

**Etablierung eines Differenzierungsprotokolls für monozytäre Zelllinien zur
Untersuchung der Auswirkungen der Makrophagenpolarisation auf
hepatozelluläre Karzinomzellen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sanzenbacher, Annika
aus Kirchheim unter Teck

Gießen (2026)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Transplantationschirurgie
Sektion Experimentelle Chirurgie

1. Gutachterin: Prof. Dr. Juliane Liese

2. Gutachterin: Prof. Dr. Elke Roeb

Tag der Disputation: 15.07.2026

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1.	Die Bedeutung des Immunsystems in der Karzinogenese	4
1.1.1.	<i>Tumor microenvironment</i>	5
1.1.2.	Immunzellen im <i>tumor microenvironment</i>	5
1.1.3.	Tumor-assoziierte Makrophagen	6
1.1.3.1.	Makrophagenfunktion	6
1.1.3.2.	Makrophagenpolarisation	9
1.1.3.3.	Einfluss von TAMs auf die Tumorprogression	12
1.2.	Das hepatozelluläre Karzinom	13
1.2.1.	Das Tumormilieu im hepatozellulären Karzinom	15
1.3.	Herausforderungen in der experimentellen Erforschung von Tumor-Immunzell-Interaktionen	17
1.3.1.	Methodische Ausgangslage der Makrophagendifferenzierung	17
1.4.	Zielsetzung	20
2.	Material und Methoden	21
2.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
2.2.	Zellkulturen	26
2.3.	Differenzierung von THP-1-Zellen in verschiedene Makrophagensubtypen	27
2.3.1.	Fixierung und Färbung der Makrophagen zur morphologischen Beurteilung	29
2.3.2.	Bestimmung der Oberflächenmarkerexpression mit FACS	30
2.3.3.	Bestimmung der Zytokinproduktion mittels ELISA	32
2.3.4.	Behandlung der differenzierten THP-1-Zellen mit inflammatorischen Stimuli	34
2.4.	Untersuchung des Einflusses von ROS-Fängern auf die Differenzierung von THP-1-Zellen	34
2.5.	Verwendung von konditionierten Medien zur Untersuchung der Interaktion zwischen HCC- und THP-1-Zellen	35
2.5.1.	Bestimmung der Zellviabilität mit dem MTT-Assay	35
2.5.2.	Bestimmung des Zelltodes mit Propidiumiodid-Färbung im FACS	36
2.6.	Statistische Auswertung	37
3.	Ergebnisse	39

3.1.	Protokoll zur Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen	39
3.2.	Charakterisierung der aus THP-1-Zellen differenzierten Makrophagensubtypen	42
3.2.1.	Mikroskopische Beurteilung	42
3.2.2.	Analyse der Oberflächenmarker im FACS	44
3.2.3.	Bestimmung der Zytokinsekretion mittels ELISA.....	51
3.2.4.	Bestimmung der IL-1 β -Freisetzung verschiedener Makrophagensubtypen nach Stimulation mit LPS, BzATP und Nigericin	53
3.3.	Beeinflussung der Makrophagenpolarisation durch MnTBAP	54
3.3.1.	Bestimmung der Oberflächenmarkerexpression von mit MnTBAP behandelten THP-1-Zellen im FACS.....	55
3.3.2.	Bestimmung der Zytokinausschüttung der mit MnTBAP behandelten THP-1-Zellen mittels ELISA	57
3.4.	Einfluss konditionierter Medien der Makrophagensubtypen auf das Proliferationsverhalten von Huh7- und HepG2-Zellen	59
3.4.1.	Zellviabilität von Huh7- und HepG2-Zellen nach der Behandlung mit konditionierten Medien	59
3.4.2.	Färbung mit Propidiumiodid und Messung mittels FACS.....	61
4.	Diskussion	63
4.1.	Differenzierung der Makrophagensubtypen M0, M1 und M2 aus der humanen Zelllinie THP-1	63
4.1.1.	Differenzierung monozytärer THP-1-Zellen zu M0-Makrophagen mit PMA.....	63
4.1.2.	Differenzierung der Makrophagensubtypen M1 und M2	65
4.1.3.	Oberflächenmarker von Makrophagen.....	67
4.1.4.	Funktionelle Charakterisierung der Makrophagensubtypen anhand der Zytokinproduktion.....	69
4.1.5.	IL-1 β -Sekretion der verschiedenen Makrophagensubtypen nach Stimulation mit inflammatorischen Substanzen.....	72
4.2.	Die Bedeutung der ROS-Modulatoren für die Differenzierung von THP-1-Zellen	74
4.3.	Einfluss konditionierter Medien von Makrophagen auf die Viabilität von HCC-Tumorzelllinien.....	76
4.4.	Kritische Betrachtung der Makrophagenklassifikation.....	78

4.5.	Ausblick	79
5.	Zusammenfassung	82
6.	Summary	83
7.	Verzeichnisse	84
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	84
7.2.	Abbildungsverzeichnis	86
7.3.	Tabellenverzeichnis	87
8.	Literaturverzeichnis	88
9.	Ehrenwörtliche Erklärung	105
10.	Danksagung	106

1. Einleitung

1.1. Die Bedeutung des Immunsystems in der Karzinogenese

Das Immunsystem ist ein komplexes System aus zellulären und humoralen Komponenten, die den Organismus vor Infektionen und Mikroorganismen schützen. Die Einteilung des Immunsystems erfolgt in die angeborene und die adaptive Immunabwehr, welche gemeinsam die effektive Elimination von Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten gewährleisten.(26) Die angeborene Immunabwehr besteht unter anderem aus phagozytären Zellen, welche nach Kontakt mit einem Pathogen Entzündungsmediatoren, Zytokine und Chemokine produzieren. Während die angeborene Immunantwort wenige Minuten nach Infektionsbeginn reagiert und die direkte Zerstörung des Pathogens zum Ziel hat, setzt die adaptive Immunantwort nach Stunden bis Tagen ein und führt über die Antikörperproduktion zur Bildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches teils zu lebenslanger Immunität führt.(90) Neben der Abwehr von Mikroorganismen und der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase ist das Immunsystem allerdings auch an der Entstehung und Fortschreiten von Krankheiten wie Autoimmunerkrankungen, allergischen Reaktionen oder Tumorerkrankungen beteiligt.(90)

Die physiologische Funktion des Immunsystems für Tumorerkrankungen liegt in der Kontrolle und Elimination von entarteten Tumorzellen.(141) Dieser Prozess wird auch als *immunosurveillance* bezeichnet.(90) Die Tumorzellen entgehen dieser Immunreaktion, indem sie neue Mutationen generieren, ihre Antigenpräsentation und die Expression von *human leucocyte antigen* (HLA) auf der Zelloberfläche verändern und dadurch nicht mehr erkannt werden.(90) Tumorzellen schaffen sich eine immunsuppressive Umgebung, welche die Komponenten des Immunsystems hemmt, unter anderem durch die Sekretion immunsuppressiver Zytokine, wie Interleukin 10 (IL-10) und *tumor growth factor β* (TGF- β).(42) Durch die Expression immunmodulatorischer Moleküle wie *programmed cell death ligand 1* (PD-L1), auch als Immuncheckpoint-Moleküle bezeichnet, werden zytotoxische Immunreaktionen gehemmt.(67) Weitere *tumor escape mechanisms* entstehen durch immunologische und molekulare Veränderungen in der unmittelbaren Umgebung des Tumors.(141)

1.1.1. *Tumor microenvironment*

Die Tumorumgebung (engl. *tumor microenvironment*) ist ein Schlüsselfaktor der Immunevasion von Tumorzellen.(141) Die unmittelbare Tumorumgebung entsteht als Resultat aus der Interaktion von Tumorzellen und dem umgebenden Gewebe, vermittelt durch Zytokine und andere regulatorische Faktoren.(112) Ein Merkmal des *tumor microenvironment* ist die Entstehung chronischer Inflammation als Reaktion auf das Tumorstadium. Die Inflammation führt zu DNA-Schäden und Dysregulation von Wachstumssignalen, was wiederum die Entstehung und Proliferation maligner Zellen fördert.(14) Veränderte Zytokinkonzentrationen im *tumor microenvironment* führen zu einer Dysbalance inflammatorischer Signale und zur Aktivierung für das Zellwachstum essenzieller Signalwege.

1.1.2. Immunzellen im *tumor microenvironment*

Das *tumor microenvironment* ist durch eine massive Infiltration mit Immunzellen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr gekennzeichnet.(141) Interessanterweise beeinflussen Anzahl, Typ und Lokalisation der Immunzellen die Prognose der Tumorerkrankungen.(7,110,141) Immunzellen können sowohl tumorfördernde als auch tumorunterdrückende Funktionen ausüben. Die komplexe Interaktion der verschiedenen Immunzellen führt schließlich zu einer wechselseitigen Gestaltung der Tumorumgebung, die die Immunevasion von Tumorzellen erleichtert.(76)

Im Folgenden soll die Rolle ausgewählter Immunzellen im *tumor microenvironment* exemplarisch dargestellt werden. Eine Vielzahl von Lymphozytenpopulationen akkumulieren in der unmittelbaren Tumorumgebung. CD8-positive-T-Lymphozyten sind als zytotoxische Zellen der adaptiven Immunabwehr maßgeblich an der direkten Zerstörung von Tumorzellen beteiligt. Im *tumor microenvironment* sind ihre Funktionen häufig unterrepräsentiert, was unter anderem an einer geringen Antigenpräsentation und dadurch verminderter Aktivierung liegt.(67,141) Ein Subtyp der T-Helferzellen, sogenannte regulatorische T-Zellen (Tregs), werden vermehrt ins Tumorgewebe rekrutiert.(67) Während zytotoxische T-Zellen die Effektorzellen der Immunreaktion gegen Tumorzellen sind, entfalten einige T-Helferzellen hingegen eine immunsuppressive Funktion und führen zu Immuntoleranz, indem sie die Funktionen

anderer Immunzellen hemmen.(42) Die Adressierung von tumorspezifischen Tregs ist Gegenstand verschiedener Studien.(74,127) Natürliche Killerzellen können Tumorzellen an veränderten Oberflächenantigenen erkennen und eliminieren. Im Tumorgewebe sind sie häufig unterrepräsentiert oder funktionell eingeschränkt.(142) *Myeloid-derived supressor cells* (MDSCs) sind unreife, myeloide Stammzellen, die sich im *tumor microenvironment* ansammeln. Vor allem der Phänotyp der CD11-positiven M-MDSCs fördert die Entstehung eines immunsuppressiven Milieus und hemmt zytotoxische T-Zellen.(67) MDSCs können sich zu TAMs differenzieren. Sie produzieren eine Vielzahl immunsuppressiver Substanzen wie Arginase 1, Nitritoxide (NO), reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Prostaglandin-E2 (PGE-2).(96) Weiterhin unterstützen sie die Differenzierung von CD4-positiven Lymphozyten zu Tregs. Die Rolle von Tumor-assoziierten Neutrophile (TANs) für das Tumorwachstum ist zweischneidig. Die Polarisation in N1 und N2-Neutrophile wird zur Beschreibung der gegensätzlichen Funktionen verwendet.(167) TANs sezernieren Chemokine wie CC-Chemokin-Ligand-2 (CCL2) und CCL17, die wiederum andere Immunzellen wie TAMs in die Tumormikroumgebung rekrutieren.(167) Sie fördern die Vaskularisierung und den Gewebeumbau von Tumorgewebe.(67) Trotz antiinflammatorischer Eigenschaften im *tumor microenvironment* scheinen die tumorfördernden Effekte von TANs zu überwiegen.(76) Therapeutische Strategien zielen daher zunehmend die Modulation oder Reprogrammierung von TANs ab.(67)

1.1.3. Tumor-assoziierte Makrophagen

1.1.3.1. Makrophagenfunktion

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems. Als Teil des mononukleär-phagozytären Systems stammen sie von myeloiden Stammzellen und im Blut zirkulierenden Monozyten ab. Makrophagen fungieren als Kontrollinstanz zur Eliminierung von Mikroorganismen und sind damit für eine effektive Immunabwehr unerlässlich.(90) Zu ihren Aufgaben gehören unter anderem die Phagozytose von Fremdpartikeln, die Modulation der Immunantwort und die Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase.(23,133) Für die Phagozytose und zahlreiche andere Funktionen besitzen Makrophagen Oberflächenrezeptoren, wie beispielsweise den Mannose-Rezeptor CD206 zur Erkennung von pathogenen Bestandteilen und

Antigenen.(155) Weitere Oberflächenmarker wie CD80 und CD86 dienen als kostimulatorische Moleküle bei der Antigenpräsentation und Interaktion von Makrophagen mit anderen Immunzellen.(155)

Die Funktionen von Makrophagen sind eng mit der Produktion von Zytokinen verknüpft. Durch die Produktion von Zytokinen wie IL-10, IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), sowie Chemokinen und ROS regulieren sie inflammatorische und antiinflammatorische Vorgänge. Unter den proinflammatorischen Zytokinen spielt IL-1 β eine bedeutende Rolle, da es als Schlüsselregulator die Sekretion weiterer Entzündungsmediatoren und die Aktivierung endothelialer Zellen vermittelt.(32) Die Synthese von IL-1 β erfolgt als inaktives Pro-Zytokin, das erst nach Stimulation inflammasomvermittelter Signalwege – etwa durch Pathogen-assoziierte Moleküle wie LPS und ATP – proteolytisch aktiviert wird.(83)

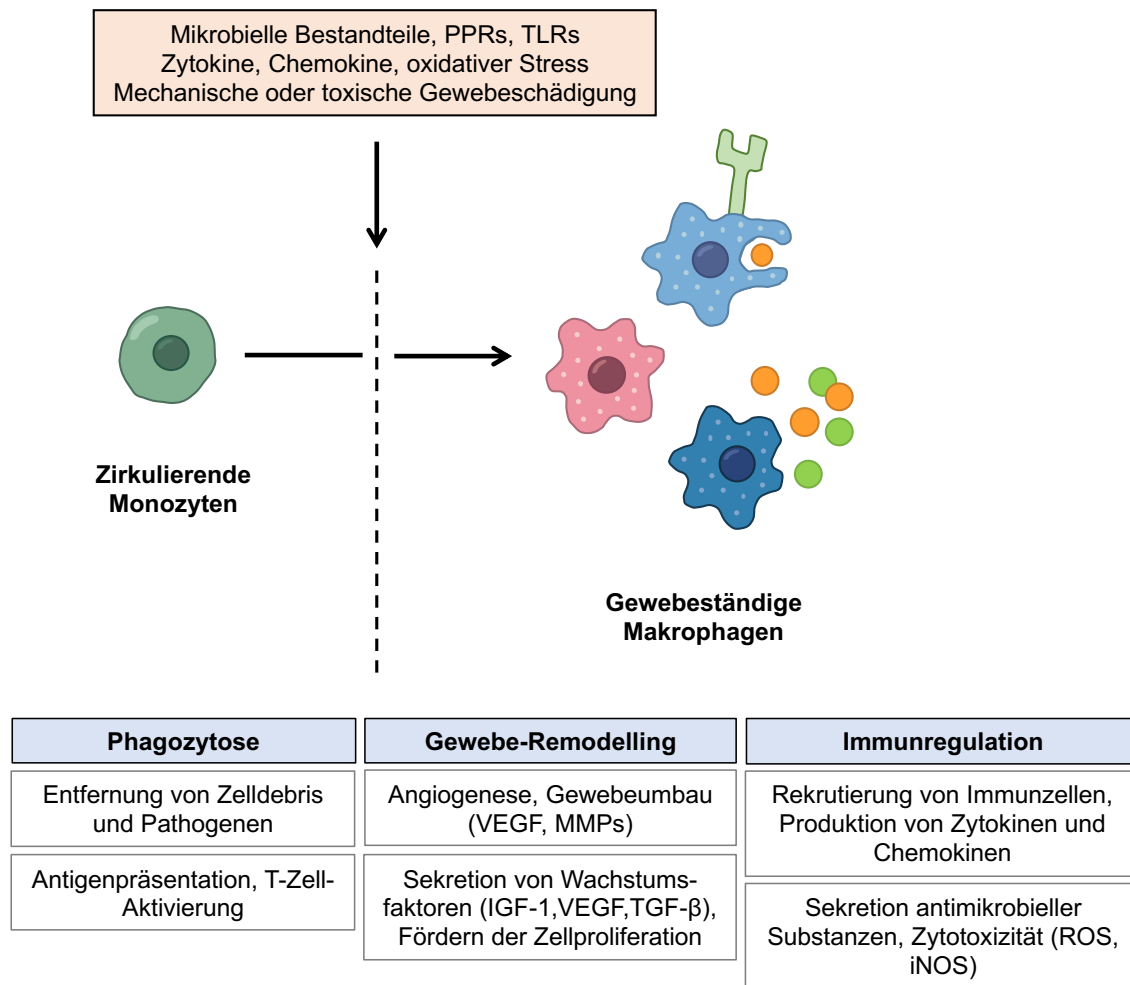


Abbildung 1: Schematischer Überblick der Makrophagenfunktion. Unter entzündlichen Bedingungen können zirkulierende Monozyten in das Gewebe rekrutiert werden und dort zu Makrophagen differenzieren. Diese dienen als antigenpräsentierende Zellen und können im Gewebe Mikroorganismen und Zelldebris durch Phagozytose entfernen. Zusätzlich haben sie ausgeprägte immunmodulatorische Funktionen und produzieren antimikrobielle Substanzen. Eigene Darstellung auf Grundlage von (133,155). **Abkürzungen:** IGF-1 = *Insuline-like growth factor 1*, iNOS = induzierbare NO-Synthase, MMPs = Matrix-Metallo-Proteinasen, PPRs = Pattern-Recognition-Rezeptoren, ROS = Reaktive Sauerstoffspezies, TGF- β = *Transforming growth factor beta*, TLRs = Toll-Like-Rezeptoren, VEGF = *Vascular endothelial growth factor*.

