

Die Rolle von CCR2+ Makrophagen für die Angiogenese und Tumervaskularisation  
in fibrotisch veränderten Lebern

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Peter Leonard Schrammen

aus

Viersen

Berichter: Herr Universitätsprofessor  
Dr. med. Frank Tacke

Herr Universitätsprofessor  
Dr. rer. nat. Ralf Weiskirchen

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2019

Teile dieser Monographie wurden bereits veröffentlicht:

*Matthias Bartneck, Peter L. Schrammen, Diana Möckel, Olivier Govaere, Anke Liepelt, Oliver Krenkel, Can Ergen, Misti Vanette McCain, Dirk Eulberg, Tom Luedde, Christian Trautwein, Fabian Kiessling, Helen Reeves, Twan Lammers, Frank Tacke. „The CCR2+ macrophage subset promotes pathogenic angiogenesis for tumor“ vascularization in fibrotic livers“. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 2019 (in press), DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.007>*

## **The Role of CCR2+ Macrophages for Angiogenesis and Tumorigenesis in fibrotic Livers**

**Background & aims:** Hepatocellular carcinoma (HCC) typically arises as a consequence of long-standing inflammation in chronic liver diseases. Liver macrophages have dual functions in HCC pathogenesis: they establish an inflammatory pro-tumorigenic environment and suppress anti-tumoral responses; however, they also actively contribute to mechanisms of tumor surveillance. We evaluated the therapeutic inhibition of macrophage recruitment during fibrosis-associated hepatocarcinogenesis.

**Methods:** Mice were subjected to a combined fibrosis-cancer model, in which a single diethylnitrosamine (DEN) injection (14 days after birth) induced multiple tumors and repetitive carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) injections for 16 weeks (weeks 8-24) established chronic inflammation and fibrosis in the liver. Monocyte recruitment was inhibited by thrice weekly s.c. injections of the chemokine CCL2 aptamer antagonist mNOX-E36. Mice were evaluated after 24 weeks.

**Results:** The combined DEN-CCl<sub>4</sub> model induced multiple tumors in fibrotic livers at 24 weeks. Tumor-bearing livers showed three major populations of tumor-associated macrophages (TAM), based on MHC-II and Gr-1 expression by FACS analysis. Inhibition of the chemokine CCL2 by mNOX-E36 significantly reduced the inflammatory (M1-type) TAM population, while myeloid derived suppressor cells remained unaltered. CCL2 inhibition was associated with significantly reduced angiogenesis, as assessed by relative hepatic blood volume on functional assessment by  $\mu$ CT, as well as fibrosis reduction (by histology and collagen immunofluorescence). Macroscopic analysis showed a trend towards reduced tumor burden (accumulated diameter and tumor numbers) in mNOX-E36-treated mice.

**Conclusions:** CCL2-dependent monocyte recruitment contributes to a tumor-promoting microenvironment in chronic liver injury including inflammation, fibrosis and angiogenesis. Therefore, inhibiting inflammatory monocyte infiltration by targeting CCL2 could represent a promising concept for chemoprevention of HCC.

## **Die Rolle von CCR2+ Makrophagen für die Angiogenese und Tumervaskularisation in fibrotisch veränderten Lebern**

**Hintergrund und Ziele:** Hepatozelluläre Karzinome (HCC) entstehen typischerweise in durch chronische Inflammation geschädigten Lebern. In der Pathogenese des HCC übernehmen Lebermakrophagen verschiedene Funktionen: zum einen schaffen sie eine tumorbegünstigende Mikroumgebung und unterdrücken antitumorale Immunantworten, zum anderen beeinflussen sie aktiv Mechanismen der körpereigenen Kontrolle von Tumorzellen. In unserer Studie evaluierten wir eine therapeutische Inhibition der Infiltration von Makrophagen in die entzündete Leber in einem Fibrose-assoziierten Hepatokarzinogenese-Modell.

**Methoden:** Mäuse erhielten ein kombiniertes Fibrose-Krebs-Modell, in dem mittels einer einzelnen Injektion mit Diethylnitrosamin (DEN) im Alter von 14 Tagen multiples Tumorstadium in der Leber induziert wurde. Repetitive Tetrachlorkohlenstoff-Injektionen (CCl<sub>4</sub>) über 16 Wochen etablierten chronische Entzündungsprozesse mit konsekutivem fibrotischem Umbau der Leber. Die Infiltration von Monozyten in die Leber wurde mittels subkutaner Injektion des CCL2-Aptamer-Antagonisten mNOX-E36 inhibiert. Die Tiere wurden nach 24 Wochen evaluiert.

**Ergebnisse:** Das kombinierte DEN-CCl<sub>4</sub>-Modell induzierte nach 24 Wochen multiple Tumoren in fibrotischen Lebern. Tumortragende Lebern zeigten drei verschiedene Populationen Tumor-assoziiierter Makrophagen (TAM), basierend auf der Expression von MHCII und Gr1 via FACS-Analyse. Die Inhibition des Chemokins CCL2 via mNOX-E36 reduzierte signifikant die Angiogenese, die mittels relativem hepatischen Blutvolumen in der  $\mu$ -Computertomographie gemessen wurde. Auch eine Fibrosereduktion (via Histologie und Kollagen-Immunfluoreszenz) wurde nachgewiesen. Die makroskopische Analyse der Lebern zeigte einen Trend zur reduzierten Tumormasse (akkumulierter Tumordurchmesser und Tumorzahl) in mNOX-E36-behandelten Tieren.

**Schlussfolgerung:** Die CCL2-abhängige Monozyteninfiltration fördert die Tumorbegünstigende Mikroumgebung in chronisch geschädigten Lebern, einschließlich Entzündung, Fibrose und Angiogenese. Die Inhibition der Infiltration von Monozyten durch die pharmakologische Hemmung von CCL2 kann ein vielversprechendes Konzept zur Chemoprävention des HCC darstellen.

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                             |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                                                                                          | <b>VII</b> |
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                                                                                                          | <b>X</b>   |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                                                                                                            | <b>X</b>   |
| <b>1) Einleitung .....</b>                                                                                                                  | <b>1</b>   |
| 1.1) Struktur und Aufgaben der Leber .....                                                                                                  | 2          |
| 1.2) Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese und Diagnostik des hepatozellulären Karzinoms .....                                              | 3          |
| 1.3) Rolle des Immunsystems in Tumorerkrankungen.....                                                                                       | 4          |
| 1.3.1.) Immunologische Faktoren im TME: Das Immunsystem .....                                                                               | 5          |
| 1.3.1.1) Das angeborene Immunsystem.....                                                                                                    | 5          |
| 1.3.1.1.1) Das monozytrophagische System.....                                                                                               | 5          |
| 1.3.1.1.1.1) Kupfferzellen: Residente Lebermakrophagen .....                                                                                | 6          |
| 1.3.1.1.1.2) Infiltrierende Makrophagen: Monozyten-abgeleitete Makrophagen .....                                                            | 7          |
| 1.3.1.1.2) Granulozyten .....                                                                                                               | 9          |
| 1.3.1.1.3) Natürliche Killerzellen.....                                                                                                     | 9          |
| 1.3.1.2) Das adaptive Immunsystem .....                                                                                                     | 10         |
| 1.3.1.2.1) T-Zellen .....                                                                                                                   | 10         |
| 1.3.1.2.2) B-Zellen.....                                                                                                                    | 12         |
| 1.3.1.2.3) myeloid derived suppressor cells (MDSC) .....                                                                                    | 12         |
| 1.5) Ziele der Arbeit .....                                                                                                                 | 14         |
| <b>2) Material und Methoden .....</b>                                                                                                       | <b>15</b>  |
| 2.1) Material.....                                                                                                                          | 15         |
| 2.2) Methoden .....                                                                                                                         | 20         |
| 2.2.1) Mäuse .....                                                                                                                          | 20         |
| 2.2.2) Modelle.....                                                                                                                         | 20         |
| 2.2.3) Spiegelmer zur CCL2-Inhibition.....                                                                                                  | 21         |
| 2.2.4) Probengewinnung .....                                                                                                                | 22         |
| 2.2.4.1) Blutproben .....                                                                                                                   | 22         |
| 2.2.4.2) Knochenmarksproben .....                                                                                                           | 23         |
| 2.2.4.3) Leberproben .....                                                                                                                  | 23         |
| 2.2.6) Durchflusszytometrie .....                                                                                                           | 24         |
| 2.2.6) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) mit vorgeschalteter CD11b-Aufreinigung via<br>Magnetic-assisted cell sorting (MACS) ..... | 27         |
| 2.2.7) Genexpressionsprofile der Tumor-assoziierten Makrophagen.....                                                                        | 28         |
| 2.2.8) In-vivo $\mu$ -CT-Bildgebung .....                                                                                                   | 29         |
| 2.2.9) Ex-vivo $\mu$ CT-Bildgebung .....                                                                                                    | 29         |
| 2.2.9) Histologie .....                                                                                                                     | 30         |
| 2.2.9.1) Hematoxylin- und Eosinfärbung .....                                                                                                | 30         |
| 2.2.9.2) Fluoreszenzfärbungen: Kollagen I, Kollagen IV, CD31 .....                                                                          | 30         |
| 2.2.9.3) Immunfluoreszenz: Ki67 und F4/80.....                                                                                              | 31         |

|                                                                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.) Ergebnisse .....</b>                                                                                                                                         | <b>32</b> |
| 3.1) Auswirkungen der CCL2-Inhibition auf Tumorwachstum und Fibroseentwicklung im kombinierten Fibrose-Krebs-Modell .....                                           | 33        |
| 3.2) Auswirkungen der CCL2-Inhibition auf das hepatische Blutvolumen, Gesamttumolvolumen und Nekroseareale in Tumorregionen .....                                   | 36        |
| 3.3) Effekte der CCL2-Inhibition auf die Infiltration Monozyten-abgeleiteter Makrophagen in die Leber...                                                            | 37        |
| 3.4) Genexpressionsprofile Tumor-assoziiierter Makrophagen-Subpopulationen.....                                                                                     | 41        |
| 3.5) Mittels Genexpressionsanalyse können den TAM-Subpopulationen weitere funktionelle Marker zugeordnet werden .....                                               | 44        |
| 3.6) TAM-Subpopulationen weisen unter CCL2i eine individuell unterschiedliche, reduzierte Expression proinflammatorischer Gene auf .....                            | 44        |
| 3.7) Auswirkungen der CCL2-Inhibition im Frühstadium der Tumorbildung .....                                                                                         | 47        |
| 3.6) Lymphozyten in der Leber werden nur in sehr geringem Ausmaß von der CCL2-Inhibition beeinflusst .....                                                          | 49        |
| <b>4.) Diskussion .....</b>                                                                                                                                         | <b>57</b> |
| 4.1) Proinflammatorische TAM-Populationen beeinflussen die Angiogenese in fibrotischen Lebern mit Hepatozellulärem Karzinom .....                                   | 57        |
| 4.2) Die Reduktion der TAM1-Makrophagen führt zu einer Reduktion der Angiogenese in einem Fibrose-HCC-Modell .....                                                  | 58        |
| 4.3) Im Fibrose-HCC-Modell zeigen sich nur geringe Einflüsse der CCL2-Inhibition auf die Tumorlast, trotz nachweisbarer Reduktion der Angiogenese und Fibrose ..... | 59        |
| 4.4) Die Modulation von TAM über Eingriffe im CCL2-CCR2-Signalweg stellt eine Möglichkeit dar, die bisherigen Therapieansätze bei HCC zu ergänzen .....             | 60        |
| <b>5) Schlussfolgerung .....</b>                                                                                                                                    | <b>61</b> |
| <b>6) Literaturverzeichnis .....</b>                                                                                                                                | <b>62</b> |
| <b>7.) Anhang .....</b>                                                                                                                                             | <b>71</b> |
| Auflistung der eigenen Publikationen (als Koautor) .....                                                                                                            | 72        |
| Danksagung .....                                                                                                                                                    | 73        |
| Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung .....                                                                                                                    | 74        |
| Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung .....                                                                      | 75        |
| Lebenslauf .....                                                                                                                                                    | 76        |

## Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung              | Bedeutung                                                |
|------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>μCT</b>             | micro computed tomography                                |
| <b>ADCC</b>            | antibody dependent cellular cytotoxicity                 |
| <b>Arg1</b>            | Arginase 1                                               |
| <b>BB4</b>             | blocking buffer 4                                        |
| <b>CCL</b>             | CC-chemokine ligand                                      |
| <b>CCL2i</b>           | CCL2-Inhibitor                                           |
| <b>CCl<sub>4</sub></b> | Tetrachlorkohlenstoff                                    |
| <b>CCR</b>             | C-C chemokine receptor                                   |
| <b>CD</b>              | cluster of differentiation                               |
| <b>c-MET</b>           | tyrosine-protein kinase Met                              |
| <b>CMP</b>             | common myeloid precursor                                 |
| <b>CSF</b>             | colony stimulating factor                                |
| <b>DAMP</b>            | danger associated molecular patterns                     |
| <b>DAPI</b>            | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                             |
| <b>DEN</b>             | Diethylnitrosamin                                        |
| <b>ECM</b>             | extracellular matrix                                     |
| <b>EDTA</b>            | Ethylendiamintetraacetat                                 |
| <b>FACS</b>            | fluorescence-activated cell sorting                      |
| <b>FELASA</b>          | Federation for Laboratory Animal Science<br>Associations |
| <b>FSC</b>             | forward scatter                                          |
| <b>G</b>               | Gauche                                                   |
| <b>GM-CSF</b>          | granulocyte macrophage colony-<br>stimulating factor     |
| <b>gMDSC</b>           | granulocyte like MDSC                                    |

---

|              |                                                                  |
|--------------|------------------------------------------------------------------|
| <b>GO</b>    | gene overlap                                                     |
| <b>HBSS</b>  | Hank's balanced salt solution                                    |
| <b>HBV</b>   | hepatitis B Virus                                                |
| <b>HCA</b>   | hierarchical cluster analysis                                    |
| <b>HCC</b>   | hepatocellular carcinoma                                         |
| <b>HCV</b>   | hepatitis C Virus                                                |
| <b>HSC</b>   | hepatic stellate cells                                           |
| <b>IL</b>    | Interleukin                                                      |
| <b>IMC</b>   | infiltrating monocytic cells                                     |
| <b>INF</b>   | Interferon                                                       |
| <b>iNKT</b>  | Invariante Natürliche Killerzellen                               |
| <b>iNOS</b>  | i-Stickstoffmonoxid-Synthase                                     |
| <b>KC</b>    | Kupffer cell                                                     |
| <b>LANUV</b> | Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz                |
| <b>LASER</b> | light amplification by stimulated emission of radiation          |
| <b>LPS</b>   | Lipopolysaccharid                                                |
| <b>LSEC</b>  | liver sinusoidal endothelial cells                               |
| <b>MACS</b>  | magnetic activated cell sorting                                  |
| <b>MCP-1</b> | monocyte chemotactic protein                                     |
| <b>M-CSF</b> | macrophage colony-stimulating factor                             |
| <b>MDP</b>   | macrophage/DC precursor                                          |
| <b>MDSC</b>  | myeloid derived suppressor cells                                 |
| <b>MHC</b>   | major histocompatibility complex                                 |
| <b>MMP</b>   | matrix metalloproteinase                                         |
| <b>NF-κB</b> | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |

---



---

|               |                                        |
|---------------|----------------------------------------|
| <b>NK</b>     | Natürliche Killer Zellen               |
| <b>NKT</b>    | Natürliche Killer T Zellen             |
| <b>PAMP</b>   | pathogen associated molecular patterns |
| <b>PBS</b>    | phosphate buffered saline              |
| <b>PD1</b>    | programmed cell death protein 1        |
| <b>PDGF</b>   | Platelet-Derived Growth Factor         |
| <b>PDL1</b>   | programmed cell death protein 1 ligand |
| <b>PE</b>     | Phycoerythrin                          |
| <b>PEG</b>    | Polyethylenglykol                      |
| <b>PROK2</b>  | Prokineticin 2                         |
| <b>RCCL2i</b> | Reverser CCL2-Inhibitor                |
| <b>RNS</b>    | reactive nitrogen species              |
| <b>ROS</b>    | reactive oxygen species                |
| <b>rpm</b>    | revolutions per minute                 |
| <b>SPF</b>    | specific pathogen free                 |
| <b>SSC</b>    | side scatter                           |
| <b>TAM</b>    | tumor associated macrophages           |
| <b>TCR</b>    | T cell receptor                        |
| <b>TGF</b>    | transforming growth factor             |
| <b>TLR</b>    | toll-like Receptor                     |
| <b>TME</b>    | tumor microenvironment                 |
| <b>TNF</b>    | tumor necrosis factor                  |
| <b>VEGF</b>   | vascular endothelial growth factor     |

---

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Experimenteller Aufbau des kombinierten Fibrose-HCC-Modells: .....                                                                         | 21 |
| Abbildung 2: Exemplarische Gating-Strategie. ....                                                                                                       | 26 |
| Abbildung 3: Abbildung 3: Effekte der CCL2-Inhibition auf den Progress von HCC. ....                                                                    | 35 |
| Abbildung 4: CCL2-Inhibition während des Fortschreitens der Tumorerkrankung führt zu einer reduzierten hepatischen Gefäßneubildung in vivo. ....        | 37 |
| Abbildung 5: Analyse der Subpopulationen hepatischer Makrophagen.....                                                                                   | 40 |
| Abbildung 6: Analyse der Subpopulationen hepatischer TAM-Populationen anhand spezifischer Oberflächenmarker und Serumanalysen .....                     | 43 |
| Abbildung 7: Analyse der Subpopulationen hepatischer Tumor-assoziiierter Makrophagen mittels Cell Sorting und mRNA-Profiling .....                      | 46 |
| Abbildung 8: Makroskopische sowie durchflusszytometrische Analyse von 14 Wochen alten Tieren nach DEN-/CCl <sub>4</sub> -/CCL2i-/RCCL2i-Behandlung..... | 49 |
| Abbildung 9: Geringe Einflussnahme der CCL2-Inhibition auf die Lymphozyten in der Leber .....                                                           | 51 |
| Abbildung 10: Darstellung der Serum-MCP1-Spiegel.....                                                                                                   | 52 |
| Abbildung 11: Einflüsse der CCL2i auf Leukozyten im Blut.....                                                                                           | 54 |
| Abbildung 12: Einflüsse der CCL2i auf Leukozyten im Knochenmark.. ....                                                                                  | 56 |

## Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Auflistung der Verbrauchsmaterialien .....                                                                                              | 15 |
| Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien.....                                                                                             | 16 |
| Tabelle 3: Auflistung der technischen Ausstattung .....                                                                                            | 17 |
| Tabelle 4: Auflistung der FACS-Antikörper.....                                                                                                     | 17 |
| Tabelle 5: Auflistung der Immunfluoreszenz-Antikörper .....                                                                                        | 18 |
| Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Software .....                                                                                               | 18 |
| Tabelle 7: Übersicht über die Gating-Strategie zur Unterteilung von in unserer Studie untersuchten Immunzellen anhand von Oberflächenmarkern ..... | 25 |
| Tabelle 8: Zuordnungen spezifischer Expressionsprofile zu Zellpopulationen .....                                                                   | 42 |

## 1) Einleitung

Die Inzidenz von Leberkrebs ist zeigt seit etlichen Jahren eine deutlich steigende Tendenz. Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist weltweit die fünfthäufigste maligne Krebserkrankung und stellt die zweithäufigste Todesursache in Zusammenhang mit malignen Tumorerkrankungen dar (Llovet et al. 2016). Mutationen in der DNA eines speziellen Zelltyps führen zu einer Induktion von Onkogenen oder dem Verlust der Aktivität eines Tumorsuppressorgens. Hierbei unterscheidet man aktivierende Mutationen, die in der Regel die Proliferation fördern, und inaktivierende Mutationen, die wiederum die Unterdrückung der Apoptose und somit das Überleben der Tumorzelle begünstigen. Aufgrund des Auftretens maligner Prozesse in verschiedenen Formen und Organsystemen gibt es häufig gemeinsame Faktoren, die die Bildung eines Tumors in Form einer Zellentartung begünstigen. Die chronische Entzündung eines Organs ist ein solcher Faktor. Zusammenhänge zwischen chronischer Entzündung und der Entstehung maligner Tumoren wurden schon in verschiedenen Organen nachgewiesen, zum Beispiel in der Prostata, der Harnblase, dem Darm oder der Leber (Newell et al. 2008).

Die Leber ist nicht nur ein zentrales Stoffwechselorgan im menschlichen Körper, sondern übernimmt auch eine entscheidende immunologische Rolle bei der Regulation einer Immunantwort gegen Pathogene, die ihr über das Pfortadersystem aus dem Darm zugeführt werden (Zimmermann et al. 2012). Entzündliche Prozesse, die über ein komplexes Ineinandergreifen zellulärer und biochemischer Mechanismen gesteuert werden und von Zelluntergang über die vermehrte Produktion von Bindegewebe bis hin zur Neubildung von Gefäßen reichen, sind bei der akuten Leberschädigung für Regenerationsprozesse bedeutsam. Im Falle einer chronischen Leberschädigung, deren Ursachen infektiöser, chemischer oder auch metabolischer Natur sein können, zeigt sich jedoch eine Dysregulation dieser Mechanismen. Diese kann zunächst zur Organfibrose, deren Maximalform die Leberzirrhose ist, führen. Die Leberzirrhose und die damit verbundenen entzündlichen Prozesse stellen einen deutlichen Risikofaktor für die Bildung eines Hepatozellulären Karzinoms dar (Capece et al. 2013). Im Folgenden möchte ich näher auf den derzeitigen Wissensstand in Bezug auf HCC sowie die Rollen des Immunsystems im Tumor und in der Leber eingehen.

### 1.1) Struktur und Aufgaben der Leber

Das größte parenchymatöse Organ des Körpers ist die Leber. Sie steht im Zentrum des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels (Antoniou & Ulmeanu 2016), produziert wichtige Proteine, wie zum Beispiel Albumin, Lipoproteine oder die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X, metabolisiert Nahrungsbestandteile, Stoffwechselprodukte, Medikamente und Toxine (Corless & Middleton 1983) und ist in der Lage, diese über die Produktion von Gallenflüssigkeit auszuschcheiden. Darüber hinaus spielt sie eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort auf Pathogene.

Die humane Leber wiegt in der Regel 2-3 % des Körpergewichts. Im Durchschnitt sind das 1500 bis 2000 g. Bei Mäusen beträgt das Gewicht in etwa 1 bis 2 g und stellt damit etwa 3 bis 4 % des Körpergewichts. Anatomisch setzt sie sich aus dem rechten und dem linken Leberlappen (*Lobus dexter*, *Lobus sinister*), dem *Lobus caudatus* und dem *Lobus quadratus* zusammen (Bismuth 1982). In Abhängigkeit der Gefäßversorgung erfolgt eine detailliertere Einteilung in 8 Segmente, von denen die Segmente I bis IV auf der linken, die Segmente V bis VIII auf der rechten Seite liegen. Segment I ist gleichbedeutend mit dem *Lobus caudatus*, Segment IVa und IVb mit dem *Lobus quadratus* (Sänger et al. 2015).

Aufgrund ihrer einzigartigen Blutversorgung ist die Leber prinzipiell in der Lage, mit allen nahrungs- und umweltassoziierten Pathogenen, die enteral aufgenommen werden, in Kontakt zu kommen (Gao et al. 2008). Wie andere Organe wird auch die Leber über das arterielle System, im speziellen über die Leberarterien (*Aa. hepaticae*) mit Sauerstoff versorgt. Das Pfortadersystem stellt dagegen die zweite Form der hepatischen Blutversorgung dar. Nährstoffreiches Blut gelangt aus dem Darm über die Pfortader (*V. portae*) zur Leber. Das Pfortaderblut enthält auch Bestandteile mikrobieller Organismen. Diese Bestandteile können von Bakterien stammen, die den Darm als Symbionten bewohnen, oder aber von Darm-assoziierten Krankheitserregern (Zimmermann et al. 2012). Der Leberarterienstamm (*A. hepatica propria*) und die Pfortader treten an der Leberpforte in die Leber ein, der Gallengang verlässt hier das Organ. Die kleinsten Verzweigungen des leberarteriellen und Pfortadersystems münden in die Lebersinusoide. Die Lebersinusoide sind mit einem speziellen fenestrierten Endothel ausgekleidet (liver sinusoidal endothelial cells, LSEC), das durchgängig für lösliche Plasmabestandteile ist. Nach Durchtritt durch die Wand der Sinusoide gelangen

diese Bestandteile in den sogenannten Disse-Raum, der zwischen LSEC und Hepatozyten liegt. Der Disse-Raum besteht aus loser Extrazellulärmatrix und beinhaltet die hepatischen Sternzellen (HSC). Hinter dem Disse-Raum liegen die Hepatozyten, die das Leberparenchym bilden. Phagozytische Immunzellen, wie Makrophagen, Kupffer-Zellen (KC) und Dendritischen Zellen (DC) können bei Leberschädigung oder Kontakt mit Pathogenen Zytokine ausschütten oder zur Antigen-Präsentation mit Lymphozyten, die die Sinusoide patrouillieren in Kontakt treten (Racanelli & Rehmann 2006).

Das Blut aus der Leber wird von den Lebervenen drainiert und über die V. cava inferior dem großen Körperkreislauf zugeführt. Gallenflüssigkeit läuft über die Gallengänge ab. Die Gallengänge liegen parallel zu den Verzweigungen des Pfortadersystems und des arteriellen Systems und münden schließlich im Darm.

## **1.2) Epidemiologie, Ätiologie, Pathogenese und Diagnostik des hepatozellulären Karzinoms**

Primäre maligne Lebertumoren stellen weltweit die fünfhäufigste Krebsentität dar und sind die zweithäufigste Ursache krebsassoziierter Todesfälle (El-Serag & Rudolph 2007; Llovet et al. 2016). 85-90 % der primären Lebermalignome sind HCC. In den meisten Fällen entstehen sie auf dem Boden einer Leberzirrhose oder einer chronischen Leberentzündung, deren Ursachen je nach Region unterschiedlich häufig sind. In den Entwicklungsländern spielen hohe Durchseuchungsraten mit dem Hepatitis B (HBV) oder dem Hepatitis C (HCV) Virus eine wichtige Rolle als Auslöser von HCC, doch auch in Europa ist die Inzidenz des HCC steigend. Neben oben genannten viralen Erkrankungen ist dies auf toxische Ursachen, wie übermäßigen und chronischen Alkoholkonsum, oder auf Stoffwechselerkrankungen, wie das vermehrte Auftreten des metabolischen Syndroms, in dessen Rahmen es zur nicht-alkoholischen Leberverfettung kommen kann, zurückzuführen (Schütte et al. 2009). Die Prognose dieser malignen Erkrankung ist schlecht. Therapeutisch stehen im Falle einer möglichen kurativen Zielsetzung chirurgische Verfahren, wie die Leberteilresektion bei den seltenen HCC ohne (oder mit kompensierter) Zirrhose, oder, im Falle einer bestehenden Zirrhose, die Lebertransplantation im Vordergrund. In der Palliativtherapie des HCC steht der Multikinase-Inhibitor Sorafenib, der das Überleben um wenige Monate verlängert (Iavarone et al. 2011), sowie eine Reihe weiterer chemotherapeutischer Optionen zu Verfügung (siehe: EASL HCC CPG 2018).

Unterstützt werden diese Verfahren von einer Reihe radiologisch-interventioneller Ansätze, die sowohl unter kurativer als auch unter palliativer Zielsetzung Verwendung finden (Schütte et al. 2014). Aufgrund der limitierten therapeutischen Maßnahmen rücken prophylaktische Maßnahmen in den Vordergrund. Patienten mit bestehender Leberzirrhose wird empfohlen, in sechsmonatigen Abständen an Früherkennungsuntersuchungen teilzunehmen. Hier steht die Musterung der Leber mittels transabdominellem Ultraschall im Vordergrund (Schütte et al. 2014). In Endemiegebieten der Hepatitis B stellt die Impfung eine wichtige primärprophylaktische Maßnahme dar (Kane 2003).

### **1.3) Rolle des Immunsystems in Tumorerkrankungen**

Chronisch entzündetes Gewebe begünstigt die Entstehung von vielen Tumorarten (Mantovani et al. 2017). Das Auftreten eines Hepatozellulären Karzinoms ohne vorbestehende Leberschädigung kommt nur äußerst selten vor. Diese Feststellungen sind eng mit dem Begriff der Tumormikroumgebung, Englisch „*tumor microenvironment*“ (TME), verbunden. Das TME bezeichnet ein Milieu, welches das Tumorwachstum, Angio- und Vaskulogenese, die Metastasierung und die Immunantwort entscheidend beeinflusst. Es besteht aus Tumorzellen, extrazellulärer Matrix (ECM), Stromazellen, die sich funktionell in angiogenetische und fibroblastische Zellen sowie Immunzellen unterteilen lassen, und den Proteinen, die von den beteiligten Zellen produziert werden (Hernandez-Gea et al. 2013). Entzündung, Tumor und das TME beeinflussen sich wechselseitig. Zum einen fördert das TME die Entstehung eines Tumors, zum anderen können es Tumorzellen zu ihren Gunsten beeinflussen und über verschiedene direkte und indirekte Mechanismen eine gegen Tumorzellen gerichtete Immunantwort unterdrücken (Talmadge & Gabrilovich 2013). Der Zustand der Leberzirrhose mit persistierender Entzündung, einer Dauerschädigung von Hepatozyten und kompensatorischen Regenerationsprozessen bildet ein solches TME und fördert somit die HCC-Entstehung. Im Folgenden möchte ich die Bestandteile des TME näher erläutern und anschließend detaillierter auf einzelne Mechanismen und Funktionen eingehen.

