweise durch die chronische Irritation/Inflammation, die durch Zigarettenrauch in der Lunge ausgelöst wird²⁸. Als Folge davon finden sich in frühen Tumorphasen vermehrt M1- bzw. M1-ähnliche tumor-assoziiertes Makrophagen mit überwiegend tumor-supprimierenden Eigenschaften. Dies geschieht hauptsächlich durch die Rekrutierung und Aktivierung

zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen, aber auch durch die gesteigerte Expression von IL-12, IL-1 β und iNOS⁷⁶. Ferner bewirken M1-ähnliche tumor-assoziierte Makrophagen direkt die Apoptose-Induktion von Tumorzellen und sind Haupteffektorzellen der anschließenden Phagozytose. Mittels Antigenpräsentation durch die Makrophagen selbst und der IL-12 vermittelten Maturation antigen-präsentierender dendritischer Zellen werden zytotoxische T-Zellen aktiviert und entfalten darüber ihre tumor-supprimierende Wirkung. Ein erhöhtes Verhältnis von M1- zu M2-Makrophagen konnte mit einer längeren Überlebensrate und einem besseren Patienten-Outcome im Ovarialkarzinom, kolorektalen Karzinom, kleinzelligen Lungenkarzinom, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, Mammakarzinom und weiteren Tumorentitäten in Verbindung gebracht werden⁷⁷. Mit fortschreitendem Tumorwachstum beginnen die Tumorzellen vermehrt Zytokine wie MCSF, IL-10, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL12, VEGF und platelet-derived growth factor (PDGF) zu sezernieren und bedingen damit einen Übergang zu einer überwiegend M2 bzw. M2-ähnlichen Polarisation der TAM⁷⁸. In entwickelten Tumoren herrscht daher häufig ein M2-ähnlicher Phänotyp vor, entsprechend in Verbindung mit einer schlechteren Prognose^{76, 79}. Dieser Zusammenhang setzt sich aus einer Anzahl von Effekten zusammen, deren gemeinsame Basis in den prohomöostatischen und wundheilenden Attributen von M2- oder M2-ähnlichen Makrophagen zu finden ist: Förderung von Tumorwachstum, Invasivität, Metastasierungstendenz, Immunsuppression, Angiogenese, Therapieresistenz und Rezidivität⁷².

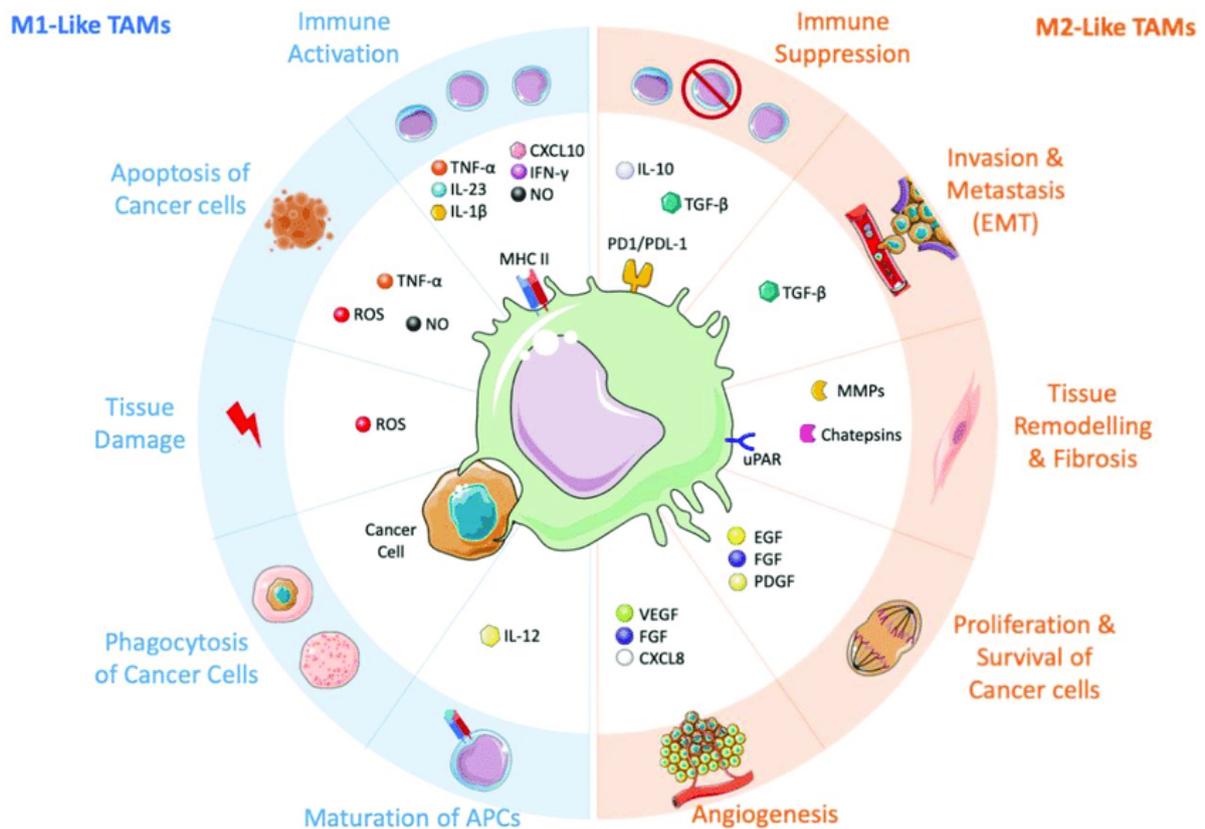


Abb. 4 – Schematische Gegenüberstellung der tumor-supprimierenden Eigenschaften M1-ähnlicher Makrophagen und der tumor-fördernden Eigenschaften M2-ähnlicher Makrophagen. Links: Tumor-Suppression M1-ähnlicher TAM durch Immunaktivierung mittels Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-23, IL-1 β , CXCL10, IFN- γ oder Antigenpräsentation über höhere Expression von MHC-II, direkte Zellschädigung durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Apoptoseinduktion von Tumorzellen über ROS, NO und TNF- α , Phagozytose von Tumorzellen sowie Aktivierung weiterer Antigen-präsentierender Zellen (APCs) mittels der Sekretion von IL-12. Rechts: Tumor-Promotion M2-ähnlicher TAM durch Immunsuppression mittels Sekretion von IL-10, TGF- β oder Expression von PD1/PDL-1, Förderung von Tumorzellinvasion und Metastasierung mittels TGF- β , Matrix-Ummodellierung durch die Sekretion von MMPs und Cathepsine, Förderung von Proliferation und Zellüberleben über Sekretion von EGF, FGF und PDGF sowie Angiogenese mittels VEGF, FGF und CXCL8. Nach Belgiovine et al (2020).

Im Rahmen der Wundheilung fördern M2-ähnliche Makrophagen die Proliferation umgebender Fibroblasten und Epithelzellen durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie EGF, FGF und PDGF bei eingetretenem Gewebeschaden. Im TME führt die Sekretion dieser Faktoren durch diese Zellen dagegen zur Proliferation der Tumorzellen und steigert deren Resistenz gegenüber Apoptosesignalen⁷⁶. In manchen Tumorentitäten konnte zudem ein proliferativer Effekt des u. a. durch TAM sezernierten TGF- β nachgewiesen werden, das unter regulären Bedingungen eigentlich übermäßiges Wachstum hemmt. Ein wichtiger Baustein zur Versorgung eines wachsenden Tumors ist die Neubildung von Blutgefäßen. TAM konnten als Schlüsselfiguren der Angiogenese im Tumor in Mausmodellen des Ovarial-, Zervix-, Prostata-, Mammakarzinom und des malignen Melanoms identifiziert werden⁷⁶. Eine hypoxische Umgebung regt TAM zur Produktion von VEGF-A, HIF-1 α und HIF-2 α an, welche die Einwanderung vaskulärer Endothelzellen, weiterer Makrophagen sowie deren erhöhte Expression von MMP9 und damit den zur Angiogenese erforderlichen Matrix-Umbau zur Folge haben⁷². Eine gesonderte Stellung nehmen hier Angiopoetin-Rezeptor Tie2 (Tek-Tyrosinkinase-Rezeptor)-exprimierende TAM ein. Hierbei handelt es sich um eine Tie2⁺CD11b⁺ Unterpopulation von TAM, die durch die massenhafte Ausschüttung von IL-10 und VEGF-A ein hochgradig angiogenes Potenzial aufweisen und dadurch häufig in stark vaskularisierten Tumorgegenden zu finden sind⁷⁶. Neovaskularisation ist jedoch nicht nur für die Versorgung des Primarius, sondern auch ein für die Evasion, Migration und damit Metastasierung von Tumorzellen entscheidender Vorgang. TAM fördern dabei die Invasivität und Metastasierungstendenz des infiltrierten Tumors durch mehrere zentrale Vorgänge. Sie orchestrieren einerseits die Umgestaltung der umgebenden Matrix durch MMPs, Cathepsine und Serinproteasen, andererseits die sogenannte epithelial to mesenchymal transition (EMT)⁸⁰. Während der EMT von Tumorzellen kommt es zu einem weitestgehenden Verlust epithelialer Marker und Attribute und zur vermehrten Expression mesenchymaler Proteine wie Vimentin oder Fibronectin. Dies führt zu einer deutlichen Reduktion interzellulärer Bindungen und einer gesteigerten Motilität der Tumorzellen. TAM fördern diesen Prozess über die TLR4/IL-10, TGF- β /Smad2 und miR-30a/NF- κ B/Snail Signalwege⁷⁶. Insbesondere eine hohe CD68-Expression von TAM konnte mit einer verringerten Tumorzellexpression von E-Cadherin, einem zentralen epithelialen Markerprotein, in Verbindung gebracht werden⁷⁶. Durch die zuvor genannten Proteasen erleichtern sie darüber hinaus das Lösen von Zell-Zell-Junktionen und fördern damit die Evasion der Tumorzellen. Einen weiteren Faktor stellen die bereits angesprochenen aberrant gebildeten Gefäße dar, die sich unter dem Einfluss TAM-sezernierter proangiogener Faktoren im hypoxischen Tumorgewebe bilden. Diese Gefäße weisen häufig eine stark aufgelockerte Struktur mit unzureichend ausgebildeten interzellulären Verbindungen im Vergleich zu regulären Gefäßen auf und fördern damit ebenfalls die Tumormetastasierung.

M2-ähnliche TAM gehören zu den Schlüsselfiguren bei der Entstehung und Aufrechterhaltung eines immunsuppressiven Milieus im TME. Einerseits geschieht dies durch Expression von TGF- β , IL-10, human leukocyte antigen G (HLA-G), Arginase -1 oder PD-L1, andererseits durch direkte Interaktionen und Rekrutierung weiterer immunsuppressiver Zellen wie MDSCs und Tregs^{76, 81, 82}. TAM sezernieren hierfür die Chemokine CCL17 und CCL22, die zur Rekrutierung weiterer Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) positiver Tregs mittels CCR4-Aktivierung beitragen⁸³. Über die Expression von PD-L1 und cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4 (CTLA4)-Ligand sind sie darüber hinaus an der direkten Zell-Zell-Inhibition zytotoxischer T-Zellen beteiligt⁸⁴⁻⁸⁶. Hierbei handelt es sich um sogenannte Immun-Checkpoints, da diese unter physiologischen Bedingungen eine überschießende Immunreaktion verhindern sollen. Checkpoint-Inhibitoren wie die anti-PD1-Antikörper Pembrolizumab und Nivolumab oder der anti-CTLA4-Antikörper Ipilimumab lösen diese „Bremse“ des Immunsystems und waren entscheidende Meilensteine in der Therapie einiger Tumorentitäten wie die des malignen Melanoms und des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. Jedoch sprechen nicht alle Patienten auf diese Form der Therapie an und TAM scheinen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung einer solchen Therapieresistenz zu spielen. Die Expression verschiedener Checkpoint-Proteine durch TAM wie PD-L1/2, PD-1, CD80, CD86 und V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation (VISTA) sowie die Inhibition zytotoxischer T-Zellen durch Zytokine wie IL-10, TGF- β , Cathepsin-K u. a. konnten mit den geringeren Ansprechraten auf die Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren in Verbindung gebracht werden⁸¹. Durch die

Überexpression von PD-L1 auf TAM werden beispielsweise anti-PD1 Antikörper unspezifisch gebunden und die Effizienz der Therapie verringert⁸⁷. Die Vielfältigkeit dieser tumor-fördernden Eigenschaften, die hohe Anzahl an infiltrierenden Zellen, ihr Vorkommen und ihre Bedeutsamkeit in den meisten Tumorentitäten machen TAM zu einem entscheidenden Ansatzpunkt bestehender und zukünftiger Therapiestrategien.

1.2.3 Therapeutische Implikationen

Aus den in den vorigen Abschnitten dargelegten Eigenschaften von TAM können mehrere Strategien zur therapeutischen Nutzung dieser Zellen gefolgert werden: Zellzahlreduktion, Repolarisation, spezifische Minderung/Blockade tumor-fördernder und Verstärkung tumor-supprimierender Funktionen von TAM. Im Folgenden werden einige sich derzeit in Erprobung befindende Strategien vorgestellt. Ein Ansatzpunkt stellt die Reduktion der tumor-infiltrierenden Makrophagen durch Blockade ihrer Rekrutierung oder Differenzierung dar. Gezielte Blockade der MCSF/CSF1R-Signalachse durch molekulare Inhibitoren oder Antikörper führen zu einer verminderten Rekrutierung und Differenzierung von Monozyten ins Tumorgewebe und verringern die Lebensspanne bereits vorhandener TAM⁸⁸. Überdies kommt es unter CSF1R-Blockade zu einem Phänotypwechsel in Richtung M1-ähnlicher Makrophagen. D2923, Pexidartinib (PLX-3397), Cabiralizumab und Emactuzumab befinden sich als CSF1R-Inhibitoren derzeit bereits in klinischer Erprobung. Insbesondere unter Anwendung von PLX-3379 und D2923 konnten eine deutliche Reduktion tumor-infiltrierender Makrophagen in präklinischen Versuchen erreicht werden^{88, 89}. CSF1R-Blockade steigerte zudem die Effektivität anderer Immuntherapien⁹⁰. Jedoch blieben auch in Kombinationsstudien (Pexidartinib + Pembrolizumab im Melanom; Cabiralizumab + Nivolumab im Pankreaskarzinom) signifikante Verbesserungen im Patienten-Outcome aus⁸⁸. Im Hinblick auf die ebenfalls beobachtete Reduktion gewebständiger Makrophagen in anderen Geweben und die daraus resultierenden Nebenwirkungen einer CSF1R-blockierenden Therapie, sind hier weitere Untersuchungen erforderlich. Daneben erwies sich die Blockade des CCL2/CCR2-Signalwegs als wirkungsvolle Alternative zur Reduktion tumor-infiltrierender Monozyten und M2-ähnlicher Makrophagen und führte in der Folge zu einer gesteigerten Infiltration durch zytotoxische T-Zellen und verringertem Tumorwachstum in präklinischen Modellen⁸⁹. Obwohl sich CCL2/CCR2-Inhibitoren in klinischen Versuchen als nebenwirkungsarme und sichere adjuvante Therapie erwiesen, blieb die zu erwartende Effektivitätssteigerung der Therapie bislang jedoch aus⁸⁸. Modellrechnungen von Fetterly et al. deuten darauf hin, dass dies auf Kompensationsmechanismen durch die gesteigerte Expression anderer Chemokine im TME in vivo zurückzuführen sein kann⁹¹. In präklinischen Modellen ebenfalls als erfolgreiche Ansätze zur Reduktion infiltrierender TAM, reduziertem Tumorwachstum und/oder verringerter Metastasierungstendenz erwiesen sich die Blockade der Signalwege CCL5/CCR5, IL8/CXCR2 und CXCL12/CXCR4⁸⁸. Eine klinische Evaluation der dazugehörigen Substanzen steht hier jedoch noch aus. Angesichts der vielen Redundanzen und der Vielschichtigkeit im chemotaktischen System, mag sich eine effektive Blockade der Infiltration von TAM in vivo nur mit multimodal konzipierten Kombinationsansätzen realisieren lassen. Eine alternative Strategie zur Zellzahlreduktion von TAM stellt ihre gezielte Depletion dar. Insbesondere für Bisphosphonate wie Clodronat und Zoledronsäure, die bereits regelhaft bei ossär metastasierten Tumoren zum Einsatz kommen, konnte eine zytotoxische Wirkung auf TAM nachgewiesen werden⁷². Ein auf TAM abzielender Transport über nano-basierte Technologien verspricht dabei eine Reduktion systemischer Nebenwirkungen und damit eine Ausweitung der Indikationskriterien. Cao et al. konnten beispielsweise Zoledronsäure-geladene Nanoliposomen mit der auf M2-ähnliche TAM abzielenden Peptidsequenz M2pep versehen und erreichten damit eine TAM-Depletion, eine Minderung der intratumoralen Hypoxie durch Normalisierung der Tumorgefäße und verbesserter Perfusion, verringerte Konzentrationen immun-suppressiver sowie höhere Konzentrationen inflammatorischer Zytokine⁹². Als weiteres Beispiel nutzten Zang et al. lipid-überzogene Calcium-Zoledronat Nanopartikel. Mittels konjugierter Mannose zielten diese dabei spezifisch auf den Mannose-Rezeptor CD206 – einen klassischen Marker von M2-Makrophagen – und erreichten darüber eine gezielte TAM-Depletion,

verringerte Tumorangiogenese und ein reduziertes Tumorwachstum⁹³. Einen weiteren Ansatz zur TAM-Depletion stellen die strukturell verwandten Chemotherapeutika Trabectedin und Lurbinectedin dar. Insbesondere in Kombination mit Gemcitabin konnte in präklinischen Modellen eine TAM-Depletion und eine Reduktion der Tumormasse erreicht werden⁷².

Auch die Repolarisation von TAM von einem M2-ähnlichen, tumor-fördernden zu einem M1-ähnlichen, tumor-supprimierenden Phänotyp stellt eine vielversprechende Therapieoption dar. Die sich bereits in klinischer Anwendung befindenden Chemotherapeutika Paclitaxel und Sorafenib können eine Repolarisation von TAM bewirken^{94, 95}, ebenso wie die zuvor angesprochenen Substanzen zur Blockade des MCSF/CSF1R Signalwegs⁸⁹. Als weiterer Signalweg bietet sich die CD47/SIRP α -Achse an. Tumorzellen überexprimieren den extrazellulären CD47, der im Normalzustand in Kombination mit dem von Makrophagen exprimierten SIRP α als „Iss-mich-nicht“-Signal fungiert, und vermeiden somit, phagozytiert zu werden^{72, 89}. Auf die Blockade dieses Mechanismus abzielende Substanzen bewirken in vivo neben einer gesteigerten Phagozytose von Tumorzellen eine Repolarisation von TAM in Richtung eines M1-ähnlichen Phänotyps, eine gesteigerte Antigen-Präsentation durch dendritische Zellen, eine Steigerung Antikörper-vermittelter NK-Zell-Zytotoxizität und eine höhere Caspase-unabhängige Apoptose von Tumorzellen⁷². Eine weitere Strategie zur Reprogrammierung von TAM setzt an der Aktivierung proinflammatorischer Oberflächenrezeptoren an. Aktivierung von TLRs zeigte sich in verschiedenen Mausmodellen effektiv in der Repolarisation von TAM in Richtung eines M1-ähnlichen Phänotyps. Topische Applikation des TLR7-Agonisten Imiquimod auf Brustkrebsmetastasen der Haut führten zu einer 20%igen Tumorregression mit veränderter Infiltration durch Lymphozyten⁹⁶. Ebenfalls in klinischer Erprobung befindet sich der TLR8-Agonist Motolimod. Versuche mit CD40 Agonisten in der Maus lieferten vielversprechende Ergebnisse durch die gesteigerte Infiltration des Tumors mit T-Zellen und tumoriziden Makrophagen⁹⁶. In einer Phase 1b-Studie erwies sich der agonistische CD40 Antikörper Sotigalimab in Kombination mit Gemcitabin und Paclitaxel, mit oder ohne Nivolumab bei Patienten mit einem metastasierten Adenokarzinom des Pankreas als verträgliche und potenziell vorteilhafte Therapieoption⁹⁷. Daneben befinden sich die CD40-Agonisten RO7009789, SEA-CD40 und CP-870893 derzeit ebenfalls in klinischer Erprobung⁹⁶. Inhibition der Phosphatidyl-3-Kinase (PI3K) in TAM verringert deren Expression immunsuppressiver Moleküle wie IL-10 und Arginase. In Kombination mit Checkpoint-Inhibitoren zeigten sich synergistische Effekte des dualen PI3K- und mTor-Inhibitors NVP-BEZ235 auf die Reduktion von Tumorwachstum und Metastasierung in verschiedenen Mausmodellen durch die Repolarisation von Makrophagen⁹⁸. Ein weites Feld an Möglichkeiten eröffnen die bereits angesprochenen gezielten, nano-basierten Technologien, die ebenfalls zur zielgenauen Umprogrammierung von TAM in Richtung eines antitumoralen Phänotyps genutzt werden. Hierzu zählen beispielsweise Mannose- oder Peptid-konjugierte siRNA Nanopartikel, mit denen eine signifikante Reduktion von M2-ähnlichen TAM, eine antitumorale Immunantwort und verbesserte Überlebensraten von Versuchstieren erreicht werden konnten. Ähnliche Daten konnten unter Einsatz von lncRNAs (long ncRNAs), circRNAs (circular RNAs) und miRNAs (microRNAs), darunter miR-1155, miR-23b-3p, lncRNA-0243 erzielt werden⁹⁸. Dieser Überblick über die verschiedenen Strategien erhebt dabei keinen Anspruch auf Vollständigkeit, verdeutlicht jedoch die große Bandbreite an Möglichkeiten einer auf TAM abzielenden Tumorthherapie. Insbesondere im Hinblick auf die große Bedeutsamkeit von TAM beim Auftreten von Therapieresistenzen bergen Kombinationsansätze ein erhebliches Potenzial.

1.3 P2Y14

1.3.1 Purinerge Signaltransduktion

Purine, Pyrimidine und deren Nukleotide – allen voran Adenosin-Triphosphat (ATP) – sind zentrale Moleküle für Speicherung, Weiterverarbeitung und Transport genetischer Informationen sowie für den Energiehaushalt von Organismen. Dass sie jedoch auch wichtige Funktionen in der extrazellulären

Signalübertragung erfüllen, blieb lange Zeit unentdeckt. Erstmals wurde dieser Verdacht 1929 durch Szent-Gyorgyi und Drury geäußert, nachdem sie kardiale Arrhythmien nach intravenöser Applikation von Adenosin beobachtet hatten⁹⁹. Mehr als 40 Jahre später wurde erstmals durch Geoffrey Burnstock die Hypothese einer purinergen neuronalen Signalübertragung aufgestellt¹⁰⁰. Spätestens jedoch nach der Entdeckung und Klonierung von immer mehr durch Purin- und Pyrimidin-Derivate aktivierbare Rezeptoren, ist ihre Bedeutsamkeit für die interzelluläre Kommunikation offenkundig. Bei der Familie der purinergen Rezeptoren handelt es sich darüber hinaus um eine evolutionär hoch konservierte Klasse zellulärer Moleküle. So finden sich diese Rezeptoren in Bakterien, Algen, Nematoden, Amöben, Pilzen, Pflanzen, Tieren u. v. m. ¹⁰¹. Ursprünglich in durch Adenosin aktivierte P1- und Adenosin-Nukleotide (ADP/ATP) aktivierte P2-Rezeptoren aufgeteilt, findet diese Einteilung auch heute noch Anwendung, nachdem die Klassifizierung der P2-Rezeptoren auch auf Nukleotide anderer Purine und Pyrimidine erweitert wurde¹⁰². Sowohl bei P1- als auch P2-Rezeptoren handelt es sich dabei um zellmembranständige Rezeptoren. Zur P1-Familie zählen die G-Protein gekoppelten Rezeptoren A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃. Diese finden sich nahezu ubiquitär im menschlichen Organismus, so sind sie beispielsweise im Herzen an der Regulation der Herzfrequenz und Erregungsweiterleitung beteiligt, steuern in den Nierengefäßen den renalen Blutfluß, bewirken eine Bronchokonstriktion in der Lunge und wirken im ZNS sedativ, anxiolytisch, antikonvulsiv und sind an der Schmerzwahrnehmung beteiligt^{103, 104}. Bekanntester Antagonist ist Koffein, dessen überwiegend erregenden Effekte aus einer Antagonisierung der schlaffördernden Wirkung des Adenosins an den A₁-Rezeptoren des Nucleus praeopticus ventrolateralis im Hypothalamus resultieren¹⁰³. Insbesondere der A_{2A} und der A₃-Rezeptor vermitteln eine immun-suppressive Wirkung durch die verringerte Sekretion inflammatorischer Zytokine sowie der Hemmung der Reifung von Makrophagen, T-Zellen und NK-Zellen¹⁰⁴.

P2 werden weiter in die Gruppe der Liganden-aktivierten Ionenkanäle P2X und die ebenfalls G-protein gekoppelten P2Y-Rezeptoren unterteilt. P2X-Rezeptoren bestehen aus homo- oder heterotrimeren Kanalstrukturen, die nach Bindung ihres Agonisten ATP eine Konformationsänderung durchlaufen und hiermit einen Kanal für Kationen wie Na⁺ und Ca²⁺ bilden¹⁰⁵. Der Einstrom dieser Ionen führt in Folge zu einer Depolarisation der Zelle. Die unterschiedliche Verbreitung der Mitglieder dieser Rezeptoren-Familie sowie ihre variierende Sensitivität gegenüber ATP bedingen eine Fülle verschiedener Funktionen. Beispielhaft aufgeführt seien hier die Regulierung der Hörschwelle im Innenohr durch P2X₂ oder die Beteiligung am Geschmackssinn durch P2X_{2/3}¹⁰⁵. ATP ist als Co-Transmitter an der

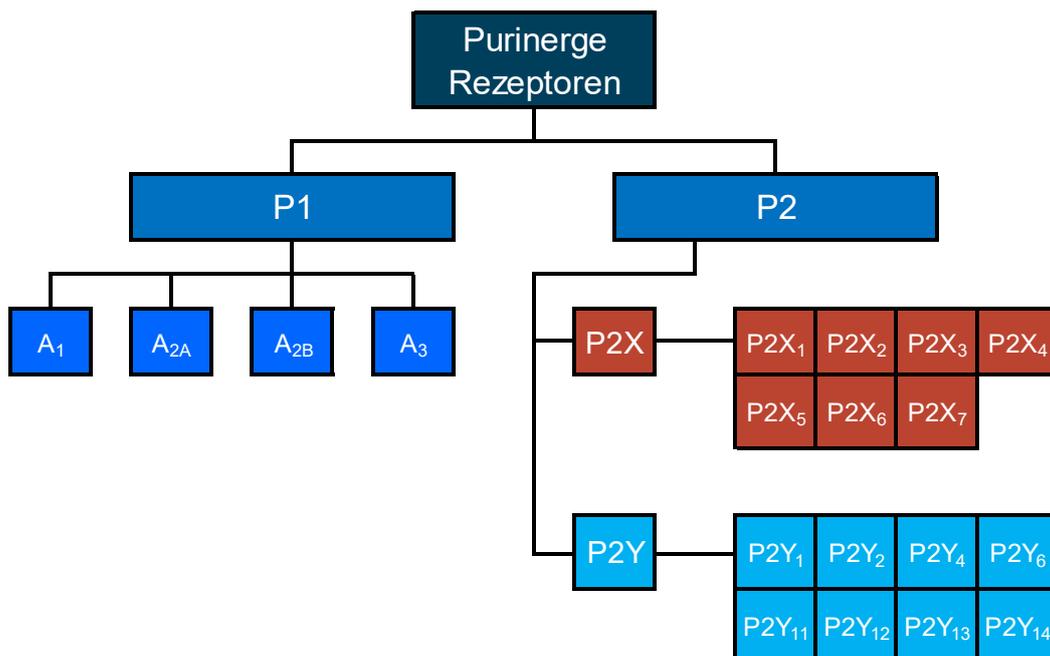


Abb. 5 – Schematische Übersicht über die Familie der purinergen Rezeptoren

Signalübertragung im vegetativen Nervensystem durch Aktivierung von P2X1 beteiligt und spielt hier eine wichtige Rolle in der Innervation der Vas deferens, der glatten Detrusormuskulatur sowie der sympathisch vermittelten arteriellen Vasokonstriktion¹⁰⁵. P2X1, P2X2, P2Y4, P2Y6 und P2Y7 erfüllen weiterhin die Funktion von DAMP-Rezeptoren durch die Expression auf Makrophagen und neutrophilen Granulozyten und deren Aktivierung bei steigendem extrazellulären ATP-Spiegel¹⁰⁶.

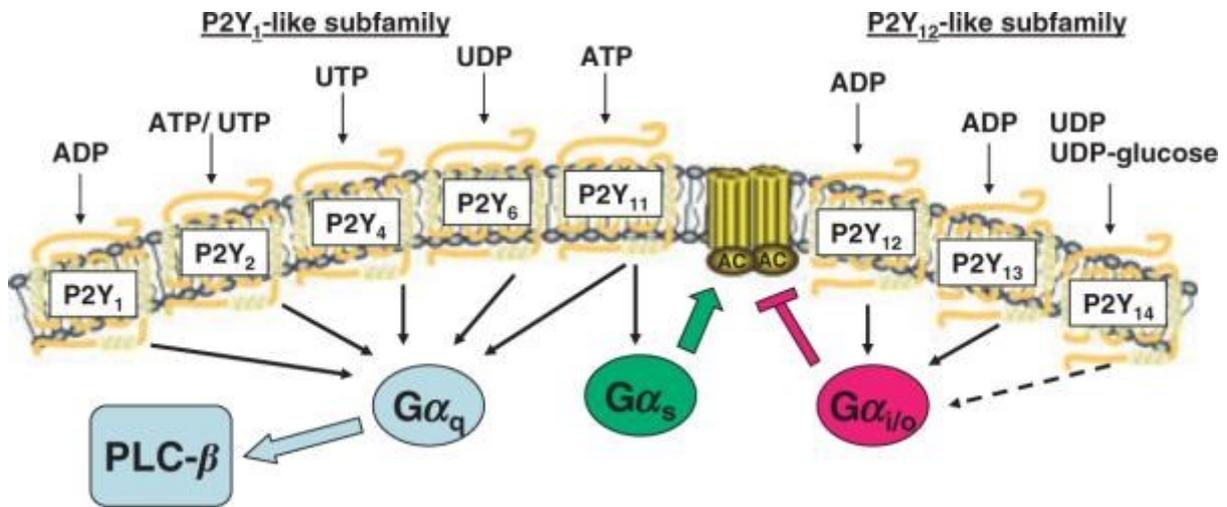


Abb. 6 – Unterschiede der P2Y-Rezeptoren hinsichtlich Liganden und Affinität zu verschiedenen Formen von G α -Untereinheiten. **Links:** Die P2Y1-ähnliche Unterfamilie bestehend aus P2Y1/2/4/6 und 11 mit vorwiegender Bindung an G α_q und Signaltransduktion mittels Phospholipase C-beta (PLC- β). P2Y11 kann ebenfalls an G α_s binden und hierüber die Adenylylcyclase (AC) aktivieren. **Rechts:** P2Y12/13 und 14 bilden die P2Y12-ähnliche Unterfamilie. G $\alpha_{i/o}$ -vermittelt wird die AC gehemmt. Nach Harden et al. (2010)

Die metabotropen P2Y-Rezeptoren sind als G-Protein gekoppelte Rezeptoren charakterisiert durch die extrazelluläre Lage des N-Terminus, die insgesamt sieben transmembranären Sequenzregionen, die drei extrazellulären Schleifen, die durch diese gemeinsam gebildete Liganden-Bindungstasche, die drei intrazellulären Schleifen, die die Bindung an die verschiedenen G-Proteine vermitteln und das intrazellulär gelegene C-terminale Ende, das diverse Phosphorylierungs-/Bindungsstellen für verschiedene Kinasen enthält¹⁰⁷. Unterschiede zwischen den Rezeptoren finden sich in ihrer jeweiligen Affinität zu verschiedenen G α -Untereinheiten und Liganden (s. Abb. 6). P2Y2 und P2Y11 werden durch Bindung von ATP aktiviert, P2Y1, P2Y12 und P2Y13 durch ADP, P2Y2 und P2Y4 durch UTP und P2Y6 und P2Y14 durch UDP. P2Y14 ist darüber hinaus der einzige Rezeptor dieser Familie, der durch diverse Zucker-Konjugate von UDP aktiviert wird, am prominentesten von UDP-Glucose (s. 1.3.2). Anhand der jeweils bevorzugt assoziierten G α -Untereinheit lassen sich die P2Y-Rezeptoren weiter in zwei Unterfamilien aufteilen: die P2Y1-ähnlichen, bestehend aus den Rezeptoren P2Y1/2/4/6 und 11, binden bevorzugt an G α_q und übertragen ihr Signal in der Folge über die Aktivierung der Phospholipase C beta (PLC- β), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Wie P2Y12 binden P2Y13 und P2Y14 dagegen bevorzugt G $\alpha_{i/o}$ mit subsequenter Signalkaskade über die Hemmung der Adenylylcyclase (AC) sowie der G $\beta\gamma$ -vermittelten Aktivierung von Effektor-Enzymen wie der Phosphatidylinositol-3-Kinase gamma (PI3K γ). Allerdings ist eine solche Einteilung mit Bedacht zu verwenden, da mehrere dieser Rezeptoren ebenfalls Bindungen zu weiteren G α -Untereinheiten eingehen können. Als Beispiel dient hier P2Y11, das gleichermaßen an G α_q und G α_s binden kann¹⁰⁷. Ferner gibt es Nachweise über G-Protein unabhängige Signaltransduktion durch P2Y-Rezeptoren – beispielsweise über β -arrestin – und deren Beeinflussung von Zellproliferation und -überleben über den MAP(mithogen-activated protein)-Kinase-Signalweg¹⁰⁸. Anhaltende Aktivierung der P2Y-Rezeptoren führt zu deren Desensibilisierung durch Rezeptor-Internalisierung oder -Endozytose¹⁰⁷. Dieser Vorgang wird durch die Phosphorylierung intrazellulärer Domänen durch GPCR-Kinasen (GRK 1–7) und die subsequente Bindung von β -Arrestinen vermittelt. P2Y-Rezeptoren finden sich in nahezu jedem Zelltyp und erfüllen eine entsprechende Vielzahl unterschiedlicher Funktionen.