Makrophagen zeichnen sich durch ihre hohe Plastizität aus. In Reaktion auf Umgebungssignale können sie unterschiedliche Funktionszustände einnehmen und ihren Phänotyp verändern. Entsprechend besitzen Makrophagen eine zweiseitige Rolle für die Inflammation und damit assoziierten Erkrankungen.(17) Durch die Sekretion inflammatorischer Zytokine und die Rekrutierung anderer Immunzellen tragen Makrophagen zur Initiation der lokalen Immunantwort und Bekämpfung von Tumorzellen bei.(34) Gleichzeitig kommt den Makrophagen aber auch eine

gewebeerhaltende Funktion zu. Durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie *insuline growth factor 1* (IGF-1) oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF) werden Zellproliferation, Geweberegeneration und Angiogenese gefördert.(133) Die Produktion von Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) führt zu Gewebeumbau und kann die Integrität der Basalmembran beeinflussen.(133) Auch die Migration von Immunzellen wird dadurch vereinfacht. Eine Dysregulation zwischen proinflammatorischen und regenerativen Funktionen von Makrophagen ist mit andauernder Inflammation und Entstehung von Tumorerkrankungen assoziiert.(1)

1.1.3.2. Makrophagenpolarisation

Makrophagen werden häufig in die Subgruppen M1- oder M2-Makrophagen unterteilt. Die M1/M2-Nomenklatur ist eine abstrakte Einteilung, um die gegensätzlichen Funktionen von Makrophagensubtypen für physiologische und pathologische Prozesse zu beschreiben. Die Polarisation in die Phänotypen M1 und M2 findet als Reaktion auf verschiedene Umgebungssignale, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Pathogene, geschädigte Zellen oder metabolische Veränderungen, statt.(91,139) Sie umfasst Unterschiede auf transkriptioneller Ebene, in der Oberflächenmarkerexpression und in zahlreichen zellulären Funktionen.(17,139)

M1-Makrophagen (auch „klassisch aktiviert“ genannt) verstärken die Immunantwort gegen Pathogene und können das Wachstum von Tumorgewebe hemmen.(17) Sie können durch Signale wie Lipopolysaccharide (LPS), Interferon- γ (IFN- γ), *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und TNF- α polarisiert werden.(23) M2-Makrophagen (auch „alternativ aktiviert“ genannt) besitzen immunsuppressive Eigenschaften, haben aber auch Funktionen für Wundheilung und Gewebereparatur.(151) Sie sind somit stärker an der Auflösung der Inflammation beteiligt. Zu den Signalen der M2-Polarisation zählen IL-4, IL-10, IL-13 und der *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF).(84,101) **Abbildung 2** zeigt die Funktionen und molekularen Marker, die in der Literatur für die Differenzierung zwischen M1- und M2-Makrophagen herangezogen werden.

Die Unterscheidung zwischen M1- und M2-Makrophagen verdeutlicht zwar wichtige funktionelle Unterschiede, die klassische M1/M2-Nomenklatur bildet jedoch die

Plastizität von Makrophagen nur unzureichend ab.(101,118) Die Makrophagenpolarisation ist vielmehr ein dynamischer und reversibler Prozess zwischen den beiden Extremen M1 und M2. Um dieser funktionellen Vielfalt besser gerecht zu werden, werden insbesondere die M2-Makrophagen in der Literatur häufig weiter in die Subtypen M2a, M2b, M2c und M2d unterteilt.(28,59,97)

Eigenschaften von M1- und M2-Makrophagen	
	
M1-Makrophagen	M2-Makrophagen
Funktionen	
Verstärkung der Immunantwort	Auflösung inflammatorischer Prozesse
Sekretion antimikrobieller Substanzen	Sekretion von Wachstumsfaktoren, Förderung der Zellproliferation
Hemmung der Zellproliferation	Gewebeumbau, Wundheilung
Tumorsuppression	Tumorfördernde Eigenschaften
Aktivierungssignale	
LPS, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α	IL-4, IL-10, IL-13, M-CSF
Oberflächenmarker	
CD80, CD86, CD68, CD40, CD38	CD163, CD206, CD200R
Sezernierte Zytokine, Chemokine und weitere Substanzen	
TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23	IL-10, IL-4, TGF- β
CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10	CCR2, CXCR1, CXCR2
ROS, iNOS	Arg1, VEGF, PDGF, IGF, MMP2, Fibronectin, Ornithin

Abbildung 2: Spezifische Eigenschaften von M1- und M2-Makrophagen. M1-Makrophagen regen inflammatorische Vorgänge an, sezernieren proinflammatorische Zytokine und hemmen die Proliferation von Tumorzellen. M2-Makrophagen hingegen lösen inflammatorische Reaktionen auf, dienen der Gewebereparatur und können das Tumorwachstum fördern. Beide Makrophagensubtypen werden durch bestimmte Umweltsignale aktiviert und sezernieren immunwirksame Substanzen, Zytokine und Chemokine. Die Einteilung in M1- und M2-Makrophagen ist eine plastische Beschreibung gegensätzlicher Makrophagenfunktionen.(23,101,139) **Abkürzungen:** Arg1 = Arginase-1, CCR = *Chemokin C-C motif receptor*, CD = *Cluster of differentiation*, CXCL = *C-X-C motif chemokine ligand*, GM-CSF = *Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor*, IGF = *Insuline like growth factor*, IFN- γ = Interferon- γ , IL = Interleukin, iNOS = induzierbare NO-Synthase, LPS = Lipopolysaccharide, M-CSF = *Macrophage Colony-Stimulating Factor*, MMP2 = Matrix Metallopeptidase 2, PDGF = *platelet-derived growth factor*, ROS = Reaktive Sauerstoffspezies, TGF- β = *Tumor growth factor β* , TNF- α = Tumor-Nekrose-Faktor- α .

1.1.3.3. Einfluss von TAMs auf die Tumorprogression

Makrophagen machen bis zu 50 % der Immunzellen im *tumor microenvironment* aus und beeinflussen die dort stattfindenden Signalwege.(23) Die als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) bezeichneten Immunzellen tragen zum prognostischen und klinischen Outcome vieler Tumorerkrankungen bei.(59,144,159)

Monozyten werden durch inflammatorische Signale - darunter Zytokine, Chemokine sowie durch Gewebeschädigung freigesetzte Faktoren - ins Tumorgewebe rekrutiert, wo sie sich zu TAMs differenzieren. Dort können sie durch Phagozytose, Antigenpräsentation und Rekrutierung zytotoxischer T-Zellen die antitumorale Immunantwort steuern.(76) Allerdings wird TAMs eine eher tumorfördernde Funktion zugeschrieben. TAMs sezernieren Wachstumsfaktoren und Zytokine, die für Zellüberleben und Zellproliferation der Tumorzellen sorgen.(17) Sie registrieren hypoxische Signale der Tumorumgebung und sezernieren daraufhin Faktoren, die die Angiogenese begünstigen.(60) Durch die Sekretion von VEGF-C und VEGF-D wird zusätzlich die Lymphangiogenese beeinflusst.(17) Von Makrophagen sezernierte MMPs, Urokinasen und Plasmin führen zu Gewebeumbau und Transformation der Extrazellulärmatrix.(84) Dadurch wird die Migration von Tumorzellen und Immunzellen vereinfacht.(23) Neben dem direkten Einfluss von TAMs auf das Tumorzellwachstum besitzen die Zellen eine Schlüsselrolle für die Gestaltung des immunologischen *tumor microenvironment*. Sie können weitere Immunzellen ins Tumorgewebe rekrutieren, die wiederum das Tumorstadium fördern.(12,84)

Auch TAMs werden nach der M1/M2-Nomenklatur eingeteilt. Es wird angenommen, dass TAMs durch ihre immunsuppressiven und die Zellproliferation fördernden Eigenschaften dem M2-Subtyp entsprechen.(110) Allerdings konnten auch für den M1-Subtyp typische Charakteristika von TAMs nachgewiesen werden.(16) Die Einteilung in das M1/M2-Kontinuum wird dem Phänotyp von TAMs somit nicht gerecht. Die plastischen Zellen können in Reaktion auf Signale aus der Tumorumgebung vielfältige, funktionelle Stadien einnehmen.(17,143) Es gibt Hinweise darauf, dass TAMs an der Resistenz von Tumoren gegenüber systemischen und Immuntherapien mitwirken.(95,131) In welchem Ausmaß TAMs an der Therapieresistenz beteiligt sind, und welche Mechanismen dahinterstehen, bleibt offen. Eine tiefgreifendere

Untersuchung der Makrophagenpolarisation in Interaktion mit den anderen Bestandteilen des *tumor microenvironment* ist daher ein wichtiger Schritt zum besseren Verständnis der Funktion von Makrophagen für die Tumorprogression und Therapieresistenz.



Tumor-assoziierte Makrophagen

Protumorale Funktionen	Antitumorale Funktionen
Fördern der Tumorzellproliferation (Sekretion von Wachstumsfaktoren)	Hemmen des Zellwachstums durch Sekretion proinflammatorischer Substanzen (z.B. IL-1 β , ROS)
Angiogenese (VEGF, VEGF-C, VEGF-D)	Rekrutierung zytotoxischer Immunzellen
Gewebeumbau, Migration von Tumorzellen (Plasmin, Urokinase, MMPs)	

Abbildung 3: Tumor-assoziierte Makrophagen. TAMs fördern die Tumorprogression verschiedener solider Tumore. Sie nehmen eine zentrale Rolle für Tumorzellproliferation, Angiogenese und Metastasierung, sowie Gestaltung eines immunsuppressiven *tumor microenvironment* ein. TAMs nehmen durch Rekrutierung zytotoxischer Immunzellen auch an der gegen den Tumor gerichteten Immunantwort teil. Eigene Darstellung auf Grundlage von (103,165). **Abkürzungen:** IL-1 β = Interleukin-1 β , MMPs = Matrix-Metallo-Proteinasen, ROS = Reaktive Sauerstoffspezies, VEGF = *Vascular endothelial growth factor*.

1.2. Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste primäre Lebertumor und weltweit die dritthäufigste krebsassoziierte Todesursache.(124) Zu den Risikofaktoren des HCC zählen die chronische Hepatitis B und C, äthyltoxische Leberschäden, Stoffwechselerkrankungen und seltener die Exposition gegenüber leberschädigenden Substanzen.(69) Gerade in westlichen Ländern steigt die Inzidenz metabolischer Fettlebererkrankungen als Risikofaktor für die Entwicklung des HCC.(124) Das HCC entsteht fast ausschließlich auf dem Boden einer chronischen Entzündung des Lebergewebes, welche zu wechselnden Zyklen aus Gewebeschäden und regenerativem Gewebeumbau führt.(109,153) Daher gilt das HCC als klassisches Beispiel für Inflamations-assoziierte Tumorentstehung. Die chronische Inflammation führt zur

Infiltration des Lebergewebes mit Immunzellen und einer Dysbalance aus inflammatorischen Signalen.(112) Daher eignet sich das HCC als Modell zur Untersuchung von Immunzellfunktionen und deren Rolle für Tumorerkrankungen.

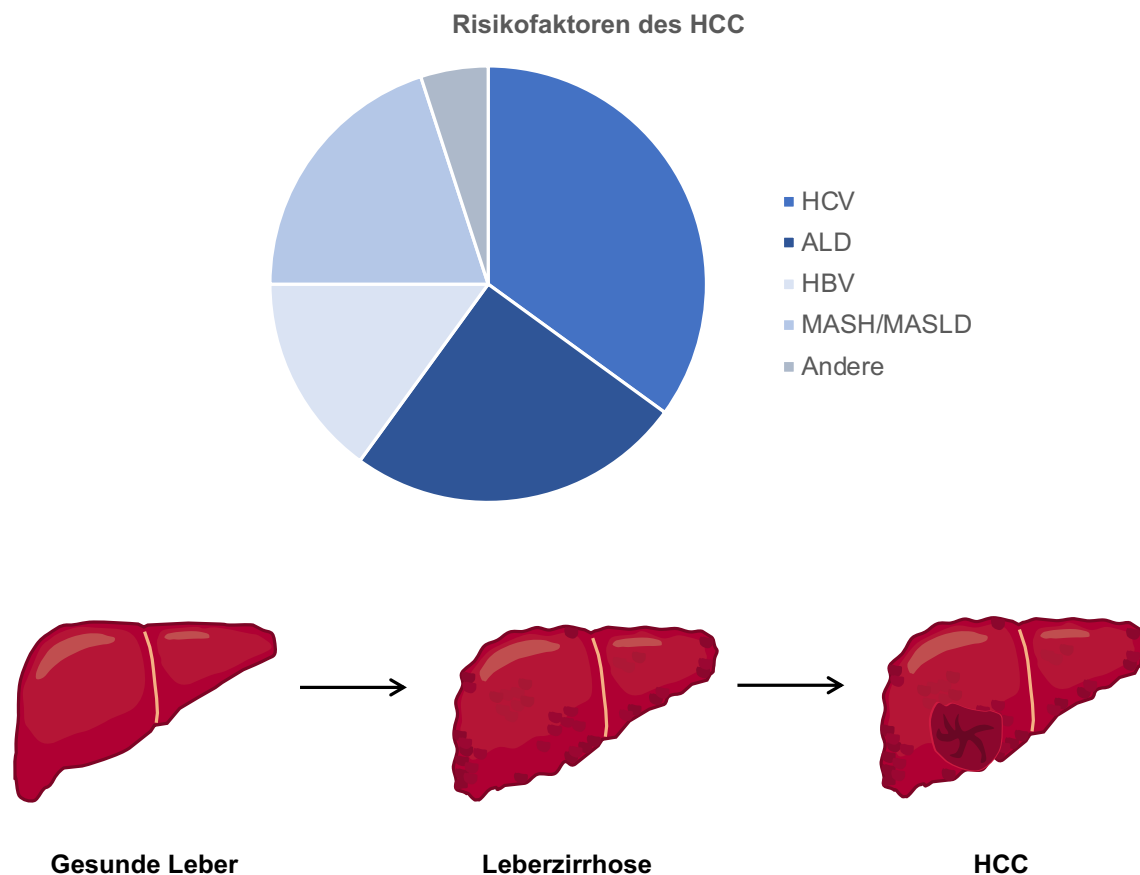


Abbildung 4: Risikofaktoren für die Entwicklung von HCC in Zentraleuropa. Die zugrundeliegenden Erkrankungen können mit oder ohne Entwicklung einer Leberzirrhose zu einem HCC führen. Das relative Risiko ein HCC zu entwickeln, unterscheidet sich je nach zugrundeliegender Erkrankung und ist bei chronischer Hepatitis-C-Infektion und begleitender Leberzirrhose am höchsten. Andere = U.a. Speicherkrankheiten, Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, Hämochromatose, Konsum von Aflatoxinen und anderen leberschädigenden Substanzen. Die Größenverhältnisse der dargestellten Risikofaktoren dienen der schematischen Veranschaulichung und stellen keine exakten epidemiologischen Häufigkeiten dar.(85,134) **Abkürzungen:** ALD = *Alcoholic liver disease*; HBV = Chronische Hepatitis-B-Infektion; HCV = Chronische Hepatitis-C-Infektion; MASH = *Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis*; MASLD = *Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease*.