### 1.3.1.) Immunologische Faktoren im TME: Das Immunsystem

Das Immunsystem verteidigt den Wirt gegen schädigende Faktoren wie Mikroorganismen, Viren oder chemische Stoffe, die über die Umwelt in den Körper gelangen. Um Schädigungen des Körpers durch die Immunreaktion gering zu halten, ist die immunologische Unterscheidung zwischen körpereigenen Strukturen und Pathogenen essenziell (Schultz & Grieder 1987). Gerade bei Tumorzellen ist diese Unterscheidung schwierig, da sie körpereigenen Zellen entstammen. Das Immunsystem kann man in zwei strukturelle Bereiche unterteilen: zellulär, bestehend aus allen Typen von Abwehrzellen, und humoral, womit Antikörper, das Komplementsystem sowie weitere Plasmaproteine bezeichnet werden. Funktionell unterscheidet man hingegen das angeborene und das adaptive Immunsystem. Durch Leberschädigung gehen Hepatozyten zugrunde. Dadurch werden sogenannte *Danger-associated molecular patterns* (DAMP) freigesetzt. Diese können Kupfferzellen aktivieren. Aktivierte Kupfferzellen produzieren eine Reihe Chemokine, die wiederum zur Infiltration weiterer Immunzellen und somit zur Einleitung einer Immunantwort führen (Dahlin et al. 1984).

#### 1.3.1.1) Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem sorgt für die Erstantwort gegen eindringende Pathogene. Humorale Komponenten sind antimikrobielle Peptide, Interferone, Akute-Phase-Proteine und das Komplementsystem. Zellulär sind in diesem Zusammenhang die Granulozyten, Monozyten und ihre Abkömmlinge und natürliche Killerzellen zu nennen.

##### 1.3.1.1.1) Das monozytrophagische System

Monozyten stammen von CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen ab, die kontinuierlich Progenitorzellen produzieren. Schon in der Embryonalzeit können diese in den Organen spezialisierte Populationen residenter Makrophagen bilden. Zudem sind sie Vorläufer eines Teils der dendritischen Zellen, deren Hauptaufgabe die Antigenpräsentation ist (Waisman et al. 2017). Grundlegende Aufgaben sind der Schutz vor Infektionen, die Regulation des Zellumsatzes und die Wundheilung (Gewebe-Remodeling).

#### 1.3.1.1.1) Kupfferzellen: Residente Lebermakrophagen

Viele Organe haben spezialisierte residente Makrophagen. Im Falle der Leber sind dies die Kupfferzellen (KC). Makrophagen der Leber und anderer Organe können ebenfalls aus Organ-internen Stammzellen hervorgehen, im Fall der Kupfferzellen sind dies Dottersack-Makrophagen (Epelman et al. 2014). Die KC erneuern sich ständig unter Einfluss von GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) und M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) (Yona et al. 2013). KC finden sich überwiegend in den Lebersinusoiden, von wo aus sie Zugriff auf pathogene Faktoren haben, die über das portalvenöse Blut angeschwemmt werden. Antigene und Bakterien können so eliminiert werden (Zimmermann et al. 2012). Mit der Ausprägung von MHCI und MHCII können sie eine antigenspezifische Immunantwort vermitteln (Thomson & Knolle 2010). Dies spielt insbesondere in der Homöostase eine Rolle, da hier entschieden wird, ob für das jeweilige Antigen eine Immunreaktion oder eine Immuntoleranz initiiert werden soll. Durch die Erkennung von DAMP, die bei akuter Leberschädigung freigesetzt werden, oder *pathogen associated molecular patterns* (PAMP) über den *toll-like receptor 4* (TLR4) und anschließender Signaltransduktion über den *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) beginnen die KC mit der Produktion diverser Zytokine, darunter der *Tumornekrosefaktor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ), *Interferon  $\beta$ 1* (IFN $\beta$ 1), *reactive oxygen species* (ROS), *reactive nitrogen species* (RNS) und Chemokine wie CCL2, CXCL1, CXCL2 und CXCL8 (Marra & Tacke 2014). Die reaktiven Spezies können Hepatozyten direkt schädigen, Chemokine führen zur Infiltration weiterer Immunzellen, vor allem von Neutrophilen Granulozyten über CXCL2 und CXCL8. Darüber hinaus wird durch CCL2 der Einstrom von Monozyten aus dem Knochenmark gefördert. Über die Fähigkeit, Hepatische Sternzellen (HSC) zu aktivieren, besitzen sie zudem fibrosefördernde Eigenschaften, was vor allem bei chronischer Schädigung zum Tragen kommt (Tacke & Zimmermann 2014). Die Rolle von KC im HCC ist nicht vollständig verstanden (Lacotte et al. 2016). Es wurde beschrieben, dass durch Lipopolysaccharide (LPS) aktivierte KC das Wachstum von Tumoren reduzieren können (Chen, Lau et al. 2002). Auf der anderen Seite zeigte sich in humanen HCC, dass KC über B7H1-PD1 (*programmed cell death protein 1*)-Interaktionen die Proliferation und Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen mindern können, was sich begünstigend für den Tumor auswirkt (Wu et al. 2009).



#### *1.3.1.1.2) Infiltrierende Makrophagen: Monozyten-abgeleitete Makrophagen*

Die Entwicklung von Monozyten geht von einer pluripotenten Stammzelle im Knochenmark aus. In der Reihe ihrer Vorläuferzellen stehen auch die gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen (CMP) und die Makrophagen-/DC-Vorläuferzellen (MDP) (Zimmermann et al. 2012). Der letzte Teil der Monozyten-Differenzierung ist der Schritt von den MDP zu Monozyten. Der Übertritt in den Blutkreislauf wird überwiegend durch CCL2-CCR2-Interaktion gesteuert (Serbina & Pamer 2006). Dennoch gibt es auch andere Mechanismen und Quellen der Rekrutierung von Monozyten (Rote Pulpa der Milz, CXCR4-CXCL12-Interaktion, oder eine Einwanderung peritonealer Makrophagen). Bei akuter und chronischer Leberschädigung kommt es zu einer massiven Rekrutierung inflammatorischer CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Monozyten aus dem Blut in die Leber (Karlmark et al. 2009). CCL2, ausgeschüttet von hepatischen Sternzellen (HSC), Hepatozyten, Endothelzellen und KC spielt dabei eine entscheidende Rolle (Tacke 2012). Diese Monozyten zeigen in der Maus noch eine hohe Ly6C-Expression und wirken proinflammatorisch, was sich durch die Produktion von Zytokinen wie IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  zeigt (Tacke 2012). Unter Herabregulierung der Ly6C-Ausprägung und dem Einfluss von CX3CL1 erfolgt ein Reifungsprozess. Ly6C-low Monozyten können eine regenerierende Rolle einnehmen, was sich zum Beispiel in der Regenerationsphase nach akuter Leberschädigung äußert. Monozyten sind die Vorläufer von Makrophagen. Diese zeigen ein breites und heterogenes Spektrum unterschiedlicher Phänotypen und Funktionen. Auf der einen Seite dieses Spektrums stehen die sogenannten M1-Makrophagen, die „klassisch“ aktiviert werden (über LPS und IFN $\gamma$ ) und mit proinflammatorischen Aufgaben assoziiert sind. So sind sie in der Lage, zytotoxisch auf phagozytierte Zellen zu wirken, zeichnen sich durch die Produktion von IL12 und anderen Zytokinen aus, können über eine erhöhte MHCII Ausprägung besser Antigene präsentieren und stellen wichtige Triggerfaktoren für die T-Helferzell-gesteuerte Immunantwort (Th1) dar (Capece et al. 2013). Auf der anderen Seite stehen die „alternativ“ aktivierten M2-Makrophagen. Ihre Aktivierung funktioniert über IL4, IL13, IL10 oder Glukokortikoide. Als direkte Vorläuferzellen können hier die oben beschriebenen regenerativen Monozyten gesehen werden (Tacke & Zimmermann 2014). Die M2-Makrophagen können nur bedingt Antigene präsentieren, produzieren IL10, TGF $\beta$ , CCL17, CCL22 und exprimieren Arg1, Mannose- und Scavenger-Rezeptoren. Sie gelten eher als Initiatoren einer Th2-Immunantwort und stehen in

Zusammenhang mit der Förderung der Gefäßneubildung und Gewebereparaturmechanismen.

In Lebertumoren spielen Makrophagen eine wichtige Rolle im TME (Mantovani et al. 2011; Lewis & Pollard 2006). Hier werden sie als Tumor-assoziierte Makrophagen, kurz TAM, bezeichnet. Generell wird den TAM eine wichtige Rolle in den zentralen Schritten der Pathogenese von Tumorerkrankungen zugesprochen, die sowohl pro- als auch antitumoral ausfallen kann (Krenkel & Tacke 2017). MoMF können in der Frühphase der Tumorentstehung seneszente Zellen beseitigen und so eine tumorsupprimierende Funktion einnehmen, während sie in einmal etablierten Tumoren die Hepatokarzinogenese fördern (Eggert et al. 2016). Als wichtiger Bestandteil des TME fördern sie das Tumorwachstum (Chang et al. 2001), begünstigen die Angiogenese und das Gewebe-Remodeling, schaffen Voraussetzungen für die Metastasierung und sind mit der Suppression einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort assoziiert (Lewis & Pollard 2006). Die Zahl der TAM im Tumor ist ein Marker für eine schlechtere Prognose bei Patienten mit Tumorerkrankungen (Leonardi et al. 2012; Budhu, Forgues et al. 2006). Eine CCL2-Inhibition mittels eines neutralisierenden Antikörpers konnte die Entstehung von Lebertumoren in miR122-defizienten Mäusen reduzieren (Teng, Han et al. 2017). Die TAM galten lange als Makrophagen vom M2-Typ. Movahedi et al. unterscheiden in tierexperimentellen Tumormodellen anhand eines Gatings von Ly6C gegen MHCII zwischen unterschiedlichen TAM Populationen, die direkt von in die Leber infiltrierenden Ly6C<sup>high</sup> Monozyten abstammen (Movahedi et al. 2010) und differenzierten diese weiter anhand der Analyse der Chemokinexpressionsprofile. MHCII<sup>high</sup> TAM zeigten in dieser Studie ein Chemokinexpressionsprofil, das typisch für die Rekrutierung von Th1-, Th2- oder NK-Zellen ist. MHCII<sup>low</sup> TAM zeigten dagegen eine höhere Fähigkeit, Makrophagen anzuziehen. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass auch TAM pro- und antiinflammatorisch ausgeprägt sein können. Wie genau die Regulation der TAM in die eine oder andere Richtung abläuft, ist noch unklar. Eine Hypothese stellt die Tumor bedingte Hypoxie in den Vordergrund (Lewis & Murdoch 2005), aber es werden auch direkte Einflüsse der Tumorzellen oder anderer Zellen des Immunsystems beschrieben (Condeelis & Pollard 2006).

#### 1.3.1.1.2) Granulozyten

Es gibt drei Arten von Granulozyten. Basophile und Eosinophile bilden nur einen kleinen Teil der Granulozyten, sind bisher wenig erforscht und spielen vor allem in der Abwehr von Parasiten eine Rolle. Die größte Gruppe bilden die Neutrophilen. Sie entstammen dem Knochenmark. Ihre Aufgabe ist die frühzeitige Phagozytose von Bakterien oder Pilzen sowie von Fragmenten apoptotischer Zellen. In der akuten Leberschädigung werden Neutrophile in hohem Maße in die Leber rekrutiert (Saijou et al. 2018). Hier agieren sie proinflammatorisch und führen über die Produktion von ROS und Proteasen zu einer weiteren Schädigung von Hepatozyten (Zimmermann et al. 2012). Die Rolle von Neutrophilen ist bisher noch nicht im Detail verstanden und abhängig von vielen Faktoren (Ocana et al. 2017). Eine erhöhte Anzahl von Neutrophilen steht mit einer schlechteren Prognose in Tumorerkrankungen in Zusammenhang. Die Freisetzung von ROS und RNS kann das Tumorstadium fördern, zudem kann sie über die Sekretion von *vascular endothelial growth factor A* (VEGFA), Matrixmetalloprotease 9 (MMP9) oder Prokineticin 2 (PROK2) die Induktion der Angiogenese positiv beeinflussen. Die zu den MDSC gehörenden Neutrophilen können die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen oder NK-Zellen unterdrücken und somit eine gegen Tumorzellen gerichtete Immunantwort abschwächen (1). Glodde et al. zeigten kürzlich, dass cMET<sup>+</sup> Neutrophile T-Zell suppressorische Eigenschaften haben (Glodde et al. 2017). Unter c-MET-Inhibition verbesserte sich dagegen die Effizienz von Tumorthérapien (Zhang et al. 2018).

#### 1.3.1.1.3) Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen sind lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems. Über aktivierende (z.B. NKp46) oder inhibitorische (z.B. NKG2A) Rezeptoren binden sie an Zielzellen. Erkennen sie fehlende oder fehlerhafte MHCII-Moleküle oder spezielle Liganden auf gestressten, infizierten oder mutierten Hepatozyten, LSEC, HSC oder KC, eliminieren sie die Zielzelle über Granzyme und Perforine (Sun et al. 2015). Bei Patienten mit HCC steht die Zahl der im Blut gemessenen NK-Zellen in Zusammenhang mit einer besseren Prognose (Hoechst et al. 2009). Auf der anderen Seite zeigten Studien, dass Tumoren die NK-Zell-Rekrutierung und Aktivität reduzieren können (Cai

et al. 2008). Dieser Vorgang ist unter anderem mit regulatorischen T-Zellen und MDSC assoziiert. Eine Inhibition der NK-Zell-Aktivität begünstigt die Progression und Invasion von Tumoren.

### *1.3.1.2) Das adaptive Immunsystem*

#### *1.3.1.2.1) T-Zellen*

Die T-Zellen stellen einen wichtigen Teil des adaptiven Immunsystems dar, die vielfältige Ausprägungen mit unterschiedlichen Aufgaben übernehmen.  $CD4^+$  T-Helferzellen sind Immunregulatoren. Auch diese lassen sich wieder in verschiedene Subgruppen gliedern. Unter dem Einfluss von Interleukin 12 (IL12) differenzieren sie in sogenannte T-Helferzellen des Typ 1 (Th1-Zellen) und koordinieren über Zytokine wie IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  die Immunreaktion gegen intrazelluläre Erreger (Hammerich et al. 2011), wie z.B. Viren und die Stimulation von B-Zellen zur Produktion von Immunglobulin G (IgG). Generell werden sie mit einer proinflammatorischen Reaktion in Verbindung gebracht, die zum Teil tumorbegünstigend sein kann. Im Tumor können sie andererseits die Zerstörung maligner oder prämaligener Zellen vermitteln und so die Tumorentstehung verhindern (Mossanen & Tacke 2013). Unter dem Einfluss von IL4 nehmen naive T-Zellen den Th2-Phänotyp an. Th2-Zellen produzieren IL4, IL5, IL13 (Hammerich et al. 2011), und IL10. Sie aktivieren naive B Zellen und spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie allergischer Erkrankungen (Hammerich et al. 2011). In HCC ist eine im Vergleich zu Th1-Zellen erhöhte Th2-Population mit aggressiveren Tumoren verbunden (Budhu & Wang 2006). Durch CCL2 in den Tumor infiltrierende Makrophagen können via CCL2-Produktion das Th1-Th2-Gleichgewicht in Richtung Th2 verlagern (Mandal et al. 2018). Th17-Zellen sind eine dritte Gruppe der T-Helfer-Zellen und durch ihre Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL17 charakterisiert. Ihre Differenzierung wird von TGF $\beta$ , IL6 und IL21 gesteuert. Im peripheren Blut von Patienten mit HCC ist ihre Zahl erhöht, vor allem bei Patienten mit HBV-assoziiertem HCC. Die Dichte IL17-produzierender Zellen korreliert mit einem günstigeren Krankheitsverlauf (Yan et al. 2014). Eine weitere  $CD4^+$  Subgruppe sind die regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ). Sie regulieren die Aktivität der T-Helferzellen über antiinflammatorische Zytokine wie TGF $\beta$  und IL10. Die Entwicklung von  $T_{reg}$  wird in Anwesenheit von TGF $\beta$  begünstigt, proinflammatorische Zytokine hemmen sie.

Tumoren können ihren T<sub>reg</sub> Pool über die Produktion von CCL20, das an CCR6 bindet, erweitern (Mossanen & Tacke 2013). Ihre immunsuppressive Funktion hemmt die Aktivität von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen, was wiederum das Tumorwachstum begünstigt. Patienten, bei denen eine hohe T<sub>reg</sub> Zahl im Tumor gemessen wurde, hatten eine schlechtere Prognose (Chen et al. 2011).

Eine weniger ausgeprägte immunregulatorische Funktion haben CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen. Mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) kontrollieren sie die MHC-I-Ausprägung ihrer Zielzellen. Erkennen sie fehlerhafte Peptide oder virale Antigene, auf die sie zuvor geprimed wurden, wird die Zielzelle ähnlich wie durch die NK-Zellen (s.o.) zerstört (Chang et al. 2017). Zytotoxische T-Zellen sind somit in der Lage, Tumorzellen direkt zu bekämpfen. Aufgrund des hohen zytotoxischen Potentials unterliegen zytotoxische T-Zellen einer ausgeprägten Regulation. Im HCC kann die Aktivität zytotoxischer T-Zellen von MDSC herabreguliert werden. Auch eine verminderte DC- oder T-Helfer-Zell-Zahl kann die CD8<sup>+</sup> Zellfunktion beeinflussen (Mossanen & Tacke 2013, Behboudi et al. 2010).

Natürliche-Killer-T-Zellen (NKT) bilden eine weitere Untergruppe der T-Lymphozyten. Ihre häufigsten Vertreter sind die invarianten NKT-Zellen (iNKT). Mit ähnlichen Oberflächenmarkern wie NK-Zellen ausgestattet, eliminieren sie Zellen mit fehlerhaften MHC-II-Molekülen oder auffälliger Antigenpräsentation. Des Weiteren können sie mit ihrem speziellen TCR V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 an CD1d andocken und auffällige Glycolipide erkennen (Das et al. 2010). Die Einleitung des Untergangs der Zielzelle erfolgt ebenfalls über Granzyme und Perforin (Matsuda, Zhang et al. 2006; Kawano, Cui et al. 1998). Zudem können sie große Mengen an Zytokinen wie IFN $\gamma$ , IL2, TGF $\beta$ , IL4 und IL13 freisetzen. Diese Aspekte implizieren eine wichtige Rolle für iNKT-Zellen im Tumorgeschehen. Tatsächlich zeigten sie das Potenzial, die Tumorprogression zu verringern und andere Zellen, denen Antitumoreffekte zugeschrieben werden, zu aktivieren.  *$\alpha$ -galactosylceramide* ( $\alpha$ -GalCer) aktivierte V $\alpha$ 14-NKT-Zellen zeigten Eigenschaften zur Prävention von Metastasen (Kawano et al. 1998). Genau wie NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen kann auch ihre Effektivität durch den Tumor herabreguliert werden (Tahir et al. 2001; Kawano et al. 1999).

#### 1.3.1.2.2) B-Zellen

B-Zellen (abgeleitet von *Bursa fabricii*, der Vögel) stellen neben den T-Zellen die zweite große Sparte des adaptiven Immunsystems. Ihre Aufgabe ist die Bildung Antigen-spezifischer Antikörper, die Antigene durch nicht kovalente Bindung neutralisieren, opsonisieren (erhöhte Phagozytose), NK-Zellen (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) oder das Komplementsystem aktivieren und somit eine antigenspezifische Immunantwort einleiten können (LeBien & Tedder 2008; Yuen et al. 2016). Die B-Zell-Aktivierung erfordert zum einen die Bindung des Antigens an den B-Zell-Rezeptor. Gebundene Antigene können zunächst ins Zellinnere aufgenommen und anschließend auf dem MHCII präsentiert werden. Dies ist wichtig für den zweiten Schritt der Aktivierung, der T-Zell-Hilfe. Über CD40L-CD40-Bindung, die Bindung des TCR an MHC und CD4 kommt es zur Kommunikation zwischen B- und Th- Zellen (Laman et al. 2017). Die Th-Zelle aktiviert nun die B-Zelle über die Ausschüttung von Zytokinen wie IL2, IL4 und IL5. Auch die Ausbildung von Memory B-Zellen erfolgt T-Zell-abhängig (Seifert & Küppers 2016). Die Rolle von B-Zellen im HCC ist noch nicht gut verstanden. Zum einen gibt es Anhaltspunkte dafür, dass B-Zellen die Tumورprogression fördern (Brunner et al. 2017). CXCR3<sup>+</sup> B-Zellen infiltrieren in HCC und können dort Makrophagen dahingehend beeinflussen, eine pro-tumorgene Rolle einzunehmen. Hier stehen sie auch in Zusammenhang mit einem erhöhten Wiederauftreten von HCC (Liu et al. 2015). Auf der anderen Seite zeigten Brunner et al. erst kürzlich, dass die Infiltration von B-Zellen mit einem verlängerten Überleben korrelieren kann. Zudem wurde hier auch festgestellt, dass ein den B-Zellen zugeordnetes Immunglobulinprofil lokal gegen den Tumor wirkt (Brunner et al. 2017).

#### 1.3.1.2.3) myeloid derived suppressor cells (MDSC)

Eine wichtige Rolle in der T-Zell-Suppression und damit in der Begünstigung der Tumorentwicklung spielen die sogenannten MDSC, eine Gruppe myeloider Zellen, deren Zahl mit einer schlechteren Prognose bei Tumorerkrankungen korreliert. Nach Tumoresektionen fällt auch die Zahl der MDSC im peripheren Blut, sodass von einer direkten Verbindung zwischen einem Tumor und der MDSC-Entstehung auszugehen ist (Salvadori et al. 2000).

Generell unterscheidet man zwischen 2 größeren MDSC-Gruppen, den monozytischen MDSC (Mo-MDSC) (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> Ly6C<sup>high</sup>), die v. a. mit der iNOS-Produktion in Verbindung stehen und den granulozyten-ähnlichen MDSC (gMDSC) (CD11b<sup>+</sup> Ly6G<sup>high</sup> Ly6C<sup>low</sup>), die mit Arg1 verknüpft sind (Talmadge & Gabrilovich 2013).

Neben den immunologisch-suppressiven Eigenschaften bestehen bei MDSC weitere tumorbegünstigende Mechanismen, wie z. B, die Schädigung der Basalmembran durch MMP, was die Entstehung von Metastasen erleichtert. Zudem können sie über VEGF die Angiogenese im TME begünstigen (Talmadge & Gabrilovich 2013).

## 1.5) Ziele der Arbeit

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sollen die Rolle von TAM-Subgruppen in HCC näher beleuchten. Generell werden Makrophagen in proinflammatorische M1- und antiinflammatorische M2-Makrophagen unterteilt, die jedoch lediglich Pole eines breiten Spektrums unterschiedlicher Makrophagenprogramme darstellen. Ein spezieller Fokus meines Projekts liegt auf den CCR2<sup>+</sup> TAM im Tumor begünstigenden Microenvironment einer fibrotischen Leber. In Versuchen zur Rolle von CCR2<sup>+</sup> Makrophagen bei der Gefäßneubildung in fibrotischen Lebern konnte der CCL2-Inhibition eine hohe antiangiogenetische Wirkung nachgewiesen werden. Im Folgenden stelle ich 3 Fragen vor, zu deren Beantwortung diese Studie einen Beitrag leisten soll:

- 1.) Lässt sich eine pro-angiogene Wirkung von CCR2<sup>+</sup> Makrophagen auch im Fibrose-HCC-Modell nachweisen und stellt die CCL2 Inhibition einen antiangiogenen Ansatz im Fibrose-HCC-Modell dar?
- 2.) Inwiefern wirkt sich die CCL2-Inhibition auf die Bildung von Tumoren und die Tumorlast aus? Hängt diese Wirkung nur mit der Hemmung der Angiogenese zusammen oder gibt es zusätzliche pro-/antitumorale Effekte?
- 3.) Welche Makrophagensubpopulationen lassen sich in einem Fibrose-HCC-Modell weiter identifizieren und welche Rollen nehmen sie (mutmaßlich) ein?



## 2) Material und Methoden

### 2.1) Material

**Tabelle 1: Auflistung der Verbrauchsmaterialien**

| Verbrauchsmaterial                              | Hersteller                                       |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 6-Well-Platte                                   | Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland        |
| APC-Counting Beads                              | BD Bioscience, New Jersey, USA                   |
| Costar®Stripette, 10 ml                         | Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland        |
| Costar®Stripette, 25 ml                         | Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland        |
| Costar®Stripette, 5 ml                          | Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland        |
| Cryomold                                        | Sakura Finetek, Leiden, Niederlande              |
| Cryotube                                        | Thermo-Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland |
| Deckgläschen                                    | Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, Deutschland |
| EDTA Röhrchen                                   | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland                 |
| Falcon, 15 ml                                   | Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland        |
| Falcon® 70 µm Cellstrainer                      | Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland        |
| Feather Skalpell Nr. 11                         | Feather, Osaka, Japan                            |
| Histogrid                                       | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland                 |
| Kanüle, 27 G                                    | B. Braun, Sempach, Schweiz                       |
| MicroAmp® Fast 96-Well Reaktionsplatte (0,1 ml) | Life Technologies, Darmstadt, Deutschland        |
| MircoAmp® Optical Adhesive Film                 | Life Technologies, Darmstadt, Deutschland        |
| Petrischale (10 cm)                             | Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland        |

|                                         |                                                   |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Pipettenspitze (0,1-10 µl)              | Peqlap (VWR), Erlangen- Deutschland               |
| Pipettenspitze (100-1000 µl)            | Peqlap (VWR), Erlangen- Deutschland               |
| Pipettenspitze (10-200 µl)              | Peqlap (VWR), Erlangen- Deutschland               |
| Pipettenspitze mit Filter (0,1-10 µl)   | Starlab, Hamburg, Deutschland                     |
| Pipettenspitze mit Filter (100-1000 µl) | Starlab, Hamburg, Deutschland                     |
| Pipettenspitze mit Filter (10-200 µl)   | Starlab, Hamburg, Deutschland                     |
| Röhre, 15 ml                            | Greiner Bio-One, Frickenhausen                    |
| Röhre, 50 ml                            | Greiner Bio-One, Frickenhausen                    |
| Rundboden-Röhrchen                      | Life-Technologies (Roche), Darmstadt, Deutschland |
| Safelock-Reaktionsgefäß, 1,5 ml         | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                   |
| Spritze, 1 ml                           | B. Braun, Sempach, Schweiz                        |
| Spritze, 20 ml                          | B. Braun, Sempach, Schweiz                        |
| Spritze, 5 ml                           | B. Braun, Sempach, Schweiz                        |
| Strip-Röhrchen, 0,2 ml                  | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                   |

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Chemikalien**

| <b>Chemikalien</b>    | <b>Hersteller</b>                                      |
|-----------------------|--------------------------------------------------------|
| BSA                   | Sigma Aldrich, München, Deutschland                    |
| CCl <sub>4</sub>      | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten |
| DEN                   | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten |
| DPBS (Dulbecco's PBS) | Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland                    |
| EDTA                  | Sigma Aldrich, München, Deutschland                    |
| Formalin (4%)         | Sigma Aldrich, München, Deutschland                    |
| Glucose 5%            | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland          |
| HBSS                  | PAA Laboratories – Freiburg, Deutschland               |
| Isofluran             | AbbVie Deutschland GmbH, Wiesbaden, Deutschland        |
| Kollagenase           | Peqlap (VWR), Erlangen, Deutschland                    |
| Lyse Puffer (10x)     | eBioScience, San Diego, USA                            |

|                           |                                            |
|---------------------------|--------------------------------------------|
| Maiskeimöl                | Peter Kölln GmbH, Elmshorn,<br>Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl)     | Sigma Aldrich, München, Deutschland        |
| Tissue-Tek O.C.T Compound | Sakura Finetek, Leiden, Niederlande        |

**Tabelle 3: Auflistung der technischen Ausstattung**

| Technische Ausstattung   | Hersteller                                                                            |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| BD FACS LSR Fortessa     | BD Biosciences, San Jose, USA                                                         |
| BioPhotometer            | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                                                       |
| Fluoreszenzmikroskop     | Axio Imager M2 microscope, Carl Zeiss<br>Microimaging GmbH, Göttingen,<br>Deutschland |
| Fotograf                 | Leica Z16 APO, Leica, Wetzlar,<br>Deutschland                                         |
| HeraeusTM Megafuge 1.0 R | Thermo-Fisher Scientific, Schwerte,<br>Deutschland                                    |
| Hochauflösende Kamera    | AxioCam MRm Rev.3, Carl Zeiss<br>Microimaging GmbH, Göttingen,<br>Deutschland         |
| Kryostat                 | Kryostat CM3050S, Leica                                                               |
| Zentrifuge 5415D         | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                                                       |
| Zentrifuge 5417D         | Eppendorf, Hamburg, Deutschland                                                       |