So findet sich eine Beteiligung an der Regulation der Thrombozyten-Aggregation, der Sekretion von Insulin aus pankreatischen β -Zellen, als chemotaktisches Signal für Mikroglia, Makrophagen und andere Immunzellen, Beeinflussung der Herzkontraktilität und -frequenz, Regulierung des Gefäßtonus u. v. m.^{108, 109}.

Ähnlich wie P2X- vermitteln auch P2Y-Rezeptoren überwiegend proinflammatorische Effekte und spielen dabei ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entstehung und Unterhaltung unterschiedlicher chronisch-entzündlicher Erkrankungen sowie der Inflammation im TME verschiedener solider Tumore¹⁰⁸. Eine tendenziell tumorfördernde Wirkung entfaltet Adenosin, das insbesondere durch die von Makrophagen, Tregs oder Tumorzellen selbst exprimierten Ektonukleotidasen beim Abbau von AMP gebildet wird, durch eine hauptsächlich A_{2A} -vermittelte Immunsuppression¹¹⁰. Hypoxische Bedingungen steigern dabei nachweislich die Expression dieser Ektonukleotidasen. A_{2A} -Rezeptor Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen hemmt dabei deren zytotoxische Aktivität direkt, aber auch indirekt über die gesteigerte IL-10 Produktion von Tregs und von durch A_{2A} -Aktivierung in Richtung M2 polarisierter Makrophagen¹¹⁰. Überdies fördert Adenosin über Aktivierung von A_{2B} -Rezeptoren auf Makrophagen deren Expression proangiogener Faktoren wie VEGF und IL-6 und reduziert gleichsam deren Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 und TNF- α ¹¹⁰. Hohe Spiegel an extrazellulärem ATP und anderen Nucleotiden dagegen zeigen einen zytotoxischen Effekt auf Tumorzellen in verschiedenen Tumoren und steigern die Proliferation und zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen durch NF- κ B-Aktivierung¹¹⁰. Geringere Nucleotidkonzentrationen, wie sie spontan durch nicht lytische Vorgänge nahezu aller Zellen in den extrazellulären Raum abgegeben werden, sind wiederum mit einem gesteigerten Tumorwachstum assoziiert¹¹¹. Aktivierung von P2 Rezeptoren auf TAM durch ATP resultiert in einem proinflammatorischen M1 Phänotyp dieser Zellen. Insbesondere Aktivierung des P2X7-Rezeptors in TAM führt durch NLRP3-Inflammasom-Aktivierung zu gesteigerter Freisetzung von IL-1 β , der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und Rekrutierung und Maturation dendritischer Zellen^{112, 113}. P2X7 erfüllt jedoch je nach exprimierender Zellart teils sehr gegensätzliche Funktionen in der Tumorumgebung. Zytotoxisch bei sehr hohen extrazellulären ATP-Konzentrationen, wirkt er unter passenden Konditionen ebenfalls wachstumsfördernd auf Tumorzellen und T-Zellen. Eine weitere Studie fand eine durch P2X7-Rezeptor-Aktivierung induzierte Hemmung der antitumoralen Aktivität von T-Zellen und Förderung ihrer Seneszenz¹¹². Angesichts der Komplexität der purinergen Signaltransduktion im Kontext des TME sind hierzu weitere Untersuchungen erforderlich. Jedoch zeigen klinische Versuche speziell zur gezielten Beeinflussung von P2X7 und A_{2A} bereits ermutigende Ergebnisse und wecken speziell in multimodalen Anwendungsszenarien Hoffnungen auf eine effektive Ergänzung der bisherigen Tumortherapien.

1.3.2 Struktur und Signalweg von P2Y14

P2Y14 (Synonyme: GPR105, KIAA0001) zählt zu den erst kürzlich entdeckten Mitgliedern der P2Y-Familie und teilt sich in Struktur und Signaltransduktion viele Gemeinsamkeiten mit P2Y12 und P2Y13. Wie die anderen P2Y-Rezeptoren besteht P2Y14 aus sieben transmembranären Regionen, drei extrazellulären Schleifen mit Bildung der Liganden-Bindungstasche, drei intrazellulären Regionen zur Bindung der G-Proteine, einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus. In der Primärsequenz besteht P2Y14 aus 338 Aminosäuren und erreicht eine molekulare Masse von 38,97 kDa. Zu den natürlichen Agonisten zählen UDP-Glucose ($EC_{50} = 132$ nM), UDP ($EC_{50} = 33$ nM), UDP-Galaktose, UDP-N-Acetyl-Glukosamin (UDP-NAG) sowie die teils potenteren, synthetischen Agonisten MRS2690 (2-thio-UDP-glucose; $EC_{50} = 49$ nM), MRS2802 und MRS2905 (α,β -methylene-2-thio-UDP; $EC_{50} = 0,92$ nM)^{108, 114}. Bekannte Antagonisten umfassen PPTN, die neueren synthetischen Moleküle MRS4458 und MRS4478 sowie den partiell antagonisierenden, fluoreszierenden Liganden MRS4174¹⁰⁸. Die Signaltransduktion nach Bindung eines der zugehörigen Agonisten erfolgt über Dissoziation des angelagerten heterotrimeren G $_i$ -Proteins (s. Abb. 7). Die G α_i -Untereinheit hemmt in Folge die Adenylylcyclase (AC), wodurch die intrazellulären Spiegel des second messengers cAMP

Einleitung

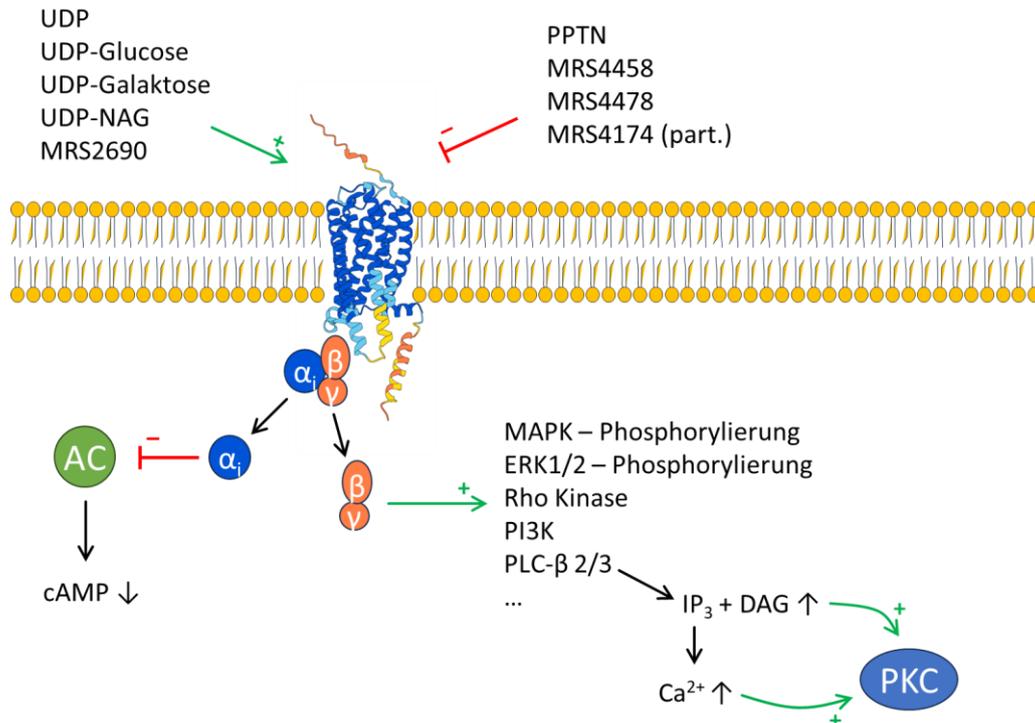


Abb. 7 – Schematische Darstellung des P2Y14 Rezeptors und des dazugehörigen Signalwegs. Strukturelles Vorhersagemodell abgerufen von AlphaFold DB prediction. Abbildung adaptiert nach Lazarowski et al (2015)

(zyklisches Adenosinmonophosphat) absinken¹¹⁵. P2Y14-abhängige MAPK/ERK-Phosphorylierung sowie Aktivierung von Rho Kinase und PI3K erfolgt über die Gβγ-Untereinheit und ist gut dokumentiert. Aufgrund des vielfach beobachteten intrazellulären Calcium-Anstiegs nach P2Y14-Aktivierung, gilt ebenfalls eine PLC-β-vermittelte IP₃/DAG-Signalkaskade mit nachgeschalteter Aktivierung der Proteinkinase C als wahrscheinlich¹¹⁴.

1.3.3 Verteilung und Funktion von P2Y14

Wie die anderen P2Y-Rezeptoren findet sich P2Y14 in nahezu allen Geweben des menschlichen Organismus. RNA-Expressionsstudien zeigten eine hohe P2Y14-Expression in Plazenta, Fettgewebe, Magen und Darm sowie intermediäre Expressionen in Gehirn (hohe Expression im Plexus choroideus), Milz, Lunge und Herzmuskelgewebe¹¹⁶. Auf Einzelzell-Ebene findet sich der Rezeptor vornehmlich auf dendritischen Zellen, Makrophagen, Langerhans-Zellen, Neuronen, Astrozyten, Granulozyten, glatten Muskelzellen, B-Zellen, Adipozyten u. a. ^{116, 117}. Eine starke P2Y14-Expression findet sich in neutrophilen Granulozyten. P2Y14-Aktivierung mittels UDP-Glukose resultiert in diesen Zellen in verringerten cAMP Konzentrationen und vermehrter ERK1/2 Phosphorylierung¹¹⁸ und agiert in Folge als chemotaktisches Signal. In mit DMSO behandelten HL60 Zellen – ein in vitro Modell neutrophiler Granulozyten – zeigte sich die P2Y14-vermittelte Chemotaxis durch einen Inhibitor der Rho-Kinase blockierbar¹¹⁹. In Patienten mit einer zystischen Fibrose konnte eine neutrophile Inflammation durch Sesma et al. mit erhöhten Konzentrationen von UDP-Glukose im Lungenparenchym in Verbindung gebracht und in Mausversuchen die neutrophile Chemotaxis mittels PPTN inhibiert werden^{120, 121}. Diese P2Y14-vermittelte chemotaktische Wirkung von UDP-Glukose konnte ebenfalls in eosinophilen Granulozyten beobachtet werden. In Allergen-sensibilisierten Mäusen konnten Karcz et al. eine hohe Expression von P2Y14 in lungenständigen Eosinophilen sowie eine vermehrte Rekrutierung weiterer eosinophiler Granulozyten feststellen, die ihrerseits wiederum eine vermehrte Freisetzung von UDP-Glukose triggerten. Dieser positive Feedback-Loop zeigte sich unter Anwendung von PPTN

inhibierbar¹²². Als weiterer inflammatorischer Mechanismus stimulierte UDP-Glukose die Mastzelldegranulation in einer Zelllinie von Ratten-Mastzellen, die effektiv mittels des unspezifischen P2Y-Antagonisten TMPS gehemmt werden konnte¹²³. In einer Folgestudie konnte diese Arbeitsgruppe ebenfalls eine P2Y14-vermittelte Mastzelldegranulation in der menschlichen Zelllinie LAD2 beobachten¹²⁴. Lintzmeier und Kollegen regten vor diesem Hintergrund an, eine niedrig dosierte Verabreichung von PPTN zur Verringerung der systemischen Inflammation infolge neutrophiler Chemotaxis und Mastzelldegranulation durch P2Y14 zur Therapie schwerer Covid-19 Erkrankungen zu nutzen¹²⁵. Vermehrte Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten sowie eine gesteigerte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch interkalierende Tubuluszellen der Niere ist auch im Rahmen eines ischämisch bedingten akuten Nierenversagens mit einer UDP-Glukose-vermittelten P2Y14-Aktivierung assoziiert¹²⁶. Dies konnte mit einer Aktivierung des MEK1/2-ERK1/2 Signalwegs in interkalierenden Zellen in Verbindung gebracht werden und zeigte sich durch PPTN Applikation inhibierbar¹²⁷.

Glatte Muskelzellen zeigen ebenfalls eine hohe Expression von P2Y14 auf ihrer Oberfläche. Anwendung von P2Y14 Agonisten entfalten eine durch PPTN inhibierbare, cAMP-abhängige, vasokontraktile Funktion auf isolierte Pankreasarterien vom Schwein. Alsaqati et al. konnten dabei erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentrationen, RhoA/ROCK Aktivierung und in Folge MLC2(myosin light chain 2)-Phosphorylierung sowie die vermehrte Freisetzung von Thromboxan A2, PGF2- α und Endothelin-1 feststellen¹²⁸. Eine vasokontraktile Wirkung einer P2Y14-Aktivierung konnte ebenfalls in Koronar- und Basilararterien der Maus beobachtet werden¹²⁹. Meister et al. nutzten P2Y14-defiziente Mäuse und konnten mittels LacZ-Reportergen eine detaillierte Übersicht über die verbreitete Expression von P2Y14 in der Maus erzielen. Hierbei stellten sie eine verzögerte gastrointestinale Passagezeit sowie eine gestörte Glukosetoleranz im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen fest. Dies konnte mit einer beeinträchtigten Freisetzung von Insulin aus pankreatischen Inselzellen in Verbindung gebracht werden¹³⁰. In weiteren Versuchen mit einem Adipozyten-spezifischen, P2Y14 Knock-out Mausmodell zeigte sich eine Resistenz dieser Mäuse gegenüber den negativen Effekten einer hochkalorischen Ernährung. Sie zeigten eine verminderte Insulinresistenz, Fettgewebeinflammation, geringere Raten an Steatosis hepatis sowie eine stärkere Lipolyse und einen höheren Energieumsatz als die Wildtyp-Kontrollen. Zeitgleich fanden die Forscher eine positive Korrelation zwischen dem BMI und einer damit steigenden P2Y14-Expression in menschlichem Fettgewebe¹³¹. Weiterhin ist P2Y14-Aktivierung in der Regulation der regenerativen Kapazität hämatologischer Stamm- und Progenitorzellen nach Stresssituationen involviert und schützt diese vor vorzeitiger Zellseneszenz^{132, 133}. Daneben beobachteten Lee et al. eine chemoattraktive Wirkung von P2Y14 knochenmarkständiger, hämatopoetischer Stammzellen, hierbei jedoch unter Verwendung eines anti-P2Y14 Antikörpers¹³⁴. Im gleichen Gewebe beheimatet fand eine andere Arbeitsgruppe P2Y14-Aktivierung durch UDP-Zucker als wichtiges co-stimulatorisches Signal in der RANKL-induzierten Osteoklastendifferenzierung und deren Hemmung in P2Y14-defizienten Vorgängerzellen¹³⁵. Anwendung eines P2Y14-Antagonisten zeigten sich effektiv in der Behandlung neuropathischer Schmerzen nach peripherem Nerven trauma im Mausmodell¹³⁶. In einer weiteren Studie konnte eine gesteigerte, p38/MAPK-vermittelte P2Y14 Expression in spinalen Mikroglia nach peripherem Nerven trauma beobachtet werden und ebenfalls eine Reduktion der neuropathischen Allodynie durch die Verabreichung eines P2Y14 Antagonisten¹³⁷.

Obwohl erst seit wenigen Jahren im Blick der Forschung, sammeln sich mehr und mehr Hinweise auf die Rolle von P2Y14 und seinen Agonisten in physiologischen und pathologischen Prozessen. Kohärent mit den anderen Mitgliedern der P2Y-Familie zeichnet sich zunehmend eine proinflammatorische Rolle von UDP-Zuckern im Zusammenhang mit einer P2Y14-vermittelten Signaltransduktion ab. UDP-Zucker werden einerseits als interzelluläres Signalmolekül aus ER und Golgi-Apparat vesikulär sezerniert, dienen jedoch auch als DAMP-Moleküle bei zellulärem Untergang und Gewebetrauma¹³⁸⁻¹⁴⁰. Aufgrund der natürlichen Resistenz von UDP-Zuckern gegenüber Ektonukleosidasen, finden sich diese in hohen Konzentrationen im extrazellulären Raum, insbesondere im Tumorgewebe^{138, 141}. In diesem Zusammenhang spielen UDP-Zucker und P2Y14 auch eine wichtige Rolle für Makrophagen und TAM.

Auch wenn P2Y14-Expression bereits in verschiedenen Makrophagen-Populationen nachgewiesen werden konnte – hierzu zählen Alveolarmakrophagen, Kupffer-Zellen und Makrophagen der Synovialmembran¹⁴²⁻¹⁴⁴ – ist hier eine weitergehende Forschung notwendig. Auch über die Funktion einer P2Y14-Aktivierung in Makrophagen ist bisher noch zu wenig bekannt. Xu et al. konnten bislang zeigen, dass UDP-Glukose als Lockstoff für Monozyten und Makrophagen dient und möglicherweise einen Mediator für die Entwicklung einer peripheren Insulinresistenz und hepatische Inflammation in hochkalorisch ernährten Mäusen darstellt¹⁴⁵. Ma et al. konnten in M1 Makrophagen eine STAT1-Aktivierung durch UDP-Glukose nachweisen¹⁴⁶ und Klaver et al. mutmaßten sogar bereits, dass P2Y14-vermittelte Glykogenolyse und das so bereitgestellte Substrat Glukose-6-Phosphat zur Auffrischung der NADPH-Reserven als protektiver Mechanismus von M1-Makrophagen vor oxidativem Stress dienen könnte¹⁴⁷. Merz et al. fanden P2Y14 ebenfalls in M1-Makrophagen überexprimiert. Daneben konnte P2Y14 ebenfalls in isolierten Knochenmark-Makrophagen der Maus sowie in MCSF-behandelten peripheren Blutmonozyten aus dem Menschen nachgewiesen werden^{145, 148}. Diese stellen dabei einen idealen Ansatzpunkt für eine funktionelle Erforschung von P2Y14 in Makrophagen dar.

1.4 Vorarbeiten

Die Arbeitsgruppe, in deren Umfeld diese Arbeit entstand, beschäftigt sich mit der Identifizierung neuer Marker und beeinflussbarer Signalwege Tumor-assoziiertes Makrophagen im Melanom. Aufgrund der für gewöhnlich geringen Tumormasse und der teils schwierigen, histopathologischen Diagnosestellung ist die direkte Isolation von humanen TAM aus diesen Tumoren zum Zweck der Durchführung funktioneller Testungen nicht möglich. Aus diesem Grund wurde bereits in vorherigen Arbeiten ein *in vitro* Modell entwickelt, das die Eigenschaften von TAM möglichst nah abbilden soll¹⁴⁹. Hierbei konnte gezeigt werden, dass typische *in vivo* TAM-Marker wie Stabilin-1 oder Lyve-1 durch eine Stimulation von isolierten peripheren CD14⁺ Blutmonozyten (pBMC) mit MCSF, Dexametason und IL-4 (MDI) *in vitro* induzierbar sind¹⁵⁰⁻¹⁵². Im direkten Vergleich zu ausschließlich mit MCSF stimulierten pBMC konnte für diese Zellen eine signifikante Hochregulation vieler M2-Marker wie CD163, CD206 oder CD73 festgestellt werden, so dass von einer M2-ähnlichen Polarisation dieser Zellen ausgegangen werden kann. Zur Identifikation weiterer möglicher Marker zur Nutzung *in vivo* wurden diese Zellen mittels Microarray auf Unterschiede in ihrer Genexpression hin untersucht. Die zehn Gene mit der stärksten Hochregulation sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt. Hierbei zeigten P2Y12 und P2Y14 eine um etwa das 40-fach erhöhte mRNA-Expression in MDI-behandelten Zellen. Die Relevanz des P2Y12 Rezeptors wurde in einer parallel laufenden Arbeit untersucht, die zeigen konnte, dass P2Y12-Aktivierung durch von Melanomzellen freigesetztes ADP als chemotaktisches Signal für M2-Makrophagen dient und so die TAM-Infiltration des Melanoms vorantreibt¹⁰⁹.

Gensymbol	Name	Änderungsfaktor
P2RY12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12	44.4
P2RY14	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	40.8
CCL13	chemokine (C-C motif) ligand 13	33.9
F13A1	coagulation factor XIII, A1 polypeptide	31.6
FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)	30.8
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	28.8
GLDN	gliomedin	22.9
ADORA3	adenosine A3 receptor	21.3
CD200R1	CD200 receptor 1	20.1
LYVE1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1	15.0

1.5 Ziele der Arbeit

Eine therapeutische Nutzung von TAM, insbesondere eine Umprogrammierung in einen tumor-supprimierenden Phänotyp birgt ein großes Potenzial. Daher ist die gründliche Untersuchung aller infrage kommenden Marker, die sich als therapeutisches Ziel nutzen lassen könnten, eine wichtige Aufgabe. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass *in vitro* mit MCSF, Dexamethason und IL-4 differenzierte periphere CD14⁺ Blutmonozyten ein typisches M2-Genexpressionsprofil aufweisen, wie man es auch *in vivo* in TAM findet. Dabei waren insbesondere die beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren P2Y12 und P2Y14 hochreguliert.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Induktion und Funktion von P2Y14 in humanen Makrophagen genauer zu untersuchen. Hierzu wurden folgende Zwischenziele definiert:

- 1. Verifizierung der Genexpressionsdaten und Charakterisierung der Faktoren, die P2Y14 *in vitro* in humanen pBMC und U937-Zellen hochregulieren.*
- 2. Herstellung und Charakterisierung eines gegen P2Y14 gerichteten Antikörpers.*
- 3. Charakterisierung der Proteinexpression von P2Y14 in humanen pBMC*
- 4. Funktionelle Untersuchung einer P2Y14-Aktivierung in transgenen U937 und humanen pBMC*

2. Methoden

2.1 Zellkultur

Für die verschiedenen in vitro Experimente wurden unterschiedliche Zelllinien verwendet (s. 2.1.1). Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und in einer mit 5 % Kohlenstoffdioxid angereicherten Atmosphäre kultiviert. Kontrollen hinsichtlich morphologischer Veränderungen und Zellvermehrung wurden mittels inversen Mikroskops in regelmäßigen Abständen durchgeführt. Der regelmäßige Ausschluss einer Mykoplasmen-Kontamination erfolgte mittels PCR.

2.1.1 Verwendete Zelllinien

U937

U937 (ATCC® CRL -1593.2™) bezeichnet eine humane, monozytäre Zelllinie und wurde von ATCC erworben. Die Zellen wurden in RPMI-1640 Medium kultiviert, welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 100 U Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep) angereichert wurde (RPMI Complete). Die Zellsuspension dieser nicht adhätierenden Zelllinie wurde regelmäßig durch Zugabe von frischem Medium oder durch vollständigen Austausch des Mediums aufgefrischt. Für einen vollständigen Austausch erfolgte eine Zentrifugation der Zellen für 5 Min. bei 300 g. Nach Verwerfen des flüssigen Überstands wurden die Zellen in PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und nach erneutem Verwerfen des PBS wurden die gewaschenen Zellen in frischem Medium in einer Konzentration von ca. 1×10^5 Zellen/ml in einer frischen T175 cm² Zellkulturflasche ausgesät.

HEK 293 + HEK 293/T17

HEK 293/T17 (ATCC® CRL -11268™) bezeichnet den hochgradig transfizierbaren Klon T17 der Zelllinie HEK 293, welche ursprünglich aus fetalen Nierenzellen isoliert worden waren. Beide Zelllinien wurden ebenfalls bei ATCC erworben. Die adhätierenden Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert, welches mit 10 % FCS, 100 U Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep) angereichert wurde (DMEM Complete) in Kombination mit 10 mM Natriumpyruvat. Zur weiteren Subkultivierung wurden die Zellen mittels Trypsin-Behandlung abgelöst. Hierfür wurde das Medium entfernt und der Zellrasen durch Zugabe von PBS einmalig gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mittels Zugabe von Trypsin/EDTA mehrere Minuten unter Beobachtung unter einem inversen Mikroskop gelöst. Nachdem mehr als 90 % der Zellen in Suspension gegangen waren, wurde die Trypsin-Aktivität durch Zugabe von frischem Medium gestoppt und die Zellen umgehend bei 300 g für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden auf diese Weise regelmäßig mit einem Aufteilungsverhältnis von 1:4 bis 1:8 ausgedünnt.

2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung der verwendeten Zelllinien wurde ein an die Zelllinie angepasstes Einfrier-Medium hergestellt. Hierfür wurde das jeweilige Complete-Medium der Zelllinie (s. 2.1.1) mit 10 % DMSO versetzt. Die Zellen wurden, falls erforderlich, in Suspension überführt, gewaschen und in Einfrier-Medium resuspendiert. Nach Überführen der Zellsuspension in 2 ml Kryoröhrchen wurden diese in mittels Isopropanol isolierte Einfrier-Container verbracht, um die Bildung größerer Eiskristalle durch eine maximale Einfriergeschwindigkeit von 1 °C/Min. zu vermeiden. Die Einfrier-Container wurden für eine kurzzeitige Kryokonservierung in - 80 °C Gefrierschränken gelagert. Für eine

langfristige Lagerung wurden die gefrorenen Röhrchen nach mindestens 24 h bei - 80 °C in Flüssigstickstoff-Tanks überführt. Zur Wiederverwendung wurden die gefrorenen Zellen schnell in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Dann wurde die Zellsuspension rasch in frisches, angewärmtes Nährmedium überführt und bei 300 g für 5 Min. zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und wie zuvor beschrieben ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen auf Vitalität und Zellzahl kontrolliert und das Medium gewechselt.

2.1.3 Isolation von CD14⁺ Zellen aus humanen peripheren Blutproben

Die Isolation der CD14⁺ Zellen erfolgte aus Buffy-Coat-Anteilen von Vollblutspenden gesunder BlutspenderInnen. Diese wurden uns taggleich vom Deutschen Roten Kreuz, Baden-Württemberg zur Verfügung gestellt. Die gekühlten Proben wurden unter Zellkulturbedingungen geöffnet und 1:1 mit PBS verdünnt. Die verdünnten Proben wurden in 50 ml Zellkultur Röhrchen überführt und hierbei vorsichtig über eine Schicht mit 15 ml Biocoll Trennlösung geschichtet. Anschließend erfolgte eine Gradient-Zentrifugation bei 1200 g und 20 °C für 30 Min. ohne abschließende Bremsung. Die Biocoll Trennlösung enthält Polysucrose, ein Polymer mit einem Molekulargewicht von etwa 400 kD und einem spezifischen Gewicht von 1077 g/ml. Durch die Gradient-Zentrifugation kann eine Auftrennung der im Blut vorhandenen Zelltypen durch die unterschiedliche molekulare Dichte erreicht werden. Nach der Auftrennung findet man mehrere, gut abgrenzbare Schichten. In der untersten Schicht befinden sich die restlichen Erythrozyten, welche sich in Verbindung mit der Polysucrose zu Aggregaten zusammenlagern. Darüber befindet sich eine Schicht mit Granulozyten. Im Gegensatz zu den vorgenannten Zelltypen penetrieren Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten die hierüber liegende Biocoll-Schicht nicht, so dass diese Zellen eine gut abgrenzbare Schicht zwischen Biocoll und der obersten Schicht, dem Blutplasma, bilden. Nach der Zentrifugation wurde die Schicht mit den Monozyten, Lymphozyten und Thrombozyten vorsichtig mit einer sterilen Pasteur-Pipette in ein neues 50 ml Zellkultur Röhrchen überführt und dieses mit PBS bis auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde für 10 Min. bei 300 g und 20 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das resultierende Zellpellet erneut mit 50 ml PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt und die Zellen zwischen der zweiten und dritten Waschung durchflusszytometrisch gezählt. Anschließend erfolgte die zweite Gradient-Zentrifugation mittels Percoll-Gradienten. Zur Herstellung der Percoll-Trennlösung wurden 15 ml Minimum essential complete (Minimum essential medium + 1 % Pen/Strep + 1 % L-Glutamin. + 1 % Nicht-essenzielle Aminosäuren) mit 13,5 ml Percoll und 1,5 ml Earls Balanced Salt Solution vermischt und für 10 Min. bei 10.670 g ohne abschließende Bremsung zentrifugiert. Das aus der letzten Waschung resultierende Zellpellet wurde in 3 ml PBS resuspendiert und langsam über die vorbereitete Percoll-Trennlösung geschichtet, wobei auf eine maximale Zellzahl von 8×10^8 pro Gradient geachtet wurde. Es erfolgte nun eine Zentrifugation bei 1200 g und 20 °C für 30 Min. ohne abschließende Bremsung. Die schmale resultierende Schicht zwischen den Percoll-Anteilen, welche inzwischen aus Monozyten und Thrombozyten bestand, wurde erneut vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgezogen und in ein neues 50 ml Zellkultur-Röhrchen überführt und mit 50 ml PBS verdünnt. Hiernach wurde die Probe bei 300 g für 10 Min. bei 20 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert und in ein 15 ml Zellkultur-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen maschinell gezählt und erneut bei 300 g für 10 Min. bei 20 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das resultierende Zellpellet in 95 µl MACS-Puffer + 5 µl CD14-MACS-Beads pro 10^7 Zellen resuspendiert. Die anschließende magnetische Zellseparation (MACS = magnetic associated cell sorting) beruht auf dem Konzept magnetischer Kügelchen in Nanometergröße, welche mit gegen CD14 gerichteten Antikörpern beschichtet wurden. CD14 ist ein Co-Rezeptor des LPS-Rezeptor-Komplexes und wird gemeinhin als ein Marker für Monozyten und Makrophagen anerkannt. Durch Zu- und Wegnahme einer magnetischen Kraft kann somit eine hochgradig spezifische Zellseparation erreicht werden. Hierzu wurde die vorbereitete Probe für 20 Min. bei 4° inkubiert, anschließend die Probenröhrchen bis auf 10 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und bei 200 g für 10 Min. bei 10 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands, wurde das resultierende Zellpellet

in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert und anschließend auf eine zuvor mit 5 ml MACS-Puffer hydrierte und in die magnetische Halterung eingesetzte LS-MACS-Säule aufgebracht. Nun wurde die Säule mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und dies insgesamt dreimal wiederholt. Nach der dritten Waschung wurde die Säule aus der magnetischen Halterung entfernt und über einem frischen 15 ml Zellkultur Röhrchen positioniert. Die jetzt nicht mehr durch magnetische Kräfte gehaltenen CD14⁺ Zellen wurden mittels 5 ml MACS-Puffer und unter vorsichtiger Zuhilfenahme des zur Säule passenden Kolbens aus dieser gelöst. Anschließend wurden die Zellen erneut maschinell gezählt und bei 200 g für 10 Min. bei 10 °C zentrifugiert und darauffolgend einmalig mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in X-Vivo Medium resuspendiert und in 6-Well-Platten zur weiteren Stimulation ausgesät. Die Stimulation erfolgte zu den unter 2.1 beschriebenen Brutbedingungen. Die Konzentrationen der zugegebenen Stimulanzien finden sich in folgender Tabelle:

Stimulus	Konzentration
MCSF	100 ng/ml
Dexamethason	1×10^{-7} M (1000 U/ml)
IL-4	10 ng/ml
LPS	1 µg/ml
IFN-γ	50 ng/ml
TNF-α	10 ng/ml
Mifepriston	100 nM
PMA	200 nM

2.1.4 Lentivirus-Herstellung zur Transduktion eukaryoter Zellen

Zur Herstellung einer transgenen, eukaryoten Zelllinie mit Überexprimierung von P2Y14 wurde zunächst ein Vektor tragender Lentivirus in HEK293/T17 Zellen produziert. Hierzu wurden die Zellen in T175 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und bis 80 % Konfluenz kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem vorbereiteten ADR6/hsP2Y14-Vektor oder ADR6/EV (s. 3.2.2) und lentiviralen Plasmiden der dritten Generation (pMD2.G L1, pRSV rev L2, pMDLg / pRRE L3 und pCDNA3.1/p 35 E 71) mittels Xtreme GENE 9 DNA Transfektions-Reagenz transfiziert. Zusätzlich wurden zur Steigerung der Plasmidaufnahme 100 nM Natriumpyruvat in das Medium gegeben. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt und mit 10 mM Natriumbutyrate versetzt, um die Virusproduktion zu stimulieren. Am Folgetag wurde das Medium verworfen, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und im Anschluss mit Erntemedium (DMEM Complete + 1 % Pen/Strep) bedeckt. Nach 8 h Inkubation wurde das Erntemedium gesammelt und mittels eines 0,22 µm Filters von Zellresten befreit. Dieser Vorgang wurde zur Steigerung der Virusausbeute insgesamt dreimal wiederholt. Das gesammelte Erntemedium wurde mittels Vivaspin-Säulen aufkonzentriert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

2.1.5 Herstellung transgener Zelllinien

Zur experimentellen Verwendung P2Y14-überexprimierender Zellen wurden die eukaryoten Zelllinien U937 und HEK 293 mittels Lentivirus (s. 2.1.4) transduziert. Hierzu wurden die genannten Zellen zu 1×10^6 in 10 ml Complete Medium (s. 2.1.1) in 6-Well-Platten ausgesät und jeweils 100 µl Viruslösung (s. 2.1.4) tropfenweise hinzugefügt. Nach 48 h wurde das Medium gewechselt und 2 µg/ml Puromycin zur Selektion hinzugegeben. Jeweils zwei Wells mit unbehandelten Zellen wurden als Negativkontrolle genutzt. Nachdem die Zellen der Negativkontrolle verstorben waren, wurden die transduzierten Zellen geerntet und in üblicher Weise kultiviert. Die Transgen-Expression von P2Y14 wurde mittels PCR, qRT-PCR, Western Blot und ICC verifiziert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Zur Gewinnung von RNA aus eukaryoten Zellen wurden die infrage kommenden Zellen geerntet, einmalig in PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die RNA-Isolation erfolgte unter Verwendung des RNeasy Kits (Qiagen) oder des innuPREP RNA Mini Kit (Jena Analytik), jeweils unter Befolgung des Hersteller-Protokolls. Im Gegensatz zu dem innuPREP Kit, welches bereits im Abschlusschritt kontaminierende, genomische DNA herausfiltert, fehlt bei dem RNeasy Kit ein solcher Schritt. Daher wurde die hieraus gewonnene Probe für 1h bei 37 °C mit DNaseI inkubiert. Abschließend wurde die RNA-Konzentration fotometrisch mittels Nanodrop bestimmt und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert. Für die weitere experimentelle Verwendung und zur Stabilisierung der genetischen Information wurde die gewonnene RNA in cDNA transkribiert. Dies wurde mittels Maxima Reverse Transkriptase in zwei Schritten erreicht. Erst wurde eine Vormischung hergestellt:

Komponente	Menge
RNA	1 µg
Oligo(dT)-Primer (100 µM)	0.5 µg
RNase freies Wasser	auffüllen bis auf 12,5 µl

Diese wurde sanft vermischt und anschließend für 4 Min. bei 65 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Mischung kurz auf Eis abgekühlt und folgende Komponenten hinzugefügt:

Komponente	Menge
5 x RT Puffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	0.5 µl (20 U)
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
Maxima Reverse Transkriptase	1 µl (200 U)

Die anschließende reverse Transkription fand bei 50 °C für 30 Min. statt, das Enzym wurde hiernach bei 85 °C für 5 Min. inaktiviert. Die Lagerung der gewonnenen cDNA erfolgte bei –20 °C.