Bei Diagnosestellung befindet sich bereits ein Großteil der Patientinnen und Patienten mit HCC in fortgeschrittenen Tumorstadien, in denen keine kurativen oder chirurgischen Behandlungsoptionen in Betracht kommen.(68) Lange Zeit war eine systemische Therapie mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib die einzige verfügbare Erstlinientherapie in diesen Stadien. Seit 2020 wurden jedoch mehrere immunbasierte Therapeutika für das HCC zugelassen, die im Vergleich zur bisherigen Standardtherapie mit Sorafenib eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens zeigen. Unter anderem wurde die Kombination aus dem PD-L1-Inhibitor Atezolizumab und dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab zur Erstlinientherapie des HCC zugelassen.(38,129) Darüber hinaus zeigte die Kombination der Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab (PD-1-Antikörper) und Ipilimumab (CTLA-4-Antikörper; CTLA = *cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*) in klinischen Studien langlebige Ansprechraten.(150) Weitere Therapeutika, u. a. die Kombination aus Tremelimumab und Durvalumab zeigen Wirksamkeit in Phase-III-Studien.(3) Die Erfolge mit immunbasierten Therapien beim HCC verdeutlichen die Bedeutung der Immunforschung für die Entwicklung weiterer, effizienterer Therapiestrategien. Trotz intensiver Forschung und neuer Therapieansätze sprechen einige Patienten nicht auf die systemischen Therapien an, die lediglich in palliativer Intention zum Einsatz kommen. Dies könnte an den heterogenen, genetischen und molekularen Veränderungen des HCC liegen.(109) Die Entschlüsselung der immunologischen Zusammenhänge im HCC und die Rolle von Immunzellen wie TAMs könnten zu neuen Erkenntnissen im Hinblick auf die Überwindung der Therapieresistenz führen.

1.2.1. Das Tumormilieu im hepatozellulären Karzinom

Die inflammatorischen Veränderungen in der Mikroumgebung des HCC haben eine Auswirkung auf Initiation, Progression und Therapieansprechen der Erkrankung.(70) Neben genetischen Veränderungen und dysregulierten Signalwegen ist vor allem die andauernde Inflammation und die Infiltration mit Immunzellen für die schlechte Prognose der Erkrankung verantwortlich.(7,110,112)

TAMs machen den größten Anteil der Immunzellen im *tumor microenvironment* des HCC aus.(30) Sie haben eine Auswirkung auf die klinisch-pathologischen Eigenschaften des HCC und sind generell mit einer schlechten Prognose assoziiert.(31,33,107,123) In

bisherigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die mit M2-Merkmalen ausgestatteten TAMs die Zellproliferation und Invasivität des HCC fördern.(148,151) TAMs tragen außerdem zur Entstehung und Aufrechterhaltung einer immunsuppressiven und wachstumsfördernden Umgebung im HCC bei.(18) Von TAMs produzierte Zytokine wie IL-10, TNF- α und IL-1 β führen über die Hemmung von zytotoxischen Immunzellen und Aktivierung inflammatorischer Signalwege zur Erhaltung einer immunsuppressiven Umgebungsreaktion.(83,135) TAMs interagieren mit anderen Immunzellen im Tumorgewebe und inhibieren dadurch die gegen das HCC gerichtete Immunantwort.(31) Sie nehmen damit eine Schlüsselfunktion für die Immunevasion der Tumorzellen ein. Eine Entschlüsselung der Interaktion zwischen HCC-Zellen und TAMs, sowie der Makrophagendifferenzierung könnte zu neuen Ansätzen für immunmodulatorische Therapien im HCC führen.

Die Zytokine IL-6, TGF- β , IL-10 und TNF- α sind im HCC hochreguliert.(138,160) Veränderte Zytokinkonzentrationen führen zu einer Dysbalance inflammatorischer Signale. Sie sind in unterschiedlichem Ausmaß mit einer immunsuppressiven Tumorumgebung und Invasivität des HCC assoziiert.(78,108) Neben Zytokinen führt auch die vermehrte Produktion von ROS zum Fortschreiten der malignen Entartung von Hepatozyten.(112) ROS sind freie Radikale oder andere Moleküle, die sich zu solchen umwandeln können. In bestimmten Konzentrationen tragen ROS zu einer normalen Zellfunktion bei, eine zu hohe Produktion von ROS führt allerdings zu oxidativem Stress.(131) So genannte ROS-Fänger besitzen die Fähigkeit, große Mengen an ROS zu binden und dadurch deren funktionellen Einfluss zu minimieren.(95) Hierzu zählen unter anderem N-Acetylcystein, α -Tocopherol und MnTBAP, die über unterschiedliche Mechanismen zur Reduktion oxidativer Prozesse beitragen.(95,99) ROS gelten als Mediatoren der inflammatorischen Leberschädigung, welche die Grundlage der Hepatokarzinogenese darstellt.(106,154) In hohen Konzentrationen können sie Signalwege einleiten, die wiederum die Angiogenese, Zellproliferation und Metastasierung des HCC beeinflussen können.(145,171) Im HCC können TAMs durch ROS ins Tumorgewebe rekrutiert werden.(8) TAMs selbst können durch einen positiven Verstärkungsmechanismus eine hohe Menge an ROS produzieren und damit die Rekrutierung weiterer Immunzellen fördern. Dadurch wird die Zusammensetzung des *tumor microenvironment* verändert. Inwiefern die Veränderung der ROS-Konzentration

die Funktion von Immunzellen in der Mikroumgebung des HCC beeinflusst, ist allerdings unklar.

1.3. Herausforderungen in der experimentellen Erforschung von Tumor-Immunzell-Interaktionen

Das Verständnis der Interaktion zwischen Tumorzellen und Immunzellen ist entscheidend für die Entwicklung immunbasierter Therapiestrategien sowie für das Verständnis von Tumorgenese und Chemotherapieresistenz von Tumoren. Allerdings steht die Erforschung der Interaktion vor mehreren Herausforderungen. Unter anderem ist die Verwendung von Tiermodellen fehleranfällig und liefert aufgrund artspezifischer Unterschiede häufig nur eingeschränkt übertragbare Ergebnisse.(89,135) Auch *in vitro* fehlt es häufig noch an standardisierten und vergleichbaren Forschungsergebnissen. Die Etablierung eines geeigneten Versuchssettings, das reproduzierbare mechanistische Untersuchungen zu den Tumor-Immunzell-Interaktionen erlaubt, ist somit entscheidend für das Verständnis dieser Wechselwirkungen. Es müssen geeignete translationale und somit auf die klinische Situation anwendbare Modelle gefunden werden.

1.3.1. Methodische Ausgangslage der Makrophagendifferenzierung

Um die Interaktion zwischen Immunzellen und Tumorzellen zu untersuchen, sind funktionell geeignete Immunzellen erforderlich. Ein häufig verwendetes Modell zur Untersuchung der Interaktion von Makrophagen mit Tumorzellen ist die *in-vitro*-Differenzierung von TAMs aus Monozyten.(102,171) Hierfür werden *in-vitro*-Zelllinien wie die Zelllinie THP-1 verwendet.(4) THP-1-Zellen stellen eine homogene und plastische Zellpopulation dar, die auf Umgebungsbedingungen und Differenzierungssignale sensitiv reagiert und somit als Modell für die Makrophagendifferenzierung geeignet sind.(4) Zur näheren Abbildung der *in-vivo*-Situation kommen auch von Spendern gewonnene periphere Blutmonozyten (*peripheral blood mononuclear cells* = PBMCs) zum Einsatz.(128) Die experimentellen Bedingungen für die Differenzierung von THP-1-Zellen sind teilweise etabliert, weisen aber dennoch deutliche Unterschiede in den Versuchsprotokollen auf. Verwendung und Konzentration der Differenzierungssubstanzen, die Dauer der Differenzierung und die Methodik zur Identifizierung der Makrophagenphänotypen variieren erheblich zwischen

den Differenzierungsprotokollen. **Tabelle 1** erwähnt wichtige Versuchsprotokolle und fasst die häufigsten Unterschiede der einzelnen Versuchsschritte zusammen. Die dargestellte Heterogenität der Protokolle verdeutlicht das Fehlen eines standardisierten Ansatzes zur Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen.

Tabelle 1: Protokolle zur Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen

Versuchsschritt	Unterschiede in den Protokollen
1 Behandlung der Monozyten mit PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat)	Variation der PMA-Konzentration - 5 ng/ml, ca. 8 nmol/l (39,54,100) - 25 ng/ml, ca. 40 nmol/l (11) - 125 ng/ml, ca. 200 nmol/l (11,28) - bis zu 180 ng/ml, ca. 300 nmol/l (159)
2 Dauer der PMA-Behandlung	Dauer der PMA-Behandlung - 6 h (137,148) - 24 h (11,44) - 48 h (105) - 72 h (28,62,63) - Bis 14 Tage (39) Einführen einer Ruhephase nach PMA-Behandlung für - 24 h (44,62,63) - 48 h (39) - 72 h oder länger (11)
3 Differenzierung der Makrophagensubtypen	Untersuchung der Makrophagensubtypen - Fokus liegt auf der Untersuchung von nur M0- oder M1-Makrophagen (20,28,65) - Differenzierung von M1- und M2-Makrophagen im Vergleich (11,54,62,97,105) Unterschiedliche Differenzierungssubstanzen für M2-Makrophagen - IL-4 und IL-13 (11,44,54,97) - Nur IL-4 (39) - IL-10 oder TGF-β (11,20,118,156)
4 Dauer der Makrophagen-differenzierung	Dauer der Behandlung mit den Differenzierungssubstanzen - 16 h (137,148) - 24 h (63,118) - 48 h (118) - 72 h (44,105)
5 Analyse der differenzierten Makrophagen	Methodische Untersuchung der Makrophagensubtypen - Verwendung von einzelnen Oberflächenmarkern (137,148,164) - Verwendung von vier bis fünf verschiedenen Oberflächenmarkern (11,39,54,118) - Untersuchung mit mehreren ergänzenden Methoden wie FACS (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung), Zytokinsekretion oder morphologischer Beurteilung (28,44,54)

1.4. Zielsetzung

Das Ziel dieser Promotion ist die Etablierung eines geeigneten Protokolls zur Makrophagendifferenzierung aus monozytären THP-1-Zellen. Dieses Protokoll ist eine wichtige Voraussetzung, um Tumor-Immunzell-Interaktionen *in vitro* zu untersuchen. Hierbei wurde insbesondere Wert auf die Charakterisierung der Makrophagen anhand ihrer Oberflächenmarkerexpression und Zytokinproduktion gelegt. Das etablierte System soll zukünftigen Untersuchungen der unterschiedlichen Makrophagensubtypen und deren Interaktion mit humanen HCC-Zelllinien, sowie Bestandteilen des *tumor microenvironment* dienen. Diese Arbeit soll nicht nur ein reproduzierbares *in-vitro*-Modell zur Differenzierung von Makrophagen in M1- und M2-Subtypen aus humanen THP-1 Zellen entwickeln, sondern auch erste Fragen zum Verständnis der Makrophagendifferenzierung und Interaktion mit humanen HCC-Zelllinien beantworten:

- Exprimieren *in vitro* differenzierte M1- und M2-Makrophagen reproduzierbar unterschiedliche Zytokinlevel und Oberflächenmarker?
- Können ROS-Modulatoren die Makrophagen, die Tumorzellen und deren Interaktion beeinflussen?
- Beeinflussen M1- und M2-Makrophagen das Wachstum und die Proliferation von HCC-Zellen?

Diese Arbeit soll die Grundlage für weitere Forschungsarbeiten und Experimente an TAMs bilden und damit zum Verständnis von Tumor-Immunzell-Interaktion beitragen. Die Charakterisierung von Zellen im *tumor microenvironment* kann langfristig dieses Tumormilieu und im Speziellen TAMs als neues Therapieziel identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Laborgeräte	
Bezeichnung	Hersteller
Axiocam 305 Color (Mikroskopie-Kamera)	Carl-Zeiss-Mikroskopie, Jena, Deutschland
CO2-Inkubator (Heracell Vios 160i)	Thermo Fisher Scientific, Walthams, Massachusetts, USA
BD FACS Verse Tm	BD Biosciences, New Jersey, USA
Fluoreszenzmikroskop (mit Olympus CMA0D Aufsatz)	Zeiss, Leipzig, Deutschland
FluoStar	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
Optima® - Mikrotiterplatten-Photometer	
Lichtmikroskop BX51	Olympus, Tokyo, Japan
Mikroskop Laborlux D	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop-Objektivadapter	Solomark, Yuyao, Zhejiang, China
Multipipette® M4	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer, Tiefe: 0,1 mm 0,0025mm ²	Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland
Pipette Pipetman 10-100	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipetten (Pipette Reference®, 0,5-10, 10-100, 100-1000)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sicherheitswerkbank Zellkultur Class II ENA 2	Nuaire, Plymouth, MN, USA
Ultraschallbad Sonorex Super RK102H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vortex Mixer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Waage	Mettler, Toledo
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zentrifuge (Rotina 420 R)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 3: Verwendete Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

Hilfsmittel	Hersteller
12-Well-Platten (CELLSTAR® Zellkultur Multiwellplatte)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
8-Well-Zellkulturkammern	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
96-Well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf-Gefäße (steril, 0,5 ml, 1,5 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Filter (steril, 0,22 µm)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Parafilm (Laboratory film)	Bemis, Neenah (USA)
Verschlussfolie	
Pipettenspitzen: 20 µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (für Pipettus, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Cellstar, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (Multistep-Pipette): 0,5 ml, 1 ml, 2,5 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen (75 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen für Suspensionkulturen (75 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen (steril, 15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar tube®	

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Accutase	Merck, Sigma-Aldrich
Alpha-Tocopherol (Reinheit > 95,5 %)	Merck, Sigma-Aldrich
Gelöst in 99,8 % Ethanol	
Aqua destillata	B. Braun, Melsungen, Deutschland
BzATP (2'(3')-O-(-benzoyl- benzoyl)ATP-Tritethylammonium-Salz	Jena Bioscience, Jena, Germany
BD Cytoperm/CytofixTM	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD Perm/WashTM	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
BSA	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach
DMSO: Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt, Germany
Ethanol (C ₂ H ₅ OH) ≥ 99,9 %, p.a.	Merck, Sigma-Aldrich
FCS: Foetal calf serum	Capricorn, Ebsdorfergrund, Deutschland
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O (Aqua, destilliert)	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
IFN-γ (human)	R&D Systems
IL-13 (Human IL-13)	Peprtech (Thermo Fisher Scientific)
IL-4 (rekombinant human IL-4)	Peprtech (Thermo Fisher Scientific)
Isopropanol ≥ 99,9 %, p.a.	Merck, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Lipopolysaccharid (E. coli O111:B4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lipopolysaccharid (E. coli O26:B6)	Merck, Darmstadt, Deutschland
May-Grünwalds Eosin- Methylenblaulösung, modifiziert	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
MnTBAP (Mn(III)tetrakis(4-benzoic- acid)porphyrin Chloride)	Calbiochem® Merck, Darmstadt, Deutschland
Cell Proliferation Kit (MTT)	Roche, Mannheim, Deutschland
N-Acetyl-L-cysteine	Merck, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Gelöst in Aqua zur Erstellung von 100 mM-NAC-Lösung	

Natriumpyruvat	Merck, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Nigericin (nigericine sodium salt)	Merck, Darmstadt, Germany
Gelöst in Ethanol (EtOH)?	
PBS - Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Merck, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco™ Life Technologies, Thermo Fischer Scientific
Phorbol-12-myristat-13-acetat(PMA) (4B,90,12β,130,20-pentahydroxytiglia-1,6-dien-3-one-12β-myristate13-acetate;12-O-tetradecanoylphorbol13-acetate)	Merck, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany
Propidiumiodid-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Merck, Sigma-Aldrich
TrypLE™ Express	Gibco™ Life Technologies (Thermo Fischer Scientific)
Zellkulturmedium - DMEM Dulbecco`s Modified Eagle Medium, HEPES, GlutaMax Supplement	Gibco™ Life Technologies, Thermo Fischer Scientific

Tabelle 5: Antikörper für die Messungen mit FACS BDVerse™

	Marker	Fluorochrom	Clone	Hersteller
Antikörper gegen Oberflächenantigene	Human CD14	FITC	M5E2	BD Pharmingen™
	Human CD38	Pe-Cy7	HIT2	BD Pharmingen™
	Human CD80	FITC	BB1	BD Pharmingen™
	Human HLA-DR	PerCP-Cy5.5	L243	BD Biosciences
	Human CD206	PE	19.2	BD Pharmingen™
	Human CD86	PE	2331	BD Pharmingen™
	Human CD11c	APC	B-ly6	BD Pharmingen™
	Human CD86/CD209/CD83	PE/PerCP/Cy5.5/APC	HB15e	BD Biosciences
	Human CD200R	BV421	OX-108	BioLegend
	Human CD163	PE	GHI/61	BD Pharmingen™

Istotypen-Kontrollen	Human CD36	PerCP-Cy	NL07	BD Pharmingen™
	Human CCR7	APC	2-L1-A	BD Pharmingen™
	Human CD16	PE	3G8	BioLegend
	Mouse-IgG2a, κ	FITC		
	Mouse-IgG1, κ	Pe-Cy7		BD Pharmingen™
	Mouse IgM, κ	FITC		BioLegend
	Mouse IgG2a, κ	PerCP-Cy5.5		BD Pharmingen™
	Mouse-IgG1, κ	PE		BD Biosciences
	Mouse BALB/c IgG1, κ	PE		BD Pharmingen™
	Mouse BALB/c IgG1, κ	APC		BD Pharmingen™
	Mouse IgG1, κ	PerCP-Cy5.5		BD Pharmingen™
	Mouse IgG1, κ			BD Biosciences
	Mouse BALB/c IgG1, κ			BioLegend
	Mouse IgM, κ	PerCP-Cy5.5		BD Pharmingen™
	Mouse BALB/c IgG1, κ	APC		BD Pharmingen™
	Mouse IgG1, κ	PE		BD Pharmingen™

Tabelle 6: ELISA-Kits (Human Quantikine ELISA R&D Systems® a biontech® brand, Minneapolis, MS, USA)

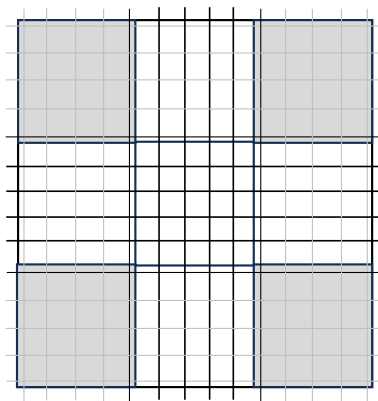
Zytokine	Artikelnummer
Human IL-6	Cat#D6050
Human IL-10	Cat#D1000B
Human TGF-β -1	Cat# DB100B
Human IL-1β / IL-1F2 DuoSet	Cat#DY201
Human TNF-a	Cat#DTA00D
Human CCL18/PARC	Cat#DCL180B

2.2. Zellkulturen

Humane, monozytäre THP-1-Zellen wurden von der *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* bezogen und dienten der Untersuchung von Monozyten- und Makrophagenfunktionen. Die Monozyten wurden als Suspensionszellen in den Zellkulturflaschen inkubiert. Für die Untersuchung von Leberkrebszellen wurden die humanen Hepatoma-Zelllinien Huh7- und HepG2-Zellen verwendet. Beide Zelllinien wurden von der *JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank)* des *National Institute of Biomedical Innovation, Health and Nutrition* erworben. Die Zellen wuchsen adhärent als Monolayer am Boden der Zellkulturflaschen.