**Tabelle 4: Auflistung der FACS-Antikörper**

| FACS-Antikörper, Klon | Hersteller                                               |
|-----------------------|----------------------------------------------------------|
| Ly6G-PE, 1A8          | Biolegend, San Diego, Kalifornien,<br>Vereinigte Staaten |
| NK1.1.-PE, PK136      | Biolegend, San Diego, Kalifornien,<br>Vereinigte Staaten |
| CD124-PE, I015F8      | Biolegend, San Diego, Kalifornien,<br>Vereinigte Staaten |
| CD11b-APC, M1/70      | BD Biosciences, San Jose, Vereinigte                     |

|                              |                                              |
|------------------------------|----------------------------------------------|
|                              | Staaten                                      |
| CD4-APC, RM4-5               | BD Biosciences, San Jose, Vereinigte Staaten |
| CD206-APC, C068C2            | Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten     |
| CD45-APCCy7, 30-F11          | BD Biosciences, San Jose, Vereinigte Staaten |
| Gr1-PerCpCy5, RB6-8C5        | BD Biosciences, San Jose, Vereinigte Staaten |
| CD19-PerCpCy5, 1D3           | BD Biosciences, San Jose, Vereinigte Staaten |
| CD8a-PECy7, 53-6.7           | BD Biosciences, San Jose, Vereinigte Staaten |
| F4/80-PECy7, BM8             | Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten     |
| CD11b-eFluor450, M1/70       | ThermoFisher, Waltham, Vereinigte Staaten    |
| MHCII-eFluor450, M5/114.15.2 | Biolegend, San Diego, Vereinigte Staaten     |

**Tabelle 5: Auflistung der Immunfluoreszenz-Antikörper**

| <b>Immunfluoreszenz-Antikörper</b> | <b>Hersteller</b>                                           |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| rabbit anti-mouse Kollagen I       | Novus Biologicals, Centennial, Colorado, Vereinigte Staaten |
| rat anti-mouse CD31                | BD Biosciences, San Jose, Vereinigte Staaten                |
| rabbit anti-mouse Kollagen IV      | Novus Biologicals, Centennial, Colorado, Vereinigte Staaten |
| Donkey anti-rat Cy3                | Dianova, Hamburg, Deutschland                               |
| Donkey anti-rabbit Cy3             | Dianova, Hamburg, Deutschland                               |

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Software**

| <b>Software</b>    | <b>Hersteller</b>                        |
|--------------------|------------------------------------------|
| FACSDiva           | BD Biosciences, San Jose, USA            |
| FlowJo, v. 7.6?    | FlowJo, LLC, Ashland, Oregon             |
| GraphPad Prism v.5 | GraphPad Software, La Jolla, USA         |
| MS Office 365      | Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland |
| ImageJ             | National Institutes of Health            |

---

|                                  |                                |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Imalytics Preclinical software 1 | -                              |
| Diskus-Software                  | Hilgers, Königswinter, Germany |

---

## **2.2) Methoden**

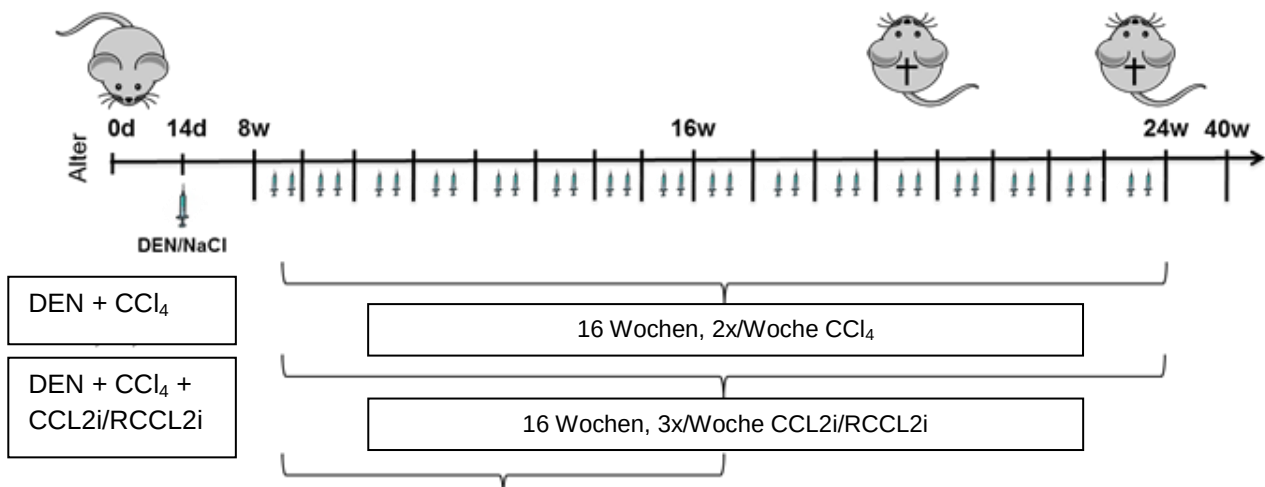
### **2.2.1) Mäuse**

In unserer Studie verwendeten wir männliche Tiere mit dem Hintergrund C57BL6/J. Diese Tiere wurden intern in der Versuchstierkunde des Uniklinikums Aachen gezüchtet und unter spezifisch-pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten. Die Behandlung der Tiere erstreckte sich in Abhängigkeit des Modells vom Alter von 2 bis 24 Wochen. Alle Experimente wurden nach den Vorgaben der Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) durchgeführt und vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz genehmigt.

### **2.2.2) Modelle**

Die HCC-Entstehung wurde mittels Diethylnitrosamin (DEN) induziert. Die DEN-Injektionen erfolgten im Alter von 14 Tagen. Das DEN wurde mit einer Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert (Schneider et al. 2012). Zur Induktion des chronischen Leberschadens erhielten die Tiere zweimal pro Woche intraperitoneale CCl<sub>4</sub>-Injektionen über 16 Wochen (Bartneck et al. 2012). Tetrachlorkohlenstoff (CCl<sub>4</sub>) wurde in Maiskeimöl gelöst und intraperitoneal mit einer Dosis von 0,6 ml/kg Körpergewicht injiziert. Die Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen Maiskeimöl ohne CCl<sub>4</sub>. Die CCL2-Inhibition erfolgte mit dem Spiegelmer mNOX-E36. Diese Substanz wurde während 16 Wochen der Leberschädigung mittels CCl<sub>4</sub> dreimal wöchentlich subkutan mit einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht injiziert (Ehling et al. 2014).

## Fibrosegetriebenes Hepatokarzinogenesemodell



**Abbildung 1: Experimenteller Aufbau des kombinierten Fibrose-HCC-Modells.** Die Tiere erhielten eine einmalige DEN-Injektion im Alter von 2 Wochen, gefolgt von zweimal wöchentlichen Injektionen mit CCl<sub>4</sub> über 16 Wochen. Die Inhibition von zirkulierendem CCL2 erfolgte mittels dreimal wöchentlichen Injektionen des CCL2-Inhibitors mNOX-E36 während der gesamten Zeit der CCl<sub>4</sub>-Injektionen. Die Tötung erfolgte 48 h nach der letzten CCl<sub>4</sub>-Injektion

### 2.2.3) Spiegelmer zur CCL2-Inhibition

mNOX-E36 ist das für diese Studie genutzte L-Ribonukleinsäureaptamer (Markenname: Spiegelmer). Zu diesem Zweck wurde es freundlicherweise von der NOXXON Pharma AG (Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Es bindet spezifisch murines *monocyte chemotactic protein*, kurz MCP-1 (=CCL2). mNOXE-36 ist ein RNA-Oligonukleotid (5'-GGCGACAUUGGUUGGGCAUGAGGCGAGGCCCUUUGA

UGAAUCCGCGGCCA-3') und inhibiert spezifisch die Infiltration CCR2-abhängiger Makrophagen. Eine vorangegangene Studie in unserer Arbeitsgruppe hatte dies bereits zeigen können (Ehling et al. 2014). Zur Verifizierung der Spezifität wurde ebenfalls eine reverse Sequenz bereitgestellt (revmNOX-E36 oder RCCL2i), wodurch ein biologisch inaktives Produkt entsteht. Der oben angesprochene Oligonukleotidteil ist kovalent an das 3'-Ende eines 40 kDa Polyethylenglykol (PEG) – Moleküls gebunden. Die Applikation erfolgte wie oben beschrieben.

#### 2.2.4) Probengewinnung

Die Tiere wurden 48 Stunden nach der letzten  $\text{CCl}_4$ -Injektion, bzw. der letzten Maiskeimöl-Injektion bei Kontrolltieren, mit einer Isofluran-Überdosis getötet. Nach Überprüfung des Zwischenzehenreflexes und der Schwanztonizität erfolgte die Präparation der Maus. Zur Gewinnung einer Blutprobe wurde der rechte Ventrikel punktiert und 600-800  $\mu\text{l}$  mit einer 1 ml Spritze, die zuvor mit 80  $\mu\text{l}$  Ethylendiamintetraacetat (EDTA) vorbereitet wurde, entnommen und in einem Röhrchen auf Eis gelagert. Das EDTA diente zur Verhinderung der Blutgerinnung. Anschließend wurde die Leber präpariert, über *V. portae* und *V. cava inferior* mit *phosphate buffered saline* (PBS) perfundiert und reseziert. Die entnommene Leber wurde zur makroskopischen Dokumentation und Begutachtung mithilfe des Leica Z16 APO macroscope beidseits fotografiert. Für Gewebsuntersuchungen wurden sowohl von Leber- als auch von Tumorgewebe zur Histologie, zur Immunfluoreszenzfärbung sowie Proben zur Protein- und RNA-Aufreinigung entnommen. Histologische Proben wurden in 4% Formalin konserviert, Proben für die Immunfluoreszenzfärbungen mit Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe B.V., Leiden, Niederlande) bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Die Proben für spätere Protein- und RNA-Analysen wurden in Kryotubes bei  $-80^\circ\text{C}$  asserviert. Der restliche Teil der Leber wurde gewogen und anschließend für die durchflusszytometrische Analyse genutzt. Zur Gewinnung von Knochenmarkszellen wurden die Femurknochen des Tieres freipräpariert, aus dem Hüftgelenk gelöst und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert.

##### 2.2.4.1) Blutproben

Zur Untersuchung der Blutprobe im Volumen 200  $\mu\text{l}$  wurde diese bei 5000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  für 5 Minuten zur Trennung von Serum und Zellsuspension in Serumröhrchen mit Gerinnungsaktivator zentrifugiert. Danach wurde das Serum abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. 300  $\mu\text{l}$  des gewonnenen Blutes fanden in der durchflusszytometrischen Analyse Verwendung. Diese wurden mit 500  $\mu\text{l}$  Lysispuffer gereinigt. Nach 5 Minuten wurde die Lysereaktion mit *Hank's balanced salt solution* (HBSS) durch das enthaltene EDTA gestoppt, dann bei 1400 rpm und  $4^\circ\text{C}$  für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde zur Zellgewinnung der Überstand entfernt. Die Zellen wurden bis zur Färbung auf Eis gelagert.



#### *2.2.4.2) Knochenmarksproben*

Der proximale Teil des Femurs wurde im Trochanterbereich abgetrennt, der distale kurz oberhalb der Kondylen, so dass nur noch der diaphysäre Femurteil übrig blieb. Mit einer mit 5 ml PBS aufgezogenen 10 ml Spritze und einer 27 G Kanüle wurde nun das Knochenmark durch einen Cell-Strainer (70µm) über einer 6-Well-Platte aus dem Knochen gespült und mit einem 10 ml Spritzenstempel vorsichtig durch das Sieb gedrückt, ohne Scherkräfte auszuüben. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit einer 10 ml Pipette aufgenommen und durch den Cell-Strainer in ein 15 ml Röhrchen überführt. Das Well wurde dann mit weiteren 5 ml PBS gespült, die ebenfalls durch den Cell-Strainer in das 5 ml Röhrchen gegeben wurden, damit verbliebene Zellen nicht verworfen wurden.

#### *2.2.4.3) Leberproben*

Sofern nicht anders angegeben wurden die im folgenden Abschnitt beschriebenen Zentrifugationsschritte bei 1400 rpm und 4°C für 5 Minuten durchgeführt.

Nach der Gewichtsmessung der restlichen Leber wurde nicht tumoröses (peritumorales) Lebergewebe mit einer Schere von den Tumoren getrennt. Beide Gewebetypen wurden dann erneut gewogen und fortan parallel bearbeitet. Die Gewebeproben wurden in 4,5 ml HBSS aufgenommen und mit einer Schere kleingeschnitten. Danach erfolgte ein Schritt zur Verdauung des Gewebes. Die Gewebesuspension wurde dazu mit 500 µl Kollagenase versetzt und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 5 ml HBSS hinzugegeben. Das darin enthaltene EDTA sollte die Kollagenasereaktion abstoppen. Durch wiederholte Aspiration mit einer 20 ml Spritze wurde das Gewebe weiter homogenisiert. Dieser Schritt wurde dann nach Aufsetzen einer 18 G Kanüle zur noch feineren Homogenisierung wiederholt. Zur Trennung der Zellsuspension von größeren Gewebestücken wurde sie durch einen 70 µm Zellfilter in ein 50 ml Röhrchen filtriert. Das Well der Platte wurde mit 10 ml gespült und auch durch den Filter gegeben, damit vorher verbliebene Zellen nicht verworfen wurden. Im Anschluss wurden 800 µl der Probe entfernt und in einem 2 ml Röhrchen mit 1,2 ml PBS aufgefüllt, anschließend zentrifugiert, resuspendiert und bis zur Färbung aufbewahrt.

Das im 50 ml Röhrchen verbliebene Volumen wurde mit 13 ml Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer (Ficoll) vorsichtig unterschichtet und für 20 Minuten bei 2000 rpm und 20 °C ohne Zentrifugenbremse zentrifugiert. Dieser Schritt diente zur Trennung der Leukozytenschicht vom restlichen Lebergewebe. Eine forcierte Bremsung der Zentrifuge hätte durch Scherkräfte die Schichtung ruiniert, wodurch sich eine nachträgliche Aufreinigung als schwierig gestaltet hätte. Nach diesem Gradienten zeigte sich im 50 ml Röhrchen eine Dreischichtung: Die oberste Phase bestand überwiegend aus Zelltrümmern (Debris) und Fett und wurde vollständig entfernt. Die weiße Intermediärschicht direkt oberhalb des Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymers bestand aus den zu analysierenden Leukozyten und wurde vorsichtig mit einer Pipette abgeschöpft und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Dieses Röhrchen wurde zentrifugiert, der Überstand entfernt, die gewonnenen Zellen resuspendiert und auf 2 Durchflusszytometrie-Röhrchen gleichmäßig aufgeteilt.

#### 2.2.5) Makroskopische Analyse der Lebertumoren

Die mittels des Leica Z16 APO fotografierten Lebern wurden mit der Diskus-Software (Hilgers, Königswinter, Germany) vermessen. Der Querdurchmesser jedes Tumors und die Gesamtumorlast wurden durch Addition der Durchmesser der Tumoren pro Leber sowie der Zahl der Tumoren bestimmt.

#### 2.2.6) Durchflusszytometrie

Prinzip des Verfahrens: Bei der Durchflusszytometrie wird die zu analysierende Zellsuspension einer feinen Glasküvette zugeführt. In dieser Küvette wird jede Zelle einzeln an Lasern unterschiedlicher Wellenlängen vorbeigeleitet. Zunächst kann die Beugung des Lichts in einem flachen Winkel gemessen werden, dem sogenannten *forward scatter* (FSC), sowie die Lichtbrechung im 90°-Winkel, dem sogenannten *side scatter* (SSC). Der Forward Scatter korreliert mit der Größe der Zelle, der *side scatter* mit ihrer Granularität (Fulwyler 1965). Zusätzlich ermöglicht die Färbung mit Fluorophor-markierten Antikörpern, die gegen spezifische Antigene der Immunzellen gerichtet sind, eine weitere Identifizierung. Durch unterschiedliche Wellenlängen in den Messbereichen der Laser werden gebundene Antikörper angeregt und können dadurch detektiert werden. Die Antigene auf den Oberflächen der Leukozyten entsprechen Unterscheidungsgruppen, die nach dem *Cluster of Differentiation* (CD) festgelegt sind.

Je nach positiver oder negativer Anregung des gebundenen Antikörpers lassen sich die Zellen weiter charakterisieren.

Sofern nicht anders angegeben, wurden die im folgenden Abschnitt beschriebenen Zentrifugationsschritte bei 1400 rpm und 4°C für 5 Minuten durchgeführt.

Es wurden Proben aus Lebergewebe, Blut und Knochenmark durchflusszytometrisch analysiert. Zur Vorbereitung der Durchflusszytometrie wurden die Zellpellets von Leber, Blut und Knochenmark mit dem jeweiligen der Färbung entsprechenden Antikörper-Mastermix versehen. Die in diesem Projekt verwendeten Antikörper wurden 1:400 in 20 µl *Blocking-Buffer 4* (BB4) und 80 µl PBS verdünnt und anschließend den zu analysierenden Leukozyten zugesetzt. Zur Inkubation wurden die Zellen 30 Minuten bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Nach der Färbung wurden die Zellen mit 500 µl PBS resuspendiert und durch einen 100 µm Siebfilter gegeben. Anschließend erfolgte ein Waschschrift (Auffüllung) mit 1,5 ml PBS: die nun 2 ml betragende Zellsuspension wurde zentrifugiert und vorsichtig dekantiert. Daraufhin wurde den Zellen kurz vor der Analyse am Durchflusszytometer 20 µl Counting Beads zur Berechnung absoluter Zellzahlen und - sofern es die jeweilige Färbung erforderte - 20 µl Hoechst 33258 zum Ausschluss toter Zellen beigelegt.

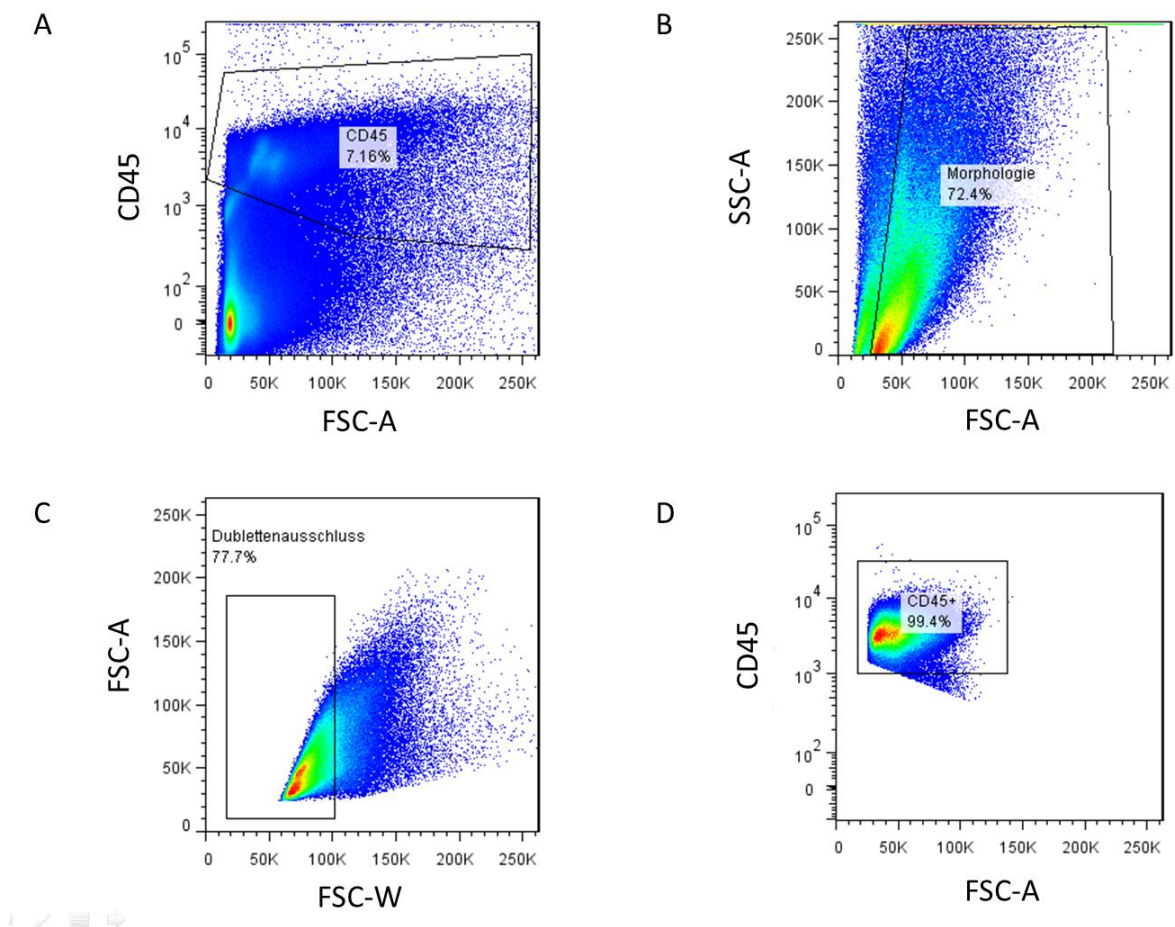
Die Messung der Zellsuspensionen erfolgte an einem Durchflusszytometer der Bauart BD FACS Canto (ein für die Diagnostik zugelassenes Gerät der Firma BD Biosciences, San Jose, USA) und wurde mit der systemeigenen Software FACSDiva (BD Biosciences) überwacht. Die abschließende Auswertung wurde mit der Software FlowJo v7.6 (FlowJo, LLC, Ashland, Oregon) durchgeführt.

Mit dieser Methode konnten Zellpopulationen sowie Subpopulationen mit der unten beschriebenen Gating-Strategie identifiziert werden. Die für unterschiedliche Populationen verwendeten Marker können Tabelle 5 entnommen werden.

**Tabelle 7: Übersicht über die Gating-Strategie zur Unterteilung von in unserer Studie untersuchten Immunzellen anhand von Oberflächenmarkern**

| Population                               |  | Oberflächenmarker                                                                 |
|------------------------------------------|--|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Monozyten-abgeleitete Makrophagen (MoMF) |  | CD45 <sup>+</sup> , Ly6G <sup>low</sup> , CD11b <sup>+</sup> ; F4/80 <sup>+</sup> |

|                                                       |                                                                                           |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kupffer-Zellen                                        | CD45 <sup>+</sup> , Ly6G <sup>low</sup> , CD11b <sup>-</sup> , F4/80 <sup>+</sup>         |
| Myeloide Supressor-Zellen (MDSC)                      | CD45 <sup>+</sup> , CD11b <sup>+</sup> , Gr1 <sup>+</sup> , MHCII <sup>intermediate</sup> |
| Tumor-assoziierte Makrophagen, Typ 1 (TAM1)           | CD45 <sup>+</sup> , CD11b <sup>+</sup> , Gr1 <sup>low</sup> , MHCII <sup>high</sup>       |
| Tumor-assoziierte Makrophagen, Typ 2 (TAM2)           | CD45 <sup>+</sup> , CD11b <sup>+</sup> , Gr1 <sup>low</sup> , MHCII <sup>low</sup>        |
| Ly6C-intermediate                                     | CD45 <sup>+</sup> , CD11b <sup>+</sup> , Gr1 <sup>high</sup> , MHCII <sup>high</sup>      |
| T-Helfer-Zellen (Th, CD4 <sup>+</sup> T-Zellen)       | CD45 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , NK1.1 <sup>-</sup>                                 |
| Zytotoxische T-Zellen (Tc, CD8 <sup>+</sup> T-Zellen) | CD45 <sup>+</sup> , CD4 <sup>-</sup> , CD8a <sup>+</sup>                                  |
| Natürliche Killerzellen (NK)                          | CD45 <sup>+</sup> , CD4 <sup>-</sup> , NK1.1 <sup>+</sup>                                 |
| Natürliche Killer-T-Zellen (NKT)                      | CD45 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , NK1.1 <sup>+</sup>                                 |
| Monozyten (Blut/Knochenmark)                          | (CD45 <sup>+</sup> ), Ly6G <sup>low</sup> , CD11b <sup>+</sup>                            |
| Neutrophile (Blut/Knochenmark)                        | (CD45 <sup>+</sup> ), Ly6G <sup>high</sup> , CD11b <sup>+</sup>                           |



**Abbildung 2: Exemplarische Gating-Strategie.** Die Abbildung zeigt exemplarisch, in welchen Schritten das Gating - hier anhand einer Leber-/Tumorprobe - abläuft. Zunächst werden CD45<sup>+</sup> Signale ausgewählt

(A), die dann im Vergleich FSC-A (A:Area) und SSC-A morphologisch eingeteilt werden (B). Davon ausgehend können in der Auftragung FSC-W (W: Width) und FSC-A Zelldoubletten ausgeschlossen werden. Anschließend zeigt sich ein präzises Bild CD45+ Zellen.

#### 2.2.6) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) mit vorgeschalteter CD11b-Aufreinigung via Magnetic-assisted cell sorting (MACS)

Da wir unterschiedliche Populationen Tumor-assoziiierter Makrophagen detaillierter betrachten wollten, benötigten wir aufgereinigte Proben der einzelnen Zelltypen. Diese gewannen wir über das Prinzip des *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS). Zur Voraufreinigung der zellreichen Suspensionen nutzten wir das *magnetic-assisted cell sorting* (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach). In diesem Schritt konnten wir zunächst CD11b<sup>+</sup> Leukozyten isolieren und erhielten so eine Suspension, die für das folgende FACS-Verfahren genutzt werden konnte.

Die Gewinnung des Leukozyten-Pellets aus Leber-/Tumorgewebe erfolgte wie im Abschnitt „Leberproben“ beschrieben. Danach wurde die Zellzahl mikroskopisch in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Anschließend wurde die Suspension bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dann wurde das Pellet in 90 µl PBS pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert und mit 10 µl CD11b MicroBeads pro 10<sup>7</sup> Zellen für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1-2 ml PBS pro 10<sup>7</sup> Zellen gewaschen und erneut bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und die Zellen mit 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Darauf folgte die magnetische Separation der Zellen. Zunächst mussten die MACS-Röhrchen vorbereitet werden. In unserer Studie verwendeten wir Röhrchen des Typs LS. Diese wurden im magnetischen Separator platziert und mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Danach konnte die mit den CD11b MicroBeads versehene Zellsuspension auf das Röhrchen gegeben werden. Nicht markierte Zellen passierten das Röhrchen und wurden an dessen unterem Ende in einem 15 ml Röhrchen aufgefangen. Zur Entfernung des Großteils nicht markierter Zellen wurde das LS-Röhrchen anschließend dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer gespült. CD11b<sup>+</sup> Leukozyten verblieben im LS-Röhrchen und mussten im nächsten Schritt gewonnen werden. Hierzu entfernten wir das LS-Röhrchen aus dem magnetischen Separator, damit die markierten Zellen nicht mehr der magnetischen Anziehung ausgesetzt waren und setzten es auf ein 15 ml Röhrchen. Das LS-Röhrchen wurde mit 5 ml MACS-Puffer gespült. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Bei diesem zweiten Spülschritt

wurde der MACS-Puffer mit einem Stempel (aus einer 10 mL-Spritze) durch das Röhrchen gedrückt. Der Durchlauf wurde bei 1400 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Darauf folgte die Färbung für die Zellsortierung. Hierzu entschieden wir uns für ein Färbepanel ähnlich der oben genannten myeloiden Färbung, fügten allerdings einen Ausschuss-Kanal „*Junk-Channel*“ hinzu, um die Reinheit der isolierten Zellen zu erhöhen und so eventuell noch in der Zellsuspension enthaltene lymphoide Zellen herauszufiltern. Dies erreichten wir mit einer Reihe Phycoerythrin (PE)-konjugierter Antikörper (CD4, CD8, B220, NK1.1, BD Biosciences), die somit eine Aussortierung lymphoider Zellen über den PE-Kanal ermöglichten. Die Färbemethode folgte dem unter „Durchflusszytometrie“ genannten Protokoll. Durch diesen Ausschuss-Kanal wird die Reinheit der Zellpopulationen stark verbessert und entspricht somit guter Laborpraxis für Zellsortierungen.