2.2.2 Klonierung von P2Y14 und Herstellung eines Expressionsvektors

Die Klonierung des humanen P2Y14-Gens (hsP2Y14) erfolgte in einen ADR6-Expressionsvektor. Dieser enthält eine EF1 α -Promoter-Sequenz, eine Multiple Cloning Site (MCS) mit Flag-Tag Markierung, eine Internal Ribosomal Entry Site (IRES), eine Puromycin-Resistenz und eine Red Fluorescent Protein (RFP)-Sequenz zur Selektion und Identifikation erfolgreich klonierter Gene. Zunächst wurde cDNA von hsP2Y14 (IRATp970D0531D) mittels PCR vermehrt und die Schnittsequenzen der Restriktionsenzyme XbaI und MluI in die Sequenz eingebracht unter Verwendung der in Tab. 7 aufgeführten Primer. Diese PCR wurde unter Zuhilfenahme und nach Protokoll der κ -HiFi HotStart DNA Polymerase durchgeführt:

Komponente	Menge
5 x κ -HiFi Puffer	10 µl
10 mM dNTP	1,5 µl
Forward Primer (10 µM)	1,5 µl
Reverse Primer (10 µM)	1,5 µl
κ -Polymerase (1 U/µl)	1,5 µl

Methoden

cDNA	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	34 µl

Geräte-Einstellungen des Thermo-Cyclers:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Start	95 °C	3 Min.	1
Denaturierung	98 °C	20 Sek.	} 17 oder 22
Anlagerung	55,7 oder 58 °C	15 Sek.	
Elongation	72 °C	60 Sek.	
Abschluss	72 °C	5 Min.	1

Mit 10 % des PCR-Produkts wurde eine Agarose-Elektrophorese in üblicher Weise durchgeführt (s. 2.2.3) und die Probe mit der stärksten Bande und ohne sichtbare unspezifische Reaktionen (T_m 58 °C, 17 Zyklen) unter Verwendung des Omnipure-OLS Purification Kit nach Hersteller-Protokoll aufgereinigt. Im Folgenden wurden das aufgereinigte PCR-Produkt und der ADR6 Vektor der enzymatischen Restriktion mit Xba1 und Mlu1 zugeführt:

Komponente	hsP2Y14	ADR6
PCR-Produkt/ADR6	20 µl	2 µl
Xba1	1 µl	1 µl
Mlu1	1 µl	1 µl
10x Tango-Puffer	10 µl	10 µl
Nuklease-freies Wasser	18 µl	36 µl

Die Verdauungslösungen wurden für 1,5 h bei 37 °C inkubiert, hiernach wurde 1 µl Calf-Intestinal-Alkalinphosphatase (CIAP) zur ADR6-Lösung hinzugefügt und beide Proben für weitere 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Bei ADR6 handelt es sich um einen ringförmigen Vektor, der durch die Restriktion linearisiert und nach Aufreinigung spontan religieren würde. Dies wird durch die Zugabe von CIAP verhindert, da diese die 5'-Phosphatgruppe des Vektors entfernt. Nach Abschluss des Restriktionsschrittes wurden beide Proben erneut einer Aufreinigung mittels des Omnipure-OLS Purification Kit zugeführt. Die aufgereinigten Produkte wurden im nächsten Schritt für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C ligiert:

Komponente	Menge
PCR-Produkt	2 µl
Linearisierter ADR6-Vektor	3 µl
Nuklease-freies Wasser	5 µl
➔ Mischung für 10 Min. auf 42 °C erhitzt, dann erst Zugabe der restlichen Komponenten	
T4 10 x Puffer	2 µl
Nuklease-freies Wasser	7,5 µl
T4 Ligase	0,5 µl

Der nun ligierte ADR6/hsP2Y14-Vektor wurde mittels Heat Shock Transformation in einen DH5α-kompetenten E.coli Stamm inseriert. Hierzu wurden die E.coli Bakterien aufgetaut und jeweils mit 2 µl ADR6/hsP2Y14 oder unbehandeltem ADR6 (ADR6/EV) vermengt und 20 Min. auf Eis inkubiert. Die Heat Shock Transformation geschah dann bei 42 °C für 45 Sek., hiernach wurden die Zellen erneut auf Eis für 2 Min. auf Raumtemperatur gebracht und 200 µl SOC-Medium zur Steigerung der Transformationseffizienz beigefügt. Die Proben wurden anschließend bei 800 rpm und 37 °C für 30 Min. geschüttelt und anschließend je 200 µl auf LB-Agarplatten aufgetragen, welche zuvor mit 100 µg/ml

Ampicillin versetzt worden waren. Nach Lagerung der Platten bei 37 °C über Nacht wurden am Folgetag mehrere einzeln liegende Kolonien geerntet und nach PCR-Kontrolle auf kohärente Bandenmuster die beiden vielversprechendsten Kolonien in 100 µg/ml Ampicillinhaltigem Flüssig-LB-Medium bei 37 °C und 120 rpm über Nacht propagiert. Am Folgetag wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet und mittels Endofree Plasmid Maxi Kit nach Hersteller-Protokoll aufgereinigt. Die Nukleinkonzentration des so aufgereinigten Plasmids wurde mittels Nanodrop 2000 bestimmt, auf 100 ng/µl eingestellt und ein Teil zur Sequenzierung durch LGC Genomics versandt. Nach Erhalt der Sequenzierungsdaten wurden diese mittels FinchTV und in Abgleich mit der NCBI-Datenbank auf Kohärenz geprüft und zur weiteren Verwendung freigegeben.

2.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die aus Punkt 2.2.1 gewonnene cDNA wurde mittels PCR auf Vorhandensein durch Primer definierter Nukleinsäure-Fragmente überprüft. Die cDNA-Proben wurden hierzu 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und die PCR pro Probe wie folgt angesetzt:

Komponente	Menge
Nuklease-freies Wasser	6,1 µl
cDNA-Probe	1 µl
10 x TAQ PCR-Puffer	1,2 µl
dNTP's	0,6 µl
Primer Forward 10 µM	0,5 µl
Primer Reverse 10 µM	0,5 µl
DFS-TAQ DNA Polymerase	0,1 µl

Geräte-Einstellungen des Thermo-Cyclers:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Start	95 °C	3 Min.	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 34
Anlagerung	T _m des Primers	30 s	
Elongation	72 °C	45 s	
Abschluss	72 °C	5 Min.	1
Haltefunktion	4 °C	∞	1

Zwischenzeitlich wurden die Agarose-Gele vorbereitet. Hierzu wurde 1 g/100 ml Agarose in TAE-Puffer gelöst. Nach Erwärmen und kurzem Abkühlen der Mischung wurden 7 µl Nancy 520 DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt und die Gele nach Gießen und Aushärtung bis zur weiteren Verwendung in TAE-Puffer gelagert. 10 µl, der mit 6 x Beschwerelösung (Loading Dye) vermengten PCR-Produkte sowie ein DNA-Marker-Mix wurden in die Taschen der vorbereiteten Agarose-Gele aufgetragen. Die anschließende Elektrophorese fand bei 100V für 20–25 Min. statt. Die fertigen Gele wurden abschließend mit dem Azure c400 Gel Imaging System visualisiert.

2.2.4 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Zur Durchführung einer qRT-PCR wurden die aus 2.2.1 gewonnenen cDNA-Proben 1:50 in Nuklease-freiem Wasser verdünnt und mit Primern und dem käuflich erworbenen SYBR® Green PCR Master Mix vermengt:

Komponente	Menge
cDNA-Probe (1:50 verdünnt)	10 µl
Primer Forward 2 µM	3,5 µl
Primer Reverse 2 µM	3,5 µl
SYBR® Green PCR Master Mix	17 µl

Die Proben wurden in Triplikaten zu jeweils 10 µl auf eine 96-Well-Platte pipettiert und mittels MX3000P Detection System unter Standardbedingungen ausgewertet. Jede Probe wurde jeweils gegen ein oder zwei Referenzgene normalisiert, welche zuvor mittels NormFinder Excel-Plug-in zu den spezifischen Zell- und Versuchsumgebungen passend festgelegt wurden (s. jeweilige Ergebnisse). Pro Versuch und Primer wurden die Effizienzkurven der Primer mittels LinRegPCR ermittelt und zur analytischen Auswertung einbezogen. Berechnung des Änderungsfaktors (ÄF) erfolgte gemäß Pfaffl-Methode nach folgender Formel:

$$\ddot{A}F = \frac{E(\text{Zielgen})^{\Delta Ct \text{ Zielgen (Kontrolle-Behandlung)}}}{E(\text{Referenzgen})^{\Delta Ct \text{ Referenzgen (Kontrolle-Behandlung)}}$$

Die Adressierung der Fehlerfortpflanzung der Standarddeviation der Primer-Effizienzen ($SD(E_{\text{Gen}})$) mittels Taylorreihe erfolgte entsprechend nachstehender Formel:

$$SD(\ddot{A}F) = \ddot{A}F \left\{ \frac{(Ct_{\text{Zielgen,Kontrolle}} - Ct_{\text{Zielgen,Behandlung}})^2}{E_{\text{Zielgen}}^2} SD(E_{\text{Zielgen}})^2 + \frac{(Ct_{\text{Referenzgen,Kontrolle}} - Ct_{\text{Referenzgen,Behandlung}})^2}{E_{\text{Referenzgen}}^2} SD(E_{\text{Referenzgen}})^2 + (\log_e E_{\text{Zielgen}})^2 \left(SD(Ct_{\text{Zielgen,Kontrolle}})^2 + SD(Ct_{\text{Zielgen,Behandlung}})^2 \right) + (\log_e E_{\text{Referenzgen}})^2 \left(SD(Ct_{\text{Referenzgen,Kontrolle}})^2 + SD(Ct_{\text{Referenzgen,Behandlung}})^2 \right) \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Im Falle mehrerer Referenzgene wurde zunächst der geometrische Mittelwert aus den Einzeleffizienzen (E_{Gen}) sowie den $SD(E_{\text{Gen}})$ errechnet und fortan verwendet. Die weitere statistische Auswertung erfolgte wie in 2.4 erläutert.

2.2.5 Microarrays

Die wie in 2.2.1 beschrieben isolierte RNA von drei Proben je Kondition wurde mittels Nanodrop 2000 auf eine Nukleinsäurekonzentration von 100 ng/µl eingestellt. Insgesamt 1 µg pro Probe wurden verwendet und zur Anfertigung der Microarrays versandt. Die Durchführung und statistische Vorauswertung der erhobenen Daten wurde durch die Affymetrix Core Facility der Universitätsmedizin Mannheim übernommen. Die vorprozessierten Daten wurden im Weiteren mittels im Rahmen einer Gensatzanreicherungsanalyse (GSEA; Gene Set Enrichment Analysis) mittels GSEA 4.3.2 Software anhand der im Folgenden aufgeführten Parameter auf eine Gensatzanreicherung hin analysiert:

Name	Wert
Enrichment statistic	classic
Normalization Mode	meandiv
Collapsing Mode	Max_probe
Max. Set Size	500

Min. Set Size	15
Number of Permutations	1000
Gene List Ordering Mode	descending
Seed for Permutation	timestamp
Gene List Sorting Mode	real
Metric for Ranked Genes	Signal2Noise
Randomization Mode	no_balance
Permutation Type	gene_set
Collapse/Remap to gene symbols	No_Collapse

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinisolation und -quantifizierung

Zur Proteingewinnung aus Zellen wurden die geernteten Zellproben zunächst in zwei Schritten mit PBS gewaschen und die Zellpellets anschließend in RIPA-Lyse-Puffer resuspendiert und für 20 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C für 10 Min. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Versuchsröhrchen transferiert und die Proteinkonzentration mittels DC™ Protein Assay bestimmt. Die daraus erhaltenen Proben wurden in Duplikaten auf eine 96 Well-Platte pipettiert und die Absorption bei 655 nm mittels Tecan Infinite 200Pro bestimmt. Zur Berechnung der Proteinkonzentration aus den Absorptionswerten wurde eine Standardkurve aus sieben Punkten mittels in RIPA-Lyse-Puffer gelöstem BSA in absteigender Konzentration von 10 mg/ml bis 0,16 mg/ml angefertigt.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde zur Auftrennung von Proteinlysaten (s. 2.3.1) nach Molekülgröße verwendet. Das Prinzip hierbei beruht auf der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit verschieden großer Proteine durch ein polymerisiertes Polyacrylamid-Gel entlang eines elektrischen Feldes. Aufgrund der schlechten Haltbarkeit der Gele wurden diese taggleich gegossen. Für die angestrebte Größenauflösung wurde eine 10-prozentige Trenngellösung wie folgt hergestellt:

Trenngellösung

dH ₂ O	5,9 ml
30 % Bisacrylamid	5 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	3,8 ml
10 % SDS	0,15 ml
10 % APS	0,15 ml
TEMED	6 µl

Um eine Austrocknung der oberen Gelränder zu vermeiden, wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet, welches nach abgeschlossener Polymerisation abgegossen und die Sammelgellösung aufgebracht wurde. Ein Probenkamm wurde bis zum Abschluss der Polymerisation der Sammelgellösung eingebracht.

Sammelgellösung

dH ₂ O	1,72 ml
30 % Bisacrylamid	0,5 ml
0,5 M Tris, pH 6,8	0,76 ml
10 % SDS	0,03 ml
10 % APS	0,03 ml
TEMED	3 µl

Die fertigen Gele wurden in die Elektrophorese-Kammer transferiert, der Probenkamm entfernt und mit TAE-Puffer bedeckt. 40 µg der zuvor 1:1 mit Lämmli-Puffer vermengten Proteinproben wurden bei 95 °C für 5 Min. gekocht. Dies dient der Denaturierung der Proteine, so dass die Auftrennung nach Molekülgröße ermöglicht wird. Zusätzlich erreicht wird dies durch das im Lämmli-Puffer enthaltene β-Mercaptoethanol, welches die Tertiärstruktur der Proteine durch die Spaltung von Disulfidbrücken auflöst und das SDS, welches sich als negativ geladenes Molekül an die Proteine anlagert und so die Eigenladung der Proteine überlagert. Nach kurzem Abkühlen wurden die Proben sowie der Marker PageRuler Prestained in die vorgeformten Vertiefungen gegeben und die Elektrophorese mit 20 mA bei Raumtemperatur durchgeführt. Abschließend wurden die Gele mittels verdünnter Coomassie-Lösung gefärbt oder wie unter 2.3.3 beschrieben weiterverarbeitet.

2.3.3 Western Blot (WB)

Zur verbesserten Darstellung, Stabilisierung der Ergebnisse und Immundetektion einzelner Proteine des mittels 2.3.2 erreichten Auftrennungsergebnisses wurden die Polyacrylamid-Gele per Western-Blot-Methode weiterverarbeitet. Der Proteintransfer erfolgte auf Nitrozellulose- und PVDF-Membranen, entweder über Nacht bei 4 °C und 180 mA im Rahmen eines Nasskammer-Transfers (Wet-Chamber-Blot) oder mittels Trans Blot Turbo für 35 Min. bei 0,45 A (max. 25 V) im Semi-Dry-Verfahren. Die geblotteten Membranen wurden nach dem Transfer mit 5 % Magermilchpulver enthaltendem PBS-Puffer (PBS-5M) für 1 h geblockt, um weitere unspezifische Proteinanlagerungen an die Membran zu unterbinden. Im nächsten Schritt wurden die Membranen mit dem zur Anwendung kommenden Primärantikörper in PBS-5M verdünnt inkubiert. Die jeweiligen Verdünnungsfaktoren finden sich in Tab. 8. Dies geschah für mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Im Anschluss wurde die Lösung abgekippt und die Membranen mindestens dreimal in PBS gewaschen. Nun erfolgte die zweite Inkubation mit einem HRP-konjugierten (horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase) Zweit-Antikörper in PBS-5M verdünnt für 1 h bei Raumtemperatur. Hiernach wurden die Membranen erneut dreimal für 10 Min. in PBS gewaschen und das HRP-Substrat Luminol, Luminat Forte Western HRP-Substrat, für 3 Min. aufgetragen. Das durch die Umwandlung des Substrats durch die HRP vermittelte chemilumineszente Signal wurde mittels lichtsensitiver Filme (High Performance Chemiluminescence Films) detektiert und die Filme mittels Agfa Autoprocessor Curx 60 entwickelt.

2.3.4 Immunzytochemie (ICC)

Zur Darstellung von Zellproteinen unter Verwendung jeweils proteinspezifischer Antikörper an kultivierten Zellen kam die Fixation und Färbung mittels Immunzytochemie zur Anwendung. Je nach Wachstumsverhalten wurden die infrage kommenden Zellen auf Coverslips kultiviert oder Cytospins angefertigt. Je nach Anforderungen des jeweiligen Antikörpers wurden die Zellen in – 20 °C kaltem Aceton oder PFA fixiert. Zur Fixierung in PFA wurden die Zell-beschichteten Objektträger zunächst vorsichtig in PBS gewaschen und anschließend für 10 Min. in 2 % PFA getaucht. Hieraufhin schloss sich eine 15-minütige Inkubation in 0,5 % Triton-X haltigem PBS und in Folge erneut für 10 Min. in 4 % PFA an. Abschließend wurden die Objektträger dreimalig für 10 Min. auf dem Schüttler in PBS gewaschen. Die Färbung wurde zunächst für 2 Min. in 0,1 % Tween-20 haltigem PBS (PBST)

vorbereitet und die Coverslips oder Cytospins jeweils mit Fettstift umfahren, um einem Verlaufen der Antikörperlösungen vorzubeugen. Im nächsten Schritt wurden die zu behandelnden Stellen für 10 Min. mit Wasserstoffperoxidase vorbehandelt, um ggf. endogen vorhandene HRP zu inaktivieren. Im Anschluss wurden die Objektträger je für 2 Min. dreimal in PBS und einmal in PBST gewaschen. Als Nächstes wurden die Objektträger für 30 Min. mit 3 % BSA in PBS geblockt, um so unspezifischen Antikörperbindungen vorzubeugen. Nun wurden die in Antibody Diluent verdünnten Primärantikörper aufgetragen, die Inkubation fand für 2 h bei Raumtemperatur statt. Nach erneut viermaliger (3 x PBS + 1 x PBST) Waschung wurde der ebenfalls in Antibody Diluent verdünnte, HRP-konjugierte, speziesspezifische Zweitantikörper aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Objektträger erneut viermal (3 x PBS + 1 x PBST) gewaschen, für 10–20 Min. mit dem DAKO AEC HS HRP Substrat inkubiert und anschließend für 30–60 Sek. in gefiltertes Hämaalaun getaucht. Das Hämaalaun dient hierbei als bläulich-violette Gegenfärbung zur besseren Kontrastierung des rötlich ausfallenden, unlöslichen HRP-Produkts. Abschließend wurden die Objektträger gründlich mit Wasser von Hämaalaun-Resten gereinigt, Deckglasmedium und Deckglas aufgebracht und bis zur mikroskopischen Auswertung luftgetrocknet. Digitale Bilder der gefärbten Proben wurden mittels CCD-Kamera Clara (Andor) und Nikon Eclipse N1 Mikroskop angefertigt und die erhobenen Daten mithilfe der NIS-Elements Software (Nikon), Adobe Photoshop 24.7.0 oder GIMP 2.10.32 weiterverarbeitet.

2.3.5 Immunhistochemie (IHC)

Die Anfertigung von Gewebeschnittfärbungen im Rahmen einer Immunhistochemie erfolgte mit Proben der Gewebebanken der Klinik für Dermatologie und der Klinik für Pathologie der Universitätsmedizin Mannheim, welche uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Hierzu wurden sowohl Kryostat-Schnitte an zuvor in Flüssigstickstoff gelagerten, als auch Schnitte von zuvor in Paraffin eingebetteten Gewebeproben angefertigt. Nach Anfertigung der Schnitte wurden diese zunächst über Nacht luftgetrocknet. Die Kryoschnitte wurden für 10 Min. in eiskaltem Aceton fixiert und hiernach erneut luftgetrocknet und der Färbung zugeführt (s. 2.3.4). Die Paraffinschnitte wurden zunächst in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100 % - 70 % EtOH) entparaffiniert. Anschließend folgte die Antigen-demaskierung bei 95 °C in EDTA (pH 9) oder Citrat-Puffer (pH 6) für jeweils 20 Min. je nach zu verwendendem Antikörper. Nach Lufttrocknung wurden die Schnitte wie in 2.3.4 gefärbt.

2.3.6 Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)

Das Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) ist eine durchflusszytometrische Methode zur Auftrennung der verschiedenen Zellen einer Probe nach physikalischen Charakteristika (Größe, Transparenz, u. a.) und nach mittels Fluoreszenz-konjugierter Antikörper markierten Epitopen bestimmter Zellproteine. Zur Anwendung dieser Methode wurden die infrage kommenden Zellproben zunächst in FACS-Surface-Puffer (FSB) gewaschen. Bei intrazellulär gelegenen Epitopen wurde das Foxp3/Transcription Factor Staining Kit unter Befolgung des Hersteller-Protokolls verwendet. Durch die anschließende Zugabe von 1,5 µl / 1×10^6 Zellen Fc-Block (BD Biosciences) in den Puffer wurden die auf Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen oder B-Zellen vorkommenden Fc-Rezeptoren geblockt, um somit unspezifische Bindungen der Farbe-Antikörper zu vermeiden. Nach 10 Min. und zweimaliger Waschung der Zellen in FSB wurden die jeweiligen Antikörper hinzugefügt und für weitere 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt entfiel, wenn kein sekundärer Fluoreszenz-konjugierter Antikörper benötigt wurde. Anschließend wurden die Zellen zweimalig in FSB gewaschen und erneut für 20 Min. bei Raumtemperatur mit den Fluoreszenz-konjugierten (sekundären) Antikörpern inkubiert. Nach erneut zweimaliger Waschung wurden die Zellen anschließend in 300 µl FSB resuspendiert und mittels FACS Canto II gemessen. Je Experiment wurde eine ungefärbte Kontrolle (Unstained Control), eine mit 7AAD gefärbte Viabilitäts-Kontrolle (Viability Control), bei Verwendung eines sekundären Antikörpers eine SO-Kontrolle (Secondary-only Control) und bei mehreren verschiedenen Antikörpern, je eine FMO-Kontrolle (Fluorescence minus one) inkludiert. Die

Auswertung erfolgte unter Verwendung der Flow-Jo Software V10.1. Die Gatingstrategie ist exemplarisch in Abb. 16 dargestellt. Die Gerätekompensation wurde zu jedem Experiment unter Nutzung der BD CompBeads nach Hersteller-Protokoll durchgeführt. Aufgrund der technisch bedingten, schlechten Vergleichbarkeit von zu verschiedenen Zeitpunkten erhobenen FACS-Daten, erfolgte die statistische Auswertung ausschließlich intraexperimentell. Die Angabe der Stichprobengröße n ist hierbei als Kumulation der Probenzahlen der getrennt ausgewerteten Experimente angegeben.

2.3.7 Herstellung eines anti-hsP2Y14 Antikörpers

Nach ausführlicher Testung mehrerer kommerziell verfügbarer Antikörper gegen P2Y14 mit teils unzufriedenstellenden Spezifitäten in den jeweiligen Anwendungsfällen, wurde der Entschluss gefasst, einen eigenen gegen P2Y14 gerichteten Antikörper herzustellen. Hierzu wurde ein polyklonaler Antikörper gegen die Peptidsequenz AQNDLDIRIKRGNTTLESTDTL konstruiert, welche der intrazellulär gelegenen Region 316 bis 338 des C-Terminus der P2Y14-Primärsequenz (NCBI Reference Sequence: NP_001074924.1) entspricht. Das synthetisierte Peptid wurde mittels KLH-Träger-Protein als immunogenes Antigen kommerziell durch die Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg verwendet (Trägerspezies: Rabbit). Die Aufreinigung des erhaltenen Serums wurde mittels Affinitätschromatografie mithilfe der dazu mitgelieferten Peptid-Säulen nach deren Protokoll durchgeführt.

2.3.8 Calcium-Influx-Assay

Der Calcium-Einstrom als Kenngröße für die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors P2Y14 wurde mittels Calcium-Influx-Assay bestimmt. Die hierfür verwendeten Zellen wurden zunächst in einer schwarzen 96-Well-Platte mit transparentem Boden in 10 % FCS haltigem PBS ausgesät und bis zum Folgetag unter Standardbrutbedingungen kultiviert. Am zweiten Tag, mindestens 24 h vor Versuchsdurchführung, wurden die Zellen auf Viabilität kontrolliert und auf 0 % FCS gewechselt. Am dritten Tag erfolgte die Versuchsdurchführung. Hierzu wurde das Calcium NoWash^{PLUS} Assay Kit verwendet und nach Hersteller-Protokoll verfahren. Zur Messung wurde mittels 12-Tip-Multipipette max. 10 μ l der Agonistenlösung, PBS als Negativkontrolle oder der Ionophore A23187 als Positivkontrolle 1:10 zu einer vertikalen Plattenreihe pro Messdurchgang unmittelbar vor Start hinzugegeben. Die Messung der Fluoreszenz (Exzitation 494 nm, Emission 516 nm) erfolgte unter Verwendung des Tecan infinite 200Pro und der dazugehörigen Software Tecan i-control V1.11.1.0. Zur Normalisierung der Messwerte wurde der Mittelwert einer vierfachen Leermessung der Platte herangezogen.

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der experimentell erhobenen Daten erfolgte unter Verwendung von GraphPad Prism 10. Mittels unpaired student's t-test, one-way ANOVA oder two-way ANOVA mit Bonferroni-Test wurde die statistische Signifikanz ermittelt und mittels Sternchen grafisch dargestellt (*= $p \leq 0,05$, **= $p \leq 0,01$, ***= $p \leq 0,001$). Die grafisch dargestellten Fehlerbalken entsprechen den errechneten SEM (Standard error of mean, Standardfehler des Mittelwerts) oder SD (Standarddeviation).