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco, *high glucose*). Das Medium wurde mit 10 % FCS (50 ml), 1 % Natriumpyruvat (5 ml) und 1 % PenStrep (Penicillin + Streptomycin, 5 ml) versetzt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 25 ml Kulturmedium im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Routinemäßig erfolgten fotografische Kontrollen der Zellkultur mit einem Handyaufsatz fürs Mikroskop (Solomark®). Der Mediumwechsel und das Umsetzen (Passagieren) in neue Zellkulturflaschen erfolgte bei allen Zelllinien in einem Abstand von drei oder vier Tagen. Die adhärent wachsenden Huh7- und HepG2-Zellen wurden passagiert, sobald der Boden der Zellkulturflasche zu 80 – 90 % bewachsen war. Adhärente Huh7- und HepG2-Zellen wurden vor der Zellzählung bei 37°C für sieben Minuten mit 5 ml Accutase pro Zellkulturflasche inkubiert und damit vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die korrekte Ablösung der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurde die Reaktion mit 5 ml DMEM-Medium gestoppt und die Zellen in Suspension in einen Falcon überführt. THP-1-Zellen in Suspensionskultur wurden direkt in Falcons überführt und für die Zellzählung vorbereitet. Je nach Versuch wurden die Zellen in einer Dichte von 3×10^6 Zellen pro Zellkulturflasche ausgesät. Alle Zelllinien wurden maximal bis zur 25. Passage verwendet.

Zur Bestimmung der Zellzahl erfolgte die Färbung von 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau. Die mikroskopische Zellzählung wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt (siehe **Abbildung 5**).



Vitale Zellen in den äußeren 4 Eckquadranten
 / 4 (Mittelwert aus allen Quadranten)
 x 2 (Verdünnungsfaktor von Trypanblau / Zellsuspension)
 x 10^4 (Faktor der Neubauer Zählkammer)
 = Zellzahl pro ml

Abbildung 5: Zellzählung mit Neubauer Zählkammer. Hierfür wurden die Zellen in den äußeren vier Quadranten gezählt und die Anzahl durch vier geteilt. Nach Verrechnung der ermittelten Zellzahl mit dem Verdünnungsfaktor 10 und dem Faktor der Neubauer Zählkammer (10^4) ergibt sich als Ergebnis die Zellzahl/ml.

2.3. Differenzierung von THP-1-Zellen in verschiedene Makrophagensubtypen

Es erfolgte die *in-vitro*-Differenzierung der Makrophagen in die Phänotypen M0, M1 und M2. Da für die Differenzierung von THP-1-Zellen zu Makrophagen eine Vielzahl unterschiedlicher Protokolle beschrieben ist, wurden in dieser Arbeit die Versuchsbedingungen variiert, um ein stabiles und reproduzierbares Protokoll zu etablieren (siehe **Tabelle 1**).

Im Rahmen des Versuchsdesigns wurden folgende Parameter variiert:

- Zelldichte der THP-1-Zellen (Aussäen von $0,3 \times 10^6$ und $0,5 \times 10^6$ Zellen/Well)
- PMA-Konzentration (50 nmol/l und 100 nmol/l)
- Einführen einer Ruhephase von 24 h in DMEM-Medium nach der Behandlung mit PMA
- Dauer der Inkubation mit Differenzierungsmedien (48 und 72 h)
- Konzentrationen des Differenzierungsstimulus IL-4 (20 ng/ml und 40 ng/ml)
- Bestimmung verschiedener Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated cell sorting*, FACS)
- Bestimmung verschiedener Zytokine mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (*Enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA)
- Bestimmung der Zytokinkonzentration in den Zellkulturüberständen nach 24, 48 und 72 h

Nach Optimierung der Versuchsbedingungen wurde ein standardisiertes Differenzierungsprotokoll etabliert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $0,3 \times 10^6$ Zellen/Well pro 1 ml DMEM-Medium in 12-Well-Platten ausgesät und mit 50 nmol/l Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) stimuliert. Die Inkubation erfolgte über 24 h bei 37°C und 5 % CO₂. Anschließend erfolgten ein Mediumwechsel und eine weitere Inkubation von 24 h in DMEM-Medium. Ein Teil der THP-1-Zellen wurde ohne Zugabe weiterer Stimulanzen inkubiert. Diese unbehandelten THP-1-Zellen werden als M0-Makrophagen bezeichnet. Die Polarisation zu M1-Makrophagen erfolgte durch die Zugabe von 10 ng/ml LPS (*E. coli* O111:B4) und 10 ng/ml IFN- γ . Die Polarisation zu M2-Makrophagen erfolgte durch die Zugabe von 20 ng/ml IL-4 und 20 ng/ml IL-13. Zur Kontrolle der korrekten Differenzierung wurden eine lichtmikroskopische Beurteilung der Morphologie, FACS-Messungen zur Detektion von Oberflächenmarkern sowie ein ELISA zur Messung der Zytokinkonzentration durchgeführt.

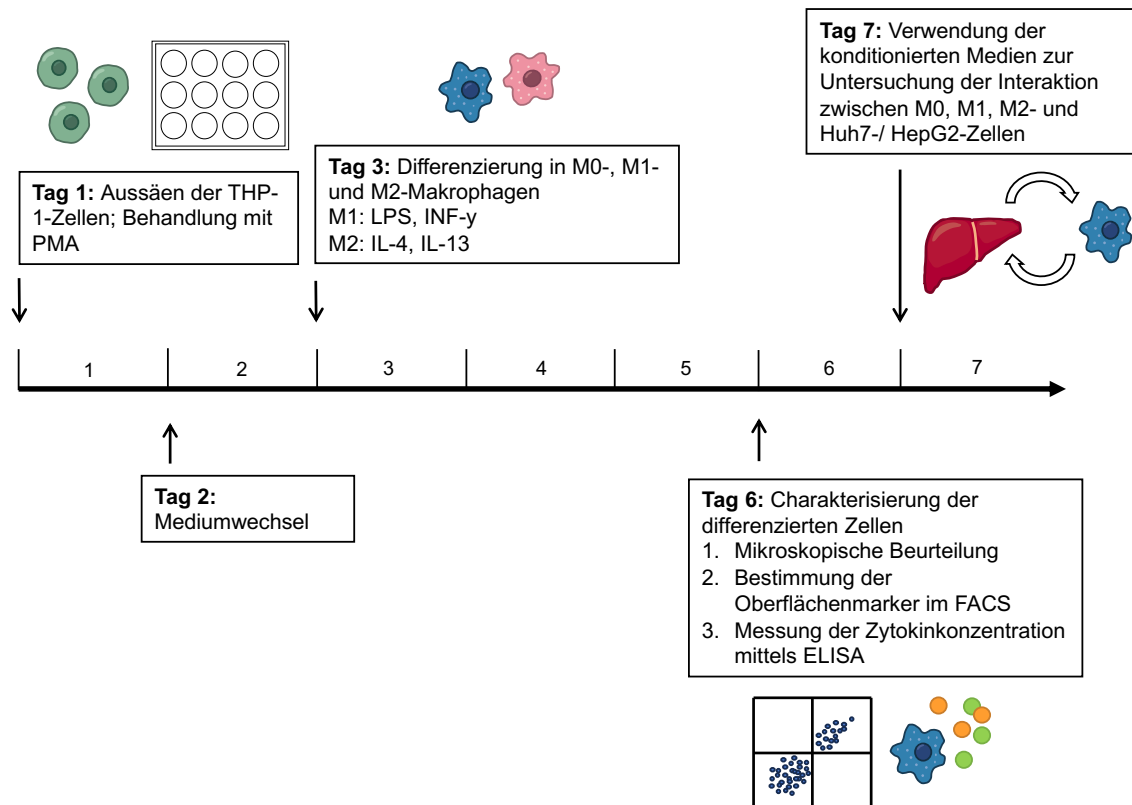


Abbildung 6: Darstellung des Ablaufs der Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen. THP-1-Zellen werden an Tag 1 ausgesät und mit 50 nmol/l PMA behandelt. An Tag 2 erfolgt ein Mediumwechsel und die Inkubation für 24 h in DMEM-Medium. An Tag 3 erfolgt die Differenzierung in verschiedene Makrophagensubtypen mit 10 ng/ml IFN- γ und 10 ng/ml LPS zur Differenzierung in M1-Makrophagen und mit 20 ng/ml IL-4 und 20 ng/ml IL-13 zur Differenzierung in M2-Makrophagen. An Tag 6 wurden die Zellen lichtmikroskopisch beurteilt und im FACS und ELISA genauer charakterisiert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend verwendet, um die Interaktion zwischen Makrophagen und HCC-Zellen zu untersuchen.

2.3.1. Fixierung und Färbung der Makrophagen zur morphologischen Beurteilung

Die THP-1-Zellen wurden auf einem 8-Well-Kammerobjektträger (*chamber slides*, Sarstedt®) mit einer Dichte von $0,1 \times 10^6$ Zellen/Well ausgesät und entsprechend dem Differenzierungsprotokoll behandelt. Nach einem Waschdurchgang mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) erfolgte die Behandlung mit 500 μ l 4,2%-iger Paraformaldehyd-Lösung (Cytofix/Cytoperm®), um die Zellen auf dem Objektträger zu fixieren. Die Zellen wurden 20 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Der Objektträger wurde luftgetrocknet und bei 4°C bis zur Färbung gelagert. Zur morphologischen Beurteilung wurden die

Zellen mit einer Pappenheim-Färbung behandelt. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus Färbemethoden nach May-Grünwald (Färbung für drei Minuten, 500 µl/Well) und einer weiteren Färbung nach Giemsa (Färbung für 15 Minuten bei einer Verdünnung von 1:20, 500 µl/Well). Zwischen den Färbungen wurden die Zellen für vier Minuten mit 500 µl destilliertem Wasser gereinigt. Der Objektträger wurde für weitere 30 Minuten luftgetrocknet. Die differenzierten Zellen auf dem Objektträger wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus CMA0D Aufsatz, Zeiss) bei 10.000 - 20.000-facher Vergrößerung morphologisch beurteilt und fotografiert. Die Bildverarbeitung erfolgte mit der ZEN-Software (SP2, 2012, *blue edition*) nach Anleitung des Herstellers.

2.3.2. Bestimmung der Oberflächenmarkerexpression mit FACS

FACS basiert auf dem Verfahren der Durchflusszytometrie. Es ist ein lasergestütztes Verfahren, welches einzelne Zellen anhand ihrer spezifischen Zelleigenschaften analysieren kann. Dabei fließt eine Zellsuspension durch ein Messgerät, das sogenannte Durchflusszytometer. Die einzelnen Zellen werden mit einem Laser bestrahlt und anhand ihrer Zellgröße im *forward scatter* (FSC, Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung) sowie ihrer Zellgranularität im *side scatter* (SSC, Lichtstreuung zur Seite) beurteilt.(120) Zusätzlich können Oberflächenmerkmale der Zellen durch Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern detektiert werden.

Die differenzierten THP-1-Zellen wurden mit Farbstoff-gekoppelten Antikörpern für bestimmte Oberflächenantigene (siehe **Tabelle 7**) gefärbt. Die Überstände wurden verworfen und es erfolgte ein Waschdurchgang mit 1 ml PBS. Um die Zellen vom Boden der Well-Platten zu lösen, wurden sie für sechs Minuten mit 500 µl TrypLE®/Well bei 37°C inkubiert. Die entstandene Zellsuspension wurde mit PBS versetzt, in einen Falcon überführt und bei 100 g (g = Maß für Zentrifugationsbeschleunigung) und 4°C für sieben Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden gezählt und für die Färbung mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml pro Röhrchen vorbereitet. Die Zellproben wurden mit 1 ml FACS-Puffer (95 % PBS + 5 % BSA = *bovine serum albumine*) pro Zellprobe gewaschen und bei 500 g und RT (Raumtemperatur) für 5 Minuten zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde verworfen und die Zellproben erneut in 400 µl FACS-Puffer

gelöst. Von der entstandenen Einzelzellsuspension wurden jeweils 100 µl in die Polystyrolröhrchen überführt.

Für die Färbung der Zellen mit den einzelnen Antikörpern wurden Mischungen aus mehreren Antikörper-Farbstoff-Kombinationen erstellt und getestet. Abhängig von der Empfehlung des Herstellers variierte die Menge der Antikörper-Lösung zwischen 3 und 5 µl pro Test. Die Menge der Antikörper-Lösung wurde mit der Anzahl an zu testenden Zellproben multipliziert. Die fertiggestellten Antikörper-Lösungen wurden gründlich gemischt. **Tabelle 7** zeigt die für die Messungen verwendeten Antikörper-Farbstoff-Kombinationen.

Tabelle 7: Verwendete Antikörper-Farbstoff-Kombinationen zur Detektion von Oberflächenmarkern

Panel	Oberflächenmarker	Fluorochrom	Menge
Panel 1	Human CD80	FITC	5 µl
	Human CD38	Pe-Cy7	5 µl
	Human CD86	PE	3 µl
	Human CD209	PerCP-Cy5.5	3 µl
	Human CD83	APC	3 µl
Panel 2	Human CD206	PE	5 µl
	Human HLA-DR	PErcP-Cy5.5	5 µl
	Human CD11c	APC	5 µl
	Human CD163	PE	5 µl
	Human CD38	Pe-Cy7	3 µl
Panel 3	Human CD14	FITC	5 µl
	Human CD16	PE	5 µl
	Human CD36	PerCP-Cy	5 µl
	Human CCR7	APC	5 µl
	Human CD200R	BV421	3 µl

Je 100 µl der Zellsuspension wurde mit der Antikörper-Lösung gemischt. Die Zell-Antikörper-Mischung wurde für 20 Minuten bei 4°C und Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein weiterer Waschgang mit 300 µl FACS-Puffer, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Es folgte eine Zentrifugation bei 250 g und RT für 6 Minuten. Die gefärbten Zellproben wurden zur Vorbereitung der Messungen mit 300 µl Fixierlösung (PBS und 1 % PFA) vorbereitet. Bis zur Messung im Durchflusszytometer wurden die Zellen im Dunkeln bei 4°C gelagert. Ein Teil der

Zellproben wurde im gleichen Schritt mit der korrespondierenden Antikörper-Isotyp-Kontrolle inkubiert. Die Isotypen-Kontrollen dienten als Negativkontrolle zur Detektion unspezifischer Antikörperbindungen. Die einzelnen Zellproben und ihre Oberflächenmarkerexpression wurden mit dem BD FACSVerse™ Gerät (BD Biosciences®) bei einer Detektion von mindestens 10.000 Ereignissen pro Zellprobe gemessen.