#### 2.2.7) Genexpressionsprofile der Tumor-assoziierten Makrophagen

Zur Analyse der Genexpressionsprofile wurden die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Zellen mittels Nanostring-Assay analysiert. Hierzu wurden 20.000 sortierte Zellen (definiert als ein Ereignis in der Durchflusszytometrie) zur mRNA-Expressionsanalyse bereitgestellt, so wie es vom Hersteller vorgesehen ist. Die mRNA-Expression von Haushaltsgenen wurde zur Normalisierung der Daten und zur Generierung des Transkript-Counts verwendet. Die differenzielle Genexpression wurde mittels DESeq (Love et al. 2014) berechnet. Die exprimierten Gene wurden nach  $\log_2$  facher Änderungsschwelle  $\geq 1$  und einem angepassten P-Wert von  $\leq 0,001$  für einen Vergleich der TAM-Populationen, bzw.  $\leq 0,05$  zum Vergleich der CCL2i-behandelten Tiere mit den unbehandelten Tieren herangezogen. Des Weiteren wurden die Daten mittels einer *gene-set-enrichment*-Analyse (Gene Ontology biological process) bearbeitet. Hierfür wurde das Cytoscape (Shannon et al. 2003) PlugIn BinGO (Maere et al. 2005) verwendet. Zur Visualisierung wurde das Cytoscan PlugIn *Enrichment Map* (Merico et al. 2010) mit etablierten Kriterien (p-Wert  $< 0,05$ , FDR Q-Wert  $< 0,25$ ) und einem Ähnlichkeits-*cutoff* mit einem Jaccard-Koeffizienten von 0,5 genutzt. In den *Enrichment Maps* repräsentiert jeder Knoten eine Einheit mit einem regulierten Genset. Die Ecken stellen eine Überschneidung von Genen (*gene overlap*, GO) zwischen benachbarten GO-Einheiten dar. Funktionelle Zuweisung von Gensets bestimmter

biologischer Prozesse erfolgte mittels *Gene Ontology* und *Biocarta* aus der DAVID database (Huang et al. 2009). *Gene Ontology* und *Biocarta* Signalwege wurden anhand ihrer Frequenz in einem bestimmten Genset analysiert. Ein *Cutoff* einer dreifachen Expressionsänderung wurde zur Erstellung von Venn-Diagrammen genutzt. Die Änderung der mRNA-Expression zur hierarchischen Gliederung (*hierarchical clustering analysis*, HCA) wurde auf der Basis des Mittelwerts aller Experimente berechnet (Bartneck et al. 2012).

#### 2.2.8) In-vivo $\mu$ CT-Bildgebung

Die *in vivo*  $\mu$ CT-Bildgebung wurde mit einem *dual-energy gantry-based flat-panel microcomputed tomography* Scanner (TomoScope 30s Duo, CT Imaging, Erlangen, Germany) durchgeführt. Die Tiere wurden vor und unmittelbar nach einer i.v. Injektion mit 100  $\mu$ l eXIA™ 160XL (Binitio Biomedical, Ottawa, Canada), einem Iod-basierten, für *in vivo*  $\mu$ CT optimierten Kontrastmittel untersucht. Die komplette Untersuchung wurde unter Anästhesie der Tiere durchgeführt. Jedes Tier erhielt einen *dual-energy*-Scan mit 41 und 64 kV (bei 0,5 mA und 1 mA). Über 6 Minuten kontinuierlicher Gantry-Rotation konnten so 2880 1032x1024 große Projektionen akquiriert werden. Zur Rekonstruktion der Daten wurde ein Rekonstruktionsalgorithmus vom Feldkamp-Typ (CT-Imaging, Erlangen, Germany) mit einer Voxel-Größe von 35x35x35x  $\mu\text{m}^3$  eingesetzt. Die rekonstruierten Daten wurden mit der *Imalytics Preclinical Software 1* analysiert. Zur  $\mu$ CT-Untersuchung der Leber wurde eine automatische Segmentierungsmethode angewandt, die außerdem über eine automatische Korrekturfunktion zur Behebung von Segmentierungsfehlern verfügte. Zur 3D-Segmentation der Leber wurden die Lebergrenzen in 10-20 Schnitten interaktiv umrandet. Die Bestimmung des relativen hepatischen Blutvolumens basierte auf der mittleren Helligkeit der Leber, eines großen Blutgefäßes, jeweils nach Applikation des Kontrastmittels sowie der mittleren Helligkeit der Leber vor Kontrastmittelgabe (0% rBV).

#### 2.2.9) Ex-vivo $\mu$ CT-Bildgebung

Zur *ex vivo* Computer-Tomographie erhielten die Tiere eine intrakardiale Injektion mit *Microfil* (Flow Tech, Carver, MA, USA), einem bleihaltigen Silikon-Kontrastmittel. Hiermit konnten hochauflösende 3D-Rekonstruktionen der Mikroarchitektur der hepatischen Blutgefäße erstellt werden. Das *Microfil*-Kontrastmittel ersetzt das Blutvolumen und

polymerisiert intravaskulär etwa 20 Minuten nach seiner Applikation. Auf diese Weise entstehen Kontrastmittel-Güsse der Lebergefäße. Die intrakardiale Injektion erfolgte direkt in den linken Ventrikel nach einer Inzision der *Vena cava inferior* bei physiologischen Blutdrücken, die über eine Perfusionspumpe aufrechterhalten wurden. Die perfundierten Lebern wurden exzidiert, mit Formalin fixiert und mittels des hochauflösenden SkyScan 1272  $\mu$ CT (SkyScan, Kontich, Belgien) untersucht. Hierzu wurden die Lebern auf einer computerkontrollierten Rotationsplattform positioniert und mit einer Rotation in Schritten von  $0,3^\circ$  bei 100 kV und einer Stromstärke von 100  $\mu$ A gescannt. Auf diese Weise konnten 640 Projektionen (4000x2096 Pixel) erstellt werden. Die Akquisitionszeit betrug pro Leber 6-8 h. Anschließend erfolgte die Anfertigung der Rekonstruktionen von  $6 \times 6 \times 6 \mu\text{m}^3$  mittels einer Feldkamp-Rückprojektion. Die Volumendaten wurden für die Bildbearbeitung auf eine Voxelgröße von  $12 \times 12 \times 12 \mu\text{m}^3$  herabgestuft. Nach einem 3D-Volumenrendering der rekonstruierten hochauflösenden CT-Daten erfolgte eine systematische und halbautomatische Analyse der Gefäß-Mikromorphologie mittels *Imalytics Preclinical Software* (Gremse et al. 2016).

## 2.2.9) Histologie

### 2.2.9.1) Hematoxylin- und Eosinfärbung

Die Hematoxylin- und Eosinfärbung (H&E-Färbung) erfolgte nach Standardmethoden in der IZKF-Core Facility des Universitätsklinikums Aachen.

### 2.2.9.2) Fluoreszenzfärbungen: Kollagen I, Kollagen IV, CD31

Grundlage für die Immunfluoreszenzfärbungen waren die Proben, die in Tissue-Tek eingehüllt und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert wurden. Zunächst wurden aus diesen Proben mittels Kryotom (Kryostat CM3050S, Leica, Wetzlar, Deutschland) ungefähr  $3 \mu\text{m}$  dünne Schnitte angefertigt, die auf Objektträger aufgetragen wurden. Die Schnitte wurden dann in PBS gewaschen, um das noch enthaltene Tissue-Tek zu entfernen. Darauf folgte ein fünfminütiger Waschschriff mit 80% Methanol bei Raumtemperatur und ein zweiminütiger mit Aceton, das bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert wurde. Danach wurden die Schnitte dreimal für je fünf Minuten erneut mit PBS gewaschen. Nach dem Waschschriff wurden die Schnitte mittels Fettstift umrandet. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primär-Antikörper für CD31 (rat anti-mouse CD31, BD Biosciences), Kollagen I (rabbit



anti-mouse Kollagen I, Novus Biologicals) oder Kollagen IV für je 60 Minuten mit einer Verdünnung von 1:100 bei Raumtemperatur inkubiert und danach wieder dreimal für je fünf Minuten mit PBS gewaschen. Nach diesem Schritt wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert. Die für die CD31 vorgesehenen Schnitte wurden mit einem Donkey anti-rat Cy3 (Dianova)-markierten Antikörper (1:500 in 12% BSA/PBS) plus 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (1:500) für 45 Minuten lichtgeschützt und bei Raumtemperatur inkubiert. Gleiches galt für die Kollagen I Schnitte mit dem Unterschied, dass als Sekundärantikörper Donkey anti-rabbit Cy3 (Dianova) verwendet wurde. Erneut folgten darauf drei Waschschrte mit PBS für je fünf Minuten.

Die gefärbten Schnitte wurden am Fluoreszenzmikroskop untersucht und auf Ebene der Anzahl der gefärbten Zellen und der entsprechenden Fläche quantifiziert.

#### *2.2.9.3) Immunfluoreszenz: Ki67 und F4/80*

Die Immunfluoreszenzfärbungen für Ki 67 und F4/80 erfolgten nach Standardmethoden in der IZKF-Core Facility des Universitätsklinikums Aachen.

### 3.) Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle der Subpopulationen der Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) näher beleuchtet werden. TAM spielen eine große Rolle bei der Modulation des Tumor-Microenvironment (Sica et al. 2014), vor allem über die Sekretion von Zytokinen, nicht nur in der Leber, sondern auch bei anderen Krebsformen (Mantovani et al. 2006). Dennoch gibt es noch keine detaillierte Untersuchung verschiedener TAM-Subpopulationen im Rahmen von HCCs. Der größte Risikofaktor für die Entstehung eines HCC ist eine bestehende Leberfibrose. Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe dokumentierten das Verhalten von infiltrierenden Makrophagen, die im Rahmen eines chronischen Leberfibrose-Modells bei Mäusen (Ehling et al. 2014) die Neubildung von Blutgefäßen in hohem Maße förderten. Dieses auf einer chronischen Leberschädigung durch CCl<sub>4</sub> basierende Modell wurde in dieser Arbeit mit einem HCC-Modell auf der Grundlage einer einmaligen DEN-Injektion kombiniert. Zur Untersuchung der Rolle von infiltrierenden Makrophagen wurde zusätzlich eine CCL2-Inhibition mittels mNOX-E36 durchgeführt, Kontrolltiere erhielten reverses mNOX-E36, welches keine CCL2-inhibitorische Wirkung hat. Auf der Grundlage dieses Versuchsaufbaus wurden folgende Gruppen angesetzt:

- Gesunde Tiere im Alter von 24 Wochen
- Tiere im Alter von 24 Wochen mit 16-wöchiger alleiniger CCl<sub>4</sub>-Schädigung
- Tiere im Alter von 24 Wochen mit DEN-induziertem HCC in 16-wöchiger CCl<sub>4</sub>-Schädigung
- Tiere im Alter von 24 Wochen mit DEN-induziertem HCC in 16-wöchiger CCl<sub>4</sub>-Schädigung und CCL2-Inhibition
- Tiere im Alter von 24 Wochen mit DEN-induziertem HCC in 16-wöchiger CCl<sub>4</sub>-Schädigung und Applikation der reversen Form des CCL2-Inhibitors

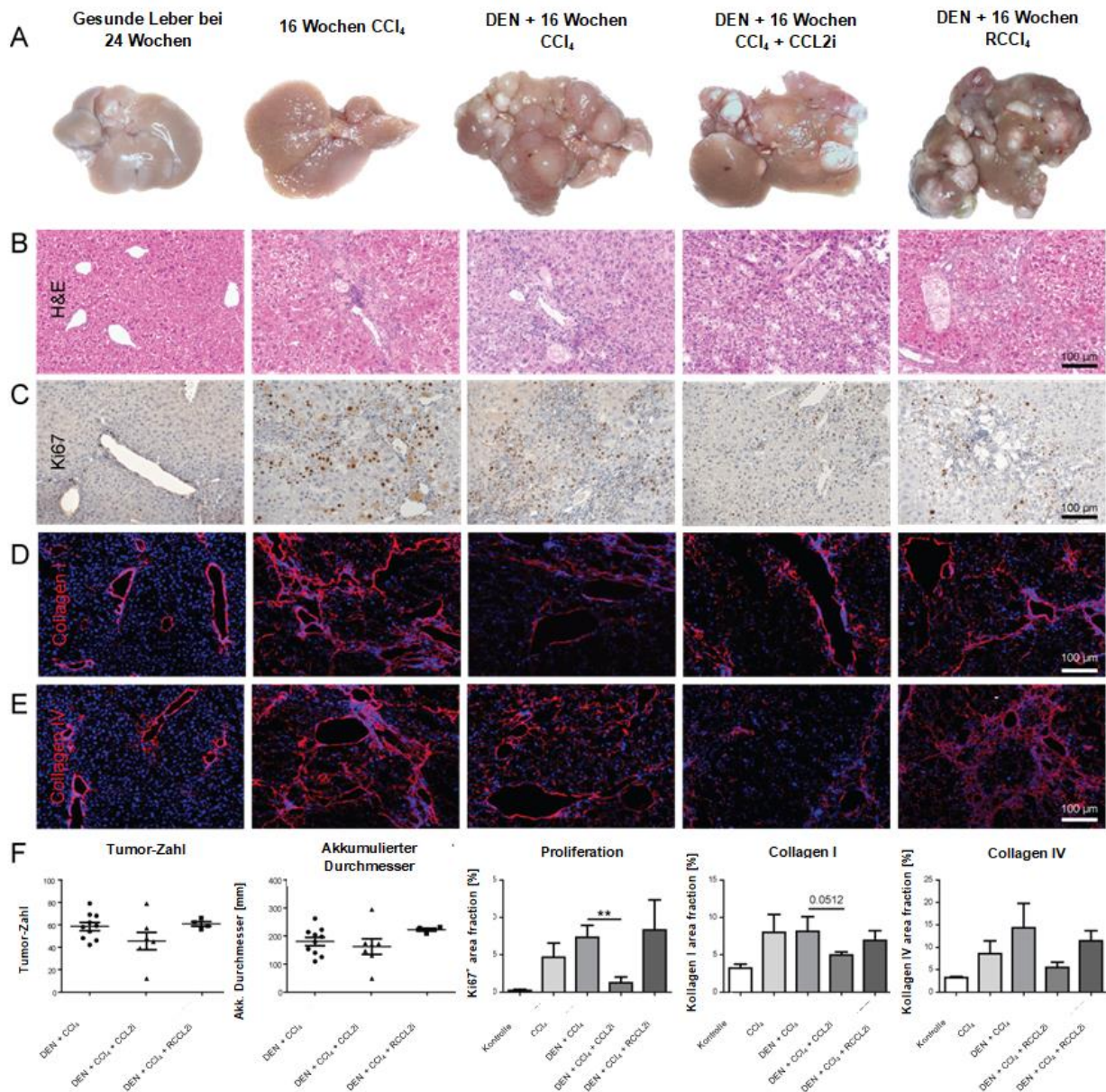
Zunächst untersuchten wir die Effekte der CCL2-Inhibition in Bezug auf Tumorlast und Fibrose. Histologische Untersuchungen basierten auf Hämatoxylin- und Eosin-Färbungen als histologische Standardfärbung, in der auch Fibrose eingeschätzt werden kann sowie auf Immunfluoreszenz-basierten Kollagen I und IV Färbungen. Die  $\mu$ -CT-Bildgebung ermöglichte eine detaillierte Messung des hepatischen Blutvolumens sowie eine Abschätzung der Tumorlast und -vaskularisation. Unterstützt wurde diese Messung

von einer Quantifizierung von CD31<sup>+</sup> Endothelzellen mittels Immunfluoreszenzfärbung. Durchflusszytometrisch quantifizierten wir verschiedene Immunzellpopulationen. Besonderen Fokus legten wir dabei auf Monozyten-abgeleitete Makrophagen und verglichen ihre Zahl im F4/80-CD11b-Gate mit einer immunhistochemisch ermittelten Quantifizierung F4/80-positiver Zellen. Zusätzlich wandten wir eine weitere, auf MHCII und Gr1 basierende Gating-Strategie an, um CD11b<sup>+</sup> Zellen genauer zu unterteilen, wegweisend war hier die Einteilung in die Populationen TAM1, TAM2 und MDSC. Diese Strategie fand auch Anwendung beim Sorting mittels FACS, durch das wir aufgereinigte Proben der oben genannten Populationen erhielten und mithilfe des Nanostring-Verfahrens Genexpressionsprofile erstellen konnten.

### **3.1) Auswirkungen der CCL2-Inhibition auf Tumorwachstum und Fibroseentwicklung im kombinierten Fibrose-Krebs-Modell**

Um die Einflüsse der CCL2-Inhibition in einem auf CCl<sub>4</sub> und DEN basierenden Fibrose-HCC-Modell zu untersuchen, wurden zuerst die im Modell untersuchten Lebern makroskopisch untersucht. Je eine Aufnahme zu jeder Kondition ist in Abbildung 3A dargestellt. Die Behandlung mit CCl<sub>4</sub> über 16 Wochen zeigte im Vergleich zu einem gleichaltrigen gesunden Tier eine aufgerauhte, höckrige Oberfläche, führte jedoch nicht zur Entwicklung von Tumoren. Diese trat nur bei Tieren auf, die auch mit DEN vorbehandelt wurden. Anschließend untersuchten wir die Unterschiede, die bei CCL2-Inhibition auftraten. Hierzu quantifizierten wir zunächst die makroskopisch sichtbare Tumorlast anhand der zuvor erstellten Fotografien. Im Folgenden wurde die Tumorlast über die Tumorzahl sowie den akkumulierten Durchmesser bestimmt, wie im Teil Material und Methoden beschrieben. Die Statistiken hierzu sind Abbildung 3F zu entnehmen. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit dem CCL2i die Gesamttumorlast in Form des akkumulierten Durchmessers kaum beeinflusst. Dieser lag bei Tieren ohne CCL2i bei im Mittel 190 mm, bei CCL2i bei ungefähr 180 mm und in der RCCL2i-Gruppe bei ungefähr 210 mm. Die Tumorzahl zeigte sich bei CCL2i-Behandlung geringgradig reduziert, von im Mittel 60 Tumoren bei Tieren mit DEN + CCl<sub>4</sub> und Tieren mit zusätzlicher RCCL2i Behandlung auf ungefähr 45 Tumoren bei CCL2-Inhibition. Histologisch zeigten sich größere Areale normalen Lebergewebes bei CCL2i-Behandlung in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung, wie in Abbildung 3B gezeigt. Weitere Unterschiede zeigten sich bei der Untersuchung der Proliferation. Die Quantifizierung

immunhistochemisch auf den Proliferationsmarker Ki67 gefärbter Schnitte zeigte eine signifikante Reduktion der Ki67 positiven Fläche von ungefähr 7% bei Tieren, die mit DEN und CCl<sub>4</sub> behandelt wurden, auf ungefähr 2% bei den Tieren, die zusätzlich den CCL2i erhielten. Gesunde Lebern zeigten eine nur geringe proliferative Aktivität mit einer Fläche von unter 1%, im Gegensatz zur RCCL2i-Gruppe, die im Mittel eine Ki67 positive Fläche von ebenfalls 7% erreichte. Um eine bessere Vorstellung von der Fibroseentwicklung zu erhalten, quantifizierten wir via Immunfluoreszenzfärbung die Fläche zweier verschiedener Kollagen-Typen in den Lebergewebe-Schnitten: Zum einen Kollagen I als Indikator für Fibrose, zum anderen Kollagen IV, welches vermehrt in Lebertumoren auftritt (Dapito et al. 2012). Repräsentative Aufnahmen sind in Abbildung 3D und 3E gezeigt, die Quantifizierung findet sich in Abbildung 3F. Bei der Kollagen I Quantifizierung maßen wir bei gesunden Tieren einen Kollagen I positiven Flächenanteil von im Mittel 3%, der sich bei Behandlung mit CCl<sub>4</sub>, DEN + CCl<sub>4</sub>, sowie DEN + CCl<sub>4</sub> + RCCL2i auf ungefähr 7% erhöhte. Lediglich bei CCL2i-behandelten Tieren lag der Anteil bei um die 5%. Ein ähnliches Ergebnis erhielten wir bei der Auswertung der Kollagen IV Färbung. Gesunde Lebern kamen auf einen Kollagen IV positiven Flächenanteil von ungefähr 3 %. Bei CCl<sub>4</sub>-Behandlung lag er im Mittel bei 7%, und erhöhte sich noch einmal bei Tieren, die zusätzlich DEN erhielten, auf fast 15%. In RCCL2i-behandelten Tieren reduzierte sich dieser Wert wiederum leicht auf 12%. Bei den CCL2i-behandelten Tieren zeigte sich ein Flächenanteil von ungefähr 5%. Zusammenfassend zeigten sowohl die Kollagen I, als auch die Kollagen IV Färbung Tendenzen zur Fibrosereduktion und zur Reduktion der Expression von Tumor-assoziiertem Kollagen durch die CCL2-Inhibition.



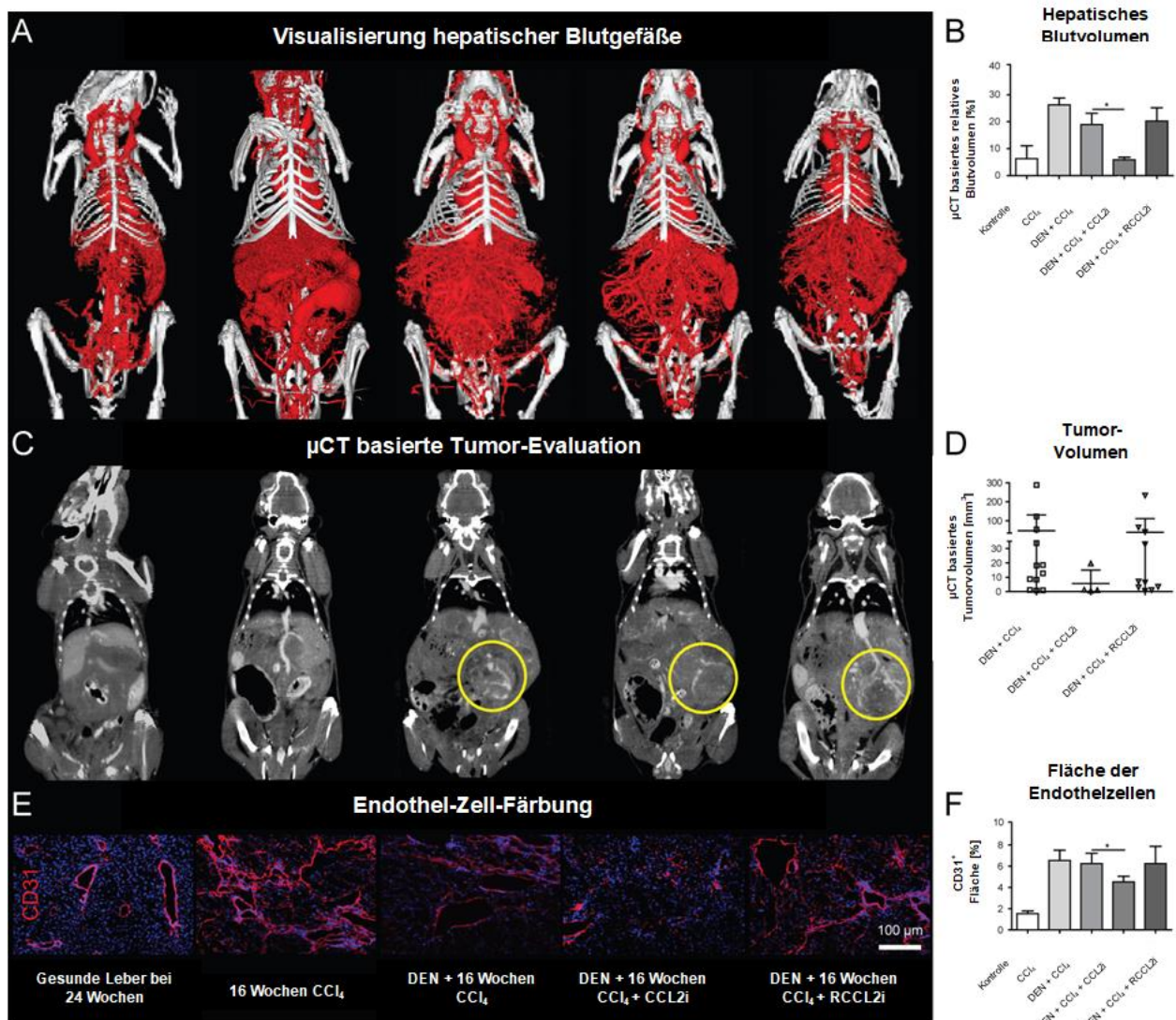
**Abbildung 3: Effekte der CCL2-Inhibition auf den Progress von HCC.** Die Behandlung der Tiere beinhaltete die 4 folgenden Kombinationen: (1) 24 Wochen lang keine Behandlung oder (2) eine einmalige DEN-Injektion intraperitoneal am 14. Lebenstag sowie 16 Wochen lang CCl<sub>4</sub>-Injektionen 2x/Woche oder Behandlungsoption (2) mit darüber hinausgehender Behandlung mit dem CCL2-Inhibitor mNOX-E36 (CCL2i) (3) beziehungsweise mit seinem reversen Kontrollmolekül rev-mNOX-E36 (RCCl<sub>2</sub>) (4) 3x/Woche über 16 Wochen. Die Untersuchung der Mäuse erfolgte 48 h nach der letzten intraperitonealen CCl<sub>4</sub>-Injektion. (A) Repräsentative makroskopische Analyse der unterschiedlichen Bedingungen, (B) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE), (C) immunhistochemische Färbung auf Ki67, Immunfluoreszenzfärbung für Kollagen I (D) und Kollagen IV (E), (F) statistische Auswertung der Tumor-Zahl, des akkumulierten Durchmessers, der Proliferation sowie der Kollagen I- und IV-Färbung.

### **3.2) Auswirkungen der CCL2-Inhibition auf das hepatische Blutvolumen, Gesamttumorvolumen und Nekroseareale in Tumorregionen**

Vorige Studien hatten bereits eine deutliche Reduktion der Gefäßneubildung unter CCL2-Inhibition in einem chronischen Fibrose-Modell nachgewiesen (Ehling et al. 2014). Im Rahmen dieser Arbeit überprüften wir, ob es ähnliche Beobachtungen im kombinierten Fibrose-HCC-Modell gibt. Anhand der  $\mu$ CT-Daten wurde der Gefäßbaum der Leber dreidimensional rekonstruiert und das relative hepatische Blutvolumen (rBV) berechnet. Gesunde Lebern wiesen ein rBV von im Mittel 5% auf, welches sich durch chronische Schädigung durch  $\text{CCl}_4$  auf fast 25% erhöhte. Bei Tieren, die DEN und  $\text{CCl}_4$  erhielten, lag es bei 20%. Ähnlich verhielt sich die Kontrollgruppe, die eine Behandlung mit DEN +  $\text{CCl}_4$  + RCCL2i erhalten hatte. Die Tiere, denen wir den CCL2-Inhibitor injiziert hatten, zeigten dagegen ein rBV von 5% und entsprachen damit dem Wert gesunder Lebern. Um die Einflüsse einer CCL2-Inhibition auf die Angiogenese zu verifizieren, führten wir zusätzlich eine CD31-Immunfluoreszenzfärbung durch. CD31 ist ein Oberflächenmarker von Endothelzellen. Wir verwendeten den  $\text{CD31}^+$  Flächenanteil als zusätzliches Maß hepatischer Gefäße. Die Ergebnisse entsprachen weitestgehend dem der  $\mu$ CT-graphischen Auswertung und sind in Abbildung 4E dargestellt: Bei gesunden Tieren lag der Mittelwert des  $\text{CD31}^+$  Flächenanteils bei etwas unter 2%, sowohl bei Tieren mit  $\text{CCl}_4$ -, DEN +  $\text{CCl}_4$ - und DEN +  $\text{CCl}_4$  + RCCL2i-Behandlung schwankte der Wert um ungefähr 6%. Wie schon in den CT-Bildern zeigte sich eine Reduktion unter CCL2-Inhibition, in der CD31-Färbung auf ungefähr 4%. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass sich das rBV sowohl unter chronischer Schädigung durch  $\text{CCl}_4$  als auch in einem kombinierten DEN +  $\text{CCl}_4$  Modell im Vergleich zu gesunden Lebern erhöht. Lediglich die Tiere, die einen CCL2i erhielten, zeigten in Bezug auf die Angiogenese Normalisierungstendenzen.

Im ersten Teil der Ergebnisdarstellung führten wir eine Messung der makroskopischen Tumorlast durch. Diese konnte jedoch nur oberflächliche Tumoren bewerten. Deshalb sollte anhand der CT- Daten das Tumolvolumen der jeweiligen Gruppen gemessen werden. Hier zeigte sich ebenfalls eine Reduktion in den Tieren mit CCL2i-Behandlung von ungefähr  $80 \text{ mm}^3$  auf ungefähr  $10 \text{ mm}^3$ . Zusätzlich ließen sich bei der radiologischen Durchmusterung der Tumoren auch einige interessante Beobachtungen tätigen, die in Abbildung 4C illustriert werden. Hier zeigten sich unter CCL2i Tumorknoten mit größeren Gefäßen in der Tumorperipherie und zentralen Nekrosen.





**Abbildung 4: CCL2-Inhibition während des Fortschreitens der Tumorerkrankung führt zu einer reduzierten hepatischen Gefäßneubildung in vivo.** Die Behandlung der Tiere beinhaltete die 4 folgenden Kombinationen: (1) 24 Wochen lang keine Behandlung oder (2) eine einmalige DEN-Injektion intraperitoneal am 14. Lebenstag sowie 16 Wochen lang CCl<sub>4</sub>-Injektionen 2x/Woche oder Behandlungsoption (2) mit darüber hinausgehender Behandlung mit dem CCL2-Inhibitor mNOX-E36 (CCL2i) (3) beziehungsweise mit seinem reversen Kontrollmolekül rev-mNOX-E36 (RCCL2i) (4) 3x/Woche über 16 Wochen. Die Untersuchung der Mäuse erfolgte 48 h nach der letzten intraperitonealen CCl<sub>4</sub>-Injektion. (A) 3D Volumen-Rending hepatischer Blutgefäße mittels eXIA 160XL, einem auf Iod basierendem Röntgenkontrastmittel und einer Auflösung von 35 µm Voxel-Seitenlänge, (B) µCT-basierte Quantifizierung des relativen hepatischen Blutvolumens, (C) µCT-basierte Analyse des Tumorsvolumens mit Quantifizierung (D), (E) Immunfluoreszenzfärbung auf CD31, (F) Quantifizierung der CD31<sup>+</sup> Fläche.