3. Materialien

Tabelle 2: Verbrauchsgüter

Artikel	Hersteller
12-well plates	Greiner bio-one
24-well plates	Greiner bio-one
6-well plates	Greiner bio-one
96-well plates	Greiner bio-one
Cell scraper	Greiner bio-one
Cell strainer 100 µm	BD Falcon
Cellculture flask 175 cm ² (T175)	Greiner bio-one
Cellculture flask 25 cm ² (T25)	Greiner bio-one
Cellculture flask 75 cm ² (T75)	Greiner bio-one
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0.5 ml	Eppendorf
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1.5 ml	Eppendorf
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2.0 ml	Eppendorf
High-Performance Chemiluminescence Film	Amersham
Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare
Immune-Blot PVDF Membrane	BioRad
LS Columns	Miltenyi
Micro-Assay-Platte, 96-well black, clear bottom (GB655097)	Greiner bio-one
Vivaspin Columns (MWCO=100,000 PES)	Sartorius

Tabelle 3: Zellkultur

Medium / Reagenz	Hersteller
Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
Earl's balanced salt solution (EBSS)	Gibco
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom
Minimum Essential Medium	Sigma
Nicht-Essenzielle Aminosäuren	Biochrom
Opti-MEM I reduced serum media	Gibco
Penicillin / Streptomycin	Biochrom
Puromycin	Invitrogen
RPMI-1640	Gibco
Trypsin / EDTA	Gibco
X-treme Gene 9 DNA transfection reagent	Roche
X-Vivo	Lonza

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Artikel	Hersteller
0.5 M Tris (pH 6,8)	Bio-Rad

Artikel	Hersteller
1.5 M Tris (pH 8,8)	Bio-Rad
10 × Tris Glycine Buffer (TGS)	Bio-Rad
30 % Acrylamide Mix	Bio-Rad
4-Aminophenylmercuric acetate (APMA)	Sigma Aldrich
7-AAD (559925)	BD Biosciences
A23187 (Calcimycin), Ca ²⁺ Ionophore (ab120287)	Abcam
Aceton (C ₃ H ₆ O)	Carl Roth
AEC Chromogen Substrate	Dako
Agarose	Sigma Aldrich
Ammonium persulfate (APS)	Sigma Aldrich
Ampicillin	Sigma Aldrich
Antibody Diluent	Dako
Antigen Retrieval Solution pH 6	Leica
Antigen Retrieval Solution pH 9	Leica
Biocoll	Biochrom
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich
Calf-Intestinal-Alkaliphosphatase	Fermentas
Cell Dissociation Solution non-enzymatic 1x	Sigma Aldrich
Collagenase IV	Genaxxon
Coomassie Brilliant Blue	Serva
Crystal violet	Carl Roth
Dexamethason	Sigma Aldrich
DFS-TAQ DNA Polymerase	Bioron
DH5 α kompetente <i>E. coli</i>	Invitrogen
DMSO	Sigma Aldrich
DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
DNase I	Fermentas
dNTP	Fermentas
dNTP	Thermo Fisher Scientific
DPBS	Gibco
EcoMount	Biocare Medical
Essigsäure / Acetic Acid (C ₂ H ₄ O ₂)	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma Aldrich
Eukitt	Kindler
Faramount Aqueous Mounting Medium	Dako
Fc-Block	BD Biosciences
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom
Gelatine	Sigma Aldrich
Heparin	Sigma Aldrich
Hydrochloric acid (HCl)	Merck
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Merck
Interferon-γ (IFN-γ)	Peprtech
Interleukin-4	Peprtech
Isopropanol	Carl Roth

Materialien

Artikel	Hersteller
Kappa Polymerase	Invitrogen
Laemmli Buffer	Bio-Rad
Lipopolysaccharide (LPS)	Invitrogen
Luminate Forte Western HRP Substrat	Millipore
Lysogeny broth (LB) Agar	Carl Roth
Lysogeny broth (LB) Medium	Carl Roth
Macrophage colony-stimulating factor (MCSF)	Peprotech
Magermilchpulver	Carl Roth
Mayer's Haematoxylin / Hämalau	Merck
Methanol	Sigma Aldrich
Mifepriston	Sigma Aldrich
Mlu I	Thermo Fisher Scientific
MRS 2690 (CAS 15039-58-4)	Santa Cruz Biotechnology
Nancy 520	Sigma Aldrich
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma Aldrich
Natriumbutyrat (C ₄ H ₇ NaO ₂)	Sigma Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich
Natriumdeoxycholat (C ₂₄ H ₃₉ O ₄ Na)	Sigma Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Bio-Rad
Natriumfluorid (NaF)	Sigma Aldrich
Natriumpyruvat (C ₃ H ₃ NaO ₃)	Sigma Aldrich
NP-40	Thermo Fisher Scientific
Oligo(dT)18 Primer	Thermo Fisher Scientific
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyde (PFA)	Carl Roth
Penicillin / Streptomycin	Biochrom
Percoll	GE Healthcare
Peroxidase Blocking Solution	Dako
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Roche
Phosphate buffered saline (PBS)	Invitrogen
PMA	Sigma Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Protein G Agarose	Roche (Sigma)
Proteinase K	Dako
Puromycin	Invivogen
RiboLock RNase inhibitor	Thermo Fisher Scientific
RIPA Buffer	Sigma Aldrich
RNAscope® Hydrogen Peroxide Reagent	ACDbio
RNAscope® Protease Plus Reagent	ACDbio
RNAscope® Target Retrieval Reagent	ACDbio
Rotiophorese Puffer TAE	Carl Roth
SOC Medium	Invitrogen
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA Ligase Puffer	Thermo Fisher Scientific

Artikel	Hersteller
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	GenAxxon
Tris / HCl	Sigma Aldrich
Triton X-100	Sigma Aldrich
Trypsin / EDTA	Gibco
Tumour necrosis factor- α (TNF- α)	Peprotech
Tween 20	Sigma Aldrich
UDP-Glukose (ab120384)	Abcam
Xba I	Thermo Scientific
Xylol / Xylene	Carl Roth
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich

Tabelle 5:Kits

Artikelname	Hersteller
Calcium NoWash ^{PLUS} Assay Kit	DiscoverX
CD14 Microbeads	Miltenyi
CompBead Anti-Mouse Ig, κ /NC Compensation Particles (552843)	BD Biosciences
CompBead ^{PLUS} Anti-Rat Ig, κ /NC Compensation Particles (560499)	BD Biosciences
DC TM Protein Assay	Bio Rad
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
GeneChip TM Human Gene 2.0 ST Array	Applied Biosystems
innuPREP RNA Mini Kit	Analytik Jena
Maxima Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific
Omnipure-OLS Purification Kit (2700911)	Omni Life Science
RNeasy Kit	Qiagen
κ -HiFi HotStart PCR Kit	VWR / Peqlab
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (00-5523-00)	eBioscience

Tabelle 6:Puffer-Rezepte

Tris Buffered Saline (TBS)	
Tris	20 mM
NaCl	150 mM
pH	7,6

RIPA-Lyse-Puffer	
Natriumchlorid (NaCl)	150 mM
NP-40	1 %
Natriumdeoxycholat	0,50 %
SDS	0,10 %
Tris / HCl (pH 8,0)	50 mM
Natriumfluorid (NaF)	10 mM
EDTA	2 mM
Protease Inhibitor Cocktail	4 %

Materialien

MACS-Puffer

PBS	1 ×
BSA	0,50 %
EDTA	2 mM

Western-Blot-Puffer (Wet-Chamber)

TGS	1 ×
Methanol	20 %

Western-Blot-Puffer (Semi-Dry)

TGS	3
Methanol	20 %
SDS	0,10 %

FACS-Surface-Puffer (FSB)

PBS	1 ×
BSA	10 %
Natriumazid (NaN ₃)	0,05 %

Tabelle 7:Primer

Gen	Forward	Reverse
hsP2Y1	AGAATGACCGAGGTGCTGTG	ACGTACAAGAAGTCGGCCAG
hsP2Y2	TCCTGTTTCCCGCAGAGTTC	CAAGCTCTGGAACCTGACCA
hsP2Y4	TTATGCAGCCCACAACCACT	GCTACGACCAACCAAAGTGC
hsP2Y6	ACACGGTCCCCTCATTGAC	TGTGCCATTGTCCCATTCCAT
hsP2Y8	AAGGTTGCTGGACAGATGGAAC	CCCACAGAGAGAAGAGGTTGC
hsP2Y10	ACTCACCAACATACCCTTCTTTC	CCACAAGGCTGCACTGTTAG
hsP2Y11	GGCACAATGAGGAAGGAAACGT	CCCTGGAACCCACTGAGTTTG
hsP2Y13	ACTGCCGCCATAAGAAGACA	ATCAAGTCGGCCACCAAAGT
hsP2Y14_qRT-PCR	AGCCGTGCTAATCTGTAACCC	AACTTCTGAAGGCAGAGGCCTTTTA
hsP2Y14_PCR	CTCACTGGGCAAAACACCTT	CTCTTAGAGCTGGGCACGTA
hsLyve-1	CTTGCAGCTATGGCTGGGTT	TAAGGGGATGCCACCGAGTA
hsRPII	CTCATCGAGGGTCATACTATTGG	CCTCTATTACGTCTGCTTGG
hsGAPDH	TTCGTCATGGGTGTGAACC	CTGTGGTCATGAGTCCTTCC
hsβ-actin	GGCACCACACCTTCTACAATGA	TCTCCTTAATGTCACGCACGAT
hsTNF-α	AGCCCATGTTGTAGCAAACC	CAGACTCGGCAAAGTCGAGA
hsCD206	TGGTTTCCATTGAAAGTGCTGC	TTCCTGGGCTTGACTIONGTTA
hsP2Y14_Xba1	AATTTCTAGACGCAGGATCTTTAATGA	
hsP2Y14_adr6_Mlu1	GTAACGCGTGCCAAAGTATCTGTGCTTTCAAGTG	

Tabelle 8:Antikörper

Antikörper	Anwendung in	Verdünnung	Hersteller
anti-hsP2Y14	WB, FACS	1/100	Sigma Aldrich (P0119-200UL)
anti-hsP2Y14	WB	1/100-1/2000	St.John's Lab. (STJ110477)

Materialien

anti-hsP2Y14	WB, ICC, IHC, FACS	1/500(WB), 1:100-1:300 (IHC)	Assay Biotechnology (G120)
anti-hsP2Y14	WB, ICC, IHC, FACS	1/100 (IHC))	Alomone Labs (APR-018)
anti-hsP2Y14 CT316	WB, ICC, IHC, FACS	1/200 (WB) 1/200 (ICC) 1/200 (IHC) 1/100 (FACS)	eigene Herstellung (PSL Heidelberg)
anti-hsStab1	ICC	1/200	eigene Herstellung (PSL Heidelberg)
anti-Flag M2	WB, ICC, IHC, FACS	1/500	Sigma Aldrich (F1804)
anti-mm / hs GAPDH	WB	1/2500	Santa Cruz (SC25778)
anti-mouse IgG HRP	IHC	1:1	Dako (K4005)
anti-mouse IgG HRP	WB	1/5000	GE Healthcare (NXA931V)
anti-rabbit IgG HRP	IHC	1:1	Dako (K4009)
anti-rabbit IgG HRP	WB	1/5000	GE Healthcare (NA934V)
APC anti-hs CD11b	FACS	1/100	BD Bioscience (550019)
APC-Cy7 anti-hs HLA-Dr	FACS	1/100	BD Bioscience (561358)
PE-Cy7 anti-hs CD86	FACS	1/100	BD Bioscience (561128)
FITC anti-rabbit IgG	FACS	1/400	Dianova (711-486-152)
FITC anti-mouse IgG	FACS	1/400	Dianova (115-095-068)
PE anti-hs CD163	FACS	1/100	BD Bioscience (556018)
PE-Cy5 anti-hs CD206	FACS	1/5	BD Bioscience (551136)

Tabelle 9: Instrumente

Instrument	Hersteller
Autoprocessor Curx 60	Agfa
Axio VERT.A1 Microscope	Zeiss
Azure c400	Azure Biosystems
Centrifuge 5417R	Eppendorf
Centrifuge 5810R	Eppendorf
Clara CCD Kamera	Andor / Oxford Instruments
Cryotome CM3050S	Leica
Cytospin 3	Shandon
DS-U3 Digital Camera Control Unit	Nikon
FACS Canto™ II	BD Biosciences
Freezer MDF U743V	Sanyo
HeraSafe KS Laminar Flow	Thermo Fisher Scientific
Incubator Heracell L50i	Thermo Fisher Scientific
Infinite M 200 Pro	Tecan
Kelvitron T	Heraeus
Microtome RM2065	Leica
Mupid-One Electrophorese Kammer	Biozym
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific
pH Meter FG2 / EL2	Mettler Toledo
PowerPac Basic	Bio-Rad

Materialien

Quadro MACS™ Separator	Miltenyi
Rotator SB2	Stuart
Shaker DRS12	Peqlab
Stratagene Mx3005P	Agilent Technologies
TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad
Thermoblock Thermomixer	Eppendorf
Thermocycler T100	Bio-Rad
Trans-Blot Turbo Device	Bio-Rad
Upright motorized Microscope Eclipse Ni-E	Nikon
UV Systems N-90 m	Intas
Vortex Genie-2	Scientific Industries
Wasserbad	Memmet
Z2 Coulter Particle Count & Size Analyzer	Beckman Coulter

Tabelle 10: Software

Name
Adobe Photoshop 6.0
FinchTV 1.4.0
FlowCytomix Pro Software (ebioscience)
FlowJo V 10.1
GraphPad Prism 8
Image J
LinRegPCR Version 2014
Microsoft Office 2019
MxPro QPCR Software (Agilent)
NIS-Elements Advanced Software (Nikon)
NormFinder Excel Plug-in
Tecan i-control V1.11.1.0
Zeiss Software System
GSEA 4.3.2
GenePattern Webanwendung _ HeatMapView Modul

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der P2Y14 Expression in pBMC und U937 Zellen

4.1.1 Stimulation von pBMC mit MDI führt zur Hochregulation der P2Y14-Genexpression

Die in 1.4 beschriebene Hochregulation der mRNA-Expression von P2Y14 in mittels MCSF, IL-4 und Dexamethason (MDI) behandelten pBMC im Vergleich zu ausschließlich mit MCSF (M) stimulierten pBMC wurde im Rahmen dieser Arbeit eingangs verifiziert und detaillierter untersucht. Hierzu erfolgte zunächst die Etablierung eines PCR-Primers und sukzessive Darstellung mittels Agarose-Gelelektrophorese. In Abb. 8 ist eine solche exemplarisch dargestellt. Es zeigte sich eine jeweils deutliche Genexpression von P2Y14 in mit MDI behandelten pBMC. Dagegen fand sich keine – oder in vereinzelt Proben eine nur schwache Expression (s. Abb. 9) – in solchen pBMC, welche ausschließlich mit MCSF stimuliert worden waren. Dies zeigte sich äquivalent zur Genexpression von LYVE-1, welcher zur Kontrolle einer M2-ähnlichen Differenzierung der pBMC herangezogen wurde. Um den zeitlichen Verlauf der durch die Stimulation hervorgerufenen Genexpression besser zu verstehen, wurden die Zellen in einem weiteren Experiment jeweils nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8 Tagen Stimulation geerntet und das Expressionsprofil im Rahmen einer gemeinsamen PCR untersucht (s. Abb. 9).

Eine über dieses Maß hinausgehende Stimulation zeigte sich in der Vergangenheit als nicht zielführend, da die Vitalität der Zellen nach 8 Tagen rapide abnimmt. Die P2Y14 Genexpression zeigte sich hierbei in den MDI-behandelten Zellen rasch zunehmend, mit der visuell größten Bande an Tag 5 der Stimulation und hiernach erneut leichtem Rückgang bis Tag 8. Ebenso konnte bei den ausschließlich mit MCSF behandelten Zellen eine sichtbare Zu- und Abnahme der Genexpression verzeichnet werden, allerdings mit dem Höhepunkt an Tag 2 der Stimulation und bei zu allen Zeitpunkten deutlich geringerer Ausprägung als in den MDI-behandelten Zellen. Aufgrund der schlechten Vergleichbarkeit und unzureichender Quantifizierbarkeit dieser PCR-Daten wurden beide Experimente im Rahmen einer qRT-PCR wiederholt (s. Abb. 10). In Abb. 10a ist der Änderungsfaktor in der P2Y14 mRNA-Expression der MDI-behandelten Zellen nach 7 Tagen Stimulation dargestellt. Im Vergleich zu den ausschließlich mit MCSF behandelten Zellen zeigte sich diese um das 11,50 - fache ($\pm 3,142$) hochsignifikant erhöht ($p=0,00005$). Dieses Ergebnis zeigte sich konsistent zu der Wiederholung des Zeitverlauf-Experiments (s. Abb. 10b). Hierbei wurden die ÄF der P2Y14 mRNA-Expression beider Gruppen gegen Tag 0 – also undifferenzierte pBMC – berechnet. Während die P2Y14 Expression in der MCSF – Gruppe zuerst

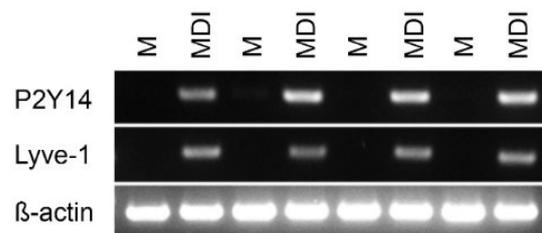


Abb. 8 – Exemplarische Fotodokumentation eines Agarose-Gels nach PCR. Aufgetragen wurden Proben von vier gesunden Spendern, jeweils für 7 Tage mit MCSF (M) oder MCSF + Dexamethason + IL-4 (MDI) stimuliert. Primer gegen P2Y14, Lyve-1 und beta-actin als Referenzgen.

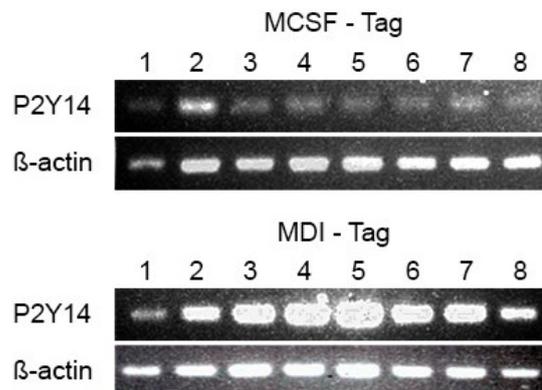


Abb. 9 – Exemplarische Fotodokumentation eines Agarose-Gels nach PCR. Dargestellt ist die Probe eines Spenders, welche für jeweils einen bis 8 Tage mit MCSF (M) oder MCSF + Dexamethason + IL-4 (MDI) stimuliert wurde. Primer gegen P2Y14 und beta-actin als Referenzgen.

Ergebnisse

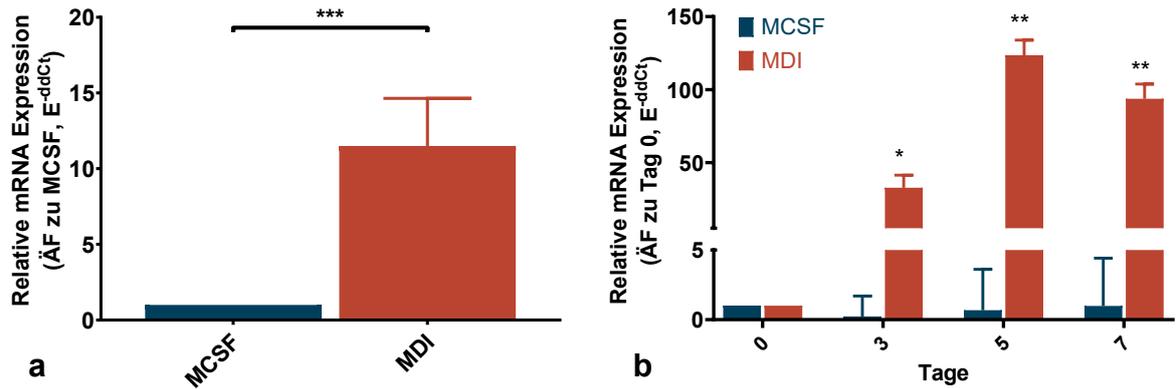


Abb. 11 – a) Darstellung der relativen P2Y14 mRNA-Expression von MDI-behandelten pBMC im Vergleich zu Zellen, welche ausschließlich mit MCSF stimuliert wurden; n=11 **b)** P2Y14 mRNA-Expression von MCSF- und MDI-behandelten Zellen im Zeitverlauf, aufgetragen an Tag 0, 3, 5 und 7 nach Beginn der Stimulation. Änderungsfaktor je Stimulation zu Tag 0; n=9. Primer gegen P2Y14, normalisiert gegen RPII und β -actin. Änderungsfaktor E^{-ddCT} . Fehlerbalken kennzeichnen die SD

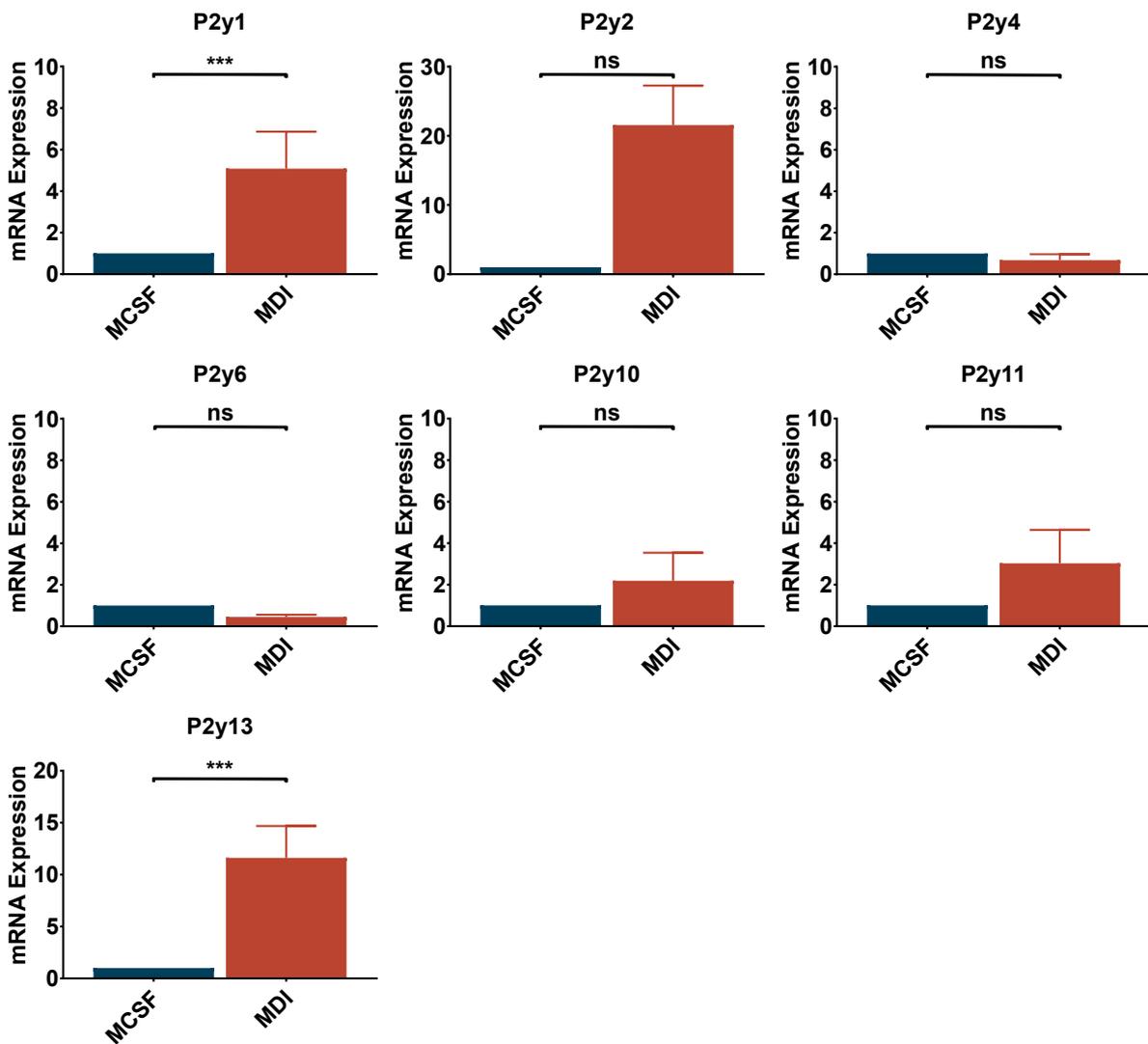
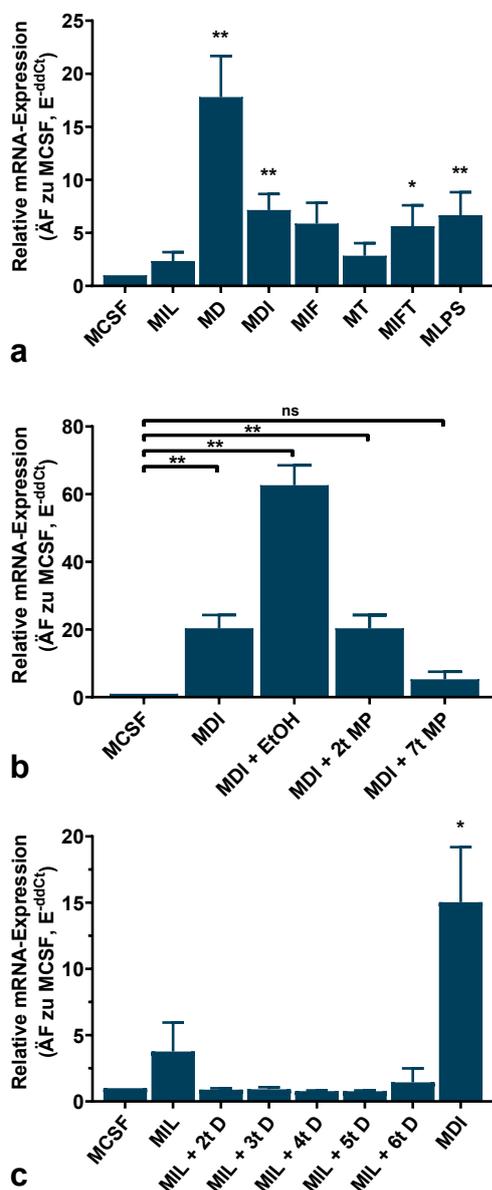


Abb. 11 – Darstellung der relativen mRNA-Expression von MDI-behandelten Zellen im Vergleich zu Zellen, welche ausschließlich mit MCSF stimuliert wurden. Die Stimulation erfolgte jeweils für 7 Tage; n=3; Primer wie angegeben, normalisiert gegen β -actin; dargestellt als Änderungsfaktor, berechnet als E^{-ddCT} zu MCSF. Fehlerbalken kennzeichnen die SD.

abfiel, um dann bis Tag 7 wieder nahezu das Ausgangsniveau zu erreichen (Tag 3: $0,23 \pm 1,468$; Tag 5: $0,68 \pm 2,932$; Tag 7: $0,98 \pm 3,437$) – wobei keines dieser Ergebnisse Signifikanz erreichte –, stieg die P2Y14-Expression in den MDI-behandelten Zellen bereits ab Tag 3 signifikant an (Tag 3: $32,77 \pm 8,64$; Tag 5: $123,40 \pm 10,448$; Tag 7: $93,71 \pm 10,062$). In Übereinstimmung mit den PCR-Ergebnissen konnte hierbei die stärkste Ausprägung an Tag 5 beobachtet werden. Neben P2Y14 zeigte sich in diesen Untersuchungsbedingungen auch P2Y12 signifikant hochreguliert, ein Ergebnis, das parallel in einer separaten Arbeit verifiziert wurde (s. 1.4). Um die Bedeutung der restlichen Mitglieder der P2Y-Familie in diesem Setting zu beleuchten, wurden diese ebenfalls mittels qRT-PCR untersucht. Nach 7 Tagen Stimulation mit MDI im Vergleich zu MCSF allein wiesen die untersuchten Zellen eine signifikante Hochregulierung der Genexpression von P2Y1 ($\text{ÄF: } 5,08 \pm 1,78$) und P2Y13 ($\text{ÄF: } 11,62 \pm 3,07$) auf. Bei den restlichen Mitgliedern der Rezeptorfamilie konnte keine signifikante Hochregulierung nachgewiesen werden.

4.1.2 Dexamethason, IFN- γ , TNF- α und LPS sind Induktoren der P2Y14-Genexpression in pBMC



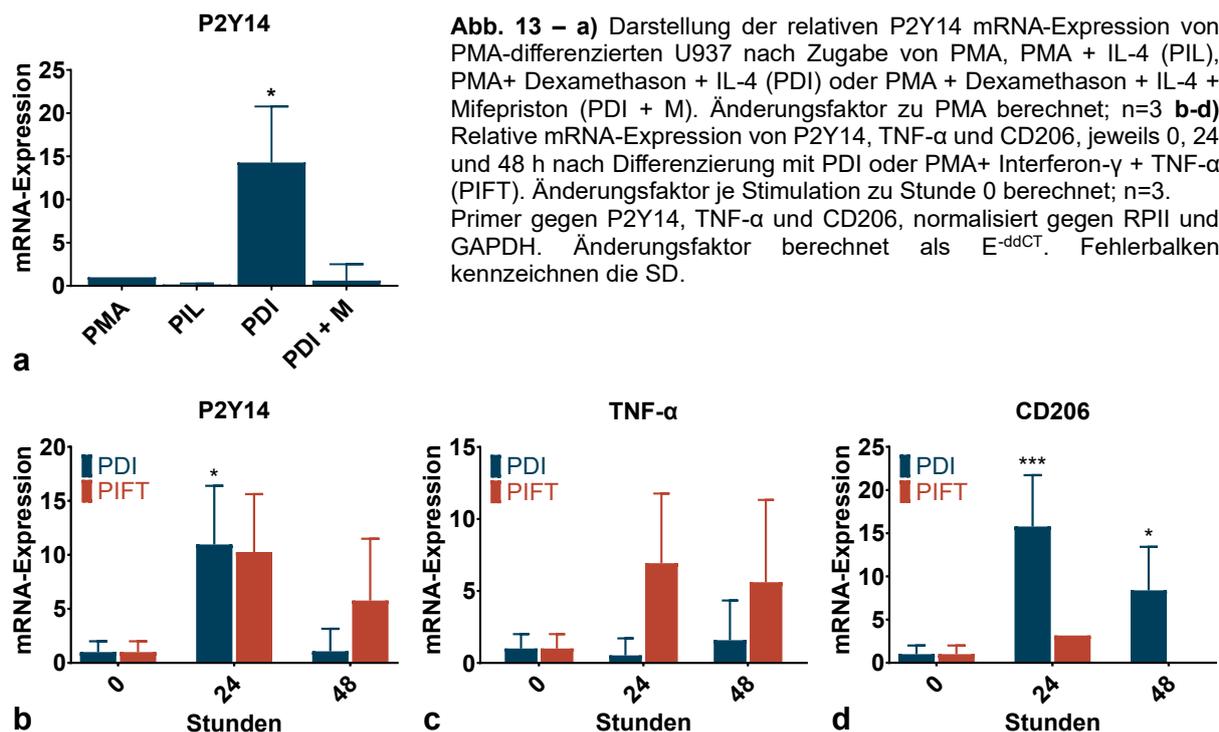
Da aus den bisherigen Daten zur P2Y14-Genexpression bislang keine Aussagen darüber getroffen werden konnten, welcher der Bestandteile der MDI-Stimulation für den starken Anstieg verantwortlich ist und um die Bedeutung für andere Untergruppen der Makrophagen-Population weiter zu beleuchten, wurden im nächsten Schritt die Auswirkungen unterschiedlicher Stimulationen auf die isolierten pBMC untersucht. Hierbei erfolgte zunächst die Stimulation nach Isolation der pBMC für 7 Tage mit MCSF (M), MCSF + IL-4 (MIL), MCSF + Dexamethason + IL-4 (MDI), MCSF + IFN- γ (MIF), MCSF + TNF- α (MIT), MCSF + IFN- γ + TNF- α (MIFT) und MCSF + LPS (s. Abb. 12a). Nach Analyse mittels qRT-PCR zeigte sich die Stimulation mit MIL ($\text{ÄF: } 2,33 \pm 0,849$) als nicht ausreichend, um eine signifikante Hochregulierung auszulösen. In Verbindung mit Dexamethason (MDI; $\text{ÄF: } 7,15 \pm 1,519$) dagegen, aber auch nur mit Dexamethason (MD; $\text{ÄF: } 17,8 \pm 3,876$) zeigte sich eine signifikante Steigerung der Genexpression im Vergleich zu MCSF. Auch MIFT ($\text{ÄF: } 5,61 \pm 1,984$) und MLPS ($\text{ÄF: } 6,64 \pm 2,194$), klassische Aktivatorer für eine M1-Polarisation von

Abb. 12 – a) Darstellung der relativen P2Y14 mRNA-Expression nach 7 Tagen Stimulation mit MCSF (M), MCSF + IL-4 (MIL), MCSF + Dexamethason + IL-4 (MDI), MCSF + Interferon- γ (MIF), MCSF + TNF- α (MIT), MCSF + Interferon- γ + TNF- α (MIFT) und MCSF + LPS (MLPS); n=7 **b**) P2Y14 mRNA-Expression von MCSF- und MDI-behandelten Zellen mit Zugabe von Mifepriston (MP) an Tag 0 (7t) oder Tag 5 (2t), Negativkontrolle von EtOH als Lösungsmittel von Mifepriston. n=7. **c**) P2Y14 mRNA-Expression von MCSF, MIL und MDI sowie Zugabe von Dexamethason zu MIL-behandelten Zellen jeweils an Tag 1, 2, 3, 4, und 5; n=4. Analyse mittels qRT-PCR. Primer gegen P2Y14, normalisiert gegen β -actin. Änderungsfaktor berechnet als E^{-ddCT} zu MCSF. SD abgebildet

Makrophagen, zeigten sich imstande, die mRNA-Expression von P2Y14 signifikant zu erhöhen. Die alleinige Stimulation jeweils mit Interferon- γ (MIF; $5,87 \pm 1,968$) oder TNF- α (MT; $2,84 \pm 1,188$) wiesen ebenfalls eine Tendenz zur Hochregulierung von P2Y14 auf. Diese Ergebnisse erreichten jedoch keine statistische Signifikanz. Mittels Suppressionsversuch sollte im nächsten Schritt Dexamethason als entscheidende Substanz innerhalb der MDI-Kombination zur Hochregulation der P2Y14-Genexpression verifiziert werden. Hierzu wurde der sich auch im klinischen Gebrauch, beispielsweise zur Behandlung des Cushing-Syndroms, befindliche Glukokortikoid-Rezeptorantagonist Mifepriston verwendet (s. Abb. 12b). Nach Isolation der Zellen wurden diese hierfür entweder mit MCSF oder MDI stimuliert. Zur Kontrolle wurde einem Teil der MDI-behandelten Zellen bereits am Tag der Isolation Mifepriston (MDI + 7t MP) oder nur das Lösungsmittel EtOH (MDI + EtOH) zugesetzt. Bei einem weiteren Teil der Zellen wurde das Mifepriston erst an Tag 5 der Stimulation hinzugefügt (MDI + 2t MP). Hierbei zeigte sich, dass eine zeitgleiche Zugabe von Mifepriston und Dexamethason imstande war, die Hochregulation von P2Y14 vollständig zu unterbinden. Die späte Zugabe von Mifepriston an Tag 5 und EtOH allein verfehlten diesen Effekt. Mit Dexamethason als hauptverantwortlicher Substanz der MDI-Stimulation zur Hochregulierung der P2Y14-Genexpression, galt es im nächsten Schritt, den zeitlichen Zusammenhang zwischen der Zugabe von MCSF, IL-4 und Dexamethason zu ergründen. Hierzu wurden die Zellen nach Isolation erneut mit MCSF, MIL und MDI stimuliert. Zu jeweils einem Teil der MIL-behandelten Zellen wurde nun an jedem folgenden Tag Dexamethason hinzugefügt (s. Abb. 12c). Es zeigte sich, dass nur die zeitgleiche Stimulation für 7 Tage (MDI, ÄF: $15,03 \pm 4,161$) zu einer signifikanten Steigerung der Genexpression von P2Y14 führte. Die vorab erfolgte Stimulation mit IL-4 führte dagegen zu einer vollständigen Aufhebung des Dexamethason-vermittelten Effekts.