Die Analyse der Messergebnisse erfolgte mit der FlowJo Software® (Version 10.8.1). Die Messergebnisse der einzelnen Zellproben wurden anhand von FSC-A (*Forward scatter*) und SSC-A (*Side scatter*) in einem Diagramm visualisiert. Das erste Gating erfolgte unter Verwendung des *Polygon-gate-tools* und Einschluss der Zellen anhand ihrer Größe und Granularität. Somit ließen sich die vitalen Monozyten einschließen. Der Einfluss des Zell-Debris wurde dadurch minimiert. Im Folgenden wurden die ausgewählten Zellen anhand ihrer Oberflächenmarkerexpression als Histogramm dargestellt. Die weitere Darstellung erfolgte in einem *Dot-Plot*-Diagramm unter Vergleich zweier verschiedener Oberflächenmarker. Quadratische Gates (*Rectangular gates*) wurden verwendet, um die Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarkerexpression zu differenzieren und den Anteil der Oberflächenmarker-exprimierenden Zellen zu ermitteln. Die Expression der Oberflächenmarker wurde als prozentualer Anteil der Oberflächenmarker-exprimierenden Zellen an der gesamten Zellprobe angegeben.

2.3.3. Bestimmung der Zytokinproduktion mittels ELISA

Um die Zytokinproduktion von differenzierten THP-1-Zellen zu quantifizieren, wurde ein ELISA verwendet (siehe **Abbildung 7**). Die Bestimmung der Zytokinproduktion von M0-, M1- und M2-Makrophagen erfolgte zur funktionellen Charakterisierung der differenzierten THP-1-Zellen.(15,170)

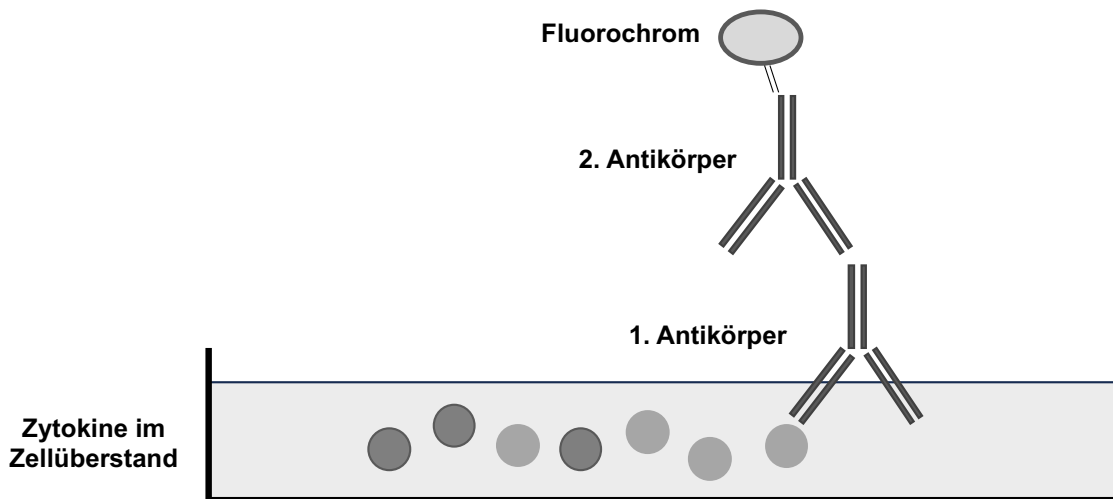


Abbildung 7: Bestimmung der Zytokinproduktion im Zellüberstand mittels *Enzyme-linked immune staining assay* (ELISA). Schematische Darstellung der Funktionsweise eines ELISA. Ein Antikörper bindet spezifisch an das gesuchte Antigen. Ein zweiter Antikörper, welcher enzymatisch an einen Farbstoff gekoppelt ist, bindet an den ersten Antikörper. Anhand des entstandenen Fluorochrom-Farbstoffes kann die Zytokinkonzentration im Überstand fluoreszenzbasiert gemessen werden.

Nach abgeschlossener Differenzierung wurden die Makrophagen (siehe 2.3.) mit 1 ml DMEM-Medium gewaschen und mit 1 ml frischem DMEM-Medium inkubiert. Der Überstand wurde nach 24, 48 und 72 h entnommen, bei 500 g und RT für 8 Minuten zentrifugiert. Je 200 – 500 µl der Überstände wurden bis zu den ELISA-Messungen bei – 20°C gelagert.

Die Konzentration der Zytokine IL-6, IL-10, TGF- β , IL-1 β , TNF- α und CCL18 wurden mit kommerziell erhältlichen Quantikine-ELISA-Kits von R&D Systems® quantifiziert. Die ELISA-Kits wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das Kit enthielt bereits mit dem Antikörper beschichtete Mikrotiterplatten. Die Standardlösung wurde entsprechend der Anleitung verdünnt. Acht Wells mit absteigender Konzentration der Standardlösung dienen der Erstellung einer Standardkurve als Referenzwerte für die Messungen. Die Absorption des entstandenen Farbstoffs wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem FluoStar Optima Mikroplatten-Reader® gemessen und mit der FluoStar Optima Software® ausgewertet.

2.3.4. Behandlung der differenzierten THP-1-Zellen mit inflammatorischen Stimuli

Eine weitere funktionelle Untersuchung der differenzierten Makrophagen erfolgte durch die Bestimmung der IL-1 β -Freisetzung. Hierzu wurden die IL-1 β -Sekretion aus monozytären THP-1-Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* voraktiviert und anschließend mit einer zweiten inflammatorischen Substanz stimuliert.(19). Die Behandlung mit LPS diente dabei als erster Stimulus für die intrazelluläre Produktion von bioinaktivem Pro-IL-1 β , welches in den Zellen verbleibt. Durch die Behandlung mit einem zweiten Gefahrenstimulus in Form von ATP oder Nigericin wurde die Prozessierung und Sekretion des gereiften IL-1 β eingeleitet.(19,119)

Die differenzierten THP-1-Zellen wurden für fünf Stunden mit 1 μ g/ml LPS (*E.coli* O25:B6) behandelt und bei 37°C inkubiert. Danach wurde ein Teil der Zellen für 40 Minuten mit 100 μ mol/l BzATP (2'/3'-O-(4-benzoylbenzoyl) Adenosin-5'-Triphosphat, Tri(Triethylammonium)-Salz) oder 50 μ mol/l Nigericin behandelt. Nach der Stimulation und Inkubation wurden die Well-Platten bei 500 g und 4°C für acht Minuten abzentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde für die ELISA-Messungen abgenommen und bis zur Messung bei -20°C gelagert. Als Kontrolle diente der Überstand von differenzierten THP-1-Zellen ohne zusätzliche Stimulation.

2.4. Untersuchung des Einflusses von ROS-Fängern auf die Differenzierung von THP-1-Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurden verschiedene antioxidative Substanzen verwendet. Durch die Verwendung der ROS-Fänger sollte der Einfluss von ROS auf die Polarisation während der Versuche minimiert werden. Für die Versuche wurden die antioxidativ wirksamen Substanzen N-Acetylcystein, α -Tocopherol und das Superoxiddismutase-Mimetikum Manganese(III) tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin chloride (MnTBAP) verwendet.

Die Makrophagendifferenzierung erfolgte gemäß dem hier etablierten Protokoll zur Differenzierung aus THP-1-Zellen. Am zweiten Tag der Differenzierung wurde nach der Behandlung mit PMA das Medium gewechselt und 10 mmol/l N-Acetylcystein, 50 μ mol/l α -Tocopherol oder 100 μ mol/l MnTBAP hinzugefügt. Die Substanzen wurden in

DMEM-Medium gelöst und je 1 ml der Mischung pro Well auf die Zellen gegeben. Es folgte eine 24-stündige Inkubation. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml DMEM-Medium gewaschen und gemäß dem Protokoll in die Makrophagensubtypen differenziert. Parallel zur Makrophagendifferenzierung unbehandelter THP-1-Zellen erfolgte die Bestimmung der Oberflächenmarkerexpression im FACS und die Messung der Zytokinkonzentration mit ELISA.

2.5. Verwendung von konditionierten Medien zur Untersuchung der Interaktion zwischen HCC- und THP-1-Zellen

Um den Einfluss der sezernierten Substanzen von differenzierten Makrophagensubtypen zu testen, wurden konditionierte Medien verwendet. Als konditionierte Medien werden Zellkulturüberstände bezeichnet, die sezernierte Substanzen, wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren enthalten. Die THP-1-Zellen wurden nach dem Standard-Differenzierungsprotokoll (siehe 2.3) ausgesät und behandelt. Im Anschluss an die Differenzierung wurden die Überstände verworfen, die Zellen mit 1 ml DMEM-Medium gewaschen und anschließend für weitere 24, 48 und 72 h mit 1 ml frischem DMEM-Medium inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Überstände entnommen und bei 500 g für 8 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die konditionierten Medien wurden zur Inkubation der HCC-Zelllinien Huh7 und HepG2 verwendet.

2.5.1. Bestimmung der Zellviabilität mit dem MTT-Assay

Der MTT-Assay beruht auf der Verstoffwechslung des Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid. Mithilfe dieses Verfahrens kann die Zellviabilität und -proliferation in einer Zellprobe eingeschätzt werden. Das Tetrazoliumsalz wird von den mitochondrialen Dehydrogenasen lebendiger Zellen verstoffwechselt. Dabei entsteht das lila Formazan-Produkt, dessen Menge direkt proportional zur Anzahl stoffwechselaktiver Zellen ist und im Fluoreszenz-Mikroplattenreader quantifiziert werden kann.(29)

Zur Durchführung wurde das MTT-Kit der Firma Roche® verwendet. Für den Versuch wurden 6.800 Zellen/Well auf einer 96-Well-Platte ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂

für 24 h mit 100 µl Kulturmedium inkubiert. Die adhärent gewachsenen Huh7- und HepG2-Zellen wurden mit 100 µl DMEM-Medium gewaschen. Anschließend wurden sie mit 100 µl des Überstandes von differenzierten M0-, M1- und M2-Makrophagen behandelt. Verwendet wurden die Überstände der Makrophagen nach 24, 48 und 72 h. Die Kontrollgruppe wurde mit 100 µl DMEM-Medium inkubiert. Die Inkubation mit den konditionierten Medien erfolgte über einen Zeitraum von 48 h. Die Durchführung des MTT erfolgte anhand der Angaben des Herstellers. Die Überstände der 96-Well-Platte wurden verworfen. Nach Zugabe von 10 µl der Lösung 1 des Test-Kits (Tetrazolium-Salz = 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid) wurden die Zellen für 3 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl der Lösung 2 (DMSO = Dimethylsulfoxid) des Test-Kits. Nach weiteren 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ konnte die Absorption des entstandenen Formazan-Produkts spektrophotometrisch im Mikroplatten-Reader (FluoStar Optima®) bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte mit der Software FLUOstar OPTIMA®. Als Referenz wurde eine Wellenlänge von mehr als 650 nm festgelegt.

2.5.2. Bestimmung des Zelltodes mit Propidiumiodid-Färbung im FACS

Um den Anteil toter gegenüber lebender Zellen zu quantifizieren, wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und die PI-positiven Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. PI ist eine fluorogene Substanz, die die Fähigkeit besitzt, durch geschädigte Zellmembranen einzudringen und mit der DNA im Zellkern zu interkalieren. Durch die Expression des roten Farbstoffes können schnelle Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt von Zellen und somit auch auf den Anteil apoptotischer Zellen einer Zellprobe gezogen werden.(93)

Huh7- und HepG2-Zellen wurden mit einer Dichte von 100.000 Zellen pro Well und 1 ml DMEM-Medium in einer 12-Well-Platte ausgesät. Es folgte eine Inkubationszeit von 24 h, in der die Zellen anwachsen konnten. 1 ml des zellfreien Überstands von differenzierten THP-1-Zellen wurde als konditionierte Medien verwendet, um die Huh7- und HepG2-Zellen für einen Zeitraum von 48 h zu inkubieren. Als Kontrolle dienten unbehandelte Huh7- und HepG2-Zellen. Die Huh7- und HepG2-Zellen wurden

für die Färbung mit PI vorbereitet. Nach Entfernen der Überstände wurden die Huh7- und HepG2-Zellen mit 200 µl Accutase® pro Well und Inkubation für fünf Minuten bei 37°C vom Boden der Wells gelöst. Anschließend wurde das Zellpellet unter Zugabe von 600 µl gekühltem PBS resuspendiert und die vollständige Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein Falcon überführt und bei 500 g und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstände erfolgte die Zugabe von 100 µl Propidiumiodid-Lösung zur jeweiligen Zellprobe. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit dem Vortexer gemischt und 15 Minuten lang im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation des Gemisches aus Zellproben und Propidiumiodid bei 500 g und 4°C für 5 Minuten. Die zellfreien Überstände wurden verworfen und das Zellpellet mit 100 µl kaltem PBS pro Zellprobe resuspendiert. Die Proben wurden bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gelagert. Als Positivkontrolle diente eine Zellprobe, deren Zellen durch Erhitzen abgestorben waren. Eine Isotypenkontrolle wurde als Kontrolle der Autofluoreszenz eingesetzt.

Die Analyse der Messergebnisse erfolgte mit der FlowJo Software® (Version 10.8.1). Die Messergebnisse der einzelnen Zellproben wurden anhand von FSC-A (*Forward Scatter*) und SSC-A (*Side Scatter*) in einem Dot-Plot-Diagramm visualisiert. Im Diagramm wurde der zelluläre Debris anhand des geringen Volumens und Fluoreszenz ausgeschlossen. Die nächste Darstellung erfolgte als Histogramm im PE-Channel zur Darstellung PI-exprimierender Zellen. Die PI-positiven Zellen ließen sich als eigenes Signal abgrenzen. Diese wurden als prozentualer Anteil der gesamten Zellpopulation ausgewertet.

2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel® und der GraphPad-Prism-Software® (Version 9.5.1 für macOS). Alle graphischen Darstellungen wurden mit der GraphPad-Prism-Software® erstellt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Angabe des Mittelwerts $\pm$ Standardabweichung. Zur Prüfung auf statistische Signifikanz wurde generell ein p-Wert von $p \leq 0,05$ festgelegt. Werte unter $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests zur Prüfung auf Normalverteilung war für die Ergebnisse keine Normalverteilung anzunehmen. Es wurden nicht-parametrische Verfahren

angewendet. Für den Vergleich von drei Versuchsgruppen untereinander erfolgte die statistische Testung mit dem Kruskal-Wallis-Test. Um die Mittelwerte der einzelnen Gruppen paarweise zu vergleichen, wurde der Kruskal-Wallis-Test um einen Dunn's-Test zur Post-hoc-Analyse ergänzt. Die Testung der abhängigen Stichproben erfolgte mit dem Friedman-Test für drei Gruppen und dem Wilcoxon-Test für den Vergleich von zwei Gruppen untereinander, jeweils mit Dunn's-Test. Die Stichprobengröße (n-Zahl) bezieht sich auf die Anzahl der Experimente. Die Daten des MTT-Assay wurden auf 100 % normalisiert. Die Angabe zur Stichprobengröße der jeweiligen Experimente findet sich in den Abbildungslegenden. Mit Ausnahmen von kontaminierten Versuchen fand keine Entfernung von Ausreißern statt.

3. Ergebnisse

3.1. Protokoll zur Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen

Im ersten Teil dieser Promotionsarbeit wurde ein Protokoll zur Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen etabliert. Um ein funktionierendes Protokoll zu erstellen, wurden die Versuchsbedingungen variiert. **Tabelle 8** bietet einen strukturierten Überblick über die in den einzelnen Versuchen identifizierten Problembereiche und die entsprechenden Anpassungen in den einzelnen Differenzierungsschritten.

Tabelle 8: Optimierung des Differenzierungsprotokolls für monozytäre THP-1-Zellen

Versuchsschritt		Ziel	Probleme
1	Aussäen der THP-1-Zellen	Erreichen eines homogenen, subkonfluenten Zellwachstums	Inhomogenes Zellwachstum, hoher Anteil toter Zellen bei einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/Well
→ Modifikation: Reduktion der Zellzahl auf $0,3 \times 10^6$ Zellen/Well			
2	Behandlung mit PMA	Differenzierung der Monozyten zu M0-Makrophagen	Hoher Anteil nicht-adhärenter Zellen bei einer PMA-Konzentration von 100 nmol/l und Behandlungsdauer von 48 h, geringe morphologische Verwandlung
→ Modifikationen: - Verkürzung der Behandlung mit PMA auf 24 h - Einführen einer Ruhephase im Medium für 24 h - Reduktion der PMA-Konzentration auf 50 nmol/l			
3	Differenzierung in M1- und M2-Makrophagen	Erfolgreiche Differenzierung der Makrophagenphänotypen	Keine ausreichende Expression von M2-Oberflächenmarkern bei einer Behandlungsdauer von 48 h, Induktion von M1-Markern durch 40 ng/ml IL-4
→ Modifikationen: - Verlängerung der Differenzierung auf einen Zeitraum von 72 h			

- Festlegen der Konzentration von IL-4 auf 20 ng/ml			
4	Analyse der differenzierten Makrophagen	Identifikation geeigneter Oberflächenmarker der Makrophagen (FACS)	Vielzahl möglicher Oberflächenmarker
→ Modifikation: Ausprobieren verschiedener Oberflächenmarker: CD80, CD86, CD209, CD83, CD38, CD11c, HLA-DR, CD14, CD16, CD36, CD163, CD206, CD200R, CCR7			
5	Analyse der differenzierten Makrophagen	Identifikation geeigneter Zytokine (ELISA)	Vielzahl möglicher Zytokine
→ Modifikation: Ausprobieren verschiedener Zytokine: TNF- α , IL-6, IL-10, CCL18, TGF- β			
6	Quantifizierung der Zytokin-Produktion	Bestimmung des Zeitpunkts mit der höchsten Zytokinproduktion	Niedrige Zytokinproduktion
→ Modifikation: Festlegung des Zeitpunktes der höchsten Zytokinkonzentration auf 24 h			

Nach der Stimulierung mit PMA differenzierten sich die unreifen, monozytären THP-1-Zellen zu Makrophagen, die adhärent am Boden der Well-Platten wuchsen. Die lichtmikroskopische Kontrolle ihres Wachstumsverhaltens der mit PMA behandelten THP-1-Zellen zeigte eine hohe Wachstumsdichte in „Zellhaufen“. Daher wurde die Zellzahl zu Versuchsbeginn auf $0,3 \times 10^6$ Zellen pro Well reduziert. Bei reduzierter Zellzahl wuchsen die Zellen homogen am Boden der Wells (siehe **Abbildung 8**).