### 3.3) Effekte der CCL2-Inhibition auf die Infiltration Monozyten-abgeleiteter Makrophagen in die Leber

Es wurde gezeigt, dass in die Leber einwandernde Monozyten und Neutrophile antiinflammatorische und Tumor-begünstigende Eigenschaften entwickeln können (Talmadge & Gabrilovich 2013) und aus diesem Grund einen hohen Einfluss auf das

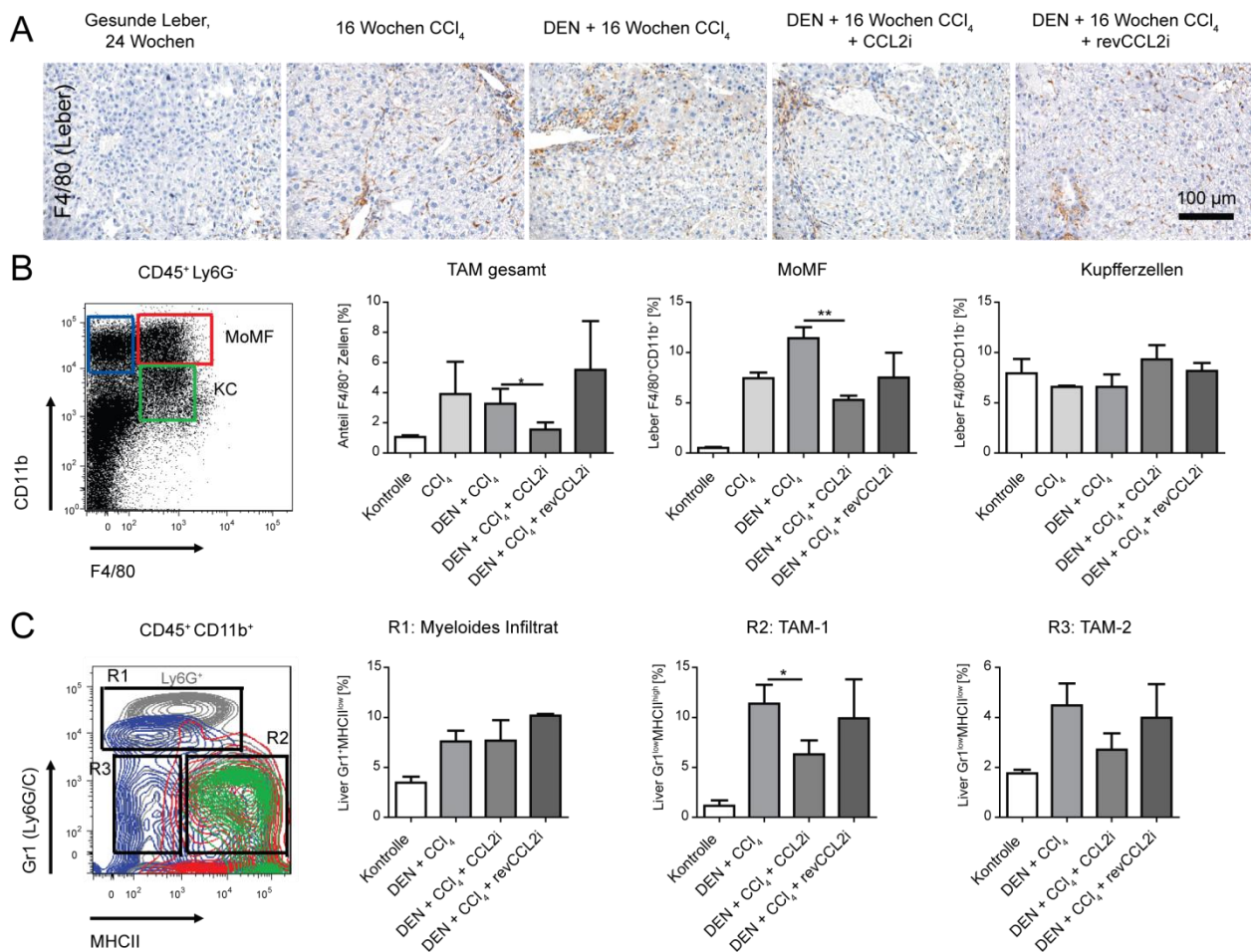
TME um den Tumor haben. Deshalb untersuchten wir via Durchflusszytometrie und F4/80-Immunhistochemie Makrophagen in Leber-Tumoren. Dazu wandten wir eine Strategie an, die schon in vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe bei chronischen Leber-Entzündungsmodellen verwendet wurde. Hierbei wurden Makrophagen als  $CD45^+ Ly6G^-$  Zellen definiert, die wiederum anhand der Marker CD11b und F4/80 in zwei größere Subpopulationen aufgeteilt werden (Bartneck et al. 2016). Dabei handelte es sich um  $CD11b^+ F4/80^+$  Monozyten-abgeleitete Makrophagen (MoMF) und  $CD11b^{int} F4/80^+$  KC. Um einen ersten Eindruck zur Rolle aller Makrophagen in unserem Modell zu erhalten, quantifizierten wir die F4/80 positive Fläche immunhistochemisch in Gewebeschnitten. Repräsentative Schnitte finden sich in Abbildung 5A, die begleitende statistische Auswertung in 5B. Bei gesunden Tieren lag der F4/80-positive Flächenanteil in der Leber bei einem Prozent. Durch  $CCl_4$ -Schädigung erhöhte sich dieser Wert auf fast 3%, in ähnlicher Weise auch bei Schädigung durch DEN und  $CCl_4$ . Tiere, die zusätzlich den RCCL2i erhielten, wiesen einen noch höheren mittleren Makrophagenanteil von fast 6% auf, der jedoch höheren Schwankungen unterlag. Unter CCL2-Inhibition konnte dagegen eine Reduktion des Makrophagenanteils auf unter 2% erreicht werden. Diese Reduktion war im Vergleich zur DEN- $CCl_4$  Gruppe statistisch signifikant. In der Durchflusszytometrie wurde gemäß oben genannter Strategie eine Quantifizierung der Subpopulationen MoMF und KC durchgeführt. Die statistischen Angaben geben den Prozentanteil der jeweiligen Population an allen  $CD45^+$  Zellen an. Bei gesunden Tieren lag der Anteil aller Makrophagen in Bezug auf  $CD45^+$  Zellen in der Leber bei einem Prozent. Abbildung 5B zeigt exemplarisch das durchflusszytometrische Auswertungsfenster (*gate*) und die statistische Auswertung der beiden Populationen. In gesunden Lebern machten MoMF weniger als 1% aller  $CD45^+$  Zellen aus, bei  $CCl_4$ -geschädigten Tieren 7% und beim DEN +  $CCl_4$  Modell waren es über 10%. Sowohl bei RCCL2i- als auch bei CCL2i-Behandlung zeigte sich eine Reduktion des Wertes, im Falle des RCCL2i auf ungefähr 7%, bei CCL2i statistisch signifikant auf 5% aller  $CD45^+$  Zellen in der Leber. Die Zahl der KC unterlag nicht solchen Unterschieden und schwankte in allen Gruppen zwischen 5 und 8%. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Zahl aller Makrophagen durch die Inhibition von CCL2 reduziert wurde. Bei detaillierter Betrachtung sahen wir, dass diese Reduktion vor allem auf die Subpopulation der MoMF zurückzuführen war, während die KC keiner Reduktion durch CCL2-Inhibition unterlagen.



Die oben beschriebene Analysestrategie setzte vor allem die Herkunft der beiden großen Makrophagen-Subpopulationen in den Mittelpunkt. Im Folgenden wurde mit einer differenzierten Betrachtung der Makrophagen deren Funktionsweise in Lebertumoren näher untersucht. Hierzu verwendeten wir eine Gating-Strategie, die von der Gruppe von Jo van Ginderachter (Movahedi et al. 2010) beschrieben wurde.  $CD45^+ CD11b^+$  Zellen wurden in einem Gate mit MHCII auf der X-Achse und Gr1 auf der Y-Achse dargestellt. Ein Beispiel hierfür findet sich in Abbildung 5C. Dieses *gate* eignet sich zur Darstellung zweier verschiedener Subsets Tumor-assoziiierter Makrophagen (TAM1 und TAM2) sowie einer weiteren Gruppe, die als Infiltrierende Myeloide Zellen (IMC) bezeichnet wurde. Alle Gruppen werden im Folgenden näher beschrieben. Da das Gate alle  $CD11b^+$  Zellen enthält, finden sich hier auch  $Ly6G^+$  neutrophile Granulozyten, die im Tumor die Rolle granulozytärer Suppressor-Zellen (gMDSC) einnehmen können. In der Software zur Auswertung durchflusszytometrischer Messungen (FlowJo) ließen sich die Populationen im MHCII-Gr1-Gate mit denen im F4/80-CD11b-Gate vergleichen und Überschneidungen zwischen diesen Populationen farbkodiert darstellen (*multicolour backgating analysis*), wie in Abbildung 5B und 5C gezeigt.  $Gr1^{high} MHCII^{low-int}$  MDSC setzten sich aus Makrophagen zusammen, die weder zur Gruppe der MoMF gehören, noch zu den KC (siehe blaue Markierung in Abbildung 5B), sowie oben genannten gMDSC (graue Population in Abbildung 5C). Die  $Gr1^{low} MHCII^{high}$  Population bildete sich sowohl aus MoMF und KC (rote und grüne Markierung in Abbildung 5B). Diese Population wird in dieser Arbeit fortan als TAM1 bezeichnet. Die dritte Population -  $Gr1^{low} MHCII^{low}$  - bestand ebenfalls aus Makrophagen, die sich weder in MoMF noch in KC einteilen ließen. Im Rahmen dieser Arbeit wird sie TAM2 genannt. Nach Festlegung dieser Populationen erstellten wir eine Statistik zur Quantifizierung (Abbildung 5C). Auch hier wurden alle Werte in Prozent der  $CD45^+$  Zellen dargestellt. In Kontrolltieren ergab der Wert des myeloiden Infiltrats in etwa 3%. Unter DEN +  $CCl_4$  Behandlung sowie zusätzlicher CCL2i-Behandlung erhöhte er sich auf jeweils 7%, im Falle der RCCL2i-Behandlung sogar auf 10%. Die Gruppe der TAM1 lag bei gesunden Tieren im Bereich von 1%, bei DEN + CCL2i-Behandlung im Mittel bei 11%, unter zusätzlicher CCL2i-Behandlung reduzierte sich die Zahl wieder auf 6%. Diese Reduktion war statistisch signifikant. Bei RCCL2i-Behandlung stellte die TAM1-Population im Mittel 10% der  $CD45^+$  Zellen. Ein ähnliches Muster zeigte sich auch bei den TAM2. Gesunde Tiere hatten einen TAM2-Anteil von etwas unter 2%, tumortragende Tiere ohne CCL2i oder RCCL2i einen Wert von knapp über 4%. Unter

CCL2i-Behandlung fiel der Anteil auf ungefähr 2,5% und bei RCCL2i-behandelten Tieren zeigte sich ein TAM2-Anteil von 4%.

Zusammenfassend konnten wir im MHCII-Gr1-Gate drei Populationen – TAM1, TAM2 und IMC - voneinander abgrenzen und zu denen im F4/80-CD11b-Gate in Bezug setzen. Die TAM1-Population zeigte Überschneidungen mit MoMF und KC, IMC und TAM2 bestanden überwiegend aus Makrophagen, die sich nicht den MoMF oder den KC zuordnen ließen. TAM1 wurden signifikant durch CCL2-Inhibition reduziert. TAM2 zeigte eine ähnliche Reduktion, wenn auch nicht statistisch signifikant.



**Abbildung 5: Analyse der Subpopulationen hepatischer Makrophagen.** Die Behandlung der Tiere beinhaltete die 4 folgenden Kombinationen: (1) 24 Wochen lang keine Behandlung oder (2) eine einmalige DEN-Injektion intraperitoneal am 14. Lebenstag sowie 16 Wochen lang CCl<sub>4</sub>-Injektionen 2x/Woche oder Behandlungsoption (2) mit darüber hinausgehender Behandlung mit dem CCL2-Inhibitor mNOX-E36 (CCL2i) (3) beziehungsweise mit seinem reversen Kontrollmolekül rev-mNOX-E36 (RCCL2i) (4) 3x/Woche über 16 Wochen. Die Untersuchung der Mäuse erfolgte 48 h nach der letzten intraperitonealen CCl<sub>4</sub>-Injektion. (A) Immunhistochemische Färbung F4/80+ hepatischer Makrophagen, (B) Gating der Subpopulationen hepatischer Makrophagen (Pregating auf CD45<sup>+</sup> und anschließend auf Ly6G<sup>-</sup>): MoMF, die mit CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> gekennzeichnet sind und Kupfer-Zellen (KC), die mit CD11b<sup>int</sup>F4/80<sup>+</sup> gekennzeichnet sind sowie die Quantifizierung der Subgruppen in drei unterschiedlichen Experimenten, (C) Verortung und Quantifizierung von MoMF (rot markiert) und KC (grün markiert) in Subgruppen Tumor-assoziiierter Makrophagen (Pregating (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) via Back-Gating-Analyse. TAM

schließen infiltrierende myeloide Zellen ( $\text{Gr1}^+\text{MHCII}^{\text{low to int}}$ ), TAM1 ( $\text{Gr1}^+\text{MHCII}^{\text{low to int}}$ ) oder TAM2 ( $\text{Gr1}^{\text{low}}\text{MHCII}^{\text{low}}$ ) ein.

### 3.4) Genexpressionsprofile Tumor-assoziiierter Makrophagen-Subpopulationen

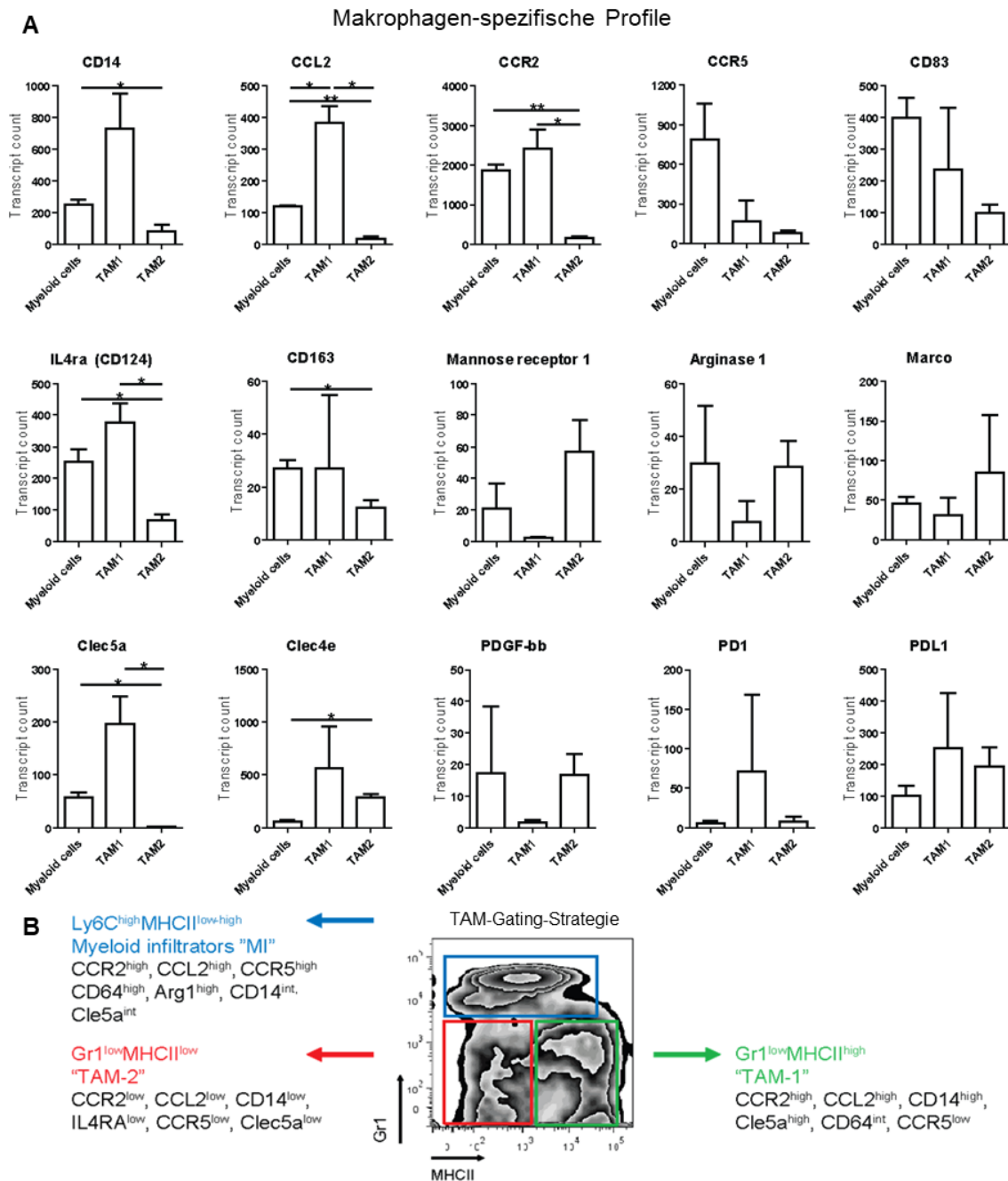
Im Folgenden wurden die einzelnen TAM-Subpopulationen näher untersucht. Dazu wurden jeweils TAM1, TAM2 und IMC via FACS aus 24 Wochen alten Tieren, die mit DEN im Alter von 2 Wochen, gefolgt von einer 16-wöchigen Induktion des Leberschadens durch  $\text{CCl}_4$  behandelt wurden, isoliert. Zur Genexpressionsanalyse isolierter Zellen nutzten wir die Nanostring-Technologie, welche die simultane quantitative Analyse von 561 für immunologische Prozesse relevanten mRNAs erlaubt. Zur genaueren Klassifikation wurden zunächst die Gene untersucht, in denen sich die Subpopulationen signifikant voneinander unterscheiden. In Abbildung 6A sind für jedes Gen die *transcript counts* der jeweiligen Populationen dargestellt. Signifikante Unterschiede zeigten sich bei der Expression von CD14, CCL2, CCR2, CCR5, CD83, IL4ra (CD124), CD163, Clec5a und Clec4e. CD14 und CCL2 wurden vor allem von den TAM1 exprimiert. CCR2 wurde dagegen sowohl von den TAM1 als auch von den IMC in ähnlichem Maße gebildet. Auch CCR5 fand sich vor allem auf IMC, die beiden TAM-Populationen bildeten es jedoch in nur geringem Umfang. Die CD83-Expression war bei den IMC am höchsten, gefolgt von TAM1 und TAM2. Das meiste IL4ra (CD124) fand sich wiederum auf TAM1, wurde aber auch vermehrt auf IMC gebildet, jedoch kaum auf TAM2. In Bezug auf CD163 gab es kaum Unterschiede zwischen der IMC- und der TAM1-Population, die TAM2-Population exprimiert dagegen signifikant weniger CD163 als die IMC. Der Mannose-Rezeptor 1 fand sich vor allem auf TAM2, in geringerem Maße auf IMC und fast gar nicht auf TAM1. Ein ähnliches Muster konnten wir bei Arginase 1, Marco und *platelet-derived growth factor bb* (PDGF-bb) finden. Bei allen Dreien zeigten die TAM1 die geringste Expression, die IMC und TAM2 bildeten diese Marker in höherem Maße. Die Untersuchung auf Clec5a zeigte auch große Unterschiede zwischen den Populationen. Clec5a wurde vor allem auf TAM1 gebildet, die Expression auf IMC lag bei ungefähr einem Drittel des Wertes bei TAM1. Bei den TAM2 kam dieser Marker fast gar nicht vor. Somit unterschieden sich die TAM2 bei Clec5a signifikant von den beiden anderen Populationen. Auch Clec4e wurde in höherem Maß auf TAM1 gebildet, gefolgt von TAM2 und nur in sehr geringer Ausprägung auf IMC. Hier war der Unterschied zwischen TAM2 und IMC signifikant. PDGF-bb kam dagegen kaum auf TAM1 vor, bei IMC und TAM2 zeigte sich eine

ähnliche Ausprägung. Auch die Werte von PD1 waren bei TAM1 am höchsten, kaum ausgeprägt wurde der Marker auf IMC und TAM2. Bei *programmed cell death protein 1 ligand* (PDL1) waren ebenfalls die TAM1 führend, knapp gefolgt von TAM2. IMC zeigten hier die geringste Ausprägung, die ungefähr 50% des Wertes der TAM1 aufwiesen.

Zusammenfassend konnten anhand dieser Untersuchung spezifische Expressionsprofile für die einzelnen Populationen festgelegt werden. Eine Übersicht findet sich in Abbildung 6B. Ly6C<sup>high</sup> MHCII<sup>low-int</sup> Infiltrierende Monozytäre Zellen (blaue Markierung) zeigen folgende Charakteristika: CCR2<sup>high</sup>, CCL2<sup>high</sup>, CCR5<sup>high</sup>, CD64<sup>high</sup>, Arg1<sup>high</sup>, CD14<sup>int</sup>, Clec5a<sup>int</sup>. Bei den Gr1<sup>low</sup> MHCII<sup>high</sup> TAM1 ist das Expressionsprofil wie folgt: CCR2<sup>high</sup>, CCL2<sup>high</sup>, CD14<sup>high</sup>, Clec5a<sup>high</sup>, CD64<sup>int</sup>, CCR5<sup>low</sup>. Gr1<sup>low</sup> MHCII<sup>low</sup> TAM2 zeigen insgesamt eher geringe Ausprägung spezifischer Marker: CCR2<sup>low</sup>, CCL2<sup>low</sup>, CD14<sup>low</sup>, IL4RA<sup>low</sup>, CCR5<sup>low</sup>, Clec5a<sup>low</sup>. Die Populationen TAM1 und IMC zeigten Überschneidungen in der Expression bei CCL2<sup>high</sup> und CCR2<sup>high</sup>. TAM1 und TAM2 überschnitten sich im CCR5<sup>low</sup> Verhalten. IMC und TAM2 zeigten dagegen keine signifikanten Überschneidungen.

**Tabelle 8: Zuordnungen spezifischer Expressionsprofile zu Zellpopulationen**

| Charakteristikum       | Zellen     |
|------------------------|------------|
| Arg1 <sup>high</sup>   | IMC        |
| CCL2 <sup>high</sup>   | IMC, TAM1  |
| CCL2 <sup>low</sup>    | TAM2       |
| CCR2 <sup>high</sup>   | IMC, TAM1  |
| CCR2 <sup>low</sup>    | TAM2       |
| CCR5 <sup>high</sup>   | IMC        |
| CCR5 <sup>low</sup>    | TAM1, TAM2 |
| CD14 <sup>high</sup>   | TAM1       |
| CD14 <sup>int</sup>    | IMC        |
| CD14 <sup>low</sup>    | TAM2       |
| CD64 <sup>high</sup>   | IMC        |
| CD64 <sup>int</sup>    | TAM2       |
| Clec5a <sup>high</sup> | TAM1       |
| Clec5a <sup>int</sup>  | IMC        |
| Clec5a <sup>low</sup>  | TAM2       |
| IL4RA <sup>low</sup>   | TAM2       |



**Abbildung 6: Analyse der Subpopulationen hepatischer TAM-Populationen anhand spezifischer Oberflächenmarker und Serumanalysen.** Die Behandlung der Tiere beinhaltete die 4 folgenden Kombinationen: (1) 24 Wochen lang keine Behandlung oder (2) eine einmalige DEN-Injektion intraperitoneal am 14. Lebenstag sowie 16 Wochen lang CCl<sub>4</sub>-Injektionen 2x/Woche oder Behandlungsoption (2) mit darüber hinausgehender Behandlung mit dem CCL2-Inhibitor mNOX-E36 (CCL2i) (3) beziehungsweise mit seinem reversen Kontrollmolekül rev-mNOX-E36 (RCCL2i) (4) 3x/Woche über 16 Wochen. Die Untersuchung der Mäuse erfolgte 48 h nach der letzten intraperitonealen CCl<sub>4</sub>-Injektion (A) Nanostring basierte mRNA-Analyse von der drei TAM-Subgruppen mit einer über dreifachen Hochregulation: ein Count repräsentiert eine mRNA-Kopie, (B) Gating-Strategie der hepatischen TAM auf infiltrierende myeloide Zellen (Gr1<sup>+</sup>MHCII<sup>low to int</sup>), TAM1 (Gr1<sup>+</sup>MHCII<sup>low</sup>).

### **3.5) Mittels Genexpressionsanalyse können den TAM-Subpopulationen weitere funktionelle Marker zugeordnet werden**

Im nächsten Schritt der Genexpressionsanalyse versuchten wir neuartige Unterscheidungskriterien der einzelnen Subpopulationen zu definieren. Dazu untersuchten wir zunächst Zellen aus Tieren, die nicht mit CCL2i behandelt wurden. Hier wiesen die TAM2 64 hochregulierte Gene auf, bei den TAM1 waren es nur 3, bei den IMC lediglich 2. Im Gegensatz dazu zeigten die IMC 123 herabregulierte Gene, TAM1 85 und TAM2 16. Dabei gab es 3 Überschneidungen zwischen IMC und TAM2, 10 zwischen TAM1 und TAM2 und 16 zwischen TAM1 und IMC.

Im Folgenden konnten wir einige Gene herausarbeiten, in deren Expression sich einzelne Populationen von den beiden anderen unterscheiden und die somit Subset-spezifisch sind. Die Statistiken hierzu sind Abbildung 7B zu entnehmen. IMC unterscheiden sich in einer signifikanten Mehrexpression von H2-Ab1 und C1qb von den beiden TAM-Populationen. Auch die Expression des MIF-Gens ist im Vergleich hoch, wenn auch nicht statistisch signifikant. Bei den TAM1 gab es deutlich höhere Werte der S100A9- und IL1 $\beta$ -Expression. Verglichen mit TAM2 und IMC wurde VEGF-A ebenfalls in der TAM1-Population vermehrt exprimiert. Bei der Population der TAM2 zeigten sich signifikant höhere Werte in den Genen für Caspase 3 und den NF $\kappa$ B-Inhibitor A. Tyrobp war ebenfalls im Vergleich erhöht, jedoch wiederum nicht signifikant.

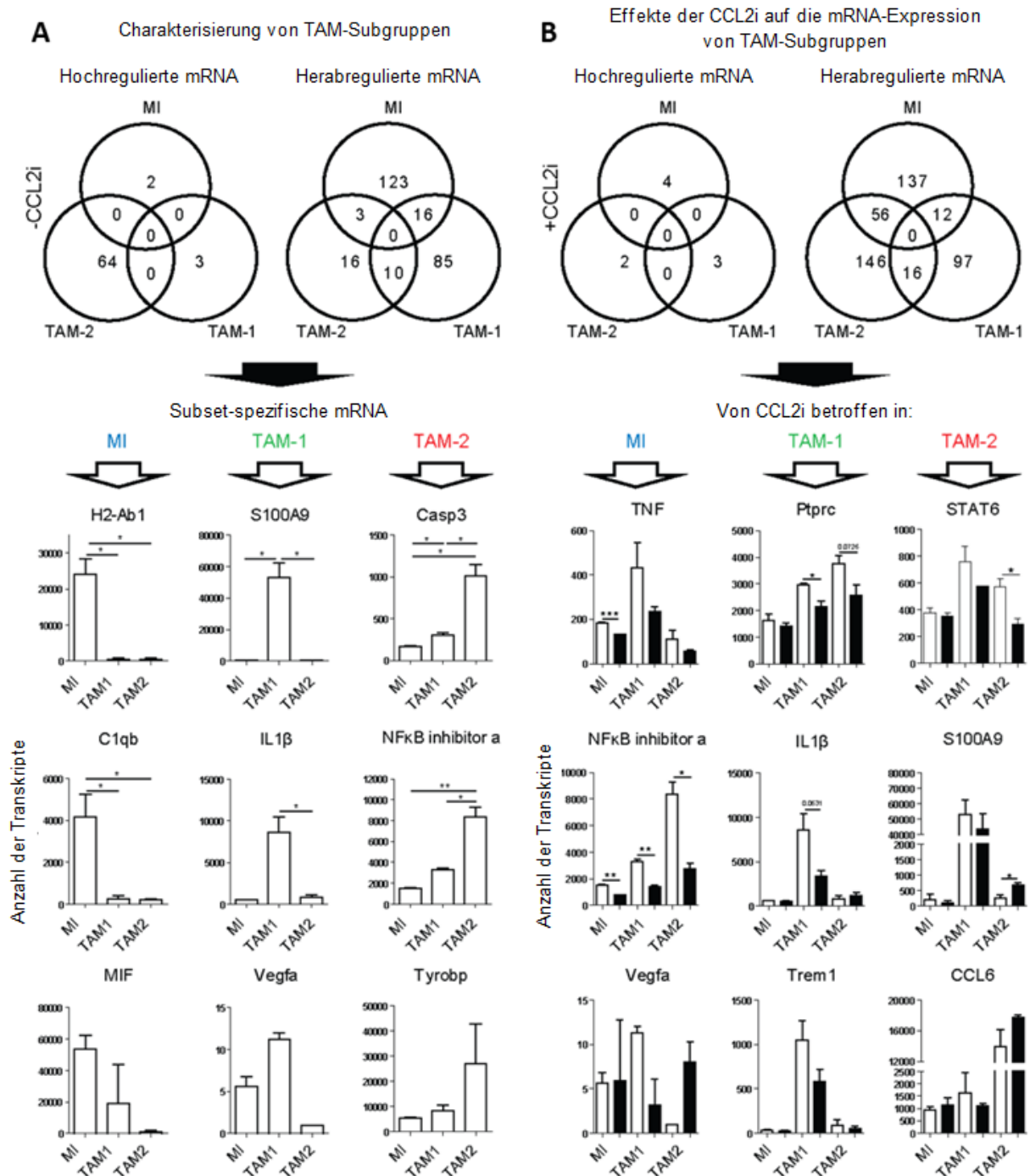
### **3.6) TAM-Subpopulationen weisen unter CCL2i eine individuell unterschiedliche, reduzierte Expression proinflammatorischer Gene auf**

In einem dritten Schritt der Genexpressionsanalyse wollten wir die Einflüsse der CCL2-Inhibition auf das Genexpressionsverhalten oben genannter TAM-Subpopulationen näher betrachten. Hierzu wurden IMC, TAM1 und TAM2 aus CCL2i-behandelten Tieren isoliert und ebenfalls mittels Nanostring-Technologie untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7B dargestellt. Unter CCL2-Inhibition lag die Zahl hochregulierter Gene bei den TAM1 bei 3, bei den TAM2 bei 2 und bei den IMC bei 4. Überschneidungen gab es hier nicht. Anders verhielt es sich mit der Zahl herabregulierter Gene. Diese lag bei den IMC bei 137, bei den TAM1 bei 97 und bei den TAM2 bei 146. Gerade in der TAM2-Population zeigte sich hiermit also eine deutliche Erhöhung im Vergleich zu den Tieren, die nicht mit CCL2i behandelt wurden (von 16 auf 146). Zwischen TAM1 und TAM2 lag

die Zahl der Überschneidungen herabregulierter Gene unter CCL2-Inhibition bei 16, IMC und TAM1 zeigten 12 Überschneidungen und IMC und TAM2 56.

