



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Charakterisierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors P2Y<sub>14</sub> in  
Tumor-assoziierten Makrophagen im In-vitro-Modell**

Autor: Andreas Krewer  
Institut / Klinik: Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
Doktormutter: Prof. Dr. A. Schmieder

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- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 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<sup>+</sup> 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 purinerge Rezeptor P2Y<sub>14</sub> 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 P2Y<sub>14</sub>-Agonisten in Immunzellen chemotaktische Signale vermitteln, ist dennoch wenig über das Expressionsprofil und die Funktionsweise von P2Y<sub>14</sub> in Makrophagen bekannt. Das Ziel dieser Studie war es daher, die zugrundeliegenden Faktoren und die funktionelle Relevanz des P2Y<sub>14</sub>-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 P2Y<sub>14</sub> unzuverlässige Ergebnisse lieferten, wurde die Herstellung eines eigenen gegen P2Y<sub>14</sub>-gerichteten Peptid-Antikörpers in Auftrag gegeben und alle verwendeten Antikörper auf Spezifität mithilfe einer lentiviral hergestellten, P2Y<sub>14</sub><sup>+</sup> transgenen U937-Zelllinie getestet.

Die P2Y<sub>14</sub>-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 P2Y<sub>14</sub> 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- $\gamma$  + Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) (MIFT) eine gesteigerte P2Y<sub>14</sub>-Genexpression in pBMC auslösen. Eine Hochregulation der P2Y<sub>14</sub>-Genexpression

durch Dexamethason + IL-4 und IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  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 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<sup>+</sup> 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.