4.1.3 P2Y14 Genexpression kann in PMA-differenzierten U937-Zellen durch Dexamethason und IL-4 induziert werden

Die menschliche, monozytäre Zelllinie U937 findet weithin Verwendung als In-vitro-Modell monozytärer Zellen in diversen zellbiologischen Untersuchungen. Durch Stimulation mit dem Phorbol-ester Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) differenzieren diese Zellen zu einer Makrophagen-ähnlichen Zellpopulation. Zur Untersuchung der bisherigen Ergebnisse auf eine mögliche Übertragbarkeit wurden



kommerziell erworbene U937 Zellen einem Stimulationsexperiment zugeführt (s. Abb. 13a) Hierzu wurden die Zellen für 24 h mit entweder PMA, PMA + IL-4 (PIL), PMA + Dexamethason + IL-4 (PDI) oder PDI + Mifepriston (PDI + M) inkubiert und mittels qRT-PCR untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Hochregulierung von P2Y14 in PDI-behandelten Zellen (ÄF: $14,28 \pm 6,487$), nicht jedoch in PIL-behandelten Zellen oder nach Antagonisierung der Dexamethason-Wirkung mittels Mifepriston. Zur Klärung, ob sich U937 Zellen ähnlich wie humane pBMC im Zeitverlauf verhalten, wurden die Zellen im folgenden Experiment für jeweils 24 und 48 h mit PDI oder PMA + IFN- γ + TNF- α (PIFT) stimuliert und das Expressionsprofil von P2Y14 im Vergleich zu unstimulierten U937-Zellen bestimmt (Abb. 13b). Hierbei fand sich eine Hochregulierung von P2Y14 in PDI- und PIFT-stimulierten Zellen nach 24 h Stimulation mit sukzessivem Abfall nach 48h. Hierbei stellte sich jedoch nur die PDI-induzierte Expressionssteigerung als statistisch signifikant dar. Dies zeigte sich in Übereinstimmung mit einer PDI-induzierten, signifikanten Hochregulierung des Mannose-Rezeptors CD206, der weithin als Marker für M2-Makrophagen anerkannt ist (Abb. 13d). Die Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α , zeigte sich in den PIFT-stimulierten Zellen tendenziell hochreguliert, in den PDI-behandelten Zellen dagegen herunterreguliert (Abb. 13c).

4.2 Charakterisierung der Proteinexpression von P2Y14

4.2.1 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen P2Y14 und Spezifitätstestung mittels transfizierten U937 und HEK 293

Im weiteren Verlauf der Experimente sollten die bisherigen Ergebnisse in Bezug auf Ihre Übertragbarkeit auf die Proteinexpression der pBMC hin untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass die getesteten, kommerziell erhältlichen Antikörper gegen P2Y14 sich teilweise als nicht spezifisch oder für die geplanten Anwendungen als ungeeignet erwiesen. Angesichts dessen wurde die Herstellung eines eigenen, gegen die Peptidsequenz AQNDLDIRIKRGNTTLESTDTL am intrazellulären C-terminalen Ende des P2Y14-Proteins gerichteten Antikörpers (CT316) in Auftrag gegeben. Zusätzlich wurden mittels Transfektion die beiden P2Y14-überexprimierenden Zelllinien U937 ADR6/hsP2Y14 und HEK 293 ADR6/hsP2Y14 generiert (s. Abb. 14a+b). Nach Erhalt und Aufreinigung des Antikörpers CT316 erfolgte die Spezifitätsbestimmung unter Nutzung dieser Zelllinien, wobei sich der Antikörper in WB, FACS, ICC und IHC als spezifisch erwies (s. Abb. 14c-f).

4.2.2 MDI-stimulierte pBMC weisen eine höhere Proteinexpression von P2Y14 auf

Zur weiteren Charakterisierung des Expressionsprofils wurden im Folgenden die P2Y14 Proteinmengen in behandelten pBMC untersucht. In Abb. 15 sind die exemplarischen Fotodokumentationen von insgesamt vier mittels Westernblot untersuchten Spenderproben nach Behandlung mit MCSF oder MDI, nach 7 Tagen Stimulation (Abb. 15a, drei Spender) oder im Rahmen eines Zeitverlauf-Experiments (Abb. 15b, ein Spender) dargestellt. Unter Verwendung eines gegen P2Y14 gerichteten Antikörpers finden sich in beiden Zellstimulationen geringe Mengen von P2Y14 auf der anhand der Proteingröße zu erwartenden Höhe. Gegen GAPDH als Referenzprotein normalisiert, sind hierbei die beobachteten Proteinbanden in MDI-stimulierten Zellen geringfügig bis deutlich ausgeprägter, mit einer gewissen interindividuellen Varianz (vgl. Abb. 15a+b). Aufgrund der schlechten Quantifizierbarkeit dieser Daten und zur besseren statistischen Auswertung wurden daraufhin die Zellen mittels FACS unter Anwendung fluoreszenz-konjugierter Zweitantikörper untersucht. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente war ein fluoreszenz-konjugierter Primärantikörper gegen P2Y14 nicht kommerziell erhältlich. Die mittels FACS untersuchten Zellen wurden zunächst anhand der

Ergebnisse

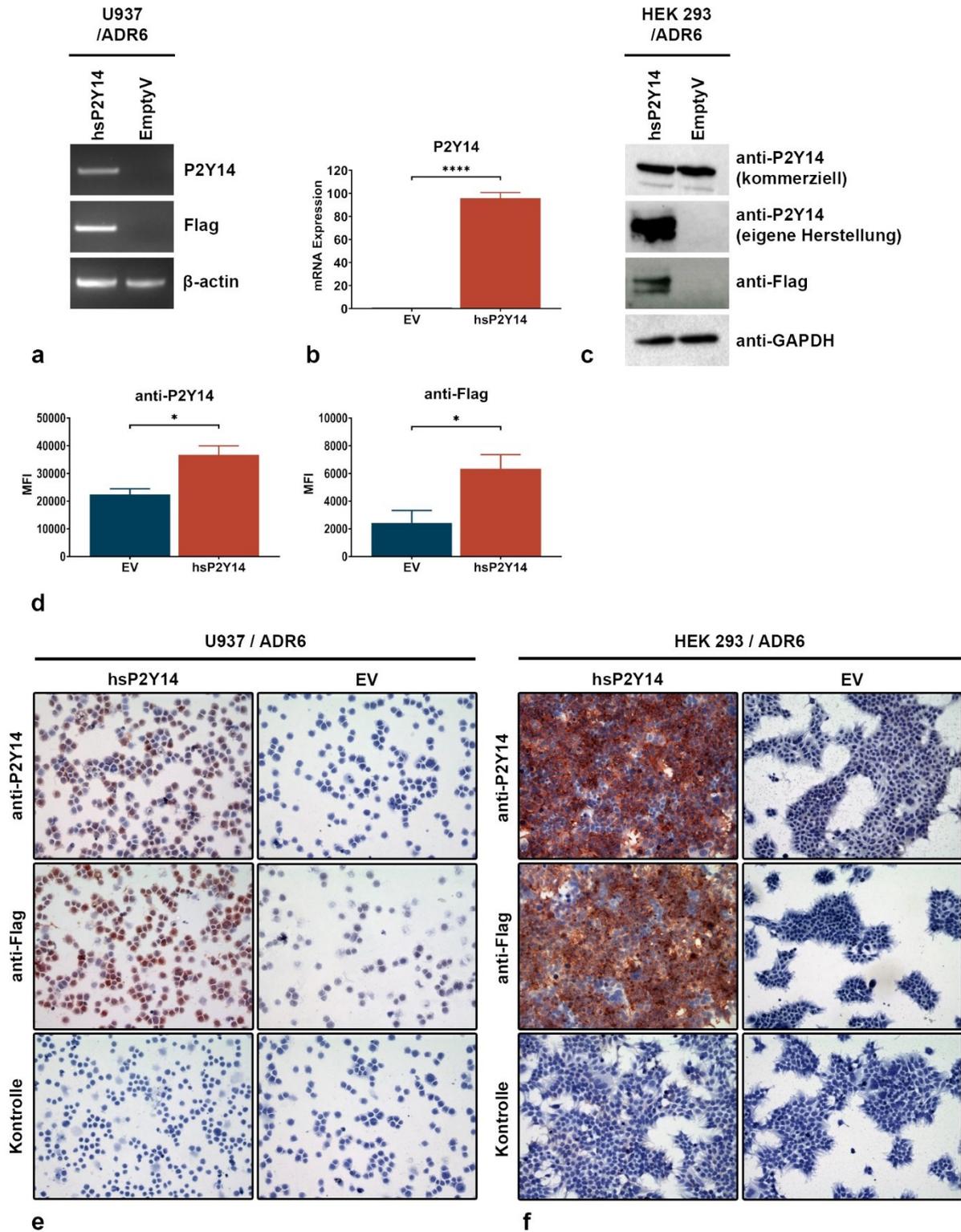


Abb. 14 – a) Exemplarische Fotodokumentation einer Agarose-Gelelektrophorese nach PCR. cDNA von U937 ADR6/hsP2Y14 und ADR6/EV, Primer gegen P2Y14, Flag-Tag und β -actin. **b)** Darstellung der relativen P2Y14 mRNA-Expression mittels qRT-PCR von U937 ADR6/hsP2Y14 gegen ADR6/EV, Änderungsfaktor als E^{-ddCt} gegen EV berechnet, Primer gegen P2Y14, Referenzgene: RPII + β -actin; n=9. **c)** Westernblot-Analyse nach SDS-PAGE von Proteinlysaten von HEK 293 ADR6/hsP2Y14 und ADR6/EV, Verwendete Antikörper: anti-P2Y14 (kommerziell, Alomone, APR-018), anti-P2Y14 (eigene Herstellung, CT316), anti-Flag, anti-GAPDH; **d)** Singlecolor FACS-Experiment von U937 ADR6/hsP2Y14 und ADR6/EV, Primärantikörper gegen P2Y14 (CT316) und Flag-Tag, Sekundärantikörper FITC-anti-rabbit; Gating mittels Unstained und SO-Kontrolle, MFI von FITC; n=3. **e + f)** Cytospins (e) und Coverslips (f) von U937 und HEK 293 ADR6/hsP2Y14 und ADR6/EV, Primärantikörper gegen P2Y14 (CT316) und Flag-Tag, SO-Kontrolle.

Ergebnisse

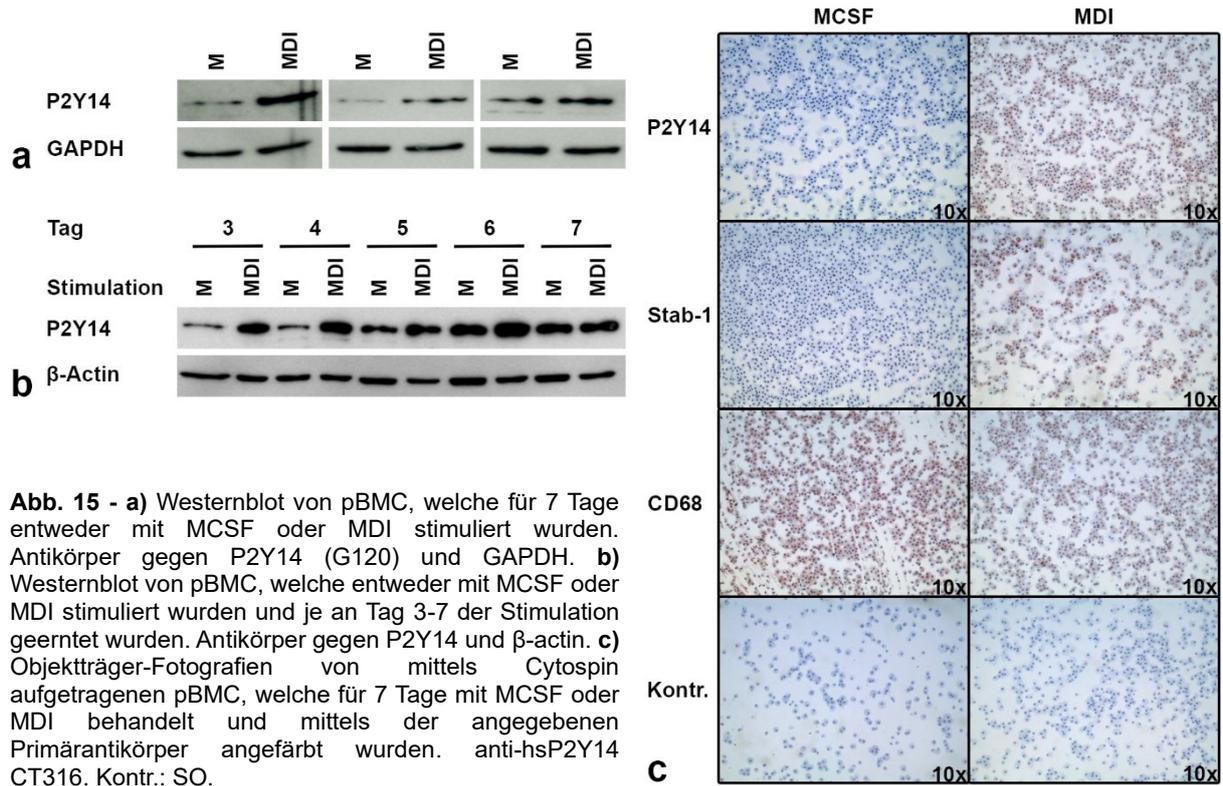


Abb. 15 - a) Westernblot von pBMC, welche für 7 Tage entweder mit MCSF oder MDI stimuliert wurden. Antikörper gegen P2Y14 (G120) und GAPDH. **b)** Westernblot von pBMC, welche entweder mit MCSF oder MDI stimuliert wurden und je an Tag 3-7 der Stimulation geerntet wurden. Antikörper gegen P2Y14 und β -actin. **c)** Objektträger-Fotografien von mittels Cytopsin aufgetragenen pBMC, welche für 7 Tage mit MCSF oder MDI behandelt und mittels der angegebenen Primärantikörper angefärbt wurden. anti-hsP2Y14 CT316. Kontr.: SO.

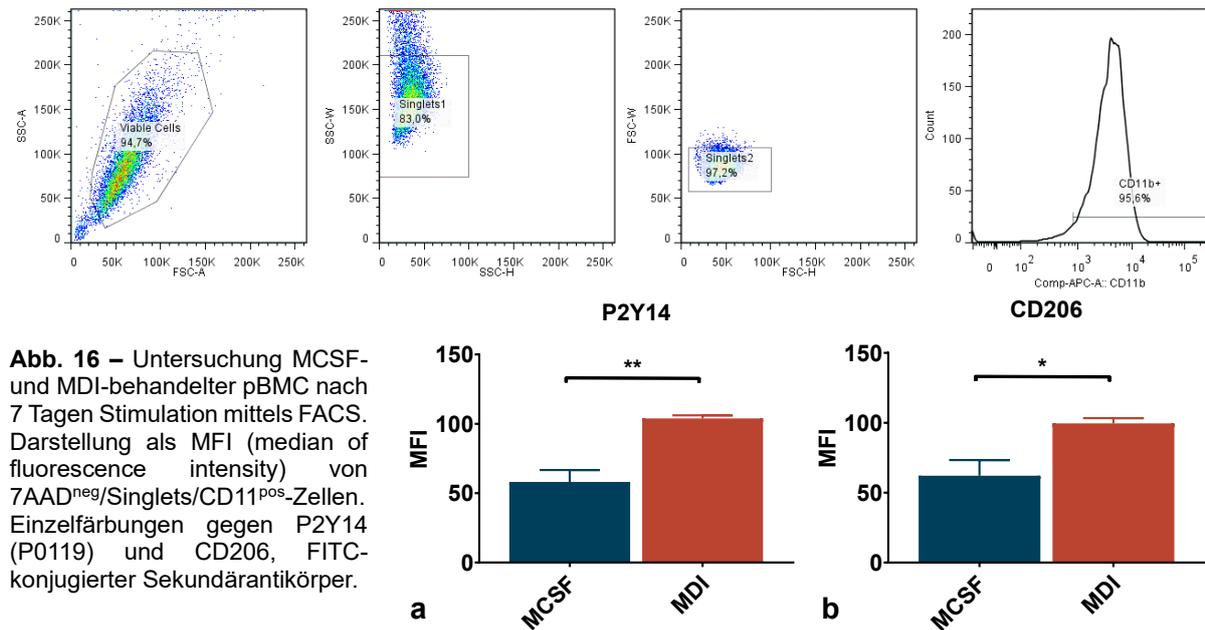


Abb. 16 – Untersuchung MCSF- und MDI-behandelter pBMC nach 7 Tagen Stimulation mittels FACS. Darstellung als MFI (median of fluorescence intensity) von 7AAD^{neg}/Singlets/CD11^{pos}-Zellen. Einzelfärbungen gegen P2Y14 (P0119) und CD206, FITC-konjugierter Sekundärantikörper.

in Abb. 16 beispielhaft dargestellten Gatingstrategie sortiert und anschließend die Signalstärke des entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffs ermittelt (MFI; median of fluorescence intensity). Im Rahmen dieses Experiments fand sich ein signifikant stärkeres Fluoreszenzsignal in MDI-stimulierten (103.9 ± 2.263 , $n=4$) im Vergleich zu MCSF-stimulierten pBMC (58.08 ± 8.627 , $n=4$) (s. Abb. 16). Dies zeigte sich konkordant zur ebenfalls erhöhten Proteinexpression von CD206 in MDI-stimulierten Zellen. Ebenso übereinstimmend dazu zeigten sich die in Abb. 15c dargestellten Cytopsin-Färbungen von stimulierten pBMC. Unter Verwendung von gegen P2Y14 oder Stab-1 gerichteter Antikörper fanden sich ausschließlich die MDI-stimulierten Zellen gefärbt. Als Differenzierungskontrolle diente hierbei CD68, dessen Expression in beiden Zellstimulationen nachgewiesen werden konnte.

4.2.3 Sowohl M1- als auch M2-ähnliche Makrophagen weisen eine erhöhte P2Y14 Proteinexpression auf

Wie in 4.1.2 dargestellt, konnte eine erhöhte P2Y14 Genexpression auch nach Stimulation mit klassischen Induktoren einer M1-Polarisation von Makrophagen wie TNF- α und IFN- γ beobachtet werden. Mit der Frage, ob dies ebenfalls auf Proteinebene zu beobachten ist, wurden im Folgenden MCSF-, MDI- und MIFT-stimulierte Zellen nach 7 Tagen Stimulation mittels FACS auf die Expression von P2Y14 sowie einiger M1- und M2-typischer Marker hin untersucht (s. Abb. 17). HLA-DR (MHCII) und CD86 dienten hierbei als Marker für eine M1-, CD163 und CD206 als Marker für eine M2-Polarisation der Zellen. Es fand sich die stärkste Expression von HLA-DR in MIFT-stimulierten Zellen, kein Unterschied fand sich dagegen in den Expressionen zwischen MCSF und MDI. Das stärkste Signal für CD86 fand sich bei MDI, mit signifikantem Unterschied zu den nahezu identischen Expressionen der MCSF- und MIFT-stimulierten Zellen. CD163 war sowohl bei MCSF als auch MDI am stärksten exprimiert, mit einer signifikanten Herunterregulation in den MIFT-behandelten Zellen. Der M2-Marker CD206 fand sich hochsignifikant hochreguliert in den MDI-stimulierten Zellen im Vergleich zu den beiden anderen Stimulationen. In Einklang mit den Ergebnissen der mRNA-Expression zeigten sich die P2Y14 Oberflächenproteine dagegen sowohl in den MDI- (13000 ± 1389) als auch den MIFT- (12160 ± 1266) im Vergleich zu den MCSF- ($5682 \pm 340,4$) behandelten Zellen signifikant erhöht.

4.2.4 Charakterisierung des Antikörpers in IHC-Färbungen dermatonkologischer Pathologien

Zur weiteren Charakterisierung der P2Y14 Proteinexpression und des diesbezüglich noch unbekanntem Antikörpers CT316 wurden im Folgenden immunhistologische Färbungen angefertigt. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich P2Y14 in mittlerem bis hohem Maße in Zellen der Epidermis findet, hauptsächlich jungen Keratinozyten, aber auch Melanozyten und Langerhans-Zellen. Dies bestätigte sich auch in den im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Färbungen (s. Abb. 18) verschiedener dermatonkologischer Pathologien, darunter die abgebildeten Färbungen eines malignen Melanoms, eines Plattenepithelkarzinoms und eines Basalzellkarzinoms. Über alle Gewebeschnitte hinweg fand sich die bereits beschriebene Färbung der unteren epidermalen Schichten, aber auch eine konsistente Färbung der vaskulären Strukturen sowie vereinzelte Zellen im Weichgewebe. Insbesondere im Fall des Basalzellkarzinoms zeigte sich eine breitflächige Färbung der Tumorzellen. Sowohl in den Färbungen des Melanoms als auch des Basalzellkarzinoms zeigt sich eine Anfärbung der infiltrierenden Immunzellen. Ausgewertet nach den

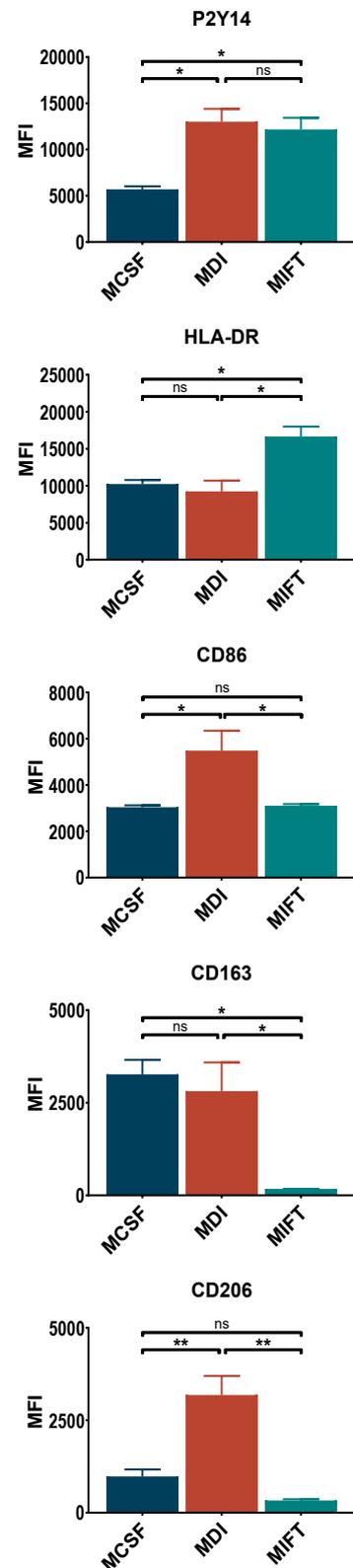


Abb. 15 – Multicolor FACS Experiment von mit MCSF, MDI oder MIFT sieben Tage stimulierten pBMC. Gating mittels 7AAD und FMO-Kontrollen wie beispielhaft in Abb. 9 abgebildet. Darstellung als MFI (median of fluorescence intensity) von 7AADneg/Singlets/CD11^{pos}-Zellen des jeweils konjugierten Fluoreszenzfarbstoffs; n=10. Verwendete Antikörper: anti-hsP2Y14 (P0119) + FITC anti-rabbit IgG (sek.), APC anti-hs CD11b, APC-Cy7 anti-hs HLA-Dr, PE-Cy7 anti-hs CD86, PE anti-hs CD163, PE-Cy5 anti-hs CD206

Ergebnisse

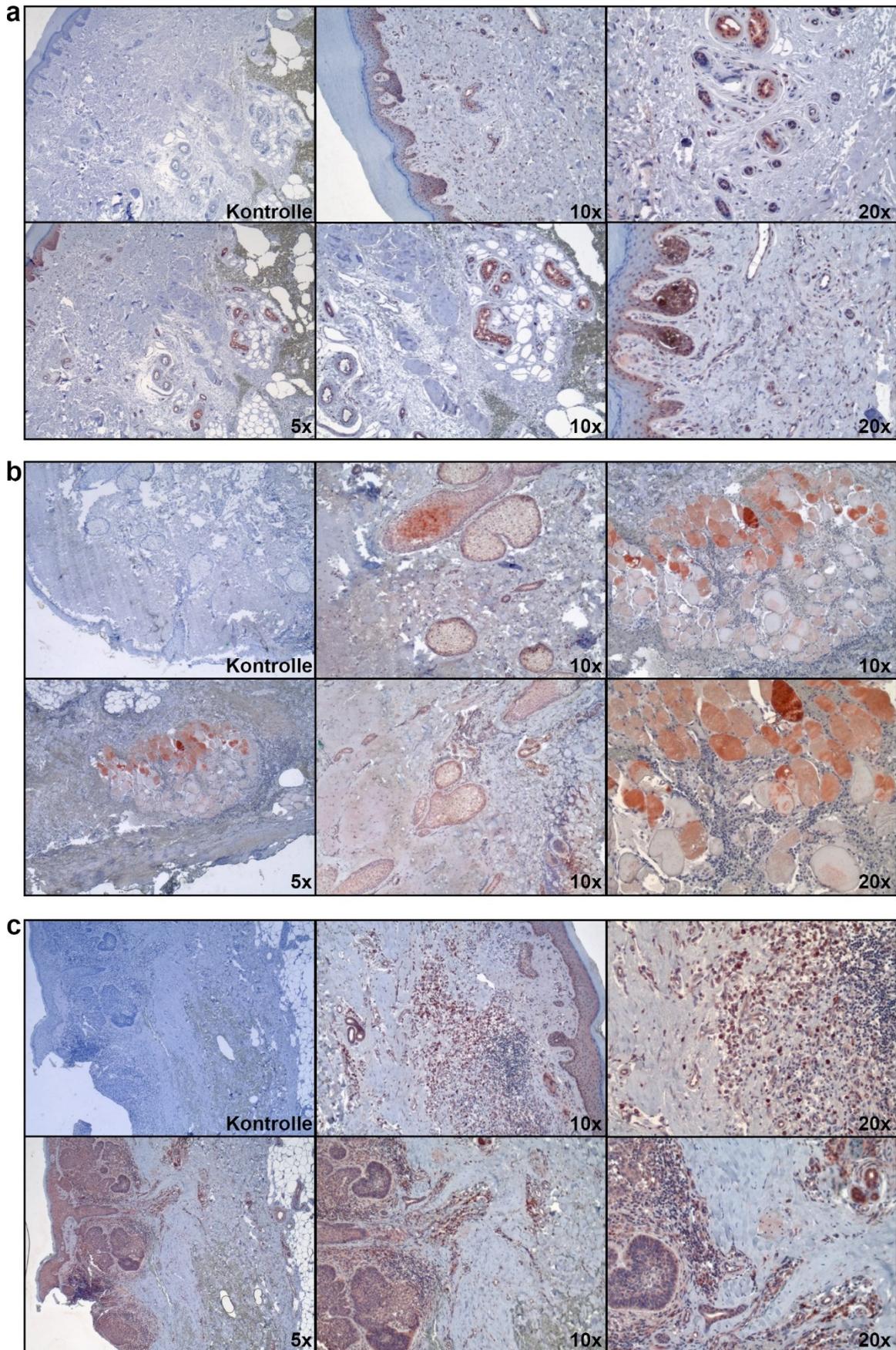


Abb. 16 - Mikroskop-Aufnahmen von mittels P2Y14-Antikörper (CT316) angefarbter Paraffingewebeschnitte. a) Melanom pT4a; b) Plattenepithelkarzinom; c) Basalzellkarzinom. Vergrößerung wie angegeben; Kontrolle: SO

erkennbaren morphologischen Kriterien handelt es sich hierbei hauptsächlich um dermale Makrophagen. Im Fall des Melanoms sind hier jedoch nur oberflächliche Ausläufer des Tumorgewebes dargestellt. Als Artefakt ist weiterhin die Anfärbung der angeschnittenen Hornperlen des Plattenepithelkarzinoms zu werten.

4.3 Funktionelle Charakterisierung von P2Y14 in U937 und MDI-behandelten pBMC

4.3.1 Stimulation mit P2Y14-Agonisten führt zu einem intrazellulären Calcium-Anstieg in transgenen U937 und MDI-stimulierten pBMC

Um Hinweise auf die Funktion des erhöht exprimierten P2Y14 Rezeptors in MDI-behandelten pBMC zu erhalten, galt es zunächst, die Reaktion des durch den Rezeptor vermittelten Signalwegs durch Stimulation mit UDP-konjugierten Zuckermolekülen zu untersuchen. Zu den bekannten Agonisten des P2Y14 Rezeptors zählen u. a. neben unkonjugiertem UDP, UDP-Galaktose und UDP-N-Acetylglukosamin auch UDP-Glukose. Nach Bindung von UDP-Glukose an P2Y14 kommt es zur Dissoziation des intrazellulär gelegenen heterotrimeren G_i -Proteins und über mehrere Zwischenschritte (s. 1.3.2) zur subsequenten Ausschüttung von Calcium aus dem Golgi-Apparat der betreffenden Zelle. Diesen Mechanismus und die generelle Stimulierbarkeit und Funktionstüchtigkeit des P2Y14-Rezeptors in unserem in-vitro-Setting zu testen, war Ziel einer fluoreszenzbasierten, intrazellulären Calcium-Messung. Da es sich sowohl bei U937 als auch bei den pBMC um nicht-adhärerende oder im Fall der MDI-stimulierten pBMC nur um sehr schwach adhärerende Zellen handelt, wurde hierzu ein kommerziell erhältliches Kit ohne erforderliche Waschschriffe verwendet. Das Prinzip hierbei beruht auf der hochsensitiven Bindung des membranpermeablen Fluorochroms FLUO-2 AM an Calcium und die hierdurch verursachte Fluoreszenzänderung, welche mittels Fotodetektor ermittelt wird. Das Verhältnis der Fluoreszenzänderung F zum gemittelten Ausgangswert F_0 (Fluoreszenz-Quotient) ist hierbei analog zum intrazellulären Calcium-Anstieg der Probe zu betrachten. Als Positivkontrolle wurde in den nachfolgenden Experimenten der Ionophor A23187 (Calcimycin) verwendet, der Zellmembranen für divalente Kationen wie Calcium und Magnesium durchlässig macht und somit ebenfalls zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt (s. Abb. 19). Zu Beginn erfolgten die Messungen an transfizierten, P2Y14-überexprimierenden U937 Zellen (s. Abb. 19a). Nach Zugabe von 1 mM UDP-Glukose kam es hierbei nach wenigen Sekunden zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals um 41,8 % (Plateau; 95%-CI: 41,3-42,3 %), wohingegen die Zugaben von UDP-Glukose zu U937 ADR6/EV oder

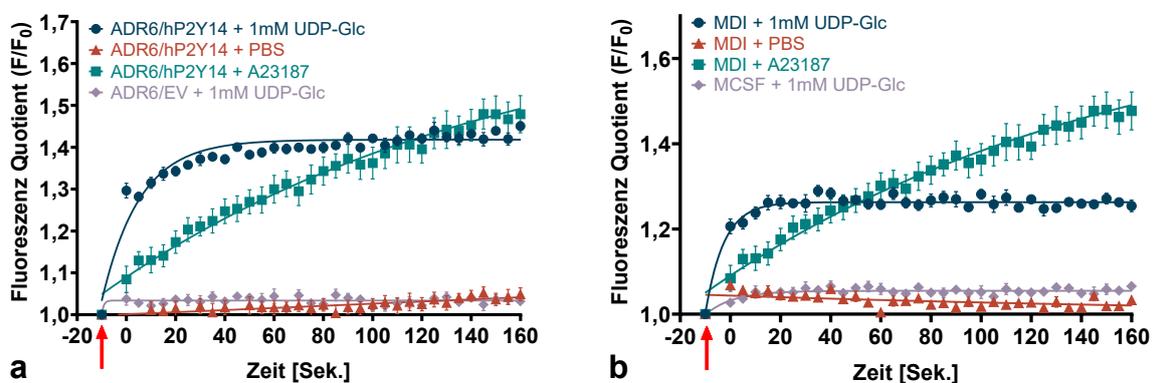


Abb. 17 – Calcium-Influx-Assay von stimulierten U937 (a) und pBMC (b). Darstellung des Fluoreszenz-Quotienten F/F_0 im Zeitverlauf nach Zugabe des jeweils angegebenen Stimulus. Der rote Indikatorpfeil kennzeichnet den Zeitpunkt der Zugabe des Stimulus, Start der Messung bei Sek. 0. Verwendete Stimuli: Rezeptoragonist UDP-Glukose, PBS als Negativkontrolle, Ionophor A23187 als Positivkontrolle. Dargestellte Kurve als Ergebnis einer nicht-linearen Regressionsanalyse (One-Phase-Association; $Y=Y_0 + (\text{Plateau}-Y_0) \cdot (1-\exp(-K \cdot x))$)

des Lösungsmittels PBS keine detektierbare Fluoreszenzveränderung zur Folge hatten. Das gleiche Experiment wurde nun mit MCSF- oder MDI-stimulierten pBMC wiederholt (s. Abb. 19b). Hierbei konnte ebenfalls ein Anstieg der Calciumkonzentration, hier in den mit UDP-Glukose stimulierten MDI-Zellen beobachtet werden. Im Plateau betrug der Anstieg 26,3 % (95%-CI: 25,9 -26,7 %). Die Zugabe von UDP-Glukose zu MCSF-Zellen führte dabei zu keiner detektierbaren Signaländerung. Als Negativkontrolle diente hier erneut PBS.