Welche Gene in welcher Population genau beeinflusst wurden, zeigt der zweite Teil von Abbildung 7B. Die schwarzen Balken stehen hier für die CCL2-Inhibition. Die Expression von TNF zeigte sich in allen Populationen vermindert, im Falle der IMC signifikant. Auch die Ausbildung des NF $\kappa$ B-Rezeptors ist in allen Subsets vermindert, hier bei jeder Population signifikant. Ein ähnliches Verhalten zeigte Ptprc, hier bestand eine Signifikanz bei TAM1. STAT6 zeigte sich leicht reduziert in TAM1, signifikant dagegen in TAM2. Die IL1 $\beta$ -Expression war in MI und in TAM2 weder ohne, noch mit CCL2-Inhibition ausgeprägt. TAM1 zeigten ohne CCL2-Inhibition einen hohen Wert, der durch den CCL2i reduziert wurde. S100A9 war noch im vorigen Abschnitt allein in der TAM1-Population exprimiert worden, durch den CCL2i exprimierten auch TAM2 dieses Gen vermehrt. Eine ähnliche Hochregulation in TAM2 zeigte sich auch für VEGF-A. Lag dessen Expression ohne CCL2-Inhibition noch bei einem sehr geringen Wert, zeigte sich eine deutliche Erhöhung bei CCL2i-behandelten Tieren. Interessanterweise zeigte sich eine gegensätzliche Reaktion in TAM1. Hier wurde VEGF-A durch die CCL2-Inhibition auf weniger als die Hälfte reduziert. Auch Trem1 zeigte eine Expressionsreduktion in TAM1, während sich seine Werte in IMC und TAM2 unverändert darstellten. CCL6 verhielt sich sowohl ohne als auch mit CCL2-Inhibition in IMC und TAM1 ähnlich gering. TAM2 exprimierten es dagegen auch ohne CCL2-Inhibitor vermehrt, verglichen zu den beiden anderen Populationen. Die Expression wurde durch den CCL2i noch leicht erhöht.

Zusammenfassend zeigte sich unter CCL2-Inhibition eine Herabregulation wichtiger proinflammatorischer Gene in allen Populationen, v.a. NF $\kappa$ B-Rezeptor und TNF $\alpha$ , letzterer insbesondere in IMC. Interessanterweise war *Vegfa* in TAM1 reduziert und in TAM2 erhöht. Andere Chemokin-Liganden, wie zum Beispiel CCL6, waren kaum von der CCL2-Inhibition beeinflusst.



**Abbildung 7: Analyse der Subpopulationen hepatischer Tumor-assoziiierter Makrophagen mittels Cell Sorting und mRNA-Profiling.** Die Behandlung der Tiere beinhaltete die 4 folgenden Kombinationen: (1) 24 Wochen lang keine Behandlung oder (2) eine einmalige DEN-Injektion intraperitoneal am 14. Lebenstag sowie 16 Wochen lang CCl<sub>4</sub>-Injektionen 2x/Woche oder Behandlungsoption (2) mit darüber hinausgehender Behandlung mit dem CCL2-Inhibitor mNOX-E36 (CCL2i) (3) beziehungsweise mit seinem reversen Kontrollmolekül rev-mNOX-E36 (RCCL2i) (4) 3x/Woche über 16 Wochen. Die Untersuchung der Mäuse erfolgte 48 h nach der letzten intraperitonealen CCl<sub>4</sub>-Injektion. (A) Charakterisierung der unterschiedlichen TAM-Subpopulationen anhand Subset-spezifischer mRNA-Profile, dargestellt sind die Anzahl hoch- und herabregulierter Gene, in denen sich die Subpopulationen überschneiden, sowie die Anzahl unterschiedlich regulierter Gene sowie exemplarische Unterschiede beim Transcript count verschiedener Gene innerhalb der Populationen. (B) Effekte der CCL2i auf TAM-Subpopulationen. Dargestellt ist die Zahl der durch die CCL2i herauf- und herabregulierten Gene sowie exemplarisch Unterschiede der einzelnen Populationen.

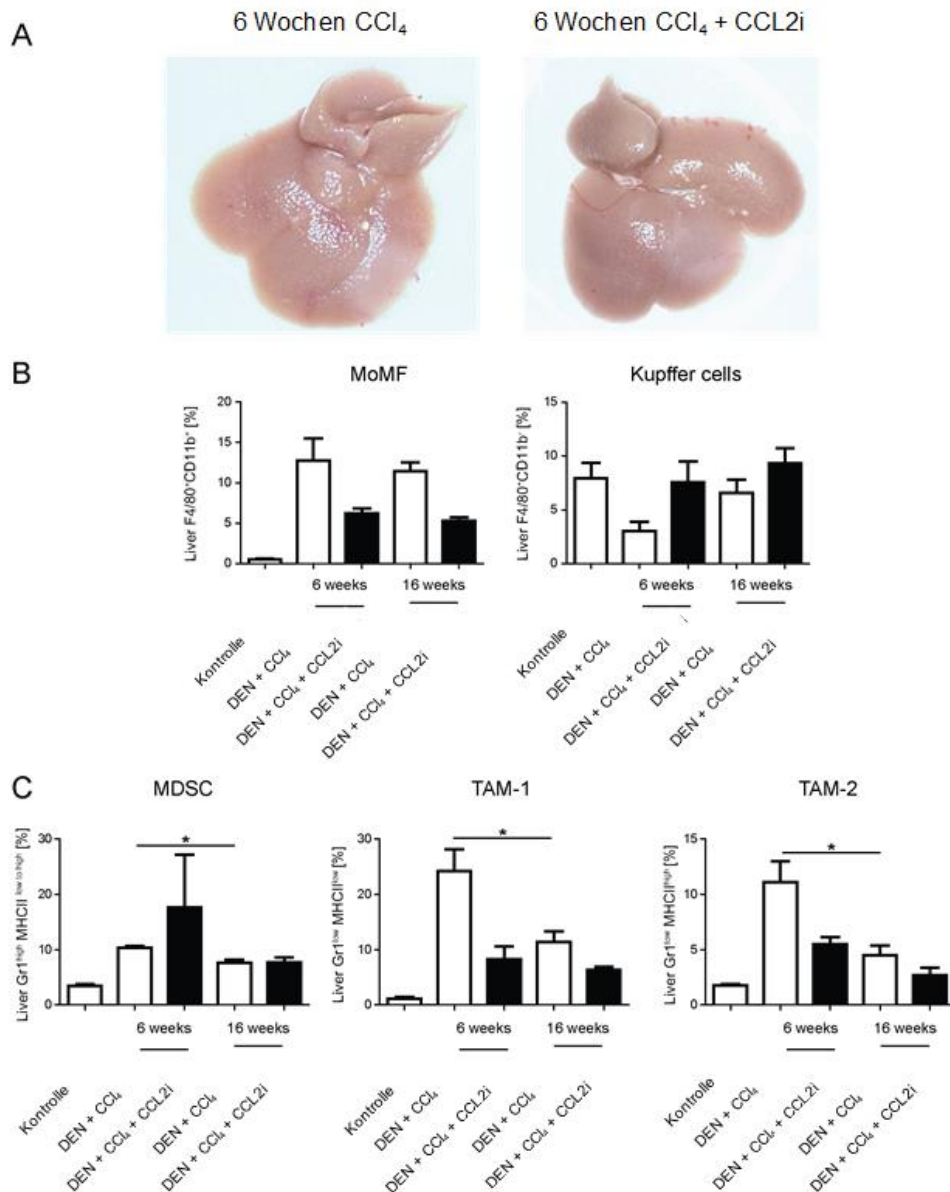


### **3.7) Auswirkungen der CCL2-Inhibition im Frühstadium der Tumorbildung**

In den vorherigen Abschnitten konnte gezeigt werden, welche Auswirkungen das oben beschriebene Fibrose-HCC-Modell auf die Tumorlast, die Angiogenese sowie verschiedene Makrophagensubpopulationen hat und inwiefern diese durch CCL2-Inhibition beeinflusst werden. Zum Zeitpunkt der Untersuchung (24 Wochen) lag bei den Tieren bereits eine hohe Tumorlast vor. Um zu ermitteln, ob das Modell oder die CCL2-Inhibition in frühen Tumorstadien Auswirkungen zeigen und wie diese gestaltet sind, führten wir eine weitere Untersuchung durch. Das Modell entsprach dabei dem im Teil „Methoden“ aufgeführten Fibrose-HCC-Modell, der Untersuchungszeitpunkt lag jedoch schon bei Woche 14 und nicht bei Woche 24. Die so behandelten Tiere erhielten also eine DEN-Injektion in der zweiten Lebenswoche sowie von Woche 8 an über 6 Wochen zweimal wöchentlich CCl<sub>4</sub>-Injektionen. mNOX-E36 wurde über den gesamten Zeitraum der CCl<sub>4</sub>-Behandlung appliziert.

Abbildung 8A zeigt exemplarisch eine makroskopische Aufnahme einer solchen Leber, Die Abbildungen 8B und 8C zeigen die Statistik der durchflusszytometrisch gemessenen Lebermakrophagen, verglichen mit den Werten der Tiere, die im Alter von 24 Wochen untersucht wurden. Die Werte sind, wie schon in vorigen Abschnitten, in Prozent aller CD45<sup>+</sup> Zellen angegeben. Weder bei Tieren mit DEN + CCl<sub>4</sub> Behandlung noch bei Tieren, die zusätzlich den CCL2i erhielten, zeigten sich zu diesem Zeitpunkt Tumoren. Die im Bild vereinzelt sichtbaren weißlichen Knoten stellten sich histologisch als Regeneratknoten, die bei Leberfibrose auftreten können, heraus. Bezüglich MoMF zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen 14 und 24 Wochen alten Tieren, beide Werte lagen ungefähr bei 12%. Dagegen ließ sich auch nach 14 Wochen schon eine Reduktion der MoMF durch mNOX-E36 feststellen. Kupffer-Zellen stellten nach 14 Wochen ungefähr 3-4% aller CD45<sup>+</sup> Zellen und damit ungefähr 50% ihres Wertes nach 24 Wochen. Bei CCL2i-behandelten Tieren stellten wir zum 14-Wochen-Zeitpunkt eine Vergrößerung der KC-Population fest, die im Bereich des Kontrollwertes bei ungefähr 8% lag. Im Falle der TAM-Subpopulationen konnten wir ebenfalls Veränderungen nach 14 Wochen zeigen, v.a. bei nicht CCL2i-behandelten Tieren. Bei diesen lag die Population der IMC nach 14 Wochen bei etwa 10% und war damit signifikant höher als

nach 24 Wochen mit ungefähr 27%. Ihr Mittelwert in der CCL2i-Gruppe lag dagegen unter hohen Schwankungen bei 15%. Unter DEN + CCl<sub>4</sub> Behandlung stellte die TAM1-Population nach 14 Wochen etwas mehr als 20% und war damit signifikant höher als nach 24 Wochen (10%). CCL2-Inhibition führte nach 14 Wochen auch zu einer TAM1-Reduktion auf knapp unter 10%. Damit lag dieser Wert ungefähr auf einer Höhe mit dem von CCL2i-behandelten Tieren, die nach 24 Wochen untersucht wurden. Ein ähnliches Bild zeigte auch die TAM2-Population. Nach 14 Wochen machte die TAM2-Subpopulation im Mittel 12% aller CD45<sup>+</sup> Zellen in der Leber aus, nach 24 Wochen waren es knapp 5%. Die CCL2i-Behandlung reduzierte die TAM2-Zahl zum frühen Untersuchungszeitpunkt auf etwas über 5%. Zusammenfassend zeigten sich bei einem 14-wöchigen DEN-CCl<sub>4</sub> Modell noch keine Tumoren, jedoch bereits Veränderungen innerhalb der Makrophagenpopulationen, die zusätzlich Einflüssen der CCL2-Inhibition unterlagen.



**Abbildung 8: Makroskopische sowie durchflusszytometrische Analyse von 14 Wochen alten Tieren nach DEN-/CCl<sub>4</sub>-/CCL2i-/RCCL2i-Behandlung.** Die Mäuse erhielten 14 Wochen lang keine Behandlung oder 8 Wochen 2x/Woche intraperitoneale CCl<sub>4</sub>-Injektionen oder zusätzlich eine einmalige DEN-Injektion intraperitoneal am 14. Lebenstag und zusätzlich 8 Wochen 2x/Woche intraperitoneale CCl<sub>4</sub>-Injektionen oder sie wurden darüber hinaus mit dem CCL2-Inhibitor mNOX-E36 (CCL2i) beziehungsweise seinem reversen Kontrollmolekül rev-mNOX-E36 3x/Woche subkutan behandelt. Die Untersuchung der Mäuse erfolgte 48 h nach der letzten intraperitonealen CCl<sub>4</sub>-Injektion. Nach 14 Wochen zeigten sich bereits Veränderungen bei den TAM-Populationen, jedoch noch kein Tumorwachstum.

### 3.6) Lymphozyten in der Leber werden nur in sehr geringem Ausmaß von der CCL2-Inhibition beeinflusst

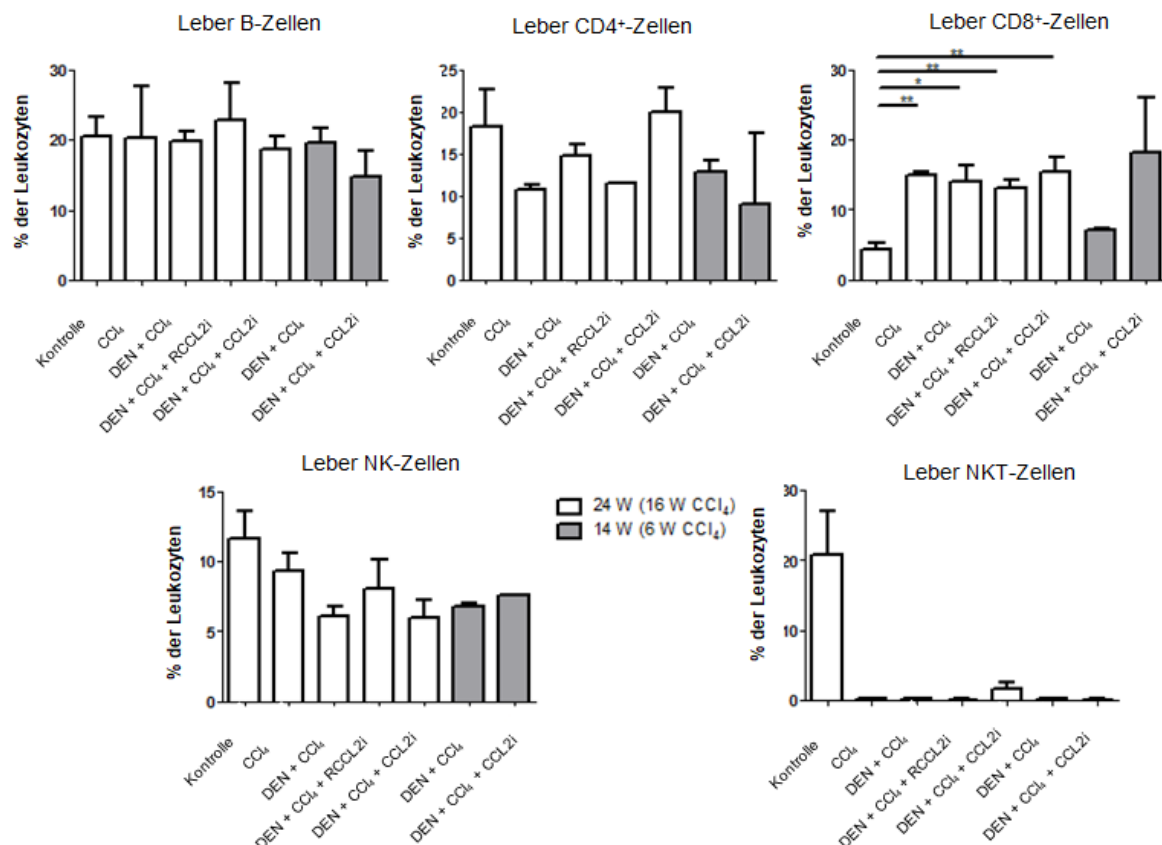
Wir konnten bisher zeigen, dass die Inhibition von CCL2 über 16 Wochen die Infiltration von Makrophagen in die Leber reduziert und Einflüsse auf die Genexpression verschiedener Makrophagen-Subpopulationen hatte. Die Frage, inwieweit auch andere

Leukozytenpopulationen in der Leber betroffen waren, blieb jedoch noch unbeantwortet. Aus diesem Grund ermittelten wir die Prozentwerte dieser Populationen in Bezug auf alle CD45<sup>+</sup> Zellen in der Durchflusszytometrie anhand von Leberproben, wie im Abschnitt „Methoden“ beschrieben. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen, geordnet nach jeweiliger Population. Zur besseren Übersicht sind alle Konditionen enthalten, Gruppen, die nach 14 statt nach 24 Wochen getötet wurden, sind grau eingefärbt.

Der Anteil von B-Lymphozyten in der Leber lag in fast allen Gruppen bei ungefähr 20%, schwankte lediglich in Tieren, die nur mit CCl<sub>4</sub> behandelt wurden sowie in der RCCL2i-Gruppe. Tiere, die den CCL2i erhielten und nach 14 Wochen getötet wurden, wiesen mit im Mittel 15% einen leicht verringerten B-Zell-Anteil auf, der jedoch nicht signifikant war. Höhere Schwankungen mit höheren Standardabweichungen gab es in der Population der CD4<sup>+</sup> Zellen. Kontrolltiere, die nur mit Öl behandelt wurden, zeigten einen CD4<sup>+</sup> Anteil von ungefähr 18%, die Tiere, die nur mit CCl<sub>4</sub> behandelt wurden sowie die RCCL2i-Gruppe lagen bei jeweils 10%. Die Gruppe mit DEN + CCl<sub>4</sub> Behandlung zeigte einen Wert von 15%. Im Fall der CCL2-inhibierten Tiere lag der Anteil bei ungefähr 20%. Ohne CCL2-Inhibition lagen die CD4<sup>+</sup> Zellen bei 14 Wochen alten Tieren bei ungefähr 13%, mit CCL2-Inhibition bei im Mittel 8%, jedoch unter hohen Schwankungen. Hier gab es keine signifikanten Unterschiede. Der Anteil CD8<sup>+</sup> Zellen lag bei Öl-Kontrolltieren bei knapp unter 5%. In der CCl<sub>4</sub>-, der DEN + CCl<sub>4</sub>-, der RCCL2i- und der CCL2i-Gruppe lag der Anteil bei etwa 14%. In jedem dieser Fälle bestand eine statistische Signifikanz verglichen mit der Öl-Kontroll-Gruppe. Tiere, die nach 14 Wochen untersucht wurden, zeigten ohne CCL2i-Behandlung Werte von um die 7%, mit CCL2-Inhibition unter hohen Schwankungen von im Mittel 17%. Bei den NK-Zellen lag der Anteil bei mit Öl behandelten Tieren bei ungefähr 11%. Nur mit CCl<sub>4</sub> behandelte Tiere wiesen Werte von im Mittel 9% auf. Tumor-tragende Tiere, die mit DEN + CCl<sub>4</sub> behandelt wurden sowie Tiere mit zusätzlicher CCL2-Inhibition zeigten Werte von 6%. Unter RCCLi-Therapie lag der Anteil bei knapp unter 8%. Bei 14 Wochen alten Tieren zeigte sich ein Anteil sowohl mit CCL2-Inhibition als auch ohne von ungefähr 7%. Auch in dieser Population gab es keine signifikanten Unterschiede. Bei den NKT-Zellen zeigte sich bei nahezu allen Gruppen ein homogenes Bild, mit Anteilen von unter 0,5%. Lediglich in CCL2-inhibierten Tieren lag der Wert bei ungefähr

1%. Stark abweichend zeigte sich hier die Öl-Kontroll-Gruppe mit einer hohen Standardabweichung und einem Mittelwert von 20%.

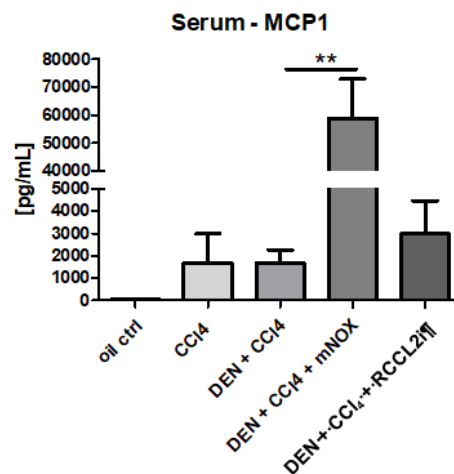
Zusammenfassend zeigten sich in Bezug auf Lymphozyten in der Leber zwar Unterschiede zwischen gesunden Tieren und Tieren mit Fibrose und/oder Lebertumoren, jedoch keine signifikante Beeinflussung durch die CCL2-Inhibition.



**Abbildung 9: Einfluss der CCL2-Inhibition auf die Lymphozyten in der Leber.** Die Behandlung der Tiere beinhaltete die folgenden Kombinationen: (1) 24 Wochen lang keine Behandlung oder (2) eine einmalige DEN-Injektion intraperitoneal am 14. Lebenstag sowie 16 Wochen lang CCl<sub>4</sub>-Injektionen 2x/Woche oder Behandlungsoption (2) mit darüber hinausgehender Behandlung mit dem CCL2-Inhibitor mNOX-E36 (CCL2i) (3) beziehungsweise mit seinem reversen Kontrollmolekül rev-mNOX-E36 (RCCL2i) (4) 3x/Woche über 16 Wochen. Die grau markierten Gruppen erhielten ein verkürztes Schema mit 6-wöchiger CCl<sub>4</sub>, beziehungsweise CCL2i-Behandlung. Die Untersuchung der Mäuse erfolgte 48 h nach der letzten intraperitonealen CCl<sub>4</sub>-Injektion.

Nach einer Untersuchung der Leberlymphozyten, wollten wir ermitteln, welche Veränderungen sich durch eine CCL2-Inhibition in den Systemen Blut und Knochenmark zeigen. Hierzu bestimmten wir zunächst das Serum-MCP (= CCL2). Abbildung 10 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. In gesunden Tieren lässt sich das Serum-MCP1 fast nicht nachweisen. Tiere unter CCl<sub>4</sub> Behandlung sowie unter Behandlung mit DEN + CCl<sub>4</sub> zeigten einen Mittelwert von ungefähr 1500 pg/ml. Unter zusätzlicher RCCL2i-Therapie lag der Mittelwert bei ungefähr 3000 pg/ml. Dagegen

wiesen Tiere mit CCL2i-Behandlung deutliche Unterschiede mit hoher Signifikanz auf. Hier lag der Mittelwert bei knapp unter 60.000 pg/ml.



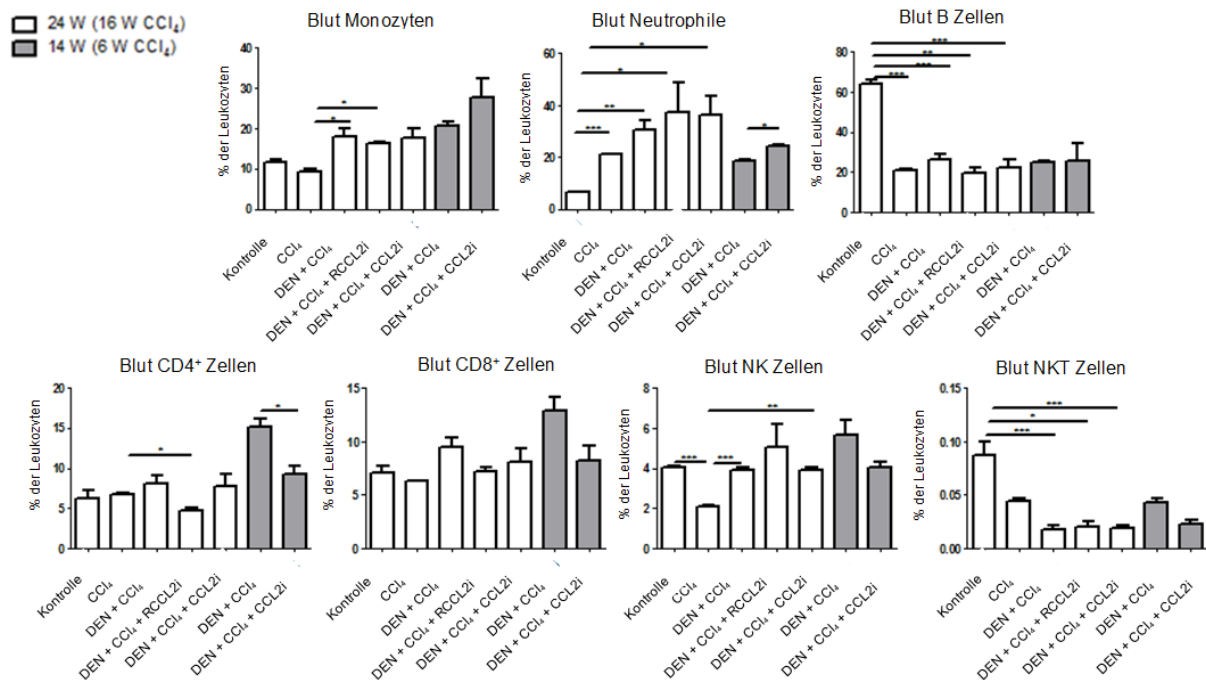
**Abbildung 10: Serum-MCP1-Spiegel.** Die Mäuse erhielten 24 Wochen lang keine Behandlung oder 16 Wochen 2x/Woche intraperitoneale CCl<sub>4</sub>-Injektionen oder zusätzlich eine einmalige DEN-Injektion intraperitoneal am 14. Lebenstag und zusätzlich 16 Wochen 2x/Woche intraperitoneale CCl<sub>4</sub>-Injektionen oder sie wurden darüber hinaus mit dem CCL2-Inhibitor mNOX-E36 (CCL2i) beziehungsweise seinem reversen Kontrollmolekül rev-mNOX-E36 3x/Woche subkutan behandelt.

Zur Untersuchung von Veränderungen durch die Inhibition von CCL2 in leukozytären Populationen der Systeme Blut und Knochenmark ermittelten wir durchflusszytometrisch ihre prozentualen Anteile. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt. Wie schon in Abbildung 9 (Leber-Lymphozyten) sind die Tiere, die im Alter von 24 Wochen getötet wurden, weiß dargestellt. Gruppen, die zum Untersuchungszeitpunkt 14 Wochen alt waren, sind grau eingefärbt.