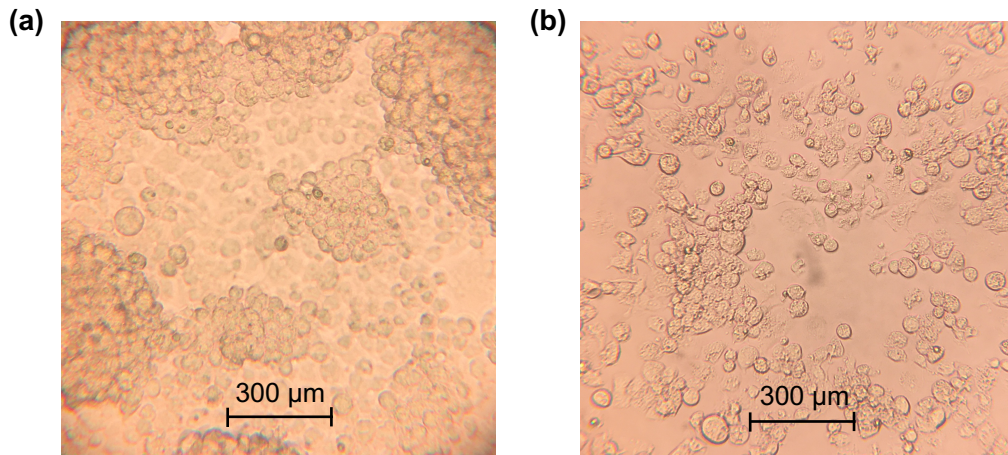


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Kontrolle des Wachstumsverhalten von aus THP-1-Zellen differenzierten M0-Makrophagen. Fotografie der Zellkultur der mit PMA behandelten THP-1-Zellen. Aufnahme nach Inkubation mit PMA für 24 h, über einen Mikroskop-Objektivadapter (Solomark®) und ein Smartphone. Vergrößerung über Lichtmikroskop x 100. **(a)** Zellzahl: $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Well; **(b)** Zellzahl: $0,3 \times 10^6$ Zellen pro Well.

Für die Vorbehandlung der monozytären THP-1-Zellen wurde hier zu Beginn eine Konzentration von 100 nmol/l PMA über einen Zeitraum von 48 h verwendet. Darunter zeigte sich lichtmikroskopisch ein hoher Anteil nicht-adhärenter THP-1-Zellen. Die Konzentration des PMA wurde anschließend auf 50 nmol/l reduziert. Die Behandlungsdauer mit PMA wurde auf 24 h verkürzt und um eine 24-stündige Ruhephase im Medium ergänzt. Daraufhin wuchsen die Zellen adhärent und zeigten eine deutlichere morphologische Veränderung, die sich in einer Zunahme der Zellgröße und der Ausbildung von Zellausläufern äußerte.

Als Nächstes mussten geeignete Oberflächenmarker für die verschiedenen Makrophagensubtypen identifiziert werden. Zu Beginn der Versuche zeigte sich im FACS eine hohe Expression der Marker CD80, CD38 und CD14 von 40 bis zu 60 % bei den M1-Makrophagen. Vergleichsweise zeigte sich eine geringe Expression der Oberflächenmarker CD200R, CD206 und CD209 von 10 bis 15 % bei den M2-Makrophagen. Die Differenzierungsphase wurde von 48 auf 72 h verlängert.

Es wurden die IL-4-Konzentrationen 20 ng/ml und 40 ng/ml getestet. Unter einer Konzentration von 40 ng/ml IL-4 zeigte sich im FACS keine vermehrte Expression von CD200R, CD206 und CD209. Stattdessen exprimierten 10 bis 15 % der Zellen die

Oberflächenmarker CD80 und CD38. In den weiteren Experimenten wurde IL-4 in einer Konzentration von 20 ng/ml verwendet. **Abbildung 9** fasst die jeweils vorgenommenen Optimierungen am Protokoll zusammen.

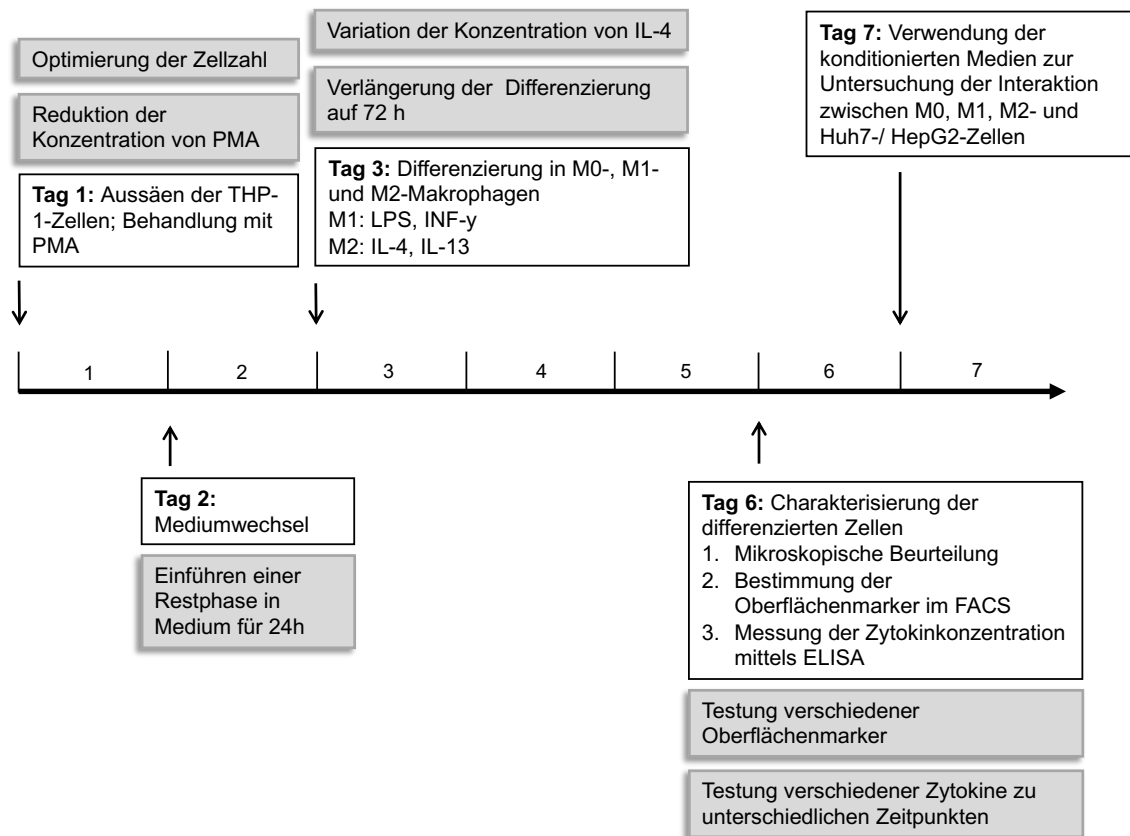


Abbildung 9: Darstellung der verschiedenen Modifikationen zur Etablierung eines Protokolls zur Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen. Die Modifikationen sind in den dunklen Textboxen zusammengefasst.

3.2. Charakterisierung der aus THP-1-Zellen differenzierten Makrophagensubtypen

3.2.1. Mikroskopische Beurteilung

Zur mikroskopischen Beurteilung wurden die behandelten THP-1-Zellen auf einem Objektträger fixiert. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Differenzierungsprotokolls fixiert und mit einer Pappenheim-Färbung eingefärbt. Die erste morphologische Beurteilung erfolgte nach der Vorbehandlung der Zellen mit 50 nmol/l PMA. Nach der Behandlung wuchsen die Zellen konfluent und bedeckten bis zu

90 % der Oberfläche des Objektträgers. Die Zellen zeigten eine Zunahme in Größe und Granularität und wuchsen adhärent als Monolayer am Boden des Wells. **Abbildung 10** zeigt die zu M0-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen.

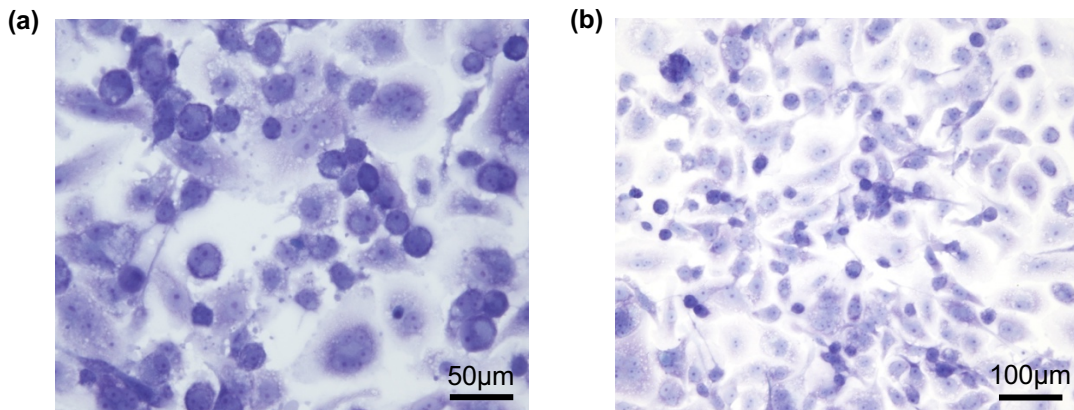


Abbildung 10: Monozytäre THP-1-Zellen entwickeln sich nach der Behandlung mit PMA zu adhärenen M0-Makrophagen. Behandlung mit 50 nmol/l PMA für 24 h. Pappenheim-Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahme mit Fluoreszenzmikroskop (Olympus CMA0D Aufsatz, Zeiss). **(a)** Vergrößerung 20.000-fach, Maßstabsbalken: 50µm. **(b)** Vergrößerung 10.000-fach, Maßstabsbalken: 100µm.

Nach der Differenzierung in die M1- und M2-Phänotypen wurden die Zellen erneut auf einem Objektträger fixiert und eingefärbt. Die M0-Makrophagen zeigten wenig morphologische Veränderung im Vergleich zu den vorherigen mikroskopischen Aufnahmen. Die als M1- bzw. M2-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen waren vergrößert und hatten sich morphologisch größtenteils zu spindelförmigen Zellen entwickelt (siehe **Abbildung 11**). Im Vergleich zu den unbehandelten M0-Makrophagen verringerte sich die Zelldichte in beiden Gruppen. In der Gruppe der M1-Makrophagen waren die Zellen überwiegend spindelförmig, schmal und lang mit mehreren Ausläufern pro Makrophage. Vereinzelt zeigten sich M0-ähnliche, undifferenzierte Makrophagen, die nur wenige morphologische Veränderungen aufwiesen. Die M2-Makrophagen erschienen vergrößert und besaßen eine rundliche, polygonale Form. Sie waren teils spindel- bis spiegeleiförmig. Im Vergleich zur Gruppe der M1-Makrophagen wiesen die M2-Makrophagen einen größeren Anteil spindelförmiger Zellen mit langen, spinnennetzartigen Ausläufern auf (siehe **Abbildung 11**).

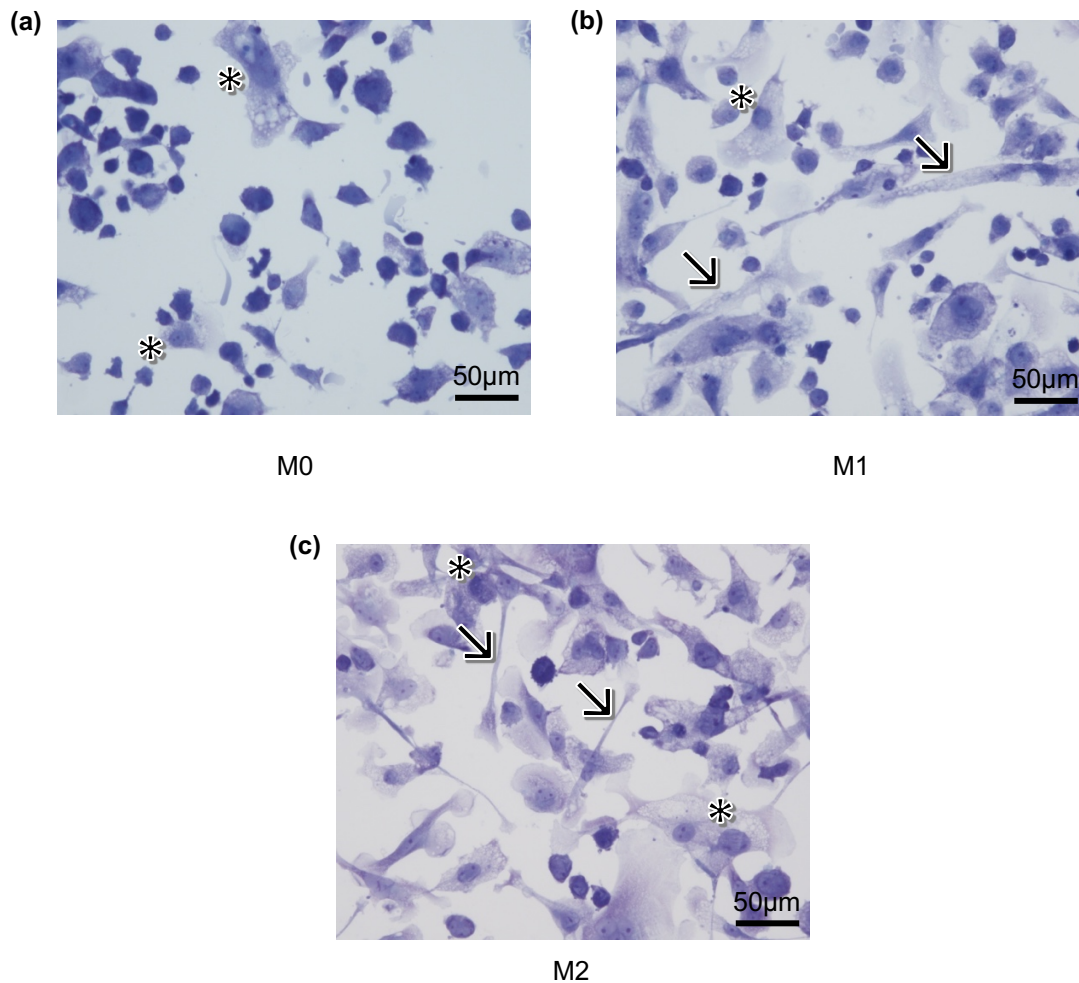


Abbildung 11: Zu M0, M1 und M2 differenzierte THP-1-Zellen entwickeln unterschiedliche morphologische Eigenschaften. Pappenheim-Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahme mit Fluoreszenzmikroskop (Olympus CMA0D Aufsatz, Zeiss). Darstellung in 20.000-facher Vergrößerung. Sterne markieren die Zellkörper. Pfeile markieren die zytoplasmatischen Ausläufer. **(a)** M0-Makrophagen, Inkubation mit DMEM-Medium. **(b)** M1-Makrophagen nach Behandlung mit LPS, IFN- γ über 72 h. **(c)** M2-Makrophagen nach Behandlung mit IL-4 und IL-13 über 72 h. Maßstabbalken: 50 μ m.