4.3.2 Microarray-Analysen von mit P2Y14-Agonisten stimulierten MDI-pBMC

Nach Bestätigung einer Calcium-involvierenden Signalkaskade in MDI-stimulierten pBMC nach Exposition mit UDP-Glukose, galt es zum Abschluss dieser Arbeit, einen breiteren Überblick über die P2Y14 vermittelte Genexpression dieser Zellen zu erhalten. Hierzu sollten Microarray-Analysen nach P2Y14-Stimulation durchgeführt werden unter Verwendung der Agonisten UDP-Glukose und MRS2690, einem synthetischen Agonisten, der eine bis zu 7-fach höhere Affinität in den Etablierungsstudien gezeigt hatte. Zur Durchführung des Experiments wurden dem Medium der isolierten pBMC am sechsten Tag der MDI-Stimulation 1 mM UDP-Glukose, 100 µM MRS2690 oder PBS hinzugefügt und die Zellen nach weiteren 24 h geerntet. Die hieraus isolierte RNA wurde daraufhin mittels Microarray-Analyse (Applied Biosystems; durchgeführt durch die Affymetrix Core Facility der Universitätsmedizin Mannheim) untersucht. In Abb. 20 findet sich ein Überblick über die hierbei signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen MDI + 24 h UDP-Glukose gegen MDI + 24 h PBS und MDI + 24 h MRS2690 gegen MDI + 24 h PBS. Auffallend ist hierbei die deckungsgleiche Herunterregulation von Chemokin (C-C Motiv)-Ligand 8 (CCL8) – dem chemotaktisch wirksamen Ligand der Chemokin-Rezeptoren CCR1, CCR2B und CCR5 – sowie von RPL7, dem kodierenden Gen für die 60S

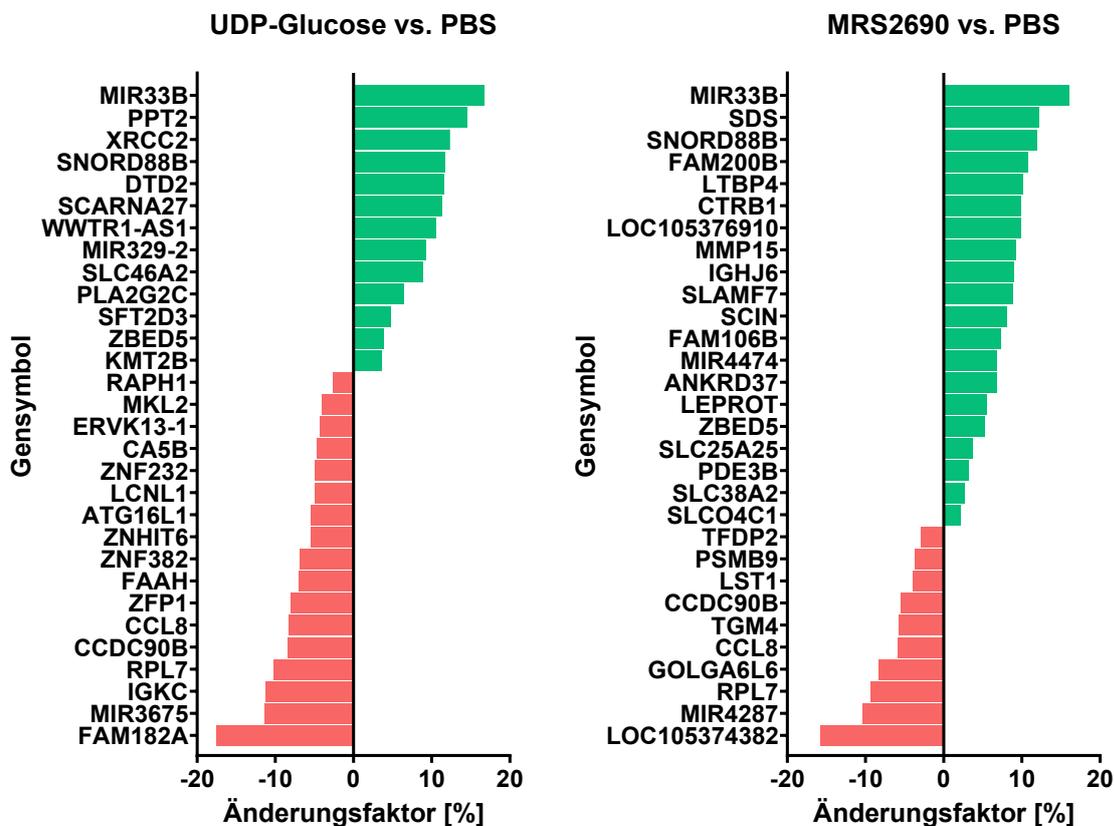


Abb. 18 – Mikroarray-Analysen von für 7 Tage mit MDI und 24h mit 1 mM UDP-Glukose oder 100 µM MRS2690 oder PBS stimulierten pBMC. Darstellung der Top 30 signifikant (One-Way-ANOVA, adjust.-p-Wert <0,05) unterschiedlich exprimierter Gene. Änderungsfaktoren in Prozent des Quotienten der Gruppen-Mittelwerte. Gensymbole folgend der NCBI Entrez Gen-Datenbank; n=3.

Ergebnisse

Ribosomen-Untereinheit L7. Am stärksten hochreguliert zeigte sich in beiden Untersuchungen die am Lipidmetabolismus beteiligte microRNA 33B (MIR33B). Weiter hochreguliert zeigten sich u. a. auch die Matrix-Metalloproteinase 15 (MMP15), der Oberflächenrezeptor und Marker maligner Plasmazellen im Multiplen Myelom SLAMF7 und die an der lysosomalen Degradierung von Thioestern beteiligte Palmitoyl-Protein-Thioesterase-2 (PPT2).

Um einen genaueren Überblick über die durch die Rezeptoraktivierung am stärksten beeinflussten Regelkreise und Gengruppen zu erhalten, erfolgte eine Gensatzanreicherungsanalyse (GSEA) unter Verwendung definierter Gensätze der KEGG-Datenbank (Kyoto encyclopedia of genes and genomes). In Abb. 21 findet sich eine Auflistung und die dazugehörigen Heatmaps der signifikanten Ergebnisse dieser Analyse. Als signifikant galt hierbei nur ein Ergebnis mit einer false discovery rate (FDR) < 0,25 und einem nominalen p-Wert < 0,05. Es zeigte sich insbesondere in den Gengruppen, welche zur Regulation von Phago- und Endozytose sowie Proteinabbau im endoplasmatischen Retikulum beitragen, eine hohe Anreicherung. Gene, deren Produkte unmittelbar an der Ubiquitinierung und am Abbau von Proteinen beteiligt sind, wie die ubiquitin-conjugating enzymes (UBE) E2D1 und E2D3 sowie Ubiquilin 4 zählten zu den Genen mit den höchsten Rangwerten. Unter den Genen mit den höchsten Rangwerten im Endozytose-Gensatz befinden sich der Thrombin-Rezeptor F2R, der Interleukin-2-Rezeptor beta (IL2RB) und die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR2. Im Phagosom-Gensatz unter den ranghöchsten Genen finden sich der macrophage scavenger receptor 1 (MSR1) sowie Toll-Like Rezeptor 6 (TLR6) – beide zentrale Moleküle in der Erkennung von PAMP – sowie eine Reihe von major histocompatibility Komplexen (HLA-A, HLA-B, HLA-DQB1, HLA-G, HLA-C). Ebenfalls überexprimiert zeigten sich Gene des Phosphatidylinositol Signalwegs und PI3K/Akt-Signalwegs, hierunter insbesondere Gene zur Codierung von Phospholipase C und Phosphatidylinositol-3-Kinase.

KEGG Gensatz	ES	NES	NOM-p	FDR (q)
04141 – Protein Processing in Endoplasmatic Reticulum	0,15	2,19	0,000	0,226
04145 – Phagosom	0,15	2,09	0,002	0,215
04070 – Phosphatidylinositol Signaling System	0,18	1,87	0,010	0,247
04151 – PI3K-AKT Signaling Pathway	0,09	1,85	0,008	0,236
04144 – Endocytosis	0,11	1,84	0,014	0,219

Abb. 19 – oben) Gensatzanreicherungsanalyse (GSEA) von Microarray-Daten von mit für 7 Tage mit MDI und 24h mit 1 mM UDP-Glukose oder 100 µM MRS2690 oder PBS stimulierten pBMC unter Verwendung von Gensätzen der KEGG Datenbank (Classic). Dargestellt sind die 5 Ergebnisse mit FDR < 0,25 und nominalem p-Wert < 0,05; n=3. ES = Enrichment Score, NES = Normalisierter Enrichment Score.

Nächste Seite a-e) Heatmaps der oben tabellarisch aufgeführten Gensätze. Aus Platzgründen wurden hierbei nur die jeweils führenden Gene (Leading Edge Subsets) dargestellt. Blaue Färbung als Indikator für eine geringere relative Expression, rote Färbung als Indikator für eine höhere relative Expression des jeweiligen Gens. Gensymbole folgend der NCBI Entrez Gene Datenbank und absteigend nach Rangwert sortiert.

a) Protein Processing in Endoplasmatic Reticulum **b)** Phagosom **c)** Phosphatidylinositol Signaling System **d)** PI3K-AKT Signaling Pathway **f)** Endocytosis

5. Diskussion

5.1 P2Y14 Genexpression in humanen Makrophagen *in vitro*

Die Arbeitsgruppe, in deren Umfeld diese Arbeit entstand, konnte in der Vergangenheit bereits zeigen, dass eine Stimulation peripherer CD14⁺ Blutmonozyten mit einer Mischung aus MCSF, Dexamethason und IL-4 einen M2-ähnlichen Makrophagen-Phänotyp hervorbringt. Hierbei konnten bereits Ms4a8a, SLAMF9 und Lyve-1 als neue TAM Marker etabliert und ihre Relevanz *in vivo* nachgewiesen werden^{150, 151, 156, 157}. Zur Identifikation weiterer TAM-Marker und Evaluation ihrer *in vivo*-Relevanz wurden Transkriptionsanalysen dieser Zellen angefertigt und der purinerge Rezeptor P2Y14 als ein vielversprechender Kandidat identifiziert. Neben einigen wenigen Nachweisen, dass dieser Rezeptor sich auf verschiedenen Makrophagen-Populationen exprimiert findet, ist bislang kaum etwas über seine funktionelle Bedeutsamkeit für Makrophagen im Allgemeinen und TAM im Speziellen bekannt. Angesichts dessen galt es zu Beginn dieser Studie zunächst die Faktoren zu identifizieren, die eine P2Y14 Expression in Makrophagen induzieren können.

Zuerst galt es, die Ergebnisse der Microarray-Daten, die die Basis für diese Studie darstellten, zu verifizieren. Hierbei konnte in mehreren unabhängigen Versuchen sowohl mittels PCR als auch qRT-PCR gezeigt werden, dass eine Stimulation von pBMC mit MDI zu einer deutlich höheren Genexpression von P2Y14 führt als eine ausschließliche Stimulation mit MCSF und eine signifikante Expressionssteigerung bereits ab Tag 3 der Stimulation vorliegt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Martinez et al, die in Microarray-Analysen von mit IL-4 stimulierten pBMC eine deutliche Hochregulation von P2Y12 und P2Y14 feststellen konnten¹⁵⁸. Hierbei ist jedoch festzustellen, dass die Forscher ihre statistische Auswertung gegen IFN- γ und LPS-stimulierte M1-Makrophagen als Kontrolle berechneten, bei denen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine deutliche Hochregulation von P2Y14 festgestellt werden konnte. Diese Diskrepanz kann in Unterschieden in der Spenderpopulation oder in der unterschiedlichen Methodenwahl begründet sein. Sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene zeigen die Daten dieser Arbeit eine gesteigerte P2Y14-Expression nach Stimulation der Zellen mit MCSF und entweder LPS, IFN- γ + TNF- α , Dexamethason oder Dexamethason + IL-4. IL-4 allein konnte dagegen in den Versuchen keine statistische Signifikanz erreichen. Dies deckt sich mit Daten von Merz et al. aus Knochenmark-Makrophagen (BMDM = bone marrow-derived macrophages) von C57Bl6/J-Mäusen, die eine starke Hochregulation von P2Y14 nach Stimulation dieser Makrophagen für 5h mit IFN- γ und LPS aufzeigten und keine signifikante Expressionssteigerung nach Stimulation mit IL-4. Eine Stimulation mit Dexamethason erfolgte hierbei jedoch nicht¹⁵⁹. Auch Ma et al. und Lattin et al. konnten bereits eine gesteigerte P2Y14-Expression in Maus-Makrophagen nach Stimulation mit LPS/IFN- γ feststellen^{146, 160}. Die Kombination aus MCSF, Dexamethason und IL-4 verwendeten auch Gratchev et al. und führten Microarray-Analysen von pBMC durch, die für 5 Tage entweder mit dieser Kombination oder IL-4 allein stimuliert worden waren¹⁶¹. In den dazugehörigen, öffentlich zur Verfügung gestellten Daten fand sich P2Y14 in MDI 5,2-fach stärker exprimiert als in MIL-stimulierten Zellen¹⁶². Auch in den vorliegenden Ergebnissen zeigte Dexamethason den stärksten Effekt auf die P2Y14-Expression der untersuchten Zellen, der sich durch Anwendung des Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten Mifepriston vollständig aufheben ließ. Aber auch die Vorbehandlung der pBMC mit MCSF und IL-4 konnte den Dexamethason-vermittelten Effekt auf die P2Y14-Expression vollständig aufheben. Um diese Ergebnisse in einer weiteren Zelllinie auf ihre Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurde die monozytäre Zelllinie U937, die breite Anwendung in der Erforschung von Monozyten und Makrophagen findet, herangezogen. Diese Zelllinie differenziert zu einem Makrophagen-ähnlichen Phänotyp unter der Stimulation mit PMA¹⁶³. Nasciminto et al. beschrieben weiterhin erst kürzlich im Detail die Polarisierbarkeit der resultierenden Zellen in Richtung eines M1- oder M2-Phänotyps¹⁶⁴. Kombination von PMA mit Dexamethason und IL-4 lösten – in Einklang mit den Ergebnissen in den pBMC – auch in den U937 Zellen eine durch Mifepriston blockierbare Expressionssteigerung von P2Y14 aus. Auch in diesen Zellen war IL-4 allein

dagegen nicht ausreichend, eine gesteigerte P2Y14-Expression zu induzieren. Obwohl die Kombination aus PMA + IFN- γ + TNF- α eine statistische Signifikanz verfehlte, zeigte sich ein zu den restlichen Ergebnissen passender Trend einer ebenfalls gesteigerten P2Y14-Genexpression. Die unter PDI verstärkte Genexpression von CD206 kann als weitere Bestätigung eines M2-ähnlichen Makrophagen-Phänotyps gesehen werden, die auch Taniguchi et al. bereits in PMA + IL-4 behandelten U937 beobachten und mit einem M2-ähnlichen Phänotyp dieser Zellen assoziieren konnten¹⁶⁵. Vergleichbare Versuche zur Untersuchung der P2Y14-Genexpression in diesen Zellen sind bislang nicht veröffentlicht, jedoch konnten Mamedova et al. in mittels DMSO differenzierten U937-Zellen eine P2Y14-, daneben aber auch eine P2Y2/4/6/11- und 13-Expression feststellen¹⁶⁶. Neben P2Y12 und P2Y14 zeigten sich auch P2Y1 und P2Y13 in MDI pBMC signifikant hochreguliert. Wie P2Y12 werden auch P2Y1 und 13 durch ADP aktiviert und beide konnten bereits in Lymphozyten und Monozyten nachgewiesen werden¹⁶⁷. Außerdem fanden auch Martinez et al. im Rahmen der bereits vorgestellten Transkriptomanalysen eine Hochregulation von P2Y13 in IL-4-stimulierten pBMC¹⁵⁸.

5.2 P2Y14 Proteinexpression in humanen Makrophagen in vitro

Zur Charakterisierung der Proteinexpression von P2Y14 in den stimulierten pBMC wurden zunächst eine Reihe kommerziell erhältlicher Antikörper getestet, die gegen verschiedene extrazelluläre Epitope von P2Y14 gerichtet sind. Da deren Verwendung, in vielen der von mir genutzten Methoden, unzuverlässig, sich teilweise widersprechende oder einfach keine Ergebnisse lieferten, wurde beschlossen, einen eigenen Antikörper gegen die intrazellulär gelegene Peptidsequenz AQNDLDIRIK RGNTTLESTDTL am C-Terminus von P2Y14 herstellen zu lassen. Um alle in Verwendung stehenden Antikörper auf ihre Spezifität hin zu überprüfen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zudem zwei P2Y14-überexprimierende, transgene Zelllinien mit einer Flag-Tag-Kontrollmöglichkeit generiert. Alle verwendeten Antikörper wurden daraufhin in den angewendeten Methoden auf ihre Übereinstimmung mit den Ergebnissen des anti-Flag M2 Antikörpers hin untersucht und die für die jeweiligen Methoden passenden Antikörper weiterverwendet.

Mittels Western Blot ließen sich der molkularen Masse entsprechende Banden mit einer tendenziell stärkeren Ausprägung bei den MDI-behandelten Zellen verifizieren, die jedoch eine hohe interindividuelle Varianz zwischen den Spenderproben aufwiesen. Auch in den FACS-Analysen konnte die gesteigerte P2Y14 Proteinexpression von MDI- im Vergleich zu MCSF-behandelten pBMC nachgewiesen werden, die sich zusätzlich konkordant zu einer stärkeren CD206-Expression in diesen Zellen zeigte. Merz et al. fanden im Rahmen ihrer bereits vorgestellten Studien in BMDM ebenfalls eine P2Y14-Proteinexpression, wenn sie diese Zellen mittels FACS untersuchten¹⁵⁹. Zudem ließ sich die höhere Proteinexpression von P2Y14 in MDI pBMC auch in den angefertigten Cytospins nachweisen. In den weiteren FACS-Experimenten konnte dieses Ergebnis konstant reproduziert werden. Zudem zeigte sich ebenfalls eine signifikant erhöhte Proteinexpression von P2Y14 nach Stimulation der pBMC mit MIFT, ein Ergebnis, das vor dem Hintergrund der induzierten P2Y14-Genexpression durch proinflammatorische Zytokine in den qPCR-Daten diese zusätzlich bestätigte. In Vereinbarkeit zu den früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe konnte hierbei auch gezeigt werden, dass die Stimulation mit MDI die pBMC zu einem CD11b⁺CD206⁺CD163⁺CD86⁺HLA-DR^{med} M2-ähnlichen Phänotyp polarisiert. Die Stimulation der pBMC mittels MIFT dagegen resultierte in einem CD11b⁺CD206⁻CD163⁻CD86⁺HLA-DR^{hi} M1-ähnlichen Phänotyp. CD206 und CD163 sind klassische Marker einer M2 Polarisation von Makrophagen, die auch häufig auf TAM exprimiert werden und sich ebenfalls in den MDI-stimulierten pBMC hochreguliert zeigten. In immunhistochemischen Untersuchungen werden beide Marker häufig zur Detektion M2-ähnlicher TAM genutzt und korrelieren darüber hinaus mit einer schlechteren Prognose vieler Tumorarten¹⁶⁸. HLA-DR als klassischer Marker einer M1 Polarisation zeigte im Vergleich eine signifikante Expressionssteigerung in den MIFT-stimulierten pBMC, in denen sich CD163 und CD206 signifikant herunterreguliert zeigten. Im Gegensatz dazu zeigte sich CD86

ebenfalls bei den MDI-stimulierten pBMC signifikant stärker exprimiert als in den beiden anderen Stimulationen. Bei CD86 handelt es sich um ein Oberflächenmolekül, das sich in Kombination mit CD80 auf antigenpräsentierenden Zellen findet¹⁶⁹. CD80/86 fungieren als Liganden für die auf T-Zellen exprimierten CD28 und CTLA-4, wobei CD28-Aktivierung eine aktivierende und CTLA-4-Aktivierung eine inhibierende Wirkung auf die T-Zell Antwort ausüben¹⁷⁰. CD80/86 wird als zusätzliches Signal neben dem Antigen-beladenen HLA-DR zur endgültigen Aktivierung der T-Zelle durch die antigenpräsentierende Zelle benötigt¹⁷⁰. Daher gilt eine intermediäre bis hohe Expression von CD86 als klassischer M1-Marker. Allerdings wird es auch auf M2b-Makrophagen stärker exprimiert¹⁷¹ und ist darum nicht zur Differenzierung zwischen diesen beiden Phänotypen geeignet¹⁷². Als klassische Induktoren einer M2b Polarisation gelten jedoch LPS/IL-1 β und die Aktivierung von TLR oder Fc-Rezeptoren auf Makrophagen¹⁷². Auch wenn sich die beobachtete signifikante Expressionssteigerung von CD86 auf MDI-behandelten pBMC mehrfach reproduzieren ließ, ist dies ein unerwartetes Ergebnis und sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden. Neben der gesteigerten Expression von CD163 und CD206, fand Kloss et al in den MDI-behandelten pBMC eine verringerte Expression der Zytokin-Rezeptoren CXCR4 und CCR2, sowie eine gesteigerte Expression der Ektonukleotidase CD73¹⁰⁹. Weiterhin konnten in den MDI pBMC eine gesteigerte Expression und Sekretion der antiinflammatorischen Zytokine TGF- β und IL-10 sowie eine verringerte Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und CCL-2 gemessen werden¹⁰⁹.

Im Zuge der Charakterisierung des neu hergestellten Antikörpers CT316 erfolgten immunhistochemische Färbungen von Hauttumoren, um das Färbeverhalten des Antikörpers zu dokumentieren. Dieses deckte sich mit der von kommerziell erhältlichen Antikörpern mit starker Färbung von epidermalen und vaskulären Strukturen, der öffentlich abrufbaren P2Y14-Expressionsverteilung entsprechend¹¹⁶. Weiterhin zeigte sich eine Anfärbung verschiedener Stromazellen der jeweiligen Tumore, insbesondere infiltrierender Immunzellen. Eine größere Anzahl dieser stark angefärbten, infiltrierenden Zellen wies morphologische Charakteristika von Makrophagen auf. Durch die fehlende zusätzliche Anfärbung Makrophagen-spezifischer Marker, kann hier jedoch keine abschließende Aussage getroffen werden und ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Diese Färbungen geben jedoch einen ersten Hinweis, dass P2Y14 in TAM und anderen infiltrierenden Immunzellen unterschiedlicher dermatologischer Tumore exprimiert ist und werfen die Frage nach der funktionellen Bedeutung von P2Y14 für diese Zellen auf.

5.3 Funktionelle Charakterisierung von P2Y14-Agonisten in humanen Makrophagen

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung des P2Y14-Rezeptors, war es zunächst notwendig, die generelle Aktivierbarkeit des Rezeptors, insbesondere in den transgenen U937 Zellen sicherzustellen. Hierzu wurde ein Calcium-Influx-Assay durchgeführt, der mittels FLUO-2AM und dessen spezifischem Fluoreszenzverhalten nach Bindung an Calcium einen Rückschluss auf die Calcium-Menge im Zytoplasma erlaubt. Das hierzu verwendete Messinstrument verfügte nicht über die Möglichkeit einer automatischen Hinzugabe der Agonistenlösung unter fortlaufender Messung, so dass der eigentliche Beginn der Messung erst ca. 5 -10 Sek. nach der Zugabe der Agonistenlösung erfolgen konnte. Dennoch konnte ein deutlicher Calcium-Anstieg in den P2Y14⁺ U937-Zellen nach Zugabe von UDP-Glukose und des synthetischen P2Y14-Agonisten MRS2690 beobachtet werden, wohingegen kein Anstieg in den U937 Zellen beobachtet wurde, die ausschließlich den ADR6 ohne das P2Y14 Transkript trugen. Hiervon ermutigt, erfolgte im Anschluss dieselbe Messung in den pBMC. Bei den MDI pBMC fand sich ein intrazellulärer Calcium-Anstieg nach Zugabe der Agonistenlösung, während der Anstieg bei den MCSF pBMC ausblieb. Interessanterweise fiel der errechnete Fluoreszenzquotient bei den pBMC geringer aus als bei den P2Y14⁺ U937 Zellen. Dies lässt sich möglicherweise auf die stärkere Expression und damit die höhere Rezeptordichte auf den transgenen Zellen zurückführen. Der

beobachtete intrazelluläre Calcium-Anstieg deckt sich mit einer Vielzahl von Publikationen, die einen intrazellulären Calcium-Anstieg nach P2Y14-Aktivierung beschreiben^{134, 173-176}.

Nachdem die Funktionalität sichergestellt und die notwendigen Agonistenkonzentrationen bekannt waren, galt es im letzten Schritt dieser Arbeit, Unterschiede in der Genexpression nach Stimulation mit P2Y14-Agonisten durch Anfertigung von Microarrays aufzuzeigen. Die statistische Vorauswertung wurde freundlicherweise durch die Affymetrix Core Facility der Universitätsmedizin Mannheim übernommen. Hierbei zeigte sich insbesondere CCL8, sowohl nach der Stimulation mit UDP-Glukose als auch mit MRS2690, herunterreguliert. Bei CCL8 handelt es sich um ein für Leukozyten chemotaktisch wirkendes Molekül, das über Aktivierung von CCR2 an der Rekrutierung von TAM und Tregs in das Tumorstroma beteiligt ist¹⁷⁷. Auch wenn die prognostische Relevanz von CCL8 im Tumorkontext aktuell noch diskutiert wird, konnte bereits für einige Tumorentitäten eine Steigerung der Invasivität und Metastasierungstendenz durch CCL8 gezeigt werden¹⁷⁸. Dagegen fanden Yang et al. eine positive Korrelation zwischen CCL8 und dem Auftreten von M1-Makrophagen im Melanom und mutmaßten hierbei einen positiven Effekt auf deren antitumorale Aktivität¹⁷⁹. Als weitere deckungsgleich durch die beiden P2Y14 Agonisten veränderte Genexpression fand sich die mikroRNA 33B (MIR33B) am stärksten hochreguliert. Bei mikroRNA handelt es sich um kurze, etwa 19 - 25 Basen lange, evolutionär hoch konservierte, nicht-kodierende RNAs, die an der Regulation vieler metabolischer Prozesse beteiligt sind¹⁸⁰. MIR33B ist dabei an der Regulation der Cholesterolaufnahme in Makrophagen beteiligt und spielt insbesondere bei der Entwicklung atherosklerotischer Plaques eine wichtige Rolle^{181, 182}. Bezogen auf den Tumorkontext ist es Moradi-Caleshtori et al. in Mausexperimenten gelungen, mithilfe MIR33B beladener Exosomen TAM zu M1 Makrophagen zu repolarisieren und hierüber einen antitumoralen Effekt auf 4T1 Brustkrebszellen zu induzieren¹⁸³. Neben CCL8 und MIR33B fand sich noch RPL7, das kodierende Gen für die 70S Ribosomen-Untereinheit durch UDP-Glukose als auch MRS2690 herunterreguliert. Kritisch sind allerdings die insgesamt geringen Unterschiede zwischen den stimulierten und unstimulierten Zellen zu sehen. Auch wenn es sich bei den aufgeführten Daten ausschließlich um statistisch signifikante Ergebnisse handelt, wird dabei üblicherweise ein unterer Grenzwert von 2 in Bezug auf den Änderungsfaktor angewendet, den in den vorliegenden Daten keines der Gene erreichte. An dieser Stelle sei darum darauf hingewiesen, dass es sich bei den genannten Genen um erste Hinweise handelt, die in weiteren Arbeiten bestätigt oder widerlegt werden müssen. Um dennoch weitere Hinweise aus den vorhandenen Daten zur Identifikation potenzieller Effekte einer P2Y14-Aktivierung in MDI pBMC zu erhalten, wurden diese mithilfe einer Gensatzanreicherungsanalyse auf dominante Muster in der Genexpression hin untersucht. Auffallend zeigte sich dabei eine enge thematische Zusammengehörigkeit der am stärksten betroffenen Gensätze: Hierbei zeigten sich insbesondere die Gensätze signifikant hochreguliert, die zur Phagozytose und Antigenprozessierung der Zellen beitragen. Dazu zählten der Thrombin-Rezeptor F2R, IL-2-Rezeptor, CCR5, CXCR2, MSR1 und TLR6 zu den Genen mit den höchsten Rangwerten. In der derzeit verfügbaren Literatur findet sich kein Zusammenhang zwischen P2Y14 und diesen Molekülen, so dass diese, nach Bestätigung der bisher nur als Hinweis dienenden Daten, auf einen weiteren Zusammenhang hin untersucht werden sollten. Ebenfalls überexprimiert zeigten sich Gene des Phosphatidylinositol Signalwegs und PI3K/Akt-Signalwegs, hierunter vornehmlich Gene zur Codierung von Phospholipase C und Phosphatidylinositol-3-Kinase. Beide Signalwege sind bedeutende Zweige der Signaltransduktion extrazellulärer Stimuli und in verschiedene zelluläre Prozesse involviert. Im Falle des PI3K/Akt-Signalwegs handelt es sich darüber hinaus um einen sogenannten „prosurvival-Pathway“ durch den hauptsächlich Wachstumssignale, Signale zur Förderung der Zellproliferation und Verringerung apoptotischer Einflüsse übermittelt werden^{184, 185}. In Zusammenschau der Daten zeichnet sich eine mutmaßlich proinflammatorische Wirkung der P2Y14-Agonisten auf die MDI pBMC ab.

5.4 Abschließende Bemerkungen

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass P2Y₁₄ und die dazugehörigen Liganden eine funktionelle Relevanz für Makrophagen aufweisen. Die Aussagekraft der vorliegenden Studie ist dabei durch die enge Limitation auf die definierte *in vitro* Versuchsumgebung eingegrenzt. Auch handelte es sich bei dem verwendeten Material um Zellen gesunder Individuen. Systemische Abweichungen, wie sie häufig in Infektions- oder Krebserkrankungen vorzufinden sind, sind demnach nicht miterfasst worden. Zeitgleich war aus Gründen der Spenderanonymität keine Abgleichung mit interindividuellen Variablen wie Alter, Geschlecht oder ethnischer Zugehörigkeit möglich, so dass keine Aussage über einen möglicherweise bestehenden, systematischen Störfaktor getroffen werden kann.