Monozyten zeigten in gesunden Tieren einen Anteil von ungefähr 11%, bei Tieren, die nur mit CCl<sub>4</sub> behandelt wurden, lagen die Werte bei im Mittel 9%. Sowohl unter Behandlung mit DEN + CCl<sub>4</sub> als auch unter zusätzlicher CCL2i-Behandlung erhöhte sich die Zahl auf ungefähr 18% und unterschied sich damit nur unwesentlich von einer zusätzlichen RCCL2i-Behandlung, durch die der Monozyten-Anteil einen Mittelwert von ungefähr 17% aufwies. Bei den neutrophilen Granulozyten lag ein Anteil von etwa 6% in gesunden Tieren vor. Bei CCl<sub>4</sub> behandelten Tieren machten sie ungefähr 20% der Leukozyten aus, bei Tieren der DEN + CCl<sub>4</sub> Gruppe fast 30% und sowohl unter zusätzlicher CCL2i- als auch unter RCCL2i-Behandlung stellten sie einen Anteil von ungefähr 35%. Verglichen mit gesunden Tieren waren all diese Unterschiede signifikant. Bei 14 Wochen alten Tieren lag der Anteil der Neutrophilen ohne CCL2i-

Behandlung bei knapp unter 20% und erhöhte sich mit der CCL2i-Therapie auf knapp über 20%. Auch hier war der Unterschied signifikant.

Auch lymphozytäre Zellen waren in die Untersuchung eingeschlossen. Gesunde Tiere hatten im Alter von 24 Wochen einen B-Zell-Anteil im Blut von ungefähr 60%. In den anderen 24 Wochen alten Gruppen schwankte dieser Anteil um die 20% und war somit jeweils signifikant verändert. Bei Tieren, die im Alter von 24 Wochen untersucht wurden, machten die B-Zellen sowohl mit als auch ohne CCL2-Inhibition etwa 20% der Gesamtleukozyten aus. Der Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen lag bei gesunden Tieren und bei Tieren, die nur die CCl<sub>4</sub> Behandlung durchlaufen hatten, bei ungefähr 6%. Bei DEN + CCl<sub>4</sub> behandelten Tieren und bei zusätzlicher CCL2-Inhibition erhöhte sich dieser Wert auf 7%. Die RCCL2i-Behandlung senkte den Anteil der CD4<sup>+</sup> Zellen wiederum auf 4%. Hier bestand eine statistische Signifikanz verglichen mit CCl<sub>4</sub> behandelten Tieren. 14 Wochen alte Tiere zeigten einen Anteil von 15%, der sich durch CCL2-Inhibition auf knapp unter 10% reduzierte. CD8<sup>+</sup> Zellen schwankten in der Öl-Kontrolle, der CCl<sub>4</sub> Gruppe, RCCL2i- und CCL2i-behandelten Tieren im Mittel zwischen 6 und 8%. Lediglich bei Tieren der DEN + CCl<sub>4</sub> Gruppe erhöhte sich dieser Wert auf knapp unter 10%. DEN + CCl<sub>4</sub> behandelte Tiere, die nach 14 Wochen untersucht wurden, zeigten mit ungefähr 12% den höchsten CD8<sup>+</sup> Anteil, der sich bei CCL2-Inhibition auf ungefähr 7% senkte. Natürliche Killerzellen (NK) machten im Blut von 24 Wochen alten gesunden Tieren, Tieren mit DEN + CCl<sub>4</sub> Behandlung und Tieren mit zusätzlicher CCL2i-Behandlung jeweils 4% aller Leukozyten aus. Im Fall der CCl<sub>4</sub> Gruppe lag dieser Anteil bei 2% und war somit, verglichen mit den drei vorhergenannten Gruppen, statistisch signifikant verändert. Unter RCCL2i-Behandlung zeigte sich ein Mittelwert von etwa 5%. Im Alter von 14 Wochen stellten die NK ohne CCL2i 6% der Leukozyten, mit CCL2i etwa 4%. Im Blut lagen die NKT in nur geringer Zahl vor. Bei gesunden Tieren im Alter von 24 Wochen stellten sie etwa 0,9% aller gemessenen Leukozyten im Blut, bei Tieren mit CCl<sub>4</sub> Behandlung etwa 0,5%, bei DEN + CCl<sub>4</sub> behandelten Tieren sowie unter zusätzlicher CCL2i- und RCCL2i-Behandlung jeweils knapp 0,2%. Somit unterschieden sich die gesunden Tiere in dieser Altersgruppe signifikant von den Gruppen, die eine Behandlung durchliefen. 14 Wochen alte Tiere ohne CCL2-Inhibition zeigten Werte von ungefähr 0,4%, CCL2i-behandelte Tiere wiesen einen NKT-Anteil von ungefähr 0,2% auf.



**Abbildung 11: Einflüsse der CCL2i auf Leukozyten im Blut.** Die Behandlung der Tiere beinhaltete die folgenden Kombinationen: (1) 24 Wochen lang keine Behandlung oder (2) eine einmalige DEN-Injektion intraperitoneal am 14. Lebenstag sowie 16 Wochen lang CCl<sub>4</sub>-Injektionen 2x/Woche oder Behandlungsoption (2) mit darüber hinausgehender Behandlung mit dem CCL2-Inhibitor mNOX-E36 (CCL2i) (3) beziehungsweise mit seinem reversen Kontrollmolekül rev-mNOX-E36 (RCCL2i) (4) 3x/Woche über 16 Wochen. Die grau markierten Gruppen erhielten ein verkürztes Schema mit 6-wöchiger CCl<sub>4</sub>, beziehungsweise CCL2i-Behandlung. Die Untersuchung der Mäuse erfolgte 48 h nach der letzten intraperitonealen CCl<sub>4</sub>-Injektion.

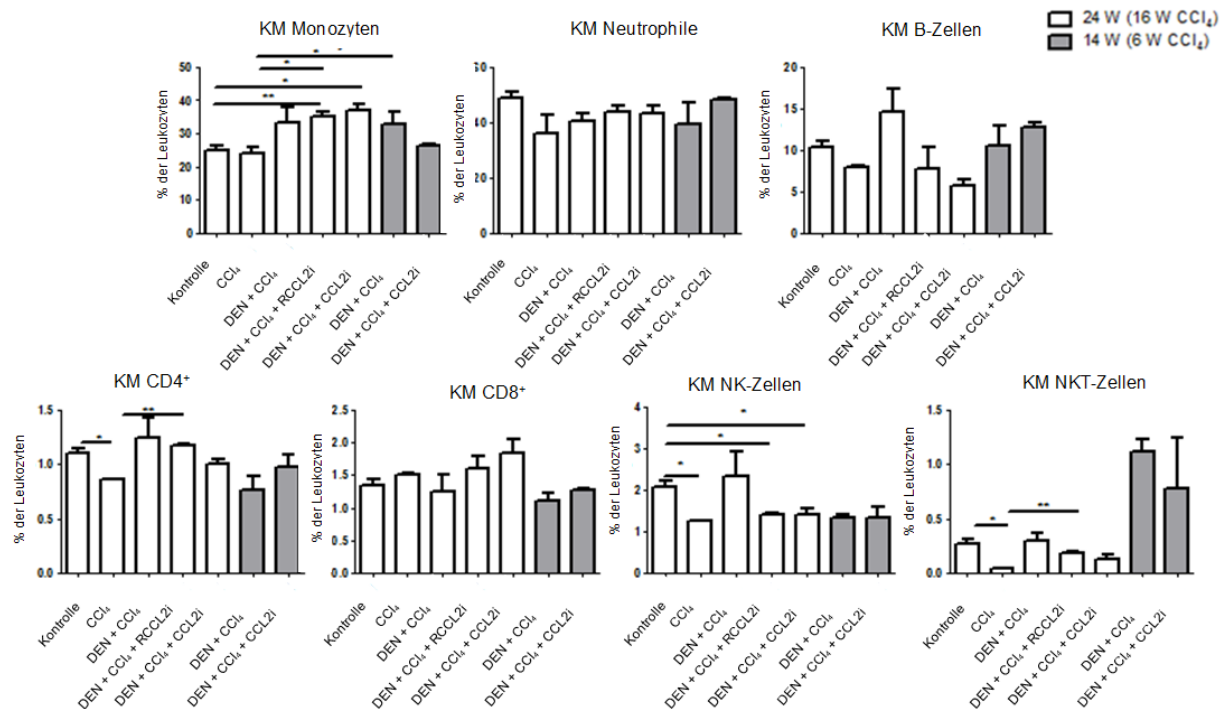
Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Knochenmarksuntersuchung sind in Abbildung 12 dargestellt.

Im Knochenmark stellten Monozyten bei 24 Wochen alten gesunden Tieren und bei Tieren, die nur CCl<sub>4</sub> erhalten hatten, einen Anteil von etwa 24% aller gemessenen Leukozyten. DEN + CCl<sub>4</sub> behandelte Tiere dieser Altersgruppe zeigten einen Monozytenanteil von ungefähr 33%, RCCL2i-behandelte Tiere einen Mittelwert von etwa 35%, der unter CCL2-Inhibition auf etwa 37% anstieg. Signifikante Unterschiede bestanden zwischen gesunden Tieren und Tieren mit RCCL2i- und CCL2i-Behandlung sowie zwischen Tieren mit CCl<sub>4</sub> Behandlung und RCCL2i- und CCL2i-Therapie. In 14 Wochen alten Tieren lag der Monozytenanteil bei etwa 30% ohne CCL2-Inhibition sowie bei etwa 25% mit CCL2-Inhibition. Neutrophile Granulozyten bildeten im Knochenmark gesunder Tiere einen Anteil von etwas unter 50%, bei CCl<sub>4</sub> behandelten Tieren etwa 33%, und sowohl bei Tieren mit DEN + CCl<sub>4</sub> Behandlung, als auch bei Tieren mit zusätzlicher RCCL2- und CCL2-Inhibition bei etwa 40%. Tiere im Alter von 14 Wochen



zeigten unter DEN + CCl<sub>4</sub> Behandlung im Knochenmark einen Neutrophilen-Anteil von knapp unter 40%, mit CCL2-Inhibitor etwa 50%.

Von den lymphozytären Zellen stellten die B-Zellen im Knochenmark die größte Fraktion. Hier zeigte sich ein Anteil von etwa 10% in gesunden Tieren, etwa 7% in CCl<sub>4</sub> behandelten Tieren und Tieren mit RCCL2i-Behandlung, im Mittel etwa 15% bei Tieren mit durchlaufener DEN + CCl<sub>4</sub> Behandlung und etwa 5% bei den Tieren, die den CCL2-Inhibitor erhielten. 14 Wochen alte Tiere ohne CCL2-Inhibition zeigten einen B-Zellen-Anteil von etwa 10%, mit CCL2-Inhibition lag dieser Wert im Mittel bei 13%. CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten stellten etwa 1% aller Leukozyten in gesunden Tieren und Tieren mit CCL2i-Behandlung, etwa 0,8% in CCl<sub>4</sub> behandelten Tieren, im Mittel etwa 1,2% bei Tieren mit DEN + CCl<sub>4</sub> Behandlung sowie Tieren mit zusätzlicher RCCL2i-Therapie. Signifikante Unterschiede lagen hier zwischen CCl<sub>4</sub> behandelten Tieren und gesunden Tieren vor sowie zwischen CCl<sub>4</sub> behandelten Tieren und den Tieren, die den RCCL2-Inhibitor erhalten hatten. Der Anteil CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten schwankte im Mittel in allen Gruppen im Alter von 24 Wochen zwischen 1,4 und etwa 1,8%. Signifikante Unterschiede lagen hier nicht vor. Bei 14 Wochen alten Tieren lag der Anteil sowohl bei Tieren mit und ohne CCL2-Behandlung bei etwa 1,2%. NK stellten im Knochenmark gesunder Tiere und bei Tieren mit durchlaufener DEN + CCl<sub>4</sub> Behandlung etwa 2% aller Leukozyten. Tiere, die nur mit CCl<sub>4</sub> behandelt wurden, sowie Tiere, die den CCL2- oder RCCL2-Inhibitor erhalten hatten zeigten im Knochenmark einen NK-Anteil von etwa 1,2%. Statistische Signifikanz bestand hier zwischen den gesunden Tieren und den Tieren, die mit CCl<sub>4</sub> behandelt wurden und der CCL2i- sowie der RCCL2i-Gruppe. Bei 14 Wochen alten Tieren stellten die NK etwa 1,2% der Leukozyten im Knochenmark, sowohl mit als auch ohne CCL2-Inhibition. NKT bildeten bei gesunden Tieren sowie bei Tieren mit DEN + CCl<sub>4</sub> Behandlung etwa 0,3% der Knochenmarksleukozyten. Bei CCl<sub>4</sub> behandelten Tieren machten weniger als 0,1% aus. Tiere mit CCL2i- oder RCCL2i-Behandlung wiesen einen Anteil von etwas unter 0,2% auf. Statistisch signifikante Unterschiede bestanden zwischen CCl<sub>4</sub> behandelten Tieren und gesunden sowie mit RCCL2i behandelten Tieren. Zum Untersuchungszeitpunkt nach 14 Wochen machten die NKT einen höheren Anteil aus. Ohne CCL2-Inhibition lag ihr Anteil hier bei etwa 1%, mit CCL2-Inhibition unter hoher Standardabweichung bei etwa 0,7%.



**Abbildung 12: Einflüsse der CCL2i auf Leukozyten im Knochenmark.** Die Behandlung der Tiere beinhaltete die folgenden Kombinationen: (1) 24 Wochen lang keine Behandlung oder (2) eine einmalige DEN-Injektion intraperitoneal am 14. Lebenstag sowie 16 Wochen lang CCl<sub>4</sub>-Injektionen 2x/Woche oder Behandlungsoption (2) mit darüber hinausgehender Behandlung mit dem CCL2-Inhibitor mNOX-E36 (CCL2i) (3) beziehungsweise mit seinem reversen Kontrollmolekül rev-mNOX-E36 (RCCL2i) (4) 3x/Woche über 16 Wochen. Die grau markierten Gruppen erhielten ein verkürztes Schema mit 6-wöchiger CCl<sub>4</sub>, beziehungsweise CCL2i-Behandlung. Die Untersuchung der Mäuse erfolgte 48 h nach der letzten intraperitonealen CCl<sub>4</sub>-Injektion.

Zusammenfassend zeigten sich auch im Knochenmark in Bezug auf verschiedene Leukozytenpopulationen zwar große Veränderungen durch die unterschiedlichen Schädigungsmodelle, die Einflüsse der CCL2-Inhibition fielen jedoch eher gering aus.

## 4.) Diskussion

### 4.1) Proinflammatorische TAM-Populationen beeinflussen die Angiogenese in fibrotischen Lebern mit Hepatozellulärem Karzinom

TAM gelten immer mehr als sinnvolle Ziele einer gegen Tumorerkrankungen gerichteten Therapie (Mantovani et al. 2017). Hoves *et al.* zeigten erst kürzlich, dass TAM, die durch CD40 Stimulation und CSF auf ein proinflammatorisches Programm eingestellt wurden, die antitumorale Immunität begünstigen (Hoves et al. 2018; Perry et al. 2018). Solche Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass eine immunologische Beeinflussung dieser Zellen eine sinnvolle Ergänzung zur bisherigen zytoreduktiven Therapie, wie z. B. Chemotherapie, Strahlentherapie oder lokale Ablationsverfahren sowie bisherigen Immuntherapien solider Tumoren darstellen (Mantovani et al. 2017).

Das HCC entsteht fast ausschließlich in chronisch entzündetem Lebergewebe, wie z.B. auf dem Boden einer Leberzirrhose. Gerade in Bezug auf die Leberzirrhose hatte sich schon zuvor gezeigt, dass verschiedene Subtypen von Makrophagen Schlüsselrollen bei der Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion, dem Fortschreiten der Erkrankung sowie dem (fehlerhaften) *Tissue-Remodeling* einnehmen (Krenkel & Tacke 2017). In Lebertumormodellen nahmen myeloide Zellen in der Regel eine immunsupprimierende Rolle ein und gingen somit mit einer verschlechterten Prognose einher (Wan et al. 2015). Aus diesen Gründen bietet die für HCC charakteristische Sequenz einer lange andauernden Lebererkrankung über die Entstehung einer Zirrhose bis hin zur Entwicklung eines HCC mit der Reprogrammierung von Makrophagen weitere therapeutische Ansätze (Ringelhan et al. 2018; Tacke 2017).

Hepatische Makrophagen bestehen aus verschiedenen heterogenen Subgruppen. Die klassischen Kupffer-Zellen stammen von lokalen Vorläuferzellen, während der Großteil der Lebermakrophagen im entzündeten Lebergewebe Gewebe-infiltrierenden Monozyten aus dem Knochenmark entstammt (Krenkel & Tacke 2017). In dieser Arbeit stellten wir die Hypothese auf, dass eine Inhibition des Chemokins CCL2, welches die Infiltration solcher von Monozyten abstammenden Makrophagen steuert, in einem kombinierten Fibrose-HCC-Modell Einfluss auf das Tumor-Wachstum und den Tumorprogress hat.

In einer Reihe mit Daten aus Patienten-Kohorten mit HCC (Ding et al. 2009; Kuang et al. 2009, Li et al. 2017), konnten wir CCR2<sup>+</sup> Makrophagen in histologischen HCC-Präparaten von Tumoren und Tumor-umgebendem Gewebe beobachten. Diese Makrophagen exprimierten eher den inflammatorischen Marker S100A9 als CD163, was die Vermutung nahe legt, dass diese TAM nicht zu einer typischen suppressiven Population gehören. Diese CCR2<sup>+</sup> Makrophagen fanden sich v. a. an Orten neu entstehender Blutgefäße, wie eine CD31-Färbung verdeutlichte. Diese Daten passen gut zu zuvor veröffentlichten Daten, die die wichtige Rolle der CCR2<sup>+</sup> Makrophagen bei der Angiogenese in zirrhotischen Lebern herausstellte (Ehling et al. 2014).

#### **4.2) Die Reduktion der TAM1-Makrophagen führt zu einer Reduktion der Angiogenese in einem Fibrose-HCC-Modell**

Angiogenese, die Gefäß(neu)bildung, wird als wichtiger Schritt in der Entstehung von Krebs und seinem Fortschritt betrachtet (Hanahan & Weinberg 2011). Sie sorgt schließlich für die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und später aufgrund des Gefäßreichtums für eine erleichterte Metastasierung (Zhang & Friedman 2012). Es wurde gezeigt, dass TAM die pathogene Angiogenese in verschiedenen Tumorarten fördern können (Abou-Elkacem et al. 2013; Noy & Pollard 2014), jedoch wurde der Phänotyp Angiogenese fördernder Makrophagen bisher nicht eindeutig beschrieben. *In vitro* sowie nach Implantation in Mäuse wiesen M2-polarisierte Makrophagen ein höheres angiogenetisches Potenzial auf als ihre M1-Gegenstücke (Jetten et al. 2014). Ähnliche Daten zeigen sich auch in anderen Wirkungsgebieten der Makrophagen. CD163 positive Makrophagen wurden mit Plaque-assoziiierter Angiogenese bei Atherosklerose bei Menschen und Mäusen assoziiert (Guo et al. 2018). Versuche zur Repolarisierung von TAM in die M1-Richtung führten zu einer Normalisierung aberranter Blutgefäße in murinen Melanom-Modellen (Jarosz-Biej et al. 2018). Unsere Daten implizieren, dass das traditionelle M1/M2-Paradigma nicht vollständig auf die Heterogenität und funktionelle Diversität von Makrophagen in dem vielschichtigen Milieu einer chronisch kranken Leber zutrifft. Im Vergleich dreier großer Populationen myeloider Zellen im HCC-TME anhand der Oberflächenmarker für TAM (Movahedi et al. 2010) zeigte sich, dass verschiedene Signalwege zur Entzündung, Angiogenese und Immunität auf unterschiedliche Weise zwischen den 3 Populationen reguliert werden. Diese Eigenschaften erklären, dass es durch die vorwiegende Reduktion von TAM1-

Makrophagen durch CCL2-Inhibition zu einer signifikanten Reduktion der Angiogenese *in vivo* kommt.

Während die CCR2-abhängige TAM1-Population Signalwege der Angiogenese sowie spezifische inflammatorische Marker aktiviert, sind ihre Fähigkeiten zur Antigen-Verarbeitung und –produktion vermindert, was die These unterstützt, dass TAM1 weniger immunogene und T-Zell-regulierende Eigenschaften haben. Auf der anderen Seite wies die CCR2 negative TAM2-Population viele Charakteristika immunsupprimierender Makrophagen auf, jedoch weniger angiogenetische Eigenschaften.

Die CCL2-Inhibition wirkt nicht nur auf die CCR2<sup>+</sup> TAM1 sondern induziert zusätzlich eine Umprogrammierung der TAM2 Population.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Inhibition von CCL2 nicht nur die CCR2<sup>+</sup> TAM1 beeinflusste, sondern auch Veränderungen bei der CCR2<sup>-</sup> TAM2 Population induzierte: Hier kam es zu einer Hochregulierung von S100A9, einem inflammatorischen Molekül, welches mit der NK-Zell-Aktivierung in Tumorerkrankungen in Verbindung steht (Narumi et al. 2015). Diese Daten implizieren eine bemerkenswerte Plastizität hepatischer Zellen myeloiden Ursprungs, einschließlich einer kompensatorischen Aktivierung während der Suppression bestimmter Subpopulationen. In Versuchen, bei denen Mäusen 4T1-Tumorzellen implantiert wurden, konnte gezeigt werden, dass TAM2 von TAM1 abstammen können, die wiederum Nachkommen infiltrierender Monozyten aus dem Knochenmark sind (Movahedi et al. 2010).

#### **4.3) Im Fibrose-HCC-Modell zeigen sich nur geringe Einflüsse der CCL2-Inhibition auf die Tumorlast, trotz nachweisbarer Reduktion der Angiogenese und Fibrose**

Die partielle Redundanz der Funktionen myeloider Zellen in der Leber kann eine hohe Relevanz für neue pharmakologisch-therapeutische Ansätze haben (Tacke 2017). Wie wir zeigen konnten, hatte die CCL2-Inhibition Auswirkungen auf die Angiogenese und die Fibroselast. Sie konnte die Tumorlast jedoch nicht signifikant reduzieren, was wiederum z. T. der Aggressivität unseres Tumormodells geschuldet ist, welches nicht leicht durch die Modulation von Makrophagensubpopulationen zu überwinden ist. Das in dieser Studie angewandte Modell, bei dem HCC multifokal in fibrotischen Lebern induziert werden, unterscheidet sich grundlegend von der Injektion von Hepatoma-

Zellen in subkutanen Gewebe oder Lebergewebe, wo sich therapeutische Ansätze, die auf CCR2 abzielen, reduzierend auf die Tumormasse auswirken (Li et al. 2017, Yao et al. 2017).

#### **4.4) Die Modulation von TAM über Eingriffe im CCL2-CCR2-Signalweg stellt eine Möglichkeit dar, die bisherigen Therapieansätze bei HCC zu ergänzen**

Wir konnten zeigen, dass sich die immunologischen Veränderungen durch die CCR2-Inhibition bereits auf die Frühphase des Fibrose-HCC-Modells auswirken (nach 6 Wochen CCl<sub>4</sub>-Behandlung, bevor die ersten Tumoren sichtbar werden). Diese, den Krankheitsverlauf begünstigenden Auswirkungen der CCR2/CCR5-Inhibition auf Gewebe-Remodeling oder Angiogenese können bei Patienten erwartet werden.

Zusätzlich sollte erwähnt werden, dass der CCR2/CCR5 Inhibitor Cenicriviroc aktuell in der dritten Phase klinischer Studien bei Patienten mit Nicht-alkoholischer Steatohepatitis und fortgeschrittener Fibrose ist. Beide Krankheitsentitäten repräsentieren Risikofaktoren für die HCC-Entstehung.

In welchem Ausmaß Therapiestrategien, die auf die Modulation oder Reprogrammierung von Tumor-assoziierten Makrophagen abzielen die zukünftigen Therapiestrategien primärer Lebertumoren beeinflussen, ist momentan Gegenstand weiterer Untersuchungen. Die eindeutige Verbindung zwischen CCR2<sup>+</sup> Makrophagen und der pathologischen Tumor-Vaskularisation unterstützt die Erforschung weiterer Therapieansätze, wie z.B. die Kombination aus konventionellen HCC-Therapien mit CCR2<sup>-</sup> oder CCL2-inhibitorischen Ansätzen.

## 5) Schlussfolgerung

Hepatozelluläre Karzinome entstehen typischerweise in chronisch entzündeten und somit fibrotisch veränderten Lebern. Eine wichtige Rolle bei der Modulation von Fibrose und Angiogenese nehmen myeloide Zellen, insbesondere Tumor-assoziierte Makrophagen, ein. In dieser Studie konnten wir die Rolle von drei wichtigen Populationen myeloider Zellen bei Lebertumoren identifizieren. Die Inhibition von CCL2 wirkte sich vor allem auf die inflammatorische TAM1-Population aus und führte hierüber zu einer Reduktion von Fibrose und Angiogenese. Eine mRNA-Expressionsanalyse konnte weitere Funktionen der drei Populationen erkennen und zeigte eine enorme Vielseitigkeit dieser Zellen, die sich unter anderem in Kompensationsmechanismen bei pharmakologischer Reduktion einer spezifischen Population widerspiegelt.

Diese Daten unterstützen die These, dass die Modulation proangiogenetischer Makrophagen, zum Beispiel über die Inhibition von CCL2, eine sinnvolle Ergänzung der bisherigen Therapiestrategien des HCC darstellen könnte.

## 6) Literaturverzeichnis

Abou-Elkacem, L., S. Arns, G. Brix, F. Gremse, D. Zopf, F. Kiessling and W. Lederle (2013). "Regorafenib inhibits growth, angiogenesis, and metastasis in a highly aggressive, orthotopic colon cancer model." Mol Cancer Ther **12**(7): 1322-1331.

Antoniou, S. and R. Ulmeanu (2016). "Nivolumab for advanced non-small cell lung cancer: an immunologically-mediated tumor checkout." Ann Transl Med **4**(10): 201.

Bartneck, M., V. Fech, J. Ehling, O. Govaere, K. T. Warzecha, K. Hittatiya, M. Vucur, J. Gautheron, T. Luedde, C. Trautwein, T. Lammers, T. Roskams, W. Jahnen-Dechent and F. Tacke (2016). "Histidine-rich glycoprotein promotes macrophage activation and inflammation in chronic liver disease." Hepatology **63**(4): 1310-1324.

Bartneck, M., K. H. Heffels, Y. Pan, M. Bovi, G. Zwadlo-Klarwasser and J. Groll (2012). "Inducing healing-like human primary macrophage phenotypes by 3D hydrogel coated nanofibres." Biomaterials **33**(16): 4136-4146.

Bartneck, M., T. Ritz, H. A. Keul, M. Wambach, J. Bornemann, U. Gbureck, J. Ehling, T. Lammers, F. Heymann, N. Gassler, T. Lüdde, C. Trautwein, J. Groll and F. Tacke (2012). "Peptide-functionalized gold nanorods increase liver injury in hepatitis." ACS Nano **6**(10): 8767-8777.

Behboudi, S., A. Alisa, S. Boswell, J. Anastassiou, A. A. Pathan and R. Williams (2010). "Expansion of anti-AFP Th1 and Tc1 responses in hepatocellular carcinoma occur in different stages of disease." Br J Cancer **102**(4): 748-753.

Bismuth, H. (1982). "Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver." World J Surg **6**(1): 3-9.

Brunner, S. M., T. Itzel, C. Rubner, R. Kesselring, E. Griesshammer, M. Evert, A. Teufel, H. J. Schlitt and S. Fichtner-Feigl (2017). "Tumor-infiltrating B cells producing antitumor active immunoglobulins in resected HCC prolong patient survival." Oncotarget **8**(41): 71002-71011.

Budhu, A., M. Forgues, Q. H. Ye, H. L. Jia, P. He, K. A. Zanetti, U. S. Kammula, Y. Chen, L. X. Qin, Z. Y. Tang and X. W. Wang (2006). "Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment." Cancer Cell **10**(2): 99-111.

Budhu, A. and X. W. Wang (2006). "The role of cytokines in hepatocellular carcinoma." J Leukoc Biol **80**(6): 1197-1213.

Cai, L., Z. Zhang, L. Zhou, H. Wang, J. Fu, S. Zhang, M. Shi, H. Zhang, Y. Yang, H. Wu, P. Tien and F. S. Wang (2008). "Functional impairment in circulating and intrahepatic NK cells and relative mechanism in hepatocellular carcinoma patients." Clin Immunol **129**(3): 428-437.