3.2.2. Analyse der Oberflächenmarker im FACS

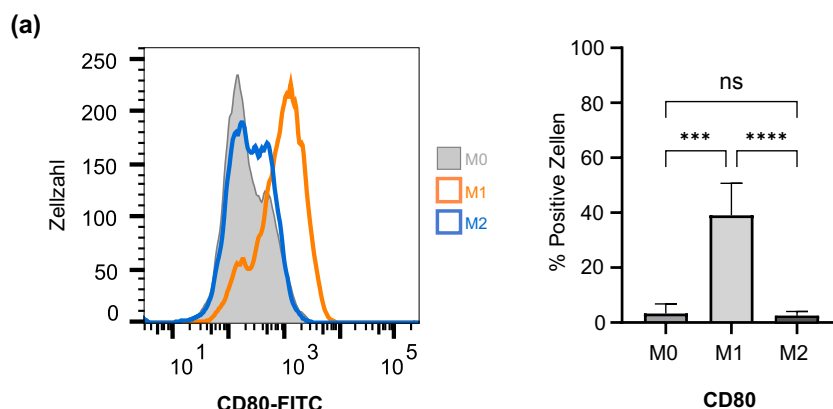
Die differenzierten THP-1-Zellen sollten anhand ihrer Oberflächenmarkerexpression charakterisiert werden (siehe **Kapitel 2.3.1** im Methodenteil). Die Messungen erfolgten mit den in der Literatur beschriebenen Oberflächenmarkern CD80, CD86, CD209, CD83, CD38, CD11c, HLA-DR, CD14, CD16, CD36, CD163, CD206, CD200R und CCR7.(11,28,44,105,119,137)

Nach Durchführung und Etablierung des Protokolls unterschieden sich die differenzierten THP-1-Zellen deutlich in ihrer Oberflächenmarkerexpression. Für die Makrophagendifferenzierung wurden die Oberflächenmarker CD80, CD14, CD38 und HLA-DR für den M1-Sutbyp, sowie CD206, CD200R und CD209 für den M2-Sutbyp etabliert (Übersicht in **Tabelle 9**).

Tabelle 9: Etablierte Oberflächenmarker zur Unterscheidung verschiedener Makrophagensubtypen nach *in-vitro*-Differenzierung

Oberflächenmarker M1-Phänotyp	Oberflächenmarker M2-Phänotyp
CD80	CD206
CD38	CD200R
CD14	CD209
HLA-DR	

Im direkten Vergleich zu den M0-Makrophagen wiesen die zu M1-Makrophagen differenzierten Zellen eine deutlich höhere Expression der Oberflächenmarker CD80, CD38, CD14 und HLA-DR auf. Bei etwa 40 % der M1-Makrophagen wurden die Oberflächenmarker CD80 und CD14 exprimiert. Die Expression des Oberflächenmarkers CD38 betrug durchschnittlich 70 %. M1-Makrophagen exprimierten vermehrt den Oberflächenmarker HLA-DR in bis zu 40 % der Fälle. Der Unterschied zur M2-Makrophagen-Population war hierbei allerdings nicht statistisch signifikant (siehe **Abbildung 12**).



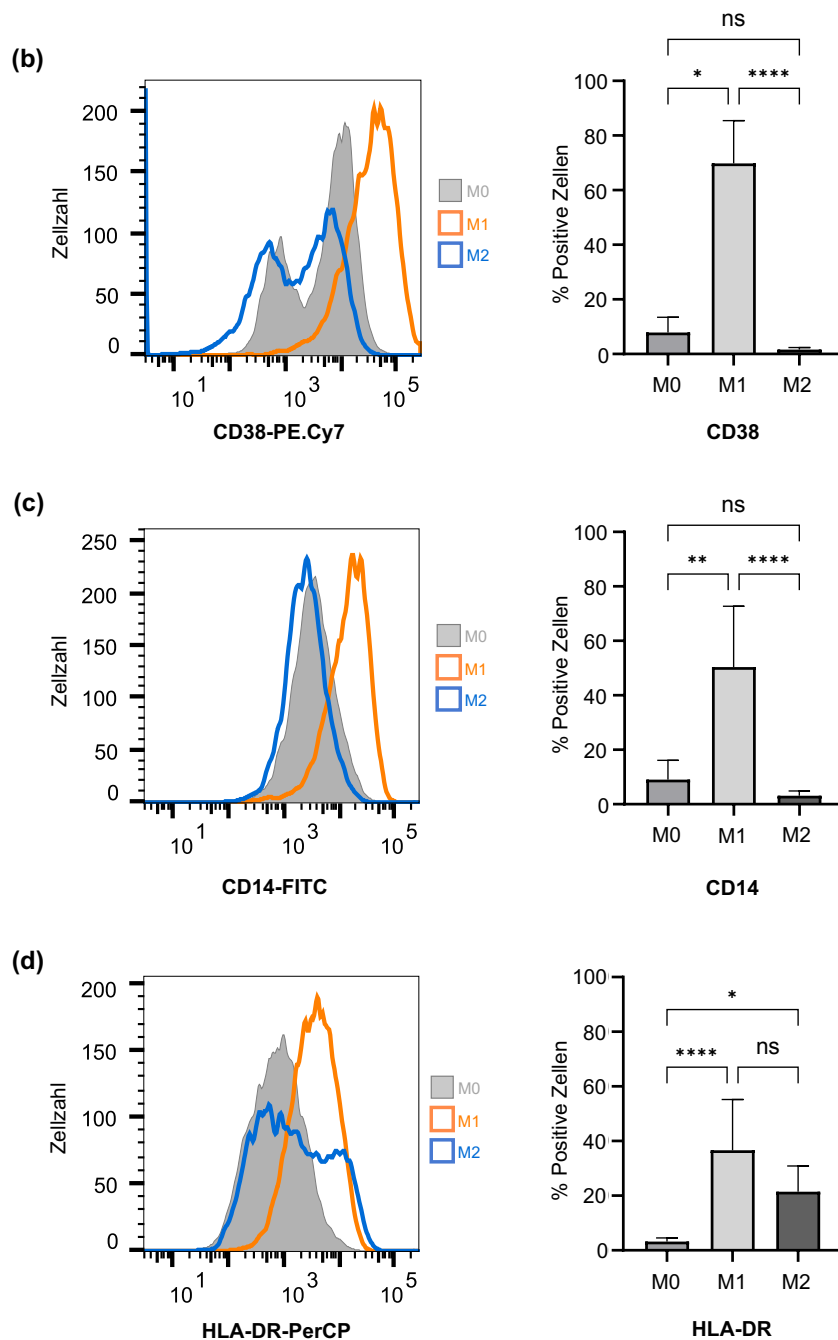


Abbildung 12: Expression M1-typischer Oberflächenmarker. Nach abgeschlossener Differenzierung der THP-1-Zellen erfolgte die Färbung mit Fluoreszenz-Antikörpern gegen unterschiedliche Oberflächenantigene **(a-d)**. Linke Spalte: Histogramme zur repräsentativen Darstellung. Rechte Spalte: Quantifizierung der Makrophagensubpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarkerexpression. Die Expression der Oberflächenmarker wird hier als prozentualer Anteil aller gemessenen Zellen angegeben. $n = 12$. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. ns = nicht signifikant.

Im Vergleich zu den M0- und M1-Makrophagen exprimierten die zu M2-Makrophagen differenzierten Zellen die Oberflächenmarker CD206, CD200R und CD209 in verstärktem Ausmaß (siehe **Abbildung 13**). Der prozentuale Anteil der Oberflächenmarkerexpression betrug bei allen drei Markern zwischen 20 % und 30 %. Der Marker CD206 zeigte eine deutlich erhöhte Expression bei den M2-Makrophagen im Vergleich zu den M0- und M1-Makrophagen. Geringe Anteile unter 5 – 10 % der M2-Oberflächenmarker wurden auch von den M0- und M1-Makrophagen exprimiert.

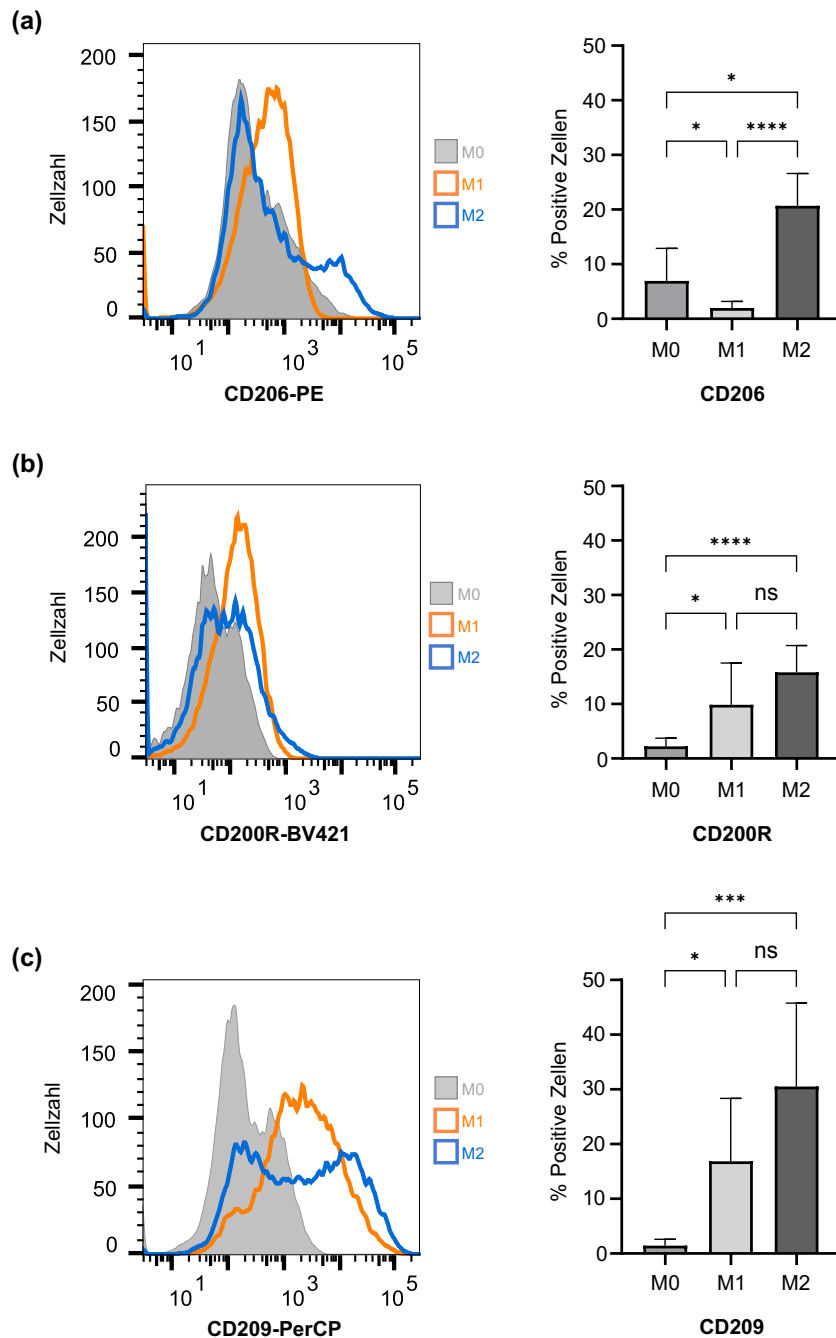


Abbildung 13: Expression M2-typischer Oberflächenmarker. Nach abgeschlossener Differenzierung der THP-1-Zellen erfolgte die Färbung mit Fluoreszenz-Antikörpern gegen unterschiedliche Oberflächenantigene (a-c). Linke Spalte: Histogramme zur repräsentativen Darstellung. Rechte Spalte: Quantifizierung der Makrophagensubpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarkerexpression. Die Expression der Oberflächenmarker wird hier als prozentualer Anteil aller gemessenen Zellen angegeben. n = 12. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. ns = nicht signifikant.

Bestimmte Oberflächenmarker zeigten geringere Unterschiede zwischen den einzelnen Phänotypen und wurden von M0-, M1- und M2-Makrophagen in einem ähnlichen

Verhältnis exprimiert (siehe **Abbildung 14**). Hierzu zählen die Oberflächenmarker CD86 und CD11c. Annähernd 30 % der M0-Makrophagen exprimierten den Oberflächenmarker CD86. Bei den M1- und M2-Makrophagen waren es ca. 50 %. Die Expression von CD11c betrug unter allen Makrophagensubtypen weniger als 10 %.

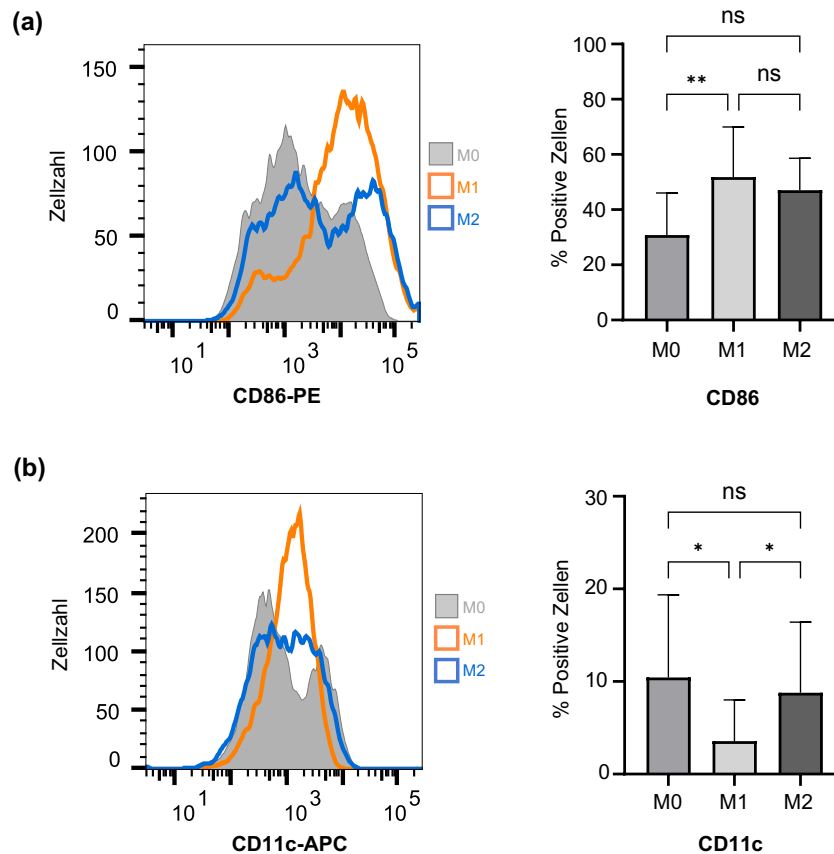


Abbildung 14: Expression der Oberflächenmarker CD11c und CD86. Nach abgeschlossener Differenzierung der THP-1-Zellen erfolgte die Färbung mit Fluoreszenz-Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD11c und CD86 (a-b). Linke Spalte: Histogramme zur repräsentativen Darstellung. Rechte Spalte: Quantifizierung der Makrophagensubpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarkerexpression. Die Expression der Oberflächenmarker wird hier als prozentualer Anteil aller gemessenen Zellen angegeben. n = 12. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. ns = nicht signifikant.

Die differenzierten THP-1-Zellen exprimierten die Marker CD36 und CD163 zu einem Anteil von 2 bis 6 % aller drei Zellpopulationen. Die Marker CCR7, CD16 und CD83 wurden unter den M1-Makrophagen vermehrt exprimiert, in einem Anteil von 12 bis 16 % der Zellpopulation. Allerdings konnte mit den Markern kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen M0-, M1- und M2-Makrophagen gefunden werden (siehe **Abbildung 15**).