Das ursprüngliche Forschungsziel, mit P2Y₁₄ einen neuen Marker für eine bestimmte Makrophagen-Polarisation/Population zu finden, wurde verworfen. Vielmehr erwies sich P2Y₁₄ als ein relevanter, noch nicht ausreichend untersuchter Rezeptor auf Makrophagen, der im Zusammenhang mit verschiedenen pathophysiologischen Prozessen weiter untersucht werden sollte. Die breite Expression über Phänotypgrenzen hinweg deutet auf eine größere funktionelle Bedeutung für UDP-Glukose und andere Liganden von P2Y₁₄ für Makrophagen hin. Die Charakterisierung der *in vivo* Relevanz und die genauere Beschreibung der mechanistischen Hintergründe ist daher ein logischer nächster Schritt und bietet eine vielversprechende Perspektive aufgrund der bereits jetzt breit verfügbaren Agonisten und Antagonisten dieses Rezeptors.

6. Zusammenfassung

Makrophagen stellen eine hochgradig heterogene Zellpopulation dar, mit zeitgleich großer Adaptationsfähigkeit zu den Erfordernissen und Einflüssen der jeweiligen Mikroumgebung. Diese Plastizität von Makrophagen bedingt die große Anzahl verschiedener Funktionen, die sie als Teil des angeborenen Immunsystems und als Wächter der Homöostase, Gewebeintegrität und Wundheilung erfüllen müssen. Angelehnt an die Th1/Th2-Dichotomie, findet eine Einteilung dieser teils sehr unterschiedlichen Polarisationsformen in der M1/M2-Klassifikation breite Verwendung in der Literatur. Hierbei beschreibt M1 einen durch Interferon- γ (IFN- γ) induzierten, proinflammatorischen Phänotyp mit Ausrichtung auf direkte Erregerabwehr und Aktivierung des adaptiven Immunsystems. M2-Makrophagen dagegen werden typischerweise durch Interleukin-4 (IL-4) induziert und sind durch die Sekretion vorwiegend immunsuppressiver Moleküle sowie ihre gewebebildenden und proangiogenen Eigenschaften gekennzeichnet. Diese M2- oder M2-ähnlichen Makrophagen spielen insbesondere im Kontext solider Tumore als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) eine große Rolle, da sie mit einer schlechteren Prognose der überwiegenden Anzahl an Tumorentitäten vergesellschaftet sind. Hierbei fand sich, dass dies in der vielfältigen direkten oder auch indirekten Förderung von Tumorwachstum, Immunevasion, Neovaskularisation und Metastasierung durch TAM begründet liegt. Aus diesem Grund ist die Etablierung neuer Marker zur Erkennung und Beeinflussung dieser Zellen ein vielversprechender Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Therapiestrategien. Unsere Arbeitsgruppe konnte in früheren Arbeiten nachweisen, dass eine Stimulation von peripheren CD14⁺ Blutmonozyten (pBMC) mit Macrophage colony-stimulating factor (MCSF), Dexamethason und IL-4 für 7 Tage (MDI) in einem M2-ähnlichen Makrophagen-Phänotyp resultiert und als In-vitro-Modell Anwendung finden kann. Microarray-Analysen dieser Zellen fanden den purinergen Rezeptor P2Y₁₄ stark hochreguliert. Dieser Gi-Protein-gekoppelte Rezeptor wird durch Uridin-Diphosphat (UDP) und UDP-Zucker wie UDP-Glukose aktiviert und wird in vielen Geweben und Zelltypen exprimiert, hierunter auch neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Auch wenn es erste Hinweise gibt, dass P2Y₁₄-Agonisten in Immunzellen chemotaktische Signale vermitteln, ist dennoch wenig über das Expressionsprofil und die Funktionsweise von P2Y₁₄ in Makrophagen bekannt. Das Ziel dieser Studie war es daher, die zugrundeliegenden Faktoren und die funktionelle Relevanz des P2Y₁₄-Rezeptors in M2-ähnlichen Makrophagen in vitro zu charakterisieren.

Die Charakterisierung erfolgte mittels Polymerase chain reaction (PCR), quantitativer real-time PCR, Western Blot, Fluorescence activated cell sorting (FACS), Immunhistochemie, Immunzytochemie, Calcium-Influx-Messungen und Microarrays. Da die getesteten kommerziell erhältlichen Antikörper gegen P2Y₁₄ unzuverlässige Ergebnisse lieferten, wurde die Herstellung eines eigenen gegen P2Y₁₄-gerichteten Peptid-Antikörpers in Auftrag gegeben und alle verwendeten Antikörper auf Spezifität mithilfe einer lentiviral hergestellten, P2Y₁₄⁺ transgenen U937-Zelllinie getestet.

Die P2Y₁₄-Genexpression findet sich in MDI-stimulierten pBMC im Vergleich zu undifferenzierten pBMC und ausschließlich mit MCSF-behandelten pBMC deutlich hochreguliert. Diese Hochregulation der mRNA-Expression zeigt sich ab Tag 3 der Stimulation signifikant und an Tag 5 ihre stärkste Ausprägung. Diese Arbeit zeigt außerdem, dass die Expressionssteigerung von P2Y₁₄ in MDI-behandelten Zellen hauptsächlich von Dexamethason vermittelt wird und durch den Glukokortikoid-Rezeptor-Antagonisten Mifepriston vollständig inhibiert werden kann. Eine ausschließliche Behandlung mit MCSF und IL-4 ist dagegen nicht ausreichend und kann bei vorgeschalteter Behandlung den Dexamethason-vermittelten Effekt aufheben. Daneben kann auch die Stimulation mit MCSF + Lipopolysaccharide (LPS), MCSF + IFN- γ + Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (MIFT) eine gesteigerte P2Y₁₄-Genexpression in pBMC auslösen. Eine Hochregulation der P2Y₁₄-Genexpression durch Dexamethason + IL-4 und IFN- γ + TNF- α findet darüber hinaus auch in mittels Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) differenzierten U937 Zellen statt, wobei auch in diesen Zellen die Zugabe von Mifepriston zu der Stimulation mit Dexamethason + IL-4 geeignet ist, die Expressionssteigerung zu unterbinden. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten FACS-Daten zeigen, dass MDI pBMC eine

Zusammenfassung

starke Expression der M2-Marker CD206 und CD163 aufweisen. Diese M2-Marker sind in MIFT-stimulierten pBMC stark herunterreguliert, dafür weisen diese Zellen eine hohe Expression des hauptsächlich in M1 exprimierten Major histocompatibility complex II (MHCII) auf. In Vereinbarkeit mit den mRNA-Expressionsdaten findet sich P2Y14 in beiden Zellpopulationen hochreguliert. Stimulationen von P2Y14+ transgenen U937 Zellen und pBMC mit UDP-Glukose und dem synthetischen P2Y14-Agonisten MRS2690 bewirken einen intrazellulären Calcium-Anstieg in diesen Zellen. Abschließend zeigen die in dieser Arbeit generierten Microarray-Daten von für 24 h mit P2Y14-Agonisten stimulierten MDI-pBMC eine signifikante Gensatzanreicherung der in Endozytose, Antigenprozessierung und dem Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT-Signalweg involvierten Genexpressionen. Die beobachteten Expressionssteigerungen von P2Y14 decken sich hierbei mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen unter ähnlichen Versuchsumgebungen. Hierbei bietet diese Arbeit allerdings die erste Beschreibung einer vorwiegend Glukokortikoid-induzierten P2Y14-Expression in Makrophagen. Angesichts der Limitation der Aussagekraft dieser Studie auf definierte in vitro Versuchsumgebungen ist eine Erweiterung der Untersuchungen auf die in vivo Situation und die dazugehörige funktionelle Charakterisierung ein notwendiger nächster Schritt. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse dieser Studie auf eine Relevanz des P2Y14-Rezeptors sowohl für M1- als auch M2-Makrophagen und eine immunmodulatorische Dimension der dazugehörigen Liganden hin.

Literaturverzeichnis

1. Wynn, TA, Chawla, A, Pollard, JW: Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496: 445-455, 2013. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
2. Kaufmann, SH: Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol*, 9: 705-712, 2008. <https://doi.org/10.1038/ni0708-705>
3. van Furth, R, Cohn, Z, Hirsch, J, Humphrey, J, Spector, W, Langevoort, H: The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, 46: 845, 1972.
4. van Furth, R, Cohn, ZA: The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*, 128: 415-435, 1968. <https://doi.org/10.1084/jem.128.3.415>
5. Austyn, JM, Gordon, S: F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*, 11: 805-815, 1981. <https://doi.org/10.1002/eji.1830111013>
6. Taylor, PR, Martinez-Pomares, L, Stacey, M, Lin, HH, Brown, GD, Gordon, S: Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 23: 901-944, 2005. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816>
7. Holness, CL, Simmons, DL: Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood*, 81: 1607-1613, 1993.
8. Samokhvalov, IM: Deconvoluting the ontogeny of hematopoietic stem cells. *Cell Mol Life Sci*, 71: 957-978, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1364-7>
9. Gomez Perdiguero, E, Klapproth, K, Schulz, C, Busch, K, Azzoni, E, Crozet, L, Garner, H, Trouillet, C, de Bruijn, MF, Geissmann, F, Rodewald, HR: Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 518: 547-551, 2015. <https://doi.org/10.1038/nature13989>
10. Mass, E, Ballesteros, I, Farlik, M, Halbritter, F, Gunther, P, Crozet, L, Jacome-Galarza, CE, Handler, K, Klughammer, J, Kobayashi, Y, Gomez-Perdiguero, E, Schultze, JL, Beyer, M, Bock, C, Geissmann, F: Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science*, 353, 2016. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4238>
11. McGrath, KE, Frame, JM, Palis, J: Early hematopoiesis and macrophage development. *Semin Immunol*, 27: 379-387, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.013>
12. Mass, E, Nimmerjahn, F, Kierdorf, K, Schlitzer, A: Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nat Rev Immunol*, 23: 563-579, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00848-y>
13. Chakarov, S, Lim, HY, Tan, L, Lim, SY, See, P, Lum, J, Zhang, XM, Foo, S, Nakamizo, S, Duan, K, Kong, WT, Gentek, R, Balachander, A, Carbajo, D, Bleriot, C, Malleret, B, Tam, JKC, Baig, S, Shabeer, M, Toh, SES, Schlitzer, A, Larbi, A, Marichal, T, Malissen, B, Chen, J, Poidinger, M, Kabashima, K, Bajenoff, M, Ng, LG, Angeli, V, Ginhoux, F: Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches. *Science*, 363, 2019. <https://doi.org/10.1126/science.aau0964>
14. Dick, SA, Wong, A, Hamidzada, H, Nejat, S, Nechanitzky, R, Vohra, S, Mueller, B, Zaman, R, Kantores, C, Aronoff, L, Momen, A, Nechanitzky, D, Li, WY, Ramachandran, P, Crome, SQ, Becher, B, Cybulsky, MI, Billia, F, Keshavjee, S, Mital, S, Robbins, CS, Mak, TW, Epelman, S: Three tissue resident macrophage subsets coexist across organs with conserved origins and life cycles. *Sci Immunol*, 7: eabf7777, 2022. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf7777>
15. Ajami, B, Bennett, JL, Krieger, C, Tetzlaff, W, Rossi, FM: Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*, 10: 1538-1543, 2007. <https://doi.org/10.1038/nn2014>
16. Ginhoux, F, Greter, M, Leboeuf, M, Nandi, S, See, P, Gokhan, S, Mehler, MF, Conway, SJ, Ng, LG, Stanley, ER, Samokhvalov, IM, Merad, M: Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330: 841-845, 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>
17. Varol, C, Vallon-Eberhard, A, Elinav, E, Aychek, T, Shapira, Y, Luche, H, Fehling, HJ, Hardt, WD, Shakhar, G, Jung, S: Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity*, 31: 502-512, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.025>
18. Zigmund, E, Varol, C, Farache, J, Elmaliah, E, Satpathy, AT, Friedlander, G, Mack, M, Shpigel, N, Boneca, IG, Murphy, KM, Shakhar, G, Halpern, Z, Jung, S: Ly6C hi monocytes in the inflamed

- colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity*, 37: 1076-1090, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.026>
19. Epelman, S, Lavine, KJ, Beaudin, AE, Sojka, DK, Carrero, JA, Calderon, B, Brija, T, Gautier, EL, Ivanov, S, Satpathy, AT, Schilling, JD, Schwendener, R, Sergin, I, Razani, B, Forsberg, EC, Yokoyama, WM, Unanue, ER, Colonna, M, Randolph, GJ, Mann, DL: Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*, 40: 91-104, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.019>
 20. Gautier, EL, Shay, T, Miller, J, Greter, M, Jakubzick, C, Ivanov, S, Helft, J, Chow, A, Elpek, KG, Gordonov, S, Mazloom, AR, Ma'ayan, A, Chua, WJ, Hansen, TH, Turley, SJ, Merad, M, Randolph, GJ, Immunological Genome, C: Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol*, 13: 1118-1128, 2012. <https://doi.org/10.1038/ni.2419>
 21. Bekkering, S, Dominguez-Andres, J, Joosten, LAB, Riksen, NP, Netea, MG: Trained Immunity: Reprogramming Innate Immunity in Health and Disease. *Annu Rev Immunol*, 39: 667-693, 2021. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-102119-073855>
 22. Buscher, K, Marcovecchio, P, Hedrick, CC, Ley, K: Patrolling Mechanics of Non-Classical Monocytes in Vascular Inflammation. *Front Cardiovasc Med*, 4: 80, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00080>
 23. Geissmann, F, Jung, S, Littman, DR: Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19: 71-82, 2003. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00174-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00174-2)
 24. Carlin, LM, Stamatiades, EG, Auffray, C, Hanna, RN, Glover, L, Vizcay-Barrena, G, Hedrick, CC, Cook, HT, Diebold, S, Geissmann, F: Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*, 153: 362-375, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.010>
 25. Gordon, S, Pluddemann, A: Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol*, 15: 53, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0392-4>
 26. Thomas, G, Tacke, R, Hedrick, CC, Hanna, RN: Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35: 1306-1316, 2015. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304650>
 27. Amarante-Mendes, GP, Adjemian, S, Branco, LM, Zanetti, LC, Weinlich, R, Bortoluci, KR: Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Frontiers in Immunology*, 9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02379>
 28. Schmieder, A, Michel, J, Schonhaar, K, Goerdts, S, Schledzewski, K: Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages. *Semin Cancer Biol*, 22: 289-297, 2012. [https://doi.org/S1044-579X\(12\)00025-9](https://doi.org/S1044-579X(12)00025-9) [pii]
 - 10.1016/j.semcancer.2012.02.002 [doi]
 29. Murray, PJ: Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*, 79: 541-566, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>
 30. Gordon, S: Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 3: 23-35, 2003. <https://doi.org/10.1038/nri978>
 31. Dermitzakis, I, Theotokis, P, Evangelidis, P, Delilampou, E, Evangelidis, N, Chatzisavvidou, A, Avramidou, E, Manthou, ME: CNS Border-Associated Macrophages: Ontogeny and Potential Implication in Disease. *Curr Issues Mol Biol*, 45: 4285-4300, 2023. <https://doi.org/10.3390/cimb45050272>
 32. Haldar, M, Murphy, KM: Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages. *Immunological reviews*, 262: 25-35, 2014. <https://doi.org/10.1111/imr.12215>
 33. Lavin, Y, Mortha, A, Rahman, A, Merad, M: Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol*, 15: 731-744, 2015. <https://doi.org/10.1038/nri3920>
 34. Borges da Silva, H, Fonseca, R, Pereira, RM, Cassado, AdA, Álvarez, JM, D'Império Lima, MR: Splenic Macrophage Subsets and Their Function during Blood-Borne Infections. *Frontiers in Immunology*, 6, 2015. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00480>
 35. Martinez, FO, Sica, A, Mantovani, A, Locati, M: Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13: 453-461, 2008.
 36. Curren Smith, EW: Macrophage Polarization and Its Role in Cancer. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 06, 2015. <https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000338>
 37. Mosser, DM, Edwards, JP: Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8: 958-969, 2008. <https://doi.org/10.1038/nri2448>

38. Gordon, S, Taylor, PR: Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5: 953-964, 2005. <https://doi.org/10.1038/nri1733>
39. Murray, PJ, Allen, JE, Biswas, SK, Fisher, EA, Gilroy, DW, Goerdt, S, Gordon, S, Hamilton, JA, Ivashkiv, LB, Lawrence, T, Locati, M, Mantovani, A, Martinez, FO, Mege, JL, Mosser, DM, Natoli, G, Saeij, JP, Schultze, JL, Shirey, KA, Sica, A, Suttles, J, Udalova, I, van Ginderachter, JA, Vogel, SN, Wynn, TA: Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41: 14-20, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
40. Todesursachenstatistik, 2023, Code: 23211. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=statistic&levelindex=0&levelid=1695734620619&code=23211#abreadcrumb>. Abgerufen 26.09.2023.
41. Kadomoto, S, Izumi, K, Mizokami, A: Macrophage Polarity and Disease Control. *Int J Mol Sci*, 23, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms23010144>
42. Sun, X, Li, Y, Deng, Q, Hu, Y, Dong, J, Wang, W, Wang, Y, Li, C: Macrophage Polarization, Metabolic Reprogramming, and Inflammatory Effects in Ischemic Heart Disease. *Front Immunol*, 13: 934040, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.934040>
43. Bishop, NC, Wadley, AJ, Hamrouni, M, Roberts, MJ: Inactivity and obesity: consequences for macrophage-mediated inflammation and the development of cardiometabolic disease. *Proc Nutr Soc*, 82: 13-21, 2023. <https://doi.org/10.1017/S0029665122002671>
44. Kunz, HE, Hart, CR, Gries, KJ, Parvizi, M, Laurenti, M, Dalla Man, C, Moore, N, Zhang, X, Ryan, Z, Polley, EC, Jensen, MD, Vella, A, Lanza, IR: Adipose tissue macrophage populations and inflammation are associated with systemic inflammation and insulin resistance in obesity. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*, 321: E105-E121, 2021. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00070.2021>
45. Lumeng, CN, Deyoung, SM, Bodzin, JL, Saltiel, AR: Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*, 56: 16-23, 2007. <https://doi.org/10.2337/db06-1076>
46. Lumeng, CN, Bodzin, JL, Saltiel, AR: Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, 117: 175-184, 2007. <https://doi.org/10.1172/JCI29881>
47. Canello, R, Henegar, C, Viguier, N, Taleb, S, Poitou, C, Rouault, C, Coupaye, M, Pelloux, V, Hugol, D, Bouillot, JL, Bouloumie, A, Barbatelli, G, Cinti, S, Svensson, PA, Barsh, GS, Zucker, JD, Basdevant, A, Langin, D, Clement, K: Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, 54: 2277-2286, 2005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2277>
48. Akata, K, van Eeden, SF: Lung Macrophage Functional Properties in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*, 21, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21030853>
49. Finicelli, M, Digilio, FA, Galderisi, U, Peluso, G: The Emerging Role of Macrophages in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: The Potential Impact of Oxidative Stress and Extracellular Vesicle on Macrophage Polarization and Function. *Antioxidants (Basel)*, 11, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11030464>
50. Ford, AQ, Dasgupta, P, Mikhailenko, I, Smith, EM, Noben-Trauth, N, Keegan, AD: Adoptive transfer of IL-4R α + macrophages is sufficient to enhance eosinophilic inflammation in a mouse model of allergic lung inflammation. *BMC Immunol*, 13: 6, 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-13-6>
51. Melgert, BN, ten Hacken, NH, Rutgers, B, Timens, W, Postma, DS, Hylkema, MN: More alternative activation of macrophages in lungs of asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*, 127: 831-833, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.045>
52. Saez, A, Herrero-Fernandez, B, Gomez-Bris, R, Sánchez-Martinez, H, Gonzalez-Granado, JM: Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: Innate Immune System. *Int J Mol Sci*, 24, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24021526>
53. Shouval, DS, Biswas, A, Goettel, JA, McCann, K, Conaway, E, Redhu, NS, Mascanfroni, ID, Al Adham, Z, Lavoie, S, Ibourk, M, Nguyen, DD, Samsom, JN, Escher, JC, Somech, R, Weiss, B, Beier, R, Conklin, LS, Ebens, CL, Santos, FG, Ferreira, AR, Sherlock, M, Bhan, AK, Muller, W, Mora, JR, Quintana, FJ, Klein, C, Muisé, AM, Horwitz, BH, Snapper, SB: Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity*, 40: 706-719, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.011>
54. Rugtveit, J, Nilsen, EM, Bakka, A, Carlsen, H, Brandtzaeg, P, Scott, H: Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel

- disease. *Gastroenterology*, 112: 1493-1505, 1997. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(97\)70030-1](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(97)70030-1)
55. Grimm, MC, Pullman, WE, Bennett, GM, Sullivan, PJ, Pavli, P, Doe, WF: Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *J Gastroenterol Hepatol*, 10: 387-395, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1995.tb01589.x>
 56. Zigmond, E, Bernshtein, B, Friedlander, G, Walker, CR, Yona, S, Kim, KW, Brenner, O, Krauthgamer, R, Varol, C, Muller, W, Jung, S: Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity*, 40: 720-733, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.012>
 57. Yao, H, Tang, G: Macrophages in intestinal fibrosis and regression. *Cell Immunol*, 381: 104614, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2022.104614>
 58. Wynn, TA, Barron, L: Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*, 30: 245-257, 2010. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354>
 59. Hinz, B, Lagares, D: Evasion of apoptosis by myofibroblasts: a hallmark of fibrotic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 16: 11-31, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0324-5>
 60. Wang, C, Ma, C, Gong, L, Guo, Y, Fu, K, Zhang, Y, Zhou, H, Li, Y: Macrophage Polarization and Its Role in Liver Disease. *Front Immunol*, 12: 803037, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.803037>
 61. Dhar, D, Baglieri, J, Kisseleva, T, Brenner, DA: Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*, 245: 96-108, 2020. <https://doi.org/10.1177/1535370219898141>
 62. Kisseleva, T, Brenner, D: Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18: 151-166, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00372-7>
 63. Pradere, JP, Kluwe, J, De Minicis, S, Jiao, JJ, Gwak, GY, Dapito, DH, Jang, MK, Guenther, ND, Mederacke, I, Friedman, R, Dragomir, AC, Aloman, C, Schwabe, RF: Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology*, 58: 1461-1473, 2013. <https://doi.org/10.1002/hep.26429>
 64. Xi, S, Zheng, X, Li, X, Jiang, Y, Wu, Y, Gong, J, Jie, Y, Li, Z, Cao, J, Sha, L, Zhang, M, Chong, Y: Activated Hepatic Stellate Cells Induce Infiltration and Formation of CD163(+) Macrophages via CCL2/CCR2 Pathway. *Front Med (Lausanne)*, 8: 627927, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.627927>
 65. Beljaars, L, Schippers, M, Reker-Smit, C, Martinez, FO, Helming, L, Poelstra, K, Melgert, BN: Hepatic Localization of Macrophage Phenotypes during Fibrogenesis and Resolution of Fibrosis in Mice and Humans. *Front Immunol*, 5: 430, 2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00430>
 66. Lee, H, Fessler, MB, Qu, P, Heymann, J, Kopp, JB: Macrophage polarization in innate immune responses contributing to pathogenesis of chronic kidney disease. *BMC Nephrol*, 21: 270, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12882-020-01921-7>
 67. Kumar, S, Dwivedi, PD, Das, M, Tripathi, A: Macrophages in food allergy: an enigma. *Mol Immunol*, 56: 612-618, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.06.009>
 68. Hutchins, NA, Unsinger, J, Hotchkiss, RS, Ayala, A: The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol Med*, 20: 224-233, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.01.002>
 69. Culemann, S, Gruneboom, A, Kronke, G: Origin and function of synovial macrophage subsets during inflammatory joint disease. *Adv Immunol*, 143: 75-98, 2019. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2019.08.006>
 70. Hanahan, D, Weinberg, RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
 71. Giraldo, NA, Sanchez-Salas, R, Peske, JD, Vano, Y, Becht, E, Petitprez, F, Validire, P, Ingels, A, Cathelineau, X, Fridman, WH, Sautes-Fridman, C: The clinical role of the TME in solid cancer. *Br J Cancer*, 120: 45-53, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0327-z>
 72. Hourani, T, Holden, JA, Li, W, Lenzo, JC, Hadjigol, S, O'Brien-Simpson, NM: Tumor Associated Macrophages: Origin, Recruitment, Phenotypic Diversity, and Targeting. *Front Oncol*, 11: 788365, 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.788365>
 73. Mulder, K, Patel, AA, Kong, WT, Piot, C, Halitzki, E, Dunsmore, G, Khalilnezhad, S, Irac, SE, Dubuisson, A, Chevrier, M, Zhang, XM, Tam, JKC, Lim, TKH, Wong, RMM, Pai, R, Khalil, AIS, Chow, PKH, Wu, SZ, Al-Eryani, G, Roden, D, Swarbrick, A, Chan, JKY, Albani, S, Derosa, L, Zitvogel, L, Sharma, A, Chen, J, Silvin, A, Bertoletti, A, Bleriot, C, Dutertre, CA, Ginhoux, F: Cross-tissue single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity*, 54: 1883-1900 e1885, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.007>

74. Zhu, Y, Herndon, JM, Sojka, DK, Kim, KW, Knolhoff, BL, Zuo, C, Cullinan, DR, Luo, J, Bearden, AR, Lavine, KJ, Yokoyama, WM, Hawkins, WG, Fields, RC, Randolph, GJ, DeNardo, DG: Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity*, 47: 323-338 e326, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.014>
75. Chen, Z, Feng, X, Herting, CJ, Garcia, VA, Nie, K, Pong, WW, Rasmussen, R, Dwivedi, B, Seby, S, Wolf, SA, Gutmann, DH, Hambarzumyan, D: Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Res*, 77: 2266-2278, 2017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2310>
76. Boutilier, AJ, Elswa, SF: Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*, 22, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22136995>
77. Sica, A, Mantovani, A: Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*, 122: 787-795, 2012. <https://doi.org/10.1172/JCI59643>
78. Cassetta, L, Pollard, JW: A timeline of tumour-associated macrophage biology. *Nat Rev Cancer*, 23: 238-257, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00547-1>
79. Sica, A, Larghi, P, Mancino, A, Rubino, L, Porta, C, Totaro, MG, Rimoldi, M, Biswas, SK, Allavena, P, Mantovani, A: Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol*, 18: 349-355, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.004>
80. Hirano, R, Okamoto, K, Shinke, M, Sato, M, Watanabe, S, Watanabe, H, Kondoh, G, Kadonosono, T, Kizaka-Kondoh, S: Tissue-resident macrophages are major tumor-associated macrophage resources, contributing to early TNBC development, recurrence, and metastases. *Commun Biol*, 6: 144, 2023. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04525-7>
81. Belgiovine, C, Digifico, E, Anfray, C, Ummerino, A, Torres Andon, F: Targeting Tumor-Associated Macrophages in Anti-Cancer Therapies: Convincing the Traitors to Do the Right Thing. *J Clin Med*, 9, 2020. <https://doi.org/10.3390/jcm9103226>
82. Umansky, V, Adema, GJ, Baran, J, Brandau, S, Van Ginderachter, JA, Hu, X, Jablonska, J, Mojsilovic, S, Papadaki, HA, Pico de Coana, Y, Santegoets, KCM, Santibanez, JF, Serre, K, Si, Y, Sieminska, I, Velegraki, M, Fridlender, ZG: Interactions among myeloid regulatory cells in cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 68: 645-660, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2200-6>
83. Columba-Cabezas, S, Serafini, B, Ambrosini, E, Sanchez, M, Penna, G, Adorini, L, Aloisi, F: Induction of macrophage-derived chemokine/CCL22 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and cultured microglia: implications for disease regulation. *J Neuroimmunol*, 130: 10-21, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(02\)00170-4](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(02)00170-4)
84. Bloch, O, Crane, CA, Kaur, R, Safaee, M, Rutkowski, MJ, Parsa, AT: Gliomas Promote Immunosuppression through Induction of B7-H1 Expression in Tumor-Associated Macrophages. *Clinical Cancer Research*, 19: 3165-3175, 2013. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-12-3314>
85. Matsunaga, T, Saito, H, Ikeguchi, M: Increased B7-H1 and B7-H4 Expressions on Circulating Monocytes and Tumor-Associated Macrophages are Involved in Immune Evasion in Patients with Gastric Cancer. *Yonago Acta Med*, 54: 1-10, 2011.
86. Anderson, KM, Czinn, SJ, Redline, RW, Blanchard, TG: Induction of CTLA-4-mediated anergy contributes to persistent colonization in the murine model of gastric *Helicobacter pylori* infection. *J Immunol*, 176: 5306-5313, 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5306>
87. Arlauckas, SP, Garris, CS, Kohler, RH, Kitaoka, M, Cuccarese, MF, Yang, KS, Miller, MA, Carlson, JC, Freeman, GJ, Anthony, RM, Weissleder, R, Pittet, MJ: In vivo imaging reveals a tumor-associated macrophage-mediated resistance pathway in anti-PD-1 therapy. *Sci Transl Med*, 9, 2017. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal3604>
88. Anderson, NR, Minutolo, NG, Gill, S, Klichinsky, M: Macrophage-Based Approaches for Cancer Immunotherapy. *Cancer Res*, 81: 1201-1208, 2021. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2990>
89. Li, M, He, L, Zhu, J, Zhang, P, Liang, S: Targeting tumor-associated macrophages for cancer treatment. *Cell Biosci*, 12: 85, 2022. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00823-5>
90. Chamseddine, AN, Assi, T, Mir, O, Chouaib, S: Modulating tumor-associated macrophages to enhance the efficacy of immune checkpoint inhibitors: A TAM-pling approach. *Pharmacol Ther*, 231: 107986, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107986>
91. Fetterly, GJ, Aras, U, Meholick, PD, Takimoto, C, Seetharam, S, McIntosh, T, de Bono, JS, Sandhu, SK, Tolcher, A, Davis, HM, Zhou, H, Puchalski, TA: Utilizing pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling to simultaneously examine free CCL2, total

- CCL2 and carlumab (CNTO 888) concentration time data. *J Clin Pharmacol*, 53: 1020-1027, 2013. <https://doi.org/10.1002/jcph.140>
92. Cao, Y, Qiao, B, Chen, Q, Xie, Z, Dou, X, Xu, L, Ran, H, Zhang, L, Wang, Z: Tumor microenvironment remodeling via targeted depletion of M2-like tumor-associated macrophages for cancer immunotherapy. *Acta Biomater*, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.02.006>
 93. Zang, X, Zhang, X, Hu, H, Qiao, M, Zhao, X, Deng, Y, Chen, D: Targeted Delivery of Zoledronate to Tumor-Associated Macrophages for Cancer Immunotherapy. *Mol Pharm*, 16: 2249-2258, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00261>
 94. Sprinzi, MF, Puschnik, A, Schlitter, AM, Schad, A, Ackermann, K, Esposito, I, Lang, H, Galle, PR, Weinmann, A, Heikenwalder, M, Protzer, U: Sorafenib inhibits macrophage-induced growth of hepatoma cells by interference with insulin-like growth factor-1 secretion. *J Hepatol*, 62: 863-870, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.011>
 95. Wanderley, CW, Colon, DF, Luiz, JPM, Oliveira, FF, Viacava, PR, Leite, CA, Pereira, JA, Silva, CM, Silva, CR, Silva, RL, Speck-Hernandez, CA, Mota, JM, Alves-Filho, JC, Lima-Junior, RC, Cunha, TM, Cunha, FQ: Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner. *Cancer Res*, 78: 5891-5900, 2018. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3480>
 96. Petty, AJ, Owen, DH, Yang, Y, Huang, X: Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 13, 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13215318>
 97. O'Hara, MH, O'Reilly, EM, Varadhachary, G, Wolff, RA, Wainberg, ZA, Ko, AH, Fisher, G, Rahma, O, Lyman, JP, Cabanski, CR, Mick, R, Gherardini, PF, Kitch, LJ, Xu, J, Samuel, T, Karakunnel, J, Fairchild, J, Bucktrout, S, LaVallee, TM, Selinsky, C, Till, JE, Carpenter, EL, Alanio, C, Byrne, KT, Chen, RO, Trifan, OC, Dugan, U, Horak, C, Hubbard-Lucey, VM, Wherry, EJ, Ibrahim, R, Vonderheide, RH: CD40 agonistic monoclonal antibody APX005M (sotigalimab) and chemotherapy, with or without nivolumab, for the treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: an open-label, multicentre, phase 1b study. *The Lancet Oncology*, 22: 118-131, 2021. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30532-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30532-5)
 98. Khan, SU, Khan, MU, Azhar Ud Din, M, Khan, IM, Khan, MI, Bungau, S, Hassan, SSU: Reprogramming tumor-associated macrophages as a unique approach to target tumor immunotherapy. *Front Immunol*, 14: 1166487, 2023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1166487>
 99. Drury, AN, Szent-Györgyi, A: The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*, 68: 213-237, 1929. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1929.sp002608>
 100. Burnstock, G: Purinergic Nerves. *Pharmacological Reviews*, 24: 509-581, 1972.
 101. Burnstock, G, Verkhratsky, A: Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta physiologica*, 195: 415-447, 2009. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01957.x>
 102. Burnstock, G: Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res*, 42: 3-8, 2009. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2008005000037>
 103. Lüllmann, H, Mohr, K, Wehling, M: *Pharmakologie und Toxikologie : Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen : ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker*, Stuttgart ; New York, Georg Thieme Verlag, 2016.
 104. Freissmuth, M, Offermanns, S, Böhm, S: *Pharmakologie und Toxikologie : von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*, Berlin ; Heidelberg, Springer, 2016.
 105. Illes, P, Müller, CE, Jacobson, KA, Grutter, T, Nicke, A, Fountain, SJ, Kennedy, C, Schmalzing, G, Jarvis, MF, Stojilkovic, SS, King, BF, Di Virgilio, F: Update of P2X receptor properties and their pharmacology: IUPHAR Review 30. *Br J Pharmacol*, 178: 489-514, 2021. <https://doi.org/10.1111/bph.15299>
 106. Di Virgilio, F, Sarti, AC, Coutinho-Silva, R: Purinergic signaling, DAMPs, and inflammation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 318: C832-C835, 2020. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00053.2020>
 107. Erb, L, Weisman, GA: Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*, 1: 789-803, 2012. <https://doi.org/10.1002/wmts.62>
 108. Jacobson, KA, Delicado, EG, Gachet, C, Kennedy, C, von Kügelgen, I, Li, B, Miras-Portugal, MT, Novak, I, Schöneberg, T, Perez-Sen, R, Thor, D, Wu, B, Yang, Z, Müller, CE: Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *Br J Pharmacol*, 177: 2413-2433, 2020. <https://doi.org/10.1111/bph.15005>
 109. Kloss, L, Dollt, C, Schledzewski, K, Krewer, A, Melchers, S, Manta, C, Sticht, C, Torre, C, Utikal, J, Umansky, V, Schmieder, A: ADP secreted by dying melanoma cells mediates chemotaxis