- Capece, D., M. Fischietti, D. Verzella, A. Gaggiano, G. Cicciarelli, A. Tessitore, F. Zazzeroni and E. Alesse (2013). "The inflammatory microenvironment in hepatocellular carcinoma: a pivotal role for tumor-associated macrophages." Biomed Res Int **2013**: 187204.
- Chang, C. I., J. C. Liao and L. Kuo (2001). "Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity." Cancer Res **61**(3): 1100-1106.
- Chang, H. F., H. Bzeih, P. Chitirala, K. Ravichandran, M. Sleiman, E. Krause, U. Hahn, V. Pattu and J. Rettig (2017). "Preparing the lethal hit: interplay between exo- and endocytic pathways in cytotoxic T lymphocytes." Cell Mol Life Sci **74**(3): 399-408.
- Chen, G. G., W. Y. Lau, P. B. Lai, Y. S. Chun, E. C. Chak, B. C. Leung, I. K. Lam, J. F. Lee and A. K. Chui (2002). "Activation of Kupffer cells inhibits tumor growth in a murine model system." Int J Cancer **99**(5): 713-720.
- Chen, K. J., S. Z. Lin, L. Zhou, H. Y. Xie, W. H. Zhou, A. Taki-Eldin and S. S. Zheng (2011). "Selective recruitment of regulatory T cell through CCR6-CCL20 in hepatocellular carcinoma fosters tumor progression and predicts poor prognosis." PLoS One **6**(9): e24671.
- Condeelis, J. and J. W. Pollard (2006). "Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis." Cell **124**(2): 263-266.
- Corless, J. K. and H. M. Middleton (1983). "Normal liver function. A basis for understanding hepatic disease." Arch Intern Med **143**(12): 2291-2294.
- Dahlin, D. C., G. T. Miwa, A. Y. Lu and S. D. Nelson (1984). "N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(5): 1327-1331.
- Dapito, D. H., A. Mencin, G. Y. Gwak, J. P. Pradere, M. K. Jang, I. Mederacke, J. M. Caviglia, H. Khiabanian, A. Adeyemi, R. Bataller, J. H. Lefkowitz, M. Bower, R. Friedman, R. B. Sartor, R. Rabadan and R. F. Schwabe (2012). "Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4." Cancer Cell **21**(4): 504-516.
- Das, R., D. B. Sant'Angelo and K. E. Nichols (2010). "Transcriptional control of invariant NKT cell development." Immunol Rev **238**(1): 195-215.
- Ding, T., J. Xu, F. Wang, M. Shi, Y. Zhang, S. P. Li and L. Zheng (2009). "High tumor-infiltrating macrophage density predicts poor prognosis in patients with primary hepatocellular carcinoma after resection." Hum Pathol **40**(3): 381-389.
- Eggert, T., K. Wolter, J. Ji, C. Ma, T. Yevsa, S. Klotz, J. Medina-Echeverz, T. Longerich, M. Forgues, F. Reisinger, M. Heikenwalder, X. W. Wang, L. Zender and T. F. Greten (2016). "Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression." Cancer Cell **30**(4): 533-547.

Ehling, J., M. Bartneck, X. Wei, F. Gremse, V. Fech, D. Möckel, C. Baeck, K. Hittatiya, D. Eulberg, T. Luedde, F. Kiessling, C. Trautwein, T. Lammers and F. Tacke (2014). "CCL2-dependent infiltrating macrophages promote angiogenesis in progressive liver fibrosis." Gut **63**(12): 1960-1971.

El-Serag, H. B. and K. L. Rudolph (2007). "Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis." Gastroenterology **132**(7): 2557-2576.

Epelman, S., K. J. Lavine and G. J. Randolph (2014). "Origin and functions of tissue macrophages." Immunity **41**(1): 21-35.

Fulwyler, M. J. (1965). "Electronic separation of biological cells by volume." Science **150**(3698): 910-911.

Gao, B., W. I. Jeong and Z. Tian (2008). "Liver: An organ with predominant innate immunity." Hepatology **47**(2): 729-736.

Glodde, N., T. Bald, D. van den Boorn-Konijnenberg, K. Nakamura, J. S. O'Donnell, S. Szczepanski, M. Brandes, S. Eickhoff, I. Das, N. Shridhar, D. Hinze, M. Rogava, T. C. van der Sluis, J. J. Ruotsalainen, E. Gaffal, J. Landsberg, K. U. Ludwig, C. Wilhelm, M. Riek-Burchardt, A. J. Müller, C. Gebhardt, R. A. Scolyer, G. V. Long, V. Janzen, M. W. L. Teng, W. Kastenmüller, M. Mazzone, M. J. Smyth, T. Tüting and M. Hölzel (2017). "Reactive Neutrophil Responses Dependent on the Receptor Tyrosine Kinase c-MET Limit Cancer Immunotherapy." Immunity **47**(4): 789-802.e789.

Gremse, F., M. Stärk, J. Ehling, J. R. Menzel, T. Lammers and F. Kiessling (2016). "Imalytics Preclinical: Interactive Analysis of Biomedical Volume Data." Theranostics **6**(3): 328-341.

Guo, L., H. Akahori, E. Harari, S. L. Smith, R. Polavarapu, V. Karmali, F. Otsuka, R. L. Gannon, R. E. Braumann, M. H. Dickinson, A. Gupta, A. L. Jenkins, M. J. Lipinski, J. Kim, P. Chhour, P. S. de Vries, H. Jinnouchi, R. Kutys, H. Mori, M. D. Kutyna, S. Torii, A. Sakamoto, C. U. Choi, Q. Cheng, M. L. Grove, M. A. Sawan, Y. Zhang, Y. Cao, F. D. Kolodgie, D. P. Cormode, D. E. Arking, E. Boerwinkle, A. C. Morrison, J. Erdmann, N. Sotoodehnia, R. Virmani and A. V. Finn (2018). "CD163+ macrophages promote angiogenesis and vascular permeability accompanied by inflammation in atherosclerosis." J Clin Invest **128**(3): 1106-1124.

Hammerich, L., F. Heymann and F. Tacke (2011). "Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases." Clin Dev Immunol **2011**: 345803.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hernandez-Gea, V., S. Toffanin, S. L. Friedman and J. M. Llovet (2013). "Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **144**(3): 512-527.

Hoechst, B., T. Voigtlaender, L. Ormandy, J. Gamrekashvili, F. Zhao, H. Wedemeyer, F. Lehner, M. P. Manns, T. F. Greten and F. Korangy (2009). "Myeloid derived

suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor." Hepatology **50**(3): 799-807.

Hoves, S., C. H. Ooi, C. Wolter, H. Sade, S. Bissinger, M. Schmittnaegel, O. Ast, A. M. Giusti, K. Wartha, V. Runza, W. Xu, Y. Kienast, M. A. Cannarile, H. Levitsky, S. Romagnoli, M. De Palma, D. Rüttinger and C. H. Ries (2018). "Rapid activation of tumor-associated macrophages boosts preexisting tumor immunity." J Exp Med **215**(3): 859-876.

Huang, d. W., B. T. Sherman and R. A. Lempicki (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." Nat Protoc **4**(1): 44-57.

Iavarone, M., G. Cabibbo, F. Piscaglia, C. Zavaglia, A. Grieco, E. Villa, C. Cammà, M. Colombo and S. S. I. A. s. group (2011). "Field-practice study of sorafenib therapy for hepatocellular carcinoma: a prospective multicenter study in Italy." Hepatology **54**(6): 2055-2063.

Jarosz-Biej, M., N. Kamińska, S. Matuszczak, T. Cichoń, J. Pamuła-Piłat, J. Czapla, R. Smolarczyk, D. Skwarzyńska, K. Kulik and S. Szala (2018). "M1-like macrophages change tumor blood vessels and microenvironment in murine melanoma." PLoS One **13**(1): e0191012.

Jetten, N., S. Verbruggen, M. J. Gijbels, M. J. Post, M. P. De Winther and M. M. Donners (2014). "Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo." Angiogenesis **17**(1): 109-118.

Kane, M. A. (2003). "Global control of primary hepatocellular carcinoma with hepatitis B vaccine: the contributions of research in Taiwan." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **12**(1): 2-3.

Karlmark, K. R., R. Weiskirchen, H. W. Zimmermann, N. Gassler, F. Ginhoux, C. Weber, M. Merad, T. Luedde, C. Trautwein and F. Tacke (2009). "Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis." Hepatology **50**(1): 261-274.

Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, H. Sato, E. Kondo, M. Harada, H. Koseki, T. Nakayama, Y. Tanaka and M. Taniguchi (1998). "Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5690-5693.

Kawano, T., T. Nakayama, N. Kamada, Y. Kaneko, M. Harada, N. Ogura, Y. Akutsu, S. Motohashi, T. Iizasa, H. Endo, T. Fujisawa, H. Shinkai and M. Taniguchi (1999). "Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells." Cancer Res **59**(20): 5102-5105.

Krenkel, O. and F. Tacke (2017). "Liver macrophages in tissue homeostasis and disease." Nat Rev Immunol **17**(5): 306-321.

- Kuang, D. M., Q. Zhao, C. Peng, J. Xu, J. P. Zhang, C. Wu and L. Zheng (2009). "Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1." J Exp Med **206**(6): 1327-1337.
- Lacotte, S., F. Slits, L. A. Orci, J. Meyer, G. Oldani, V. Delaune, C. Gonelle-Gispert, P. Morel and C. Toso (2016). "Impact of myeloid-derived suppressor cell on Kupffer cells from mouse livers with hepatocellular carcinoma." Oncoimmunology **5**(11): e1234565.
- Laman, J. D., E. Claassen and R. J. Noelle (2017). "Functions of CD40 and Its Ligand, gp39 (CD40L)." Crit Rev Immunol **37**(2-6): 371-420.
- LeBien, T. W. and T. F. Tedder (2008). "B lymphocytes: how they develop and function." Blood **112**(5): 1570-1580.
- Leonardi, G. C., S. Candido, M. Cervello, D. Nicolosi, F. Raiti, S. Travali, D. A. Spandidos and M. Libra (2012). "The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma (review)." Int J Oncol **40**(6): 1733-1747.
- Lewis, C. and C. Murdoch (2005). "Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies." Am J Pathol **167**(3): 627-635.
- Lewis, C. E. and J. W. Pollard (2006). "Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments." Cancer Res **66**(2): 605-612.
- Li, X., W. Yao, Y. Yuan, P. Chen, B. Li, J. Li, R. Chu, H. Song, D. Xie, X. Jiang and H. Wang (2017). "Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma." Gut **66**(1): 157-167.
- Liu, R. X., Y. Wei, Q. H. Zeng, K. W. Chan, X. Xiao, X. Y. Zhao, M. M. Chen, F. Z. Ouyang, D. P. Chen, L. Zheng, X. M. Lao and D. M. Kuang (2015). "Chemokine (C-X-C motif) receptor 3-positive B cells link interleukin-17 inflammation to protumorigenic macrophage polarization in human hepatocellular carcinoma." Hepatology **62**(6): 1779-1790.
- Llovet, J. M., J. Zucman-Rossi, E. Pikarsky, B. Sangro, M. Schwartz, M. Sherman and G. Gores (2016). "Hepatocellular carcinoma." Nat Rev Dis Primers **2**: 16018.
- Love, M. I., W. Huber and S. Anders (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." Genome Biol **15**(12): 550.
- Maere, S., K. Heymans and M. Kuiper (2005). "BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks." Bioinformatics **21**(16): 3448-3449.
- Mandal, P. K., S. Biswas, G. Mandal, S. Purohit, A. Gupta, A. Majumdar Giri, S. Roy Chowdhury and A. Bhattacharyya (2018). "CCL2 conditionally determines CCL22-dependent Th2-accumulation during TGF- $\beta$ -induced breast cancer progression." Immunobiology **223**(2): 151-161.
- Mantovani, A., G. Germano, F. Marchesi, M. Locatelli and S. K. Biswas (2011). "Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions." Eur J Immunol **41**(9): 2522-2525.

Mantovani, A., F. Marchesi, A. Malesci, L. Laghi and P. Allavena (2017). "Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology." Nat Rev Clin Oncol **14**(7): 399-416.

Mantovani, A., T. Schioppa, C. Porta, P. Allavena and A. Sica (2006). "Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion." Cancer Metastasis Rev **25**(3): 315-322.

Marra, F. and F. Tacke (2014). "Roles for chemokines in liver disease." Gastroenterology **147**(3): 577-594.e571.

Matsuda, J. L., Q. Zhang, R. Ndongye, S. K. Richardson, A. R. Howell and L. Gapin (2006). "T-bet concomitantly controls migration, survival, and effector functions during the development of Valpha14i NKT cells." Blood **107**(7): 2797-2805.

Merico, D., R. Isserlin, O. Stueker, A. Emili and G. D. Bader (2010). "Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation." PLoS One **5**(11): e13984.

Mossanen, J. C. and F. Tacke (2013). "Role of lymphocytes in liver cancer." Oncoimmunology **2**(11): e26468.

Movahedi, K., D. Laoui, C. Gysemans, M. Baeten, G. Stangé, J. Van den Bossche, M. Mack, D. Pipeleers, P. In't Veld, P. De Baetselier and J. A. Van Ginderachter (2010). "Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes." Cancer Res **70**(14): 5728-5739.

Narumi, K., R. Miyakawa, R. Ueda, H. Hashimoto, Y. Yamamoto, T. Yoshida and K. Aoki (2015). "Proinflammatory Proteins S100A8/S100A9 Activate NK Cells via Interaction with RAGE." J Immunol **194**(11): 5539-5548.

Newell, P., A. Villanueva, S. L. Friedman, K. Koike and J. M. Llovet (2008). "Experimental models of hepatocellular carcinoma." J Hepatol **48**(5): 858-879.

Noy, R. and J. W. Pollard (2014). "Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy." Immunity **41**(1): 49-61.

Ocana, A., C. Nieto-Jiménez, A. Pandiella and A. J. Templeton (2017). "Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies." Mol Cancer **16**(1): 137.

Perry, C. J., A. R. Muñoz-Rojas, K. M. Meeth, L. N. Kellman, R. A. Amezcua, D. Thakral, V. Y. Du, J. X. Wang, W. Damsky, A. L. Kuhlmann, J. W. Sher, M. Bosenberg, K. Miller-Jensen and S. M. Kaech (2018). "Myeloid-targeted immunotherapies act in synergy to induce inflammation and antitumor immunity." J Exp Med **215**(3): 877-893.

Racanelli, V. and B. Rehermann (2006). "The liver as an immunological organ." Hepatology **43**(2 Suppl 1): S54-62.

- Ringelhan, M., D. Pfister, T. O'Connor, E. Pikarsky and M. Heikenwalder (2018). "The immunology of hepatocellular carcinoma." Nat Immunol **19**(3): 222-232.
- Saijou, E., Y. Enomoto, M. Matsuda, C. Yuet-Yin Kok, S. Akira, M. Tanaka and A. Miyajima (2018). "Neutrophils alleviate fibrosis in the CCl." Hepatol Commun **2**(6): 703-717.
- Salvadori, S., G. Martinelli and K. Zier (2000). "Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity." J Immunol **164**(4): 2214-2220.
- Schneider, C., A. Teufel, T. Yevsa, F. Staib, A. Hohmeyer, G. Walenda, H. W. Zimmermann, M. Vucur, S. Huss, N. Gassler, H. E. Wasmuth, S. A. Lira, L. Zender, T. Luedde, C. Trautwein and F. Tacke (2012). "Adaptive immunity suppresses formation and progression of diethylnitrosamine-induced liver cancer." Gut **61**(12): 1733-1743.
- Schultz, K. T. and F. Grieder (1987). "Structure and function of the immune system." Toxicol Pathol **15**(3): 262-264.
- Schütte, K., J. Bornschein and P. Malfertheiner (2009). "Hepatocellular carcinoma--epidemiological trends and risk factors." Dig Dis **27**(2): 80-92.
- Schütte, K., C. Schulz and P. Malfertheiner (2014). "Hepatocellular Carcinoma: Current Concepts in Diagnosis, Staging and Treatment." Gastrointest Tumors **1**(2): 84-92.
- Seifert, M. and R. Küppers (2016). "Human memory B cells." Leukemia **30**(12): 2283-2292.
- Serbina, N. V. and E. G. Pamer (2006). "Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2." Nat Immunol **7**(3): 311-317.
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski and T. Ideker (2003). "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks." Genome Res **13**(11): 2498-2504.
- Sica, A., P. Invernizzi and A. Mantovani (2014). "Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology." Hepatology **59**(5): 2034-2042.
- Sun, C., H. Y. Sun, W. H. Xiao, C. Zhang and Z. G. Tian (2015). "Natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma and NK cell-based immunotherapy." Acta Pharmacol Sin **36**(10): 1191-1199.
- Sänger, C., A. Schenk, L. O. Schwen, L. Wang, F. Gremse, S. Zafarnia, F. Kiessling, C. Xie, W. Wei, B. Richter, O. Dirsch and U. Dahmen (2015). "Intrahepatic Vascular Anatomy in Rats and Mice--Variations and Surgical Implications." PLoS One **10**(11): e0141798.
- Tacke, F. (2012). "Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo." Fibrogenesis Tissue Repair **5**(Suppl 1): S27.

Tacke, F. (2017). "Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases." J Hepatol **66**(6): 1300-1312.

Tacke, F. and H. W. Zimmermann (2014). "Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis." J Hepatol **60**(5): 1090-1096.

Tahir, S. M., O. Cheng, A. Shaulov, Y. Koezuka, G. J. Bubley, S. B. Wilson, S. P. Balk and M. A. Exley (2001). "Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer." J Immunol **167**(7): 4046-4050.

Talmadge, J. E. and D. I. Gabrilovich (2013). "History of myeloid-derived suppressor cells." Nat Rev Cancer **13**(10): 739-752.

Teng, K. Y., J. Han, X. Zhang, S. H. Hsu, S. He, N. A. Wani, J. M. Barajas, L. A. Snyder, W. L. Frankel, M. A. Caligiuri, S. T. Jacob, J. Yu and K. Ghoshal (2017). "Blocking the CCL2-CCR2 Axis Using CCL2-Neutralizing Antibody Is an Effective Therapy for Hepatocellular Cancer in a Mouse Model." Mol Cancer Ther **16**(2): 312-322.

Thomson, A. W. and P. A. Knolle (2010). "Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment." Nat Rev Immunol **10**(11): 753-766.

Waisman, A., D. Lukas, B. E. Clausen and N. Yogev (2017). "Dendritic cells as gatekeepers of tolerance." Semin Immunopathol **39**(2): 153-163.

Wan, S., N. Kuo, I. Kryczek, W. Zou and T. H. Welling (2015). "Myeloid cells in hepatocellular carcinoma." Hepatology **62**(4): 1304-1312.

Wu, K., I. Kryczek, L. Chen, W. Zou and T. H. Welling (2009). "Kupffer cell suppression of CD8<sup>+</sup> T cells in human hepatocellular carcinoma is mediated by B7-H1/programmed death-1 interactions." Cancer Res **69**(20): 8067-8075.

Yan, J., X. L. Liu, G. Xiao, N. L. Li, Y. N. Deng, L. Z. Han, L. C. Yin, L. J. Ling and L. X. Liu (2014). "Prevalence and clinical relevance of T-helper cells, Th17 and Th1, in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma." PLoS One **9**(5): e96080.

Yao, W., Q. Ba, X. Li, H. Li, S. Zhang, Y. Yuan, F. Wang, X. Duan, J. Li, W. Zhang and H. Wang (2017). "A Natural CCR2 Antagonist Relieves Tumor-associated Macrophage-mediated Immunosuppression to Produce a Therapeutic Effect for Liver Cancer." EBioMedicine **22**: 58-67.

Yona, S., K. W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guillemins, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer and S. Jung (2013). "Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis." Immunity **38**(1): 79-91.

Yuen, G. J., E. Demissie and S. Pillai (2016). "B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship." Trends Cancer **2**(12): 747-757.

Zhang, D. Y. and S. L. Friedman (2012). "Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis." Hepatology **56**(2): 769-775.

Zhang, H., Q. Feng, W. D. Chen and Y. D. Wang (2018). "HGF/c-MET: A Promising Therapeutic Target in the Digestive System Cancers." Int J Mol Sci **19**(11).

Zimmermann, H. W., C. Trautwein and F. Tacke (2012). "Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury." Front Physiol **3**: 56.



## **7.) Anhang**

Auflistung der eigenen Publikationen (als Koautor)

Danksagung

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Lebenslauf

### **Auflistung der eigenen Publikationen (als Koautor)**

1. Jérémie Gautheron, Mihael Vucur, Anne T. Schneider, Ilenia Severi, Christoph Roderburg, Sanchari Roy, Matthias Bartneck, Peter Schrammen, Mauricio Berriel Diaz, Josef Ehling, Felix Gremse, Felix Heymann, Christiane Koppe, Twan Lammers, Fabian Kiessling, Niels Van Best, Oliver Pabst, Gilles Courtois, Andreas Linkermann, Stefan Krautwald, Ulf P. Neumann, Frank Tacke, Christian Trautwein, Douglas R. Green, Thomas Longerich, Norbert Frey, Mark Luedde, Matthias Blüher, Stephan Herzig, Mathias Heikenwälder, Tom Luedde: *The necroptosis-inducing kinase RIPK3 dampens adipose tissue inflammation and glucose intolerance*. Nat Commun. 2016 Jun 21;7:11869. doi: 10.1038/ncomms11869.
2. Matthias Bartneck, Peter Schrammen, Diana Moeckel, Olivier Govaere, Anke Liepelt, Oliver Krenkel, Can Ergen, Misti Vanette McCain, Dirk Eulberg, Tom Luedde, Christian Trautwein, Fabian Kiessling, Helen Reeves, Twan Lammers, Frank Tacke: *The CCR2+ macrophage subset promotes pathogenic angiogenesis for tumor“ vascularization in fibrotic livers*. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology, 2019 (in press), DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.007>

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Bei **Diana Möckel** für die Durchführung des Imagings und die Bearbeitung und Analyse der daraus gewonnenen Daten sowie für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Herstellung und Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen.

Bei **Dr. Anke Liepelt** und **Dr. Oliver Krenkel** für die Bearbeitung der Genexpressionsprofile und die Analyse und Interpretation der Vielzahl an Daten, die hierdurch gewonnen wurden.

Bei **Dr. Can Ergen** für die Mithilfe bei der Planung des Imagings sowie des Anlernens zu Beginn meiner Laborzeit.

Bei **Aline Müller** für die Hilfe bei den Serum-Analysen und das Beibringen der PCR-Methode.

Beim **Team des IZKF** des Universitätsklinikums Aachen für die Anfertigung der HE- sowie immunhistochemischen Färbungen

Bei **Dr. Dirk Eulberg** und der Firma Noxxon für die freundliche und jederzeit zügige Bereitstellung des CCL2-Inhibitors, ohne den die Versuche nicht möglich gewesen wären.

Bei **Univ.-Prof. Dr. Tom Lüdde**, dem Ersatzbetreuer dieses Projekts, für die Bereitstellung von Materialien und freundliche Einbindung in ein Projekt seiner Arbeitsgruppe.

Bei **Univ.-Prof. Dr. Christian Trautwein**, dem Direktor unserer Klinik, für die Möglichkeit, in der Forschungsabteilung der Medizinischen Klinik III arbeiten zu dürfen.

Bei **Univ.-Prof. Dr. Fabian Kiessling** und **Univ.-Prof. Dr. Dr. Twan Lammers** für die Unterstützung bei den Imaging-Versuchen und die Hilfe bei der Auswertung und Interpretation der daraus hervorgegangenen Daten.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater **Univ.-Prof. Dr. Dr. Frank Tacke** und meinem Betreuer **Dr. Matthias Bartneck** für die exzellente Betreuung während des gesamten Projekts, für die Planung der Versuche, die Hilfe bei Analyse und Interpretation der Daten, vor allem aber dafür, dass immer jemand für die Vielzahl an Fragen zur Verfügung stand und für die Möglichkeit, Teil einer tollen Arbeitsgruppe gewesen zu sein.

Herzlichen Dank Ihnen/Euch allen!

## **Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung**

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

in der Klinik für Gastroenterologie, Stoffwechselerkrankungen und Internistische Intensivmedizin (Med. Klinik III) des Universitätsklinikums Aachen

hinterlegt sind.

## Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, **Peter Leonard Schrammen** an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „**Die Rolle von CCR2+ Makrophagen für die Angiogenese und Tumorstromavaskularisation in fibrotisch veränderten Lebern**“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe. Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

|                                            | Peter Schrammen (Doktorand) | Matthias Bartneck (Betreuer) | Diana Möckel | Anke Liepelt | Olivier Krenkel | Can Ergen | Aline Müller | Twan Lammer | Fabian Kiessling | Tom Lüdtke | Dirk Eulberg (Firma Noxxon) | IZKF UK Aachen | Christian Trautwein | Frank Tacke (Doktorvater) | Summe (%) |
|--------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------|--------------|-----------------|-----------|--------------|-------------|------------------|------------|-----------------------------|----------------|---------------------|---------------------------|-----------|
| Konzept der Experimente                    | 5                           | 55                           | 0            | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 40                        | 100       |
| Vorbereitung der Tiere                     | 100                         | 0                            | 0            | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| Präparation der Tiere                      | 60                          | 0                            | 40           | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| Makroskopische Untersuchung                | 100                         | 0                            | 0            | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| Flow Cytometry - Durchführung              | 100                         | 0                            | 0            | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| Flow Cytometry - Analyse                   | 90                          | 10                           | 0            | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| MACS – Durchführung                        | 100                         | 0                            | 0            | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| Serum-Analysen Durchführung                | 0                           | 0                            | 0            | 0            | 0               | 0         | 100          | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| HE-Färbung - Durchführung                  | 0                           | 0                            | 0            | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 100            | 0                   | 0                         | 100       |
| HE-Färbung Auswertung                      | 80                          | 20                           | 0            | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| Immunhistochemie (F4/80/Ki67) Durchführung | 0                           | 0                            | 0            | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 100            | 0                   | 0                         | 100       |
| Immunhistochemie (F4/80/Ki67) Auswertung   | 50                          | 0                            | 50           | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| Immunfluoreszenzfärbung Durchführung       | 50                          | 0                            | 50           | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| Immunfluoreszenzfärbung Analyse            | 40                          | 0                            | 60           | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| µCT – Durchführung                         | 0                           | 0                            | 100          | 0            | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| µCT - Auswertung                           | 0                           | 0                            | 95           | 0            | 0               | 5         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| Nanostring - Durchführung                  | 0                           | 0                            | 0            | 100          | 0               | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| Nanostring - Analyse                       | 0                           | 0                            | 0            | 60           | 40              | 0         | 0            | 0           | 0                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 0                         | 100       |
| Interpretation der Daten                   | 20                          | 30                           | 0            | 0            | 0               | 0         | 0            | 5           | 5                | 0          | 0                           | 0              | 0                   | 40                        | 100       |
| Bereitstellung der Materialien             | 0                           | 0                            | 0            | 0            | 0               | 0         | 0            | 5           | 5                | 5          | 10                          | 0              | 10                  | 65                        | 100       |

\_\_\_\_\_  
Unterschrift der Doktorandin/des Doktoranden

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Peter Leonard Schrammen

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des Doktorvaters

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Peter Leonard Schrammen  
Anschrift: Tippheideweg 7, 41379 Brüggen  
Geburtsdatum: 15.05.1992  
Geburtsort: Viersen

### **Schulausbildung:**

8/1998 – 7/2002 Katholische Grundschule Brüggen-Born,  
8/2002 – 7/2011 Albertus-Magnus-Gymnasium Dülken

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife, 2011

### **Hochschulausbildung:**

2011-2017 Medizinstudium an der RWTH Aachen  
2015-2016 Doktorand in der Klinik für Gastroenterologie,  
Stoffwechselerkrankungen und Internistische  
Intensivmedizin des Uniklinikums Aachen  
Dezember 2017 Staatsexamen Medizin

### **Praktika**

#### **Pflegedienstpraktika (2011-2012)**

7/2011 – 8/2011 Fünfwöchiges Pflegedienstpraktikum in der  
chirurgischen und in der internistischen Abteilung des  
Städtischen Krankenhauses Nettetal  
8/2012 – 9/2012 Fünfwöchiges Pflegedienstpraktikum in der  
internistischen Abteilung des Städtischen  
Krankenhauses Nettetal  
2/2013 – 3/2013 Fünfwöchiges Pflegedienstpraktikum in der  
internistischen Abteilung des Städtischen  
Krankenhauses Nettetal

### Famulaturen (2013-2016)

|                   |                                                                                                                                                |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 9/2013 – 10/2013  | 4 Wochen in der internistischen Abteilung des Krankenhaus Nettetal mit Schwerpunkt Gastroenterologie                                           |
| 2/2014 – 3/2014   | 2 Wochen in der Fachklinik für Anästhesie und Operative Intensivmedizin der Kliniken Maria Hilf in Mönchengladbach                             |
| 3/2014            | 2 Wochen im Zentrum für ambulante Urologie „Zenturo“ in Mönchengladbach                                                                        |
| 2/2015 – 3/2015   | 4 Wochen im Internistisch-hausärztlichen Zentrum in Mönchengladbach                                                                            |
| 11/2015 – 12/2015 | 2 Wochen in der Poliklinik der Klinik für Gastroenterologie, Stoffwechselerkrankungen und Internistische Intensivmedizin im Uniklinikum Aachen |
| 3/2016            | 2 Wochen in der Klinik für diagnostische und interventionelle Radiologie im Uniklinikum Aachen                                                 |

### Praktisches Jahr (2016-2017)

|                  |                                                                                                                                            |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10/2016 – 3/2017 | 1. Tertial (Wahlfach Anästhesie):<br>Hermann-Josef-Krankenhaus Erkelenz<br>Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin                       |
| 3/2017 – 7/2017  | 2. Tertial (Chirurgie):<br>Hermann-Josef-Krankenhaus Erkelenz<br>Klinik für Allgemein und Viszeralchirurgie<br>Klinik für Unfallchirurgie  |
| 7/2017 – 10/2017 | 3. Tertial (Innere Medizin)<br>Hermann-Josef-Krankenhaus Erkelenz<br>Klinik für Innere Medizin/Gastroenterologie<br>Klinik für Kardiologie |

### Ausbildung (ab 01/2018)

|              |                                                                                                            |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| seit 01/2018 | Assistenzarzt in Weiterbildung im Fachbereich Innere Medizin an der Medizinischen Klinik III des UK Aachen |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|