- and chemokine secretion of macrophages via the purinergic receptor P2Y₁₂. *Cell Death Dis*, 10: 760, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2010-6>
110. Burnstock, G, Di Virgilio, F: Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal*, 9: 491-540, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9372-5>
111. Huang, Z, Xie, N, Illes, P, Di Virgilio, F, Ulrich, H, Semyanov, A, Verkhatsky, A, Sperlagh, B, Yu, S-G, Huang, C, Tang, Y: From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6: 162, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00553-z>
112. Di Virgilio, F: P2X₇ is a cytotoxic receptor....maybe not: implications for cancer. *Purinergic Signal*, 17: 55-61, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11302-020-09735-w>
113. Gicquel, T, Robert, S, Loyer, P, Victoni, T, Bodin, A, Ribault, C, Gleonnec, F, Couillin, I, Boichot, E, Lagente, V: IL-1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J*, 29: 4162-4173, 2015. <https://doi.org/10.1096/fj.14-267393>
114. Lazarowski, ER, Harden, TK: UDP-Sugars as Extracellular Signaling Molecules: Cellular and Physiologic Consequences of P2Y₁₄ Receptor Activation. *Mol Pharmacol*, 88: 151-160, 2015. <https://doi.org/10.1124/mol.115.098756>
115. Costanzi, S, Mamedova, L, Gao, ZG, Jacobson, KA: Architecture of P2Y nucleotide receptors: structural comparison based on sequence analysis, mutagenesis, and homology modeling. *J Med Chem*, 47: 5393-5404, 2004. <https://doi.org/10.1021/jm049914c>
116. Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000174944-P2RY14>. Abgerufen 23.11.2023.
117. Karlsson, M, Zhang, C, Mear, L, Zhong, W, Digre, A, Katona, B, Sjostedt, E, Butler, L, Odeberg, J, Dusart, P, Edfors, F, Oksvold, P, von Feilitzen, K, Zwahlen, M, Arif, M, Altay, O, Li, X, Ozcan, M, Mardinoglu, A, Fagerberg, L, Mulder, J, Luo, Y, Ponten, F, Uhlen, M, Lindskog, C: A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv*, 7, 2021. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh2169>
118. Scrivens, M, Dickenson, JM: Functional expression of the P2Y₁₄ receptor in human neutrophils. *Eur J Pharmacol*, 543: 166-173, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.05.037>
119. Sesma, JI, Kreda, SM, Steinckwich-Besancon, N, Dang, H, Garcia-Mata, R, Harden, TK, Lazarowski, ER: The UDP-sugar-sensing P2Y₁₄ receptor promotes Rho-mediated signaling and chemotaxis in human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol*, 303: C490-498, 2012. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00138.2012>
120. Barrett, MO, Sesma, JI, Ball, CB, Jayasekara, PS, Jacobson, KA, Lazarowski, ER, Harden, TK: A selective high-affinity antagonist of the P2Y₁₄ receptor inhibits UDP-glucose-stimulated chemotaxis of human neutrophils. *Mol Pharmacol*, 84: 41-49, 2013. <https://doi.org/10.1124/mol.113.085654>
121. Sesma, JI, Weitzer, CD, Livraghi-Butrico, A, Dang, H, Donaldson, S, Alexis, NE, Jacobson, KA, Harden, TK, Lazarowski, ER: UDP-glucose promotes neutrophil recruitment in the lung. *Purinergic Signal*, 12: 627-635, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9524-5>
122. Karcz, TP, Whitehead, GS, Nakano, K, Nakano, H, Grimm, SA, Williams, JG, Deterding, LJ, Jacobson, KA, Cook, DN: UDP-glucose and P2Y₁₄ receptor amplify allergen-induced airway eosinophilia. *J Clin Invest*, 131, 2021. <https://doi.org/10.1172/JCI140709>
123. Gendaszewska-Darmach, E, Weglowska, E, Walczak-Drzewiecka, A, Karas, K: Nucleoside 5'-O-monophosphorothioates as modulators of the P2Y₁₄ receptor and mast cell degranulation. *Oncotarget*, 7: 69358-69370, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12541>
124. Gao, ZG, Wei, Q, Jayasekara, MP, Jacobson, KA: The role of P2Y₁₄ and other P2Y receptors in degranulation of human LAD2 mast cells. *Purinergic Signal*, 9: 31-40, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9325-4>
125. Lintzmaier Petiz, L, Glaser, T, Scharfstein, J, Ratajczak, MZ, Ulrich, H: P2Y₁₄ Receptor as a Target for Neutrophilia Attenuation in Severe COVID-19 Cases: From Hematopoietic Stem Cell Recruitment and Chemotaxis to Thrombo-inflammation. *Stem Cell Rev Rep*, 17: 241-252, 2021. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10129-7>
126. Battistone, MA, Mendelsohn, AC, Spallanzani, RG, Allegretti, AS, Liberman, RN, Sesma, J, Kalim, S, Wall, SM, Bonventre, JV, Lazarowski, ER, Brown, D, Breton, S: Proinflammatory P2Y₁₄ receptor inhibition protects against ischemic acute kidney injury in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 130: 3734-3749, 2020. <https://doi.org/10.1172/JCI134791>
127. Azroyan, A, Cortez-Retamozo, V, Bouley, R, Liberman, R, Ruan, YC, Kiselev, E, Jacobson, KA, Pittet, MJ, Brown, D, Breton, S: Renal intercalated cells sense and mediate inflammation via

- the P2Y₁₄ receptor. *PLoS One*, 10: e0121419, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121419>
128. Alsaqati, M, Latif, ML, Chan, SL, Ralevic, V: Novel vasocontractile role of the P2Y₁(4) receptor: characterization of its signalling in porcine isolated pancreatic arteries. *Br J Pharmacol*, 171: 701-713, 2014. <https://doi.org/10.1111/bph.12473>
129. Haanes, KA, Edvinsson, L: Characterization of the contractile P2Y₁₄ receptor in mouse coronary and cerebral arteries. *FEBS letters*, 588: 2936-2943, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.044>
130. Meister, J, Le Duc, D, Ricken, A, Burkhardt, R, Thiery, J, Pfannkuche, H, Polte, T, Grosse, J, Schoneberg, T, Schulz, A: The G protein-coupled receptor P2Y₁₄ influences insulin release and smooth muscle function in mice. *J Biol Chem*, 289: 23353-23366, 2014. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.580803>
131. Jain, S, Pydi, SP, Jung, YH, Scortichini, M, Kesner, EL, Karcz, TP, Cook, DN, Gavrilova, O, Wess, J, Jacobson, KA: Adipocyte P2Y₁₄ receptors play a key role in regulating whole-body glucose and lipid homeostasis. *JCI Insight*, 6, 2021. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.146577>
132. Cho, J, Yusuf, R, Kook, S, Attar, E, Lee, D, Park, B, Cheng, T, Scadden, DT, Lee, BC: Purinergic P2Y₁(4) receptor modulates stress-induced hematopoietic stem/progenitor cell senescence. *J Clin Invest*, 124: 3159-3171, 2014. <https://doi.org/10.1172/JCI61636>
133. Garrison, BS, Rossi, DJ: Loss of P2Y₁(4) results in an arresting response to hematological stress. *J Clin Invest*, 124: 2846-2848, 2014. <https://doi.org/10.1172/JCI76626>
134. Lee, BC, Cheng, T, Adams, GB, Attar, EC, Miura, N, Lee, SB, Saito, Y, Olszak, I, Dombkowski, D, Olson, DP, Hancock, J, Choi, PS, Haber, DA, Luster, AD, Scadden, DT: P2Y-like receptor, GPR105 (P2Y₁₄), identifies and mediates chemotaxis of bone-marrow hematopoietic stem cells. *Genes & development*, 17: 1592-1604, 2003. <https://doi.org/10.1101/gad.1071503>
135. Lee, SA, Park, JH, Lee, SY: Selective induction of P2Y₁₄ receptor by RANKL promotes osteoclast formation. *Mol Cells*, 36: 273-277, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0226-3>
136. Mufti, F, Jung, YH, Giancotti, LA, Yu, J, Chen, Z, Phung, NB, Jacobson, KA, Salvemini, D: P2Y₁(4) Receptor Antagonists Reverse Chronic Neuropathic Pain in a Mouse Model. *ACS Med Chem Lett*, 11: 1281-1286, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.0c00115>
137. Kobayashi, K, Yamanaka, H, Yanamoto, F, Okubo, M, Noguchi, K: Multiple P2Y subtypes in spinal microglia are involved in neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Glia*, 60: 1529-1539, 2012. <https://doi.org/10.1002/glia.22373>
138. Lazarowski, ER, Shea, DA, Boucher, RC, Harden, TK: Release of cellular UDP-glucose as a potential extracellular signaling molecule. *Mol Pharmacol*, 63: 1190-1197, 2003. <https://doi.org/10.1124/mol.63.5.1190>
139. Katakura, S, Takao, T, Arase, T, Yoshimasa, Y, Tomisato, S, Uchida, S, Masuda, H, Uchida, H, Tanaka, M, Maruyama, T: UDP-glucose, a cellular danger signal, and nucleotide receptor P2Y₁₄ enhance the invasion of human extravillous trophoblast cells. *Placenta*, 101: 194-203, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.09.061>
140. Harden, TK, Sesma, JL, Fricks, IP, Lazarowski, ER: Signalling and pharmacological properties of the P2Y receptor. *Acta physiologica*, 199: 149-160, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02116.x>
141. Zimmermann, H, Zebisch, M, Strater, N: Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. *Purinergic Signal*, 8: 437-502, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4>
142. Li, H, Jiang, W, Ye, S, Zhou, M, Liu, C, Yang, X, Hao, K, Hu, Q: P2Y₁₄ receptor has a critical role in acute gouty arthritis by regulating pyroptosis of macrophages. *Cell Death Dis*, 11: 394, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2609-7>
143. Ishimaru, M, Yusuke, N, Tsukimoto, M, Harada, H, Takenouchi, T, Kitani, H, Kojima, S: Purinergic signaling via P2Y receptors up-mediates IL-6 production by liver macrophages/Kupffer cells. *J Toxicol Sci*, 39: 413-423, 2014. <https://doi.org/10.2131/jts.39.413>
144. Myrtek, D, Müller, T, Geyer, V, Derr, N, Ferrari, D, Zissel, G, Dürk, T, Sorichter, S, Luttmann, W, Kuepper, M, Norgauer, J, Di Virgilio, F, Virchow, JC, Jr., Idzko, M: Activation of human alveolar macrophages via P2 receptors: coupling to intracellular Ca²⁺ increases and cytokine secretion. *J Immunol*, 181: 2181-2188, 2008. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2181>
145. Xu, J, Morinaga, H, Oh, D, Li, P, Chen, A, Talukdar, S, Mamane, Y, Mancini, JA, Nawrocki, AR, Lazarowski, E, Olefsky, JM, Kim, JJ: GPR105 ablation prevents inflammation and improves insulin sensitivity in mice with diet-induced obesity. *J Immunol*, 189: 1992-1999, 2012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103207>

146. Ma, J, Wei, K, Liu, J, Tang, K, Zhang, H, Zhu, L, Chen, J, Li, F, Xu, P, Chen, J, Liu, J, Fang, H, Tang, L, Wang, D, Zeng, L, Sun, W, Xie, J, Liu, Y, Huang, B: Glycogen metabolism regulates macrophage-mediated acute inflammatory responses. *Nat Commun*, 11: 1769, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15636-8>
147. Klaver, D, Thurnher, M: Control of Macrophage Inflammation by P2Y Purinergic Receptors. *Cells*, 10, 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10051098>
148. Akhtari, M, Zargar, SJ, Vojdani, M, Ashraf-Ganjouei, A, Javinani, A, Hamzeh, E, Rezaeiemanesh, A, Jamshidi, A, Mahmoudi, M: P2 receptors mRNA expression profiles in macrophages from ankylosing spondylitis patients and healthy individuals. *Int J Rheum Dis*, 23: 350-357, 2020. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13783>
149. Schmieder, A, Schledzewski, K, Michel, J, Schonhaar, K, Morias, Y, Bosschaerts, T, Van den Bossche, J, Dorny, P, Sauer, A, Sticht, C, Geraud, C, Waibler, Z, Beschin, A, Goerdts, S: The CD20 homolog Ms4a8a integrates pro- and anti-inflammatory signals in novel M2-like macrophages and is expressed in parasite infection. *Eur J Immunol*, 42: 2971-2982, 2012. <https://doi.org/10.1002/eji.201142331> [doi]
150. Schonhaar, K, Schledzewski, K, Michel, J, Dollt, C, Gkaniatsou, C, Geraud, C, Kzhyshkowska, J, Goerdts, S, Schmieder, A: Expression of stabilin-1 in M2 macrophages in human granulomatous disease and melanocytic lesions. *Int J Clin Exp Pathol*, 7: 1625-1634, 2014.
151. Dollt, C, Becker, K, Michel, J, Melchers, S, Weis, CA, Schledzewski, K, Krewer, A, Kloss, L, Gebhardt, C, Utikal, J, Schmieder, A: The shedded ectodomain of Lyve-1 expressed on M2-like tumor-associated macrophages inhibits melanoma cell proliferation. *Oncotarget*, 8: 103682-103692, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21771>
152. Kloss, L: *Molecular and functional characterization of P2Y12 expression in tumor-associated macrophages*. Med. Dissertation. Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg, 2019. 10.11588/heidok.00026811
153. Mootha, VK, Lindgren, CM, Eriksson, KF, Subramanian, A, Sihag, S, Lehar, J, Puigserver, P, Carlsson, E, Ridderstrale, M, Laurila, E, Houstis, N, Daly, MJ, Patterson, N, Mesirov, JP, Golub, TR, Tamayo, P, Spiegelman, B, Lander, ES, Hirschhorn, JN, Altshuler, D, Groop, LC: PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*, 34: 267-273, 2003. <https://doi.org/10.1038/ng1180>
154. Subramanian, A, Tamayo, P, Mootha, VK, Mukherjee, S, Ebert, BL, Gillette, MA, Paulovich, A, Pomeroy, SL, Golub, TR, Lander, ES, Mesirov, JP: Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 15545-15550, 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
155. Reich, M, Liefeld, T, Gould, J, Lerner, J, Tamayo, P, Mesirov, JP: GenePattern 2.0. *Nat Genet*, 38: 500-501, 2006. <https://doi.org/10.1038/ng0506-500>
156. Dollt, C, Michel, J, Kloss, L, Melchers, S, Schledzewski, K, Becker, K, Sauer, A, Krewer, A, Koll, F, Schmieder, A: The novel immunoglobulin super family receptor SLAMF9 identified in TAM of murine and human melanoma influences pro-inflammatory cytokine secretion and migration. *Cell Death Dis*, 9: 939, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1011-1>
157. Schmieder, A, Schledzewski, K, Michel, J, Tuckermann, JP, Tome, L, Sticht, C, Gkaniatsou, C, Nicolay, JP, Demory, A, Faulhaber, J, Kzhyshkowska, J, Geraud, C, Goerdts, S: Synergistic activation by p38MAPK and glucocorticoid signaling mediates induction of M2-like tumor-associated macrophages expressing the novel CD20 homolog MS4A8A. *Int J Cancer*, 129: 122-132, 2011. <https://doi.org/10.1002/ijc.25657>
158. Martinez, FO, Gordon, S, Locati, M, Mantovani, A: Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol*, 177: 7303-7311, 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7303>
159. Merz, J, Nettesheim, A, von Garlen, S, Albrecht, P, Saller, BS, Engelmann, J, Hertle, L, Schäfer, I, Dimanski, D, König, S, Karnbrock, L, Bulatova, K, Peikert, A, Hoppe, N, Hilgendorf, I, von Zur Mühlen, C, Wolf, D, Groß, O, Bode, C, Zirlik, A, Stachon, P: Pro- and anti-inflammatory macrophages express a sub-type specific purinergic receptor profile. *Purinergic Signal*, 17: 481-492, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11302-021-09798-3>
160. Lattin, JE, Schroder, K, Su, AI, Walker, JR, Zhang, J, Wiltshire, T, Saijo, K, Glass, CK, Hume, DA, Kellie, S, Sweet, MJ: Expression analysis of G Protein-Coupled Receptors in mouse macrophages. *Immunome Res*, 4: 5, 2008. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-4-5>
161. Gratchev, A, Kzhyshkowska, J, Kannookadan, S, Ochsenreiter, M, Popova, A, Yu, X, Mamidi, S, Stonehouse-Usselman, E, Muller-Moliniet, I, Gooi, L, Goerdts, S: Activation of a TGF-beta-specific multistep gene expression program in mature macrophages requires glucocorticoid-

- mediated surface expression of TGF-beta receptor II. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 180: 6553-6565, 2008. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6553>
162. EMBL's Expression Atlas. <https://www.ebi.ac.uk/gxa/experiments/E-GEOD-7568/Results>. Abgerufen 25.11.2023.
 163. Vogel, DY, Glim, JE, Stavenuiter, AW, Breur, M, Heijnen, P, Amor, S, Dijkstra, CD, Beelen, RH: Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, 219: 695-703, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.05.002>
 164. Nascimento, CR, Rodrigues Fernandes, NA, Gonzalez Maldonado, LA, Rossa Junior, C: Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for in vitro studies. *Biochem Biophys Rep*, 32: 101383, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2022.101383>
 165. Taniguchi, K, Hikiji, H, Okinaga, T, Hashidate-Yoshida, T, Shindou, H, Ariyoshi, W, Shimizu, T, Tominaga, K, Nishihara, T: Essential Role of Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 3 in the Induction of Macrophage Polarization in PMA-Treated U937 Cells. *J Cell Biochem*, 116: 2840-2848, 2015. <https://doi.org/10.1002/jcb.25230>
 166. Mamedova, L, Capra, V, Accomazzo, MR, Gao, ZG, Ferrario, S, Fumagalli, M, Abbracchio, MP, Rovati, GE, Jacobson, KA: CysLT1 leukotriene receptor antagonists inhibit the effects of nucleotides acting at P2Y receptors. *Biochem Pharmacol*, 71: 115-125, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.003>
 167. Wang, L, Jacobsen, SE, Bengtsson, A, Erlinge, D: P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells. *BMC Immunol*, 5: 16, 2004. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-5-16>
 168. Komohara, Y, Jinushi, M, Takeya, M: Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci*, 105: 1-8, 2014. <https://doi.org/10.1111/cas.12314>
 169. Chen, C, Gault, A, Shen, L, Nabavi, N: Molecular cloning and expression of early T cell costimulatory molecule-1 and its characterization as B7-2 molecule. *J Immunol*, 152: 4929-4936, 1994.
 170. Chen, L, Flies, DB: Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, 13: 227-242, 2013. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
 171. Zhang, B, Bailey, WM, Braun, KJ, Gensel, JC: Age decreases macrophage IL-10 expression: Implications for functional recovery and tissue repair in spinal cord injury. *Exp Neurol*, 273: 83-91, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.08.001>
 172. Wang, L-x, Zhang, S-x, Wu, H-j, Rong, X-l, Guo, J: M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, 106: 345-358, 2019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR>
 173. Freeman, K, Tsui, P, Moore, D, Emson, PC, Vawter, L, Naheed, S, Lane, P, Bawagan, H, Herrity, N, Murphy, K, Sarau, HM, Ames, RS, Wilson, S, Livi, GP, Chambers, JK: Cloning, pharmacology, and tissue distribution of G-protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001) rodent orthologs. *Genomics*, 78: 124-128, 2001. <https://doi.org/10.1006/geno.2001.6662>
 174. Chambers, JK, Macdonald, LE, Sarau, HM, Ames, RS, Freeman, K, Foley, JJ, Zhu, Y, McLaughlin, MM, Murdock, P, McMillan, L, Trill, J, Swift, A, Aiyar, N, Taylor, P, Vawter, L, Naheed, S, Szekeres, P, Hervieu, G, Scott, C, Watson, JM, Murphy, AJ, Duzic, E, Klein, C, Bergsma, DJ, Wilson, S, Livi, GP: A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem*, 275: 10767-10771, 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.10767>
 175. Skelton, L, Cooper, M, Murphy, M, Platt, A: Human immature monocyte-derived dendritic cells express the G protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001, P2Y14) and increase intracellular calcium in response to its agonist, uridine diphosphoglucose. *J Immunol*, 171: 1941-1949, 2003. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1941>
 176. Fumagalli, M, Brambilla, R, D'Ambrosi, N, Volonte, C, Matteoli, M, Verderio, C, Abbracchio, MP: Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors. *Glia*, 43: 218-203, 2003. <https://doi.org/10.1002/glia.10248>
 177. Korbecki, J, Kojder, K, Simińska, D, Bohatyrewicz, R, Gutowska, I, Chlubek, D, Baranowska-Bosiacka, I: CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of the Ligands of Receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4. *Int J Mol Sci*, 21, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21218412>
 178. Zhang, X, Chen, L, Dang, W-q, Cao, M-f, Xiao, J-f, Lv, S-q, Jiang, W-j, Yao, X-h, Lu, H-m, Miao, J-y, Wang, Y, Yu, S-c, Ping, Y-f, Liu, X-d, Cui, Y-h, Zhang, X, Bian, X-w: CCL8 secreted by tumor-associated macrophages promotes invasion and stemness of glioblastoma cells via ERK1/2 signaling. *Laboratory Investigation*, 100: 619-629, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0345-3>

179. Yang, P, Chen, W, Xu, H, Yang, J, Jiang, J, Jiang, Y, Xu, G: Correlation of CCL8 expression with immune cell infiltration of skin cutaneous melanoma: potential as a prognostic indicator and therapeutic pathway. *Cancer Cell International*, 21: 635, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02350-8>
180. Shao, D, Lian, Z, Di, Y, Zhang, L, Rajoka, MSR, Zhang, Y, Kong, J, Jiang, C, Shi, J: Dietary compounds have potential in controlling atherosclerosis by modulating macrophage cholesterol metabolism and inflammation via miRNA. *NPJ Sci Food*, 2: 13, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41538-018-0022-8>
181. Rayner, KJ, Sheedy, FJ, Esau, CC, Hussain, FN, Temel, RE, Parathath, S, van Gils, JM, Rayner, AJ, Chang, AN, Suarez, Y, Fernandez-Hernando, C, Fisher, EA, Moore, KJ: Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest*, 121: 2921-2931, 2011. <https://doi.org/10.1172/JCI57275>
182. Rayner, KJ, Suarez, Y, Davalos, A, Parathath, S, Fitzgerald, ML, Tamehiro, N, Fisher, EA, Moore, KJ, Fernandez-Hernando, C: MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*, 328: 1570-1573, 2010. <https://doi.org/10.1126/science.1189862>
183. Moradi-Chaleshtori, M, Bandehpour, M, Heidari, N, Mohammadi-Yeganeh, S, Mahmoud Hashemi, S: Exosome-mediated miR-33 transfer induces M1 polarization in mouse macrophages and exerts antitumor effect in 4T1 breast cancer cell line. *Int Immunopharmacol*, 90: 107198, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107198>
184. Hamacher, R, Schmid, RM, Saur, D, Schneider, G: Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer*, 7: 64, 2008. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-7-64>
185. Schlieman, MG, Fahy, BN, Ramsamooj, R, Beckett, L, Bold, RJ: Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer*, 89: 2110-2115, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601396>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 – Zeitlicher Verlauf der Makrophagen-Ontogenese in der Maus.....	2
Abb. 2 – Die wichtigsten Oberflächenrezeptoren auf Makrophagen und ihren Unterarten	3
Abb. 3 – M1/M2-Polarisations-Modell	6
Abb. 4 – Funktionelle Gegenüberstellung M1- und M2-ähnlicher TAM	10
Abb. 5 – Die Familie der purinergen Rezeptoren	14
Abb. 6 – Liganden und G-Proteine der P2Y-Rezeptoren.....	15
Abb. 7 – Schematische Darstellung der P2Y14 Signalkaskade	17
Abb. 8 – P2Y14 mRNA-Expression MCSF vs. MDI (PCR).....	39
Abb. 9 – P2Y14 mRNA-Expression MCSF vs. MDI im Zeitverlauf (PCR).....	39
Abb. 10 – P2Y14 mRNA-Expression MCSF vs. MDI und im Zeitverlauf (qPCR).....	40
Abb. 11 – P2Y1/2/4/6/10/11/13 mRNA-Expression MCSF vs. MDI (qPCR)	40
Abb. 12 – Stimulations- und Inhibitionsexperimente P2Y14 (qPCR).....	41
Abb. 13 – P2Y14 mRNA Expression in PMA-differenzierten U937 Zellen (qPCR)	42
Abb. 14 – Kontrollexperimente nach Transduktion und Antikörperherstellung	44
Abb. 15 – Proteinexpression von P2Y14 MCSF vs. MDI (Westernblot + Cytospins).....	45
Abb. 16 – Proteinexpression von P2Y14 MCSF vs. MDI (FACS) + Gatingstrategie	45
Abb. 17 – Multicolor-FACS-Experiment MCSF vs. MDI vs. MIFT.....	46
Abb. 18 – Antikörpercharakterisierung antiP2Y14_CT316 in Paraffin	47
Abb. 19 – Calcium-Influx-Assay von stimulierten U937 und pBMC.....	48
Abb. 20 – Microarray-Analysen von mit UDP-Glukose stimulierten MDI-pBMC	49
Abb. 21 – Gensatzanreicherungsanalyse und Heatmaps der Microarray-Daten	50

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Andreas Krewer
Geburtsdatum	20.01.1988
Geburtsort	Saarbrücken

Schulbildung

1994 – 1998	Grundschule Schafbrücke
1998 – 2007	Albertus-Magnus-Gymnasium St. Ingbert
21.07.2007	Abitur

Beruflicher und universitärer Werdegang

11 / 2007 – 07 / 2008	Zivildienst
10 / 2008 – 09 / 2011	Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger
10 / 2011 – 09 / 2012	Gesundheits- und Krankenpfleger auf der Intensivstation der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen
WS 2012 / 13	Beginn des Studiums (Humanmedizin) An der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
10 / 2012 – 09 / 2014	Vorklinischer Studienabschnitt
10.09.2014	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10 / 2014 – 11 / 2019	Klinischer Studienabschnitt
04 / 2015 – 09 / 2016	Promotionsstipendium in Projekt 13 des Graduiertenkollegs „Hallmarks of Skin Cancer“ (2099/1), mit Unterbrechung des Studiums (2 Semester)
18.07.2016	Thesis Advisory Committee (TAC)-Meeting im Rahmen der Anglo-German Research Training Initiative Summer School, King's College London
11.10.2018	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
19.11.2019	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: 1,0
27.11.2019	Approbation als Arzt
Seit 01 / 2020	Arzt in Weiterbildung

Danksagung

Meine höchste Wertschätzung gilt Frau Prof. Dr. Astrid Schmieder für die Möglichkeit dieser Promotion, die exzellente Betreuung, den stetigen wissenschaftlichen Austausch und nicht zuletzt für die fachliche Begutachtung der vorliegenden Arbeit. Sie war jederzeit mit hervorragendem Rat an meiner Seite und führte mich durch so manch missglücktes Experiment und viele frustrane Wochen. Astrid, vielen herzlichen Dank für deinen unverbrüchlichen Glauben an mich, dein immenses Engagement, deine unverwechselbar positive Art und dein herzliches Wesen, die es immer wieder geschafft haben, mich über die tiefsten Tiefen dieser Arbeit zu tragen.

Herrn Prof. Dr. Viktor Umansky gilt mein tiefer Dank für den konstanten Austausch und die produktive Zusammenarbeit, nicht zuletzt im Rahmen unserer gemeinsamen Laborbesprechungen. Auch für die enge Betreuung und die Möglichkeit, ihm meine Arbeit im Rahmen des TAC Meetings vorstellen zu können, möchte ich mich herzlich bedanken.

Ich möchte auch Herrn Prof. Dr. Sergij Goerdts für die Möglichkeit danken, meine Arbeit in den Laborräumlichkeiten der Klinik für Dermatologie der Universitätsmedizin Mannheim und als Mitglied des Graduiertenkollegs 2099 „Hallmarks of Skin Cancer“ absolvieren zu können. Die wertvollen Kurse, die exzellente Organisation und die internationale Plattform an Gleichgesinnten, die dieser GRK mir zur Verfügung gestellt hat, haben mich in meiner persönlichen und wissenschaftlichen Entwicklung sehr vorangebracht.

Herrn Prof. Dr. Pascal Meier vom Institute of Cancer Research in London möchte ich für die großzügige Möglichkeit danken, sein Labor besuchen zu dürfen. Während dieses Besuches erhielt ich die Möglichkeit viele neue Methoden zu erlernen, knüpfte neue Kontakte und entwickelte durch die vielen produktiven Diskussionen neue Herangehensweisen an teilweise festgefahrene Probleme. Hierfür herzlichen Dank.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Sergio Quezada und Herrn Prof. Dr. Utikal für die wertvollen Ratschläge und die wissenschaftliche Zwischenbegutachtung meiner Arbeit während des TAC Meetings in London.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Thomas Wieland für die fruchtbare Kooperation und den Erfahrungsaustausch. Auch Frau Doris Baltus möchte ich in diesem Zusammenhang für die Möglichkeit danken, von ihr den korrekten Umgang und die Feinheiten der intrazellulären Calcium-Messung zu erlernen.

Mein besonderer Dank geht an alle Mitglieder der AG Goerdts und der AG Géraud, allen voran Dr. Victor Olsavszky, Dr. Kai Schledzewski, Hiltrud Schönhaber, Jochen Weber, Dr. Calin Manta und Sayran Arif-Said für die ungezählten Hilfestellungen und die unschätzbare Unterstützung bei so vielen technischen und wissenschaftlichen Problem- und Fragestellungen.

Eine tiefe Dankbarkeit empfinde ich für Claudia Dollt, Loreen Kloss und Susanne Melchers als meinen ehemaligen KollegInnen in der AG Schmieder. Ich werde die tolle Atmosphäre, die oft langen Gespräche, das Herumalbern und die große gegenseitige Unterstützung, die wir uns untereinander im Team bewahrt haben, sehr vermissen. Es war mir eine große Freude, mit euch arbeiten zu dürfen!

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern und meine besten Freunde Julian Scriba, Dennis Schäfer-Babajew, Theresa Stake, Linda Ophüls, Danina Dressler, Christoph Lücke, Franziska Schwillie und Franz-Josef Dally, die mir ein konstanter Quell an Kraft und Durchhaltevermögen waren, für ihre bedingungslose Unterstützung und auch für den ein oder anderen kritischen Ton, wenn ich mich mal wieder zu selbstvergessen in Kleinigkeiten zu verlieren drohte.

Mein größter Dank gilt Sven Schwarz, der den schwersten Teil des Weges mit mir gehen musste und den ich trotzdem immer sicher an meiner Seite wusste. Sven, ich kann dir nicht genug danken für deine Unterstützung, deine Geduld und dass du immer für mich da bist. Ich liebe dich.