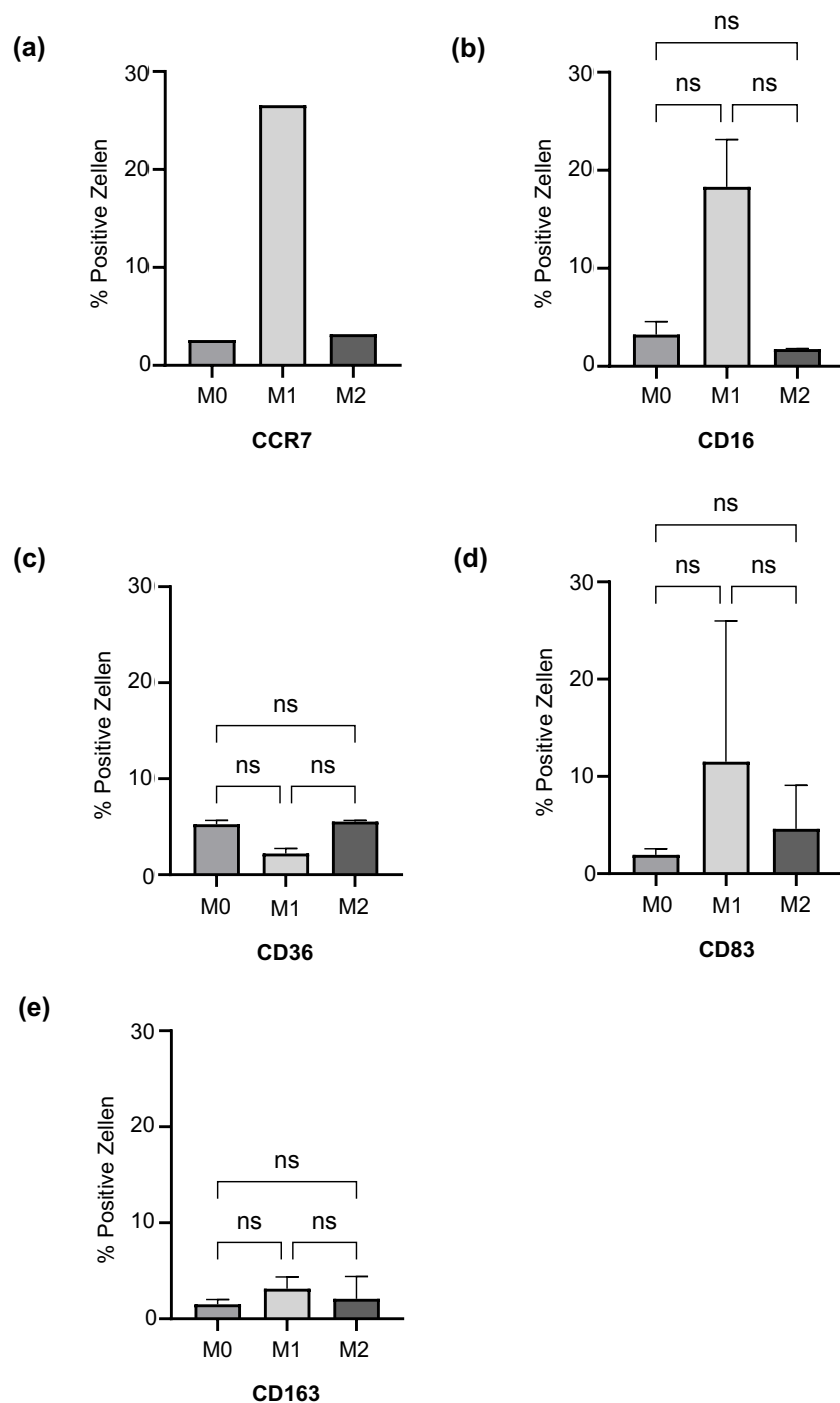


Abbildung 15: Expression unspezifischer Oberflächenmarker. Nach abgeschlossener Differenzierung der THP-1-Zellen erfolgte die Färbung mit Fluoreszenz-Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CCR7, CD16, CD36, CD83 und CD163 (**a-e**). Quantifizierung der Makrophagensubpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarkerexpression. Die Expression der Oberflächenmarker wird hier als prozentualer Anteil der gemessenen Zellen angegeben. Dargestellt sind deskriptive Daten mit $n = 1-3$. Statistische Auswertung erfolgte nur bei $n > 2$. ns = nicht signifikant.

3.2.3. Bestimmung der Zytokinsekretion mittels ELISA

Nach abgeschlossener Differenzierung wurde die Konzentration von TNF- α , IL-6, IL-10, CCL18 und TGF- β in den Überständen der Zellen nach 24, 48 und 72 h bestimmt. Die Zytokinproduktion der M0-, M1- und M2-Makrophagen wurde quantitativ mittels ELISA erfasst.

Tabelle 10: Etablierte Zytokine zur Unterscheidung verschiedener Makrophagensubtypen nach *in-vitro*-Differenzierung

Zytokine M1-Phänotyp	Zytokine M2-Phänotyp
TNF- α	IL-10
IL-6	CCL18

Die Überstände der für 72 h inkubierten Makrophagen wiesen die höchsten Zytokinkonzentrationen auf, gefolgt von den Überständen nach 48 und 24 h. Daher erfolgte die statistische Auswertung und graphische Darstellung mit den Zytokinkonzentrationen in den Überständen nach 72 h.

Die zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen sezernierten eine höhere Konzentration der Zytokine TNF- α und IL-6. Die Konzentration von TNF- α in den zellfreien Überständen der M1-Makrophagen betrug im Durchschnitt 35 pg/ml und ließ sich damit von der Zytokinproduktion der M0- und M2-Makrophagen abgrenzen. Die IL-6-Sekretion der M1-Makrophagen betrug über 40 pg/ml und wies einen noch deutlicheren Unterschied zu den M0- und M2-Makrophagen auf (siehe **Abbildung 16**).

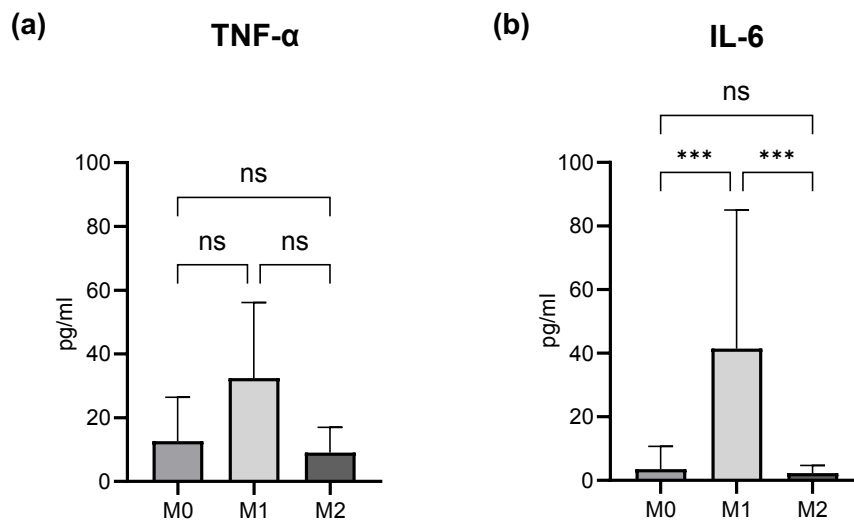


Abbildung 16: Expression M1-typischer Zytokine. Nach abgeschlossener Differenzierung wurde die Konzentration der Zytokine TNF- α und IL-6 in den zellfreien Überständen der differenzierten THP-1-Zellen nach 72 h mit Quantikine ELISA Kits (R&D Systems ®) bestimmt (**a-b**). Die Konzentration wird in pg/ml angegeben. $n = 11$. *** $p \leq 0.001$, ns = nicht signifikant.

In den zellfreien Überständen von zu M2-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen konnten höhere Konzentrationen von CCL18 und IL-10 nachgewiesen werden. Die Konzentration von CCL18 betrug in den Überständen der M2-Makrophagen bis zu 8.000 pg/ml. Die Konzentration von IL-10 betrug durchschnittlich 70 pg/ml. Die Unterschiede in den Konzentrationen von IL-10 waren nicht statistisch signifikant (siehe **Abbildung 17**). In den zellfreien Überständen konnten keine Unterschiede in der Konzentration von TGF- β zwischen M0-, M1- und M2-Makrophagen festgestellt werden. Die folgenden ELISA-Messungen wurden daher ohne die Bestimmung von TGF- β durchgeführt.

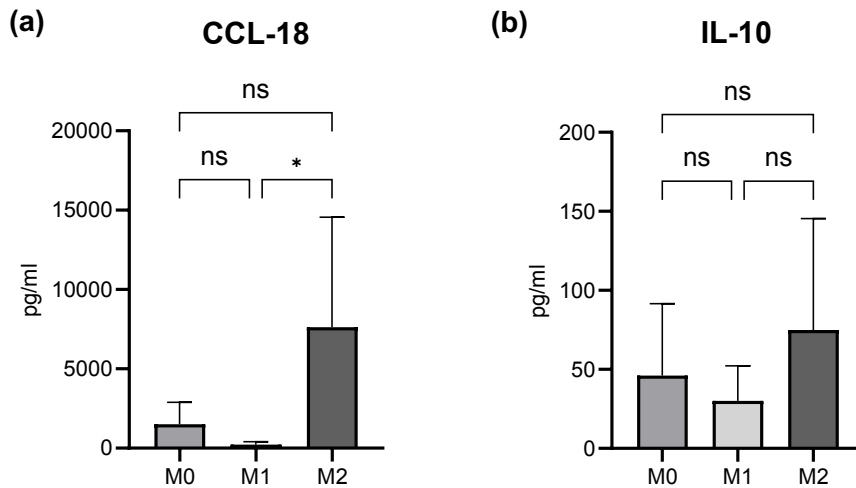


Abbildung 17: Expression M2-typischer Zytokine. Nach abgeschlossener Differenzierung wurde die Konzentration der Zytokine CCL18 und IL-10 in den zellfreien Überständen der differenzierten THP-1-Zellen nach 72 h mit Quantikine ELISA Kits (R&D Systems ®) bestimmt (**a-b**). Die Konzentration wird in pg/ml angegeben. $n = 11$. $*p \leq 0.05$, ns = nicht signifikant.

3.2.4. Bestimmung der IL-1 β -Freisetzung verschiedener Makrophagensubtypen nach Stimulation mit LPS, BzATP und Nigericin

Zur weiteren funktionellen Untersuchung der differenzierten THP-1-Zellen erfolgte die Stimulation der M0-, M1- und M2-Makrophagen in einem zweistufigen Prozess mit inflammatorischen Substanzen (siehe **Kapitel 2.3.4**).

Alle drei Makrophagensubtypen reagierten auf die Behandlung mit den inflammatorischen Stimuli. Bereits ohne Stimulierung sezernierten die zu M1-Makrophagen differenzierten THP-1-Zellen mit ca. 25 pg/ml mehr IL-1 β als die anderen Makrophagensubtypen (siehe **Abbildung 18**). Nach der Stimulierung mit LPS verstärkte sich deren IL-1 β -Sekretion auf bis zu 90 pg/ml und nach der Behandlung mit LPS und BzATP auf bis zu 120 pg/ml. Damit sezernierten die M1-Makrophagen deutlich mehr IL-1 β als Reaktion auf die Stimulierung, als die M0- und M2-Makrophagen. Die Behandlung mit Nigericin führte in allen drei Gruppen zu einer erhöhten Freisetzung von IL-1 β . M1-Makrophagen sezernierten durchschnittlich 400 pg/ml IL-1 β , während M2-Makrophagen durchschnittlich 280 pg/ml IL-1 β freisetzten. Die höchste IL-1 β -Konzentration wurde in den Überständen der mit Nigericin behandelten M0-Makrophagen gemessen, mit Werten von bis zu 14000 pg/ml.

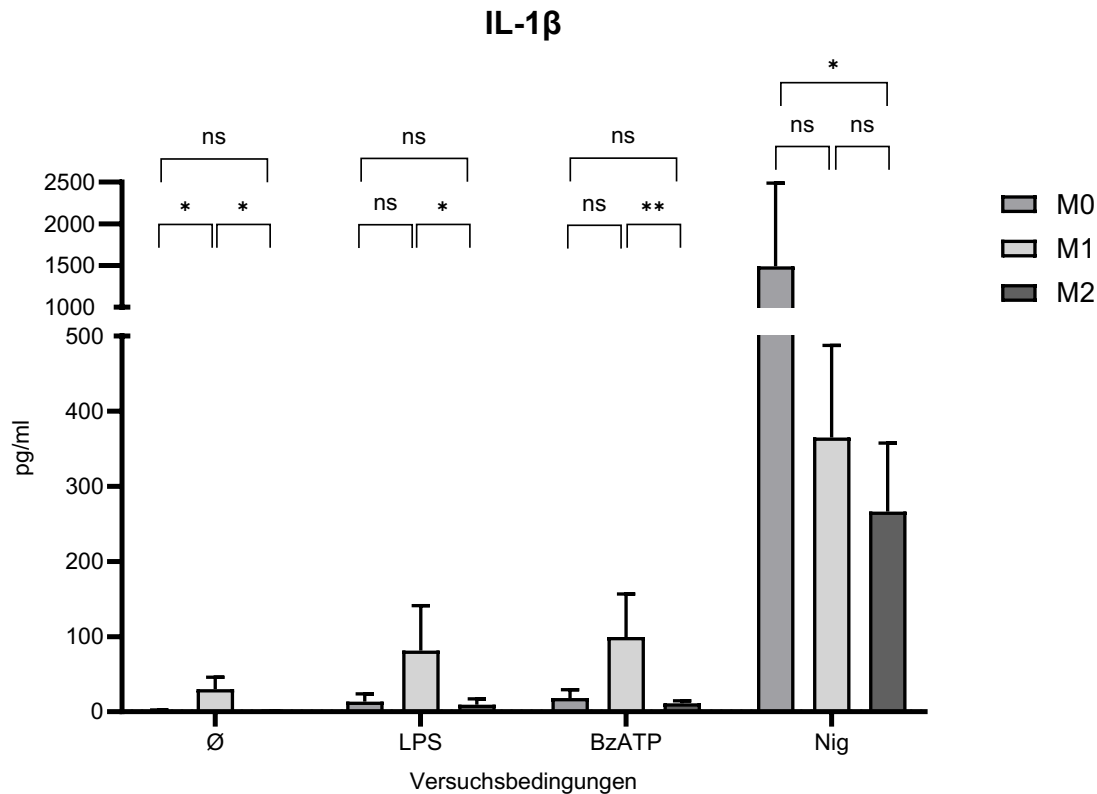


Abbildung 18: Freisetzung von IL-1 β nach Stimulierung mit proinflammatorischen Substanzen. Nach einer Vorbehandlung mit 1 μ g/ml LPS (*E.coli* O25:B6) für fünf Stunden wurden die differenzierten THP-1-Zellen für 40 Minuten mit 100 μ M BzATP oder 50 μ M Nigericin behandelt. Die Konzentration von IL-1 β in den zellfreien Überständen wurde mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte M0-, M1- und M2-Makrophagen. n = 5. *p $\leq$ 0.05, **p $\leq$ 0.01, ns = nicht signifikant.

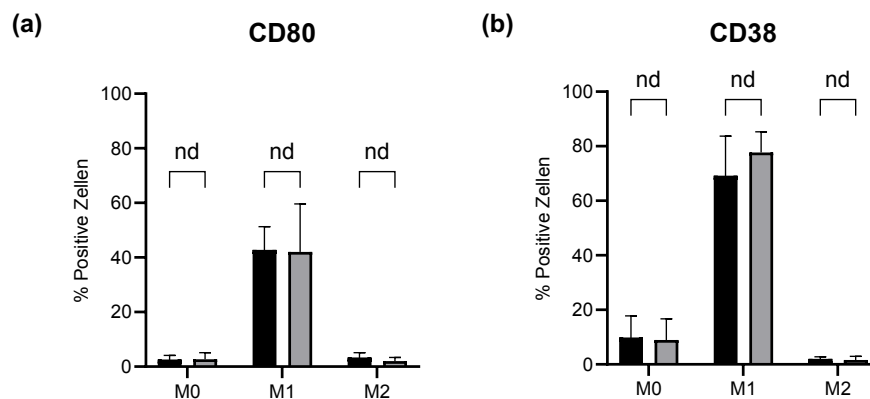
3.3. Beeinflussung der Makrophagenpolarisation durch MnTBAP

Mithilfe des *in-vitro*-Modells zur Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen sollte der Einfluss von ROS auf die Polarisation der Makrophagen untersucht werden. Dabei sollte getestet werden, inwiefern oxidativer Stress und ROS die Makrophagenpolarisation und die damit verbundenen Funktionen beeinflussen. Der Versuch wurde unter Verwendung verschiedener antioxidativer Substanzen, sogenannter ROS-Fänger, durchgeführt. Zu Beginn kamen die ROS-Fänger N-Acetylcystein, α -Tocopherol und das Superoxiddismutase-Mimetikum MnTBAP zum Einsatz. Die THP-1-Zellen wurden während der 24-stündigen Ruhephase und nach der Behandlung mit PMA mit den ROS-Fängern behandelt. Anschließend erfolgte die Differenzierung der vorbehandelten THP-1-Zellen in die Makrophagensubtypen nach etabliertem Protokoll.

Die ersten Versuche dienten dazu, zu evaluieren, ob die Behandlung mit den Substanzen grundsätzlich einen Effekt auf die THP-1-Zellen hat. In den ersten beiden Versuchen konnte unter der Behandlung mit N-Acetylcystein und α -Tocopherol kein Effekt auf die Oberflächenmarkerexpression der differenzierten THP-1-Zellen festgestellt werden. Die weiteren Versuche sowie deren Auswertung erfolgten daher ausschließlich mit der Substanz MnTBAP. Als Kontrollgruppe dienten differenzierte THP-1-Zellen, die während der 24-stündigen Ruhephase in DMEM-Medium inkubiert wurden.

3.3.1. Bestimmung der Oberflächenmarkerexpression von mit MnTBAP behandelten THP-1-Zellen im FACS

Im FACS wurde der Anteil Oberflächenmarker-exprimierender Zellen bestimmt. Die Messungen erfolgten dabei analog zu den unbehandelten Zellen. Bei den mit MnTBAP behandelten und anschließend differenzierten THP-1-Zellen traten leichte Differenzen in der Expression der M1- und M2-Oberflächenmarker auf. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den mit MnTBAP behandelten Zellen konnte allerdings nicht festgestellt werden (siehe **Abbildung 19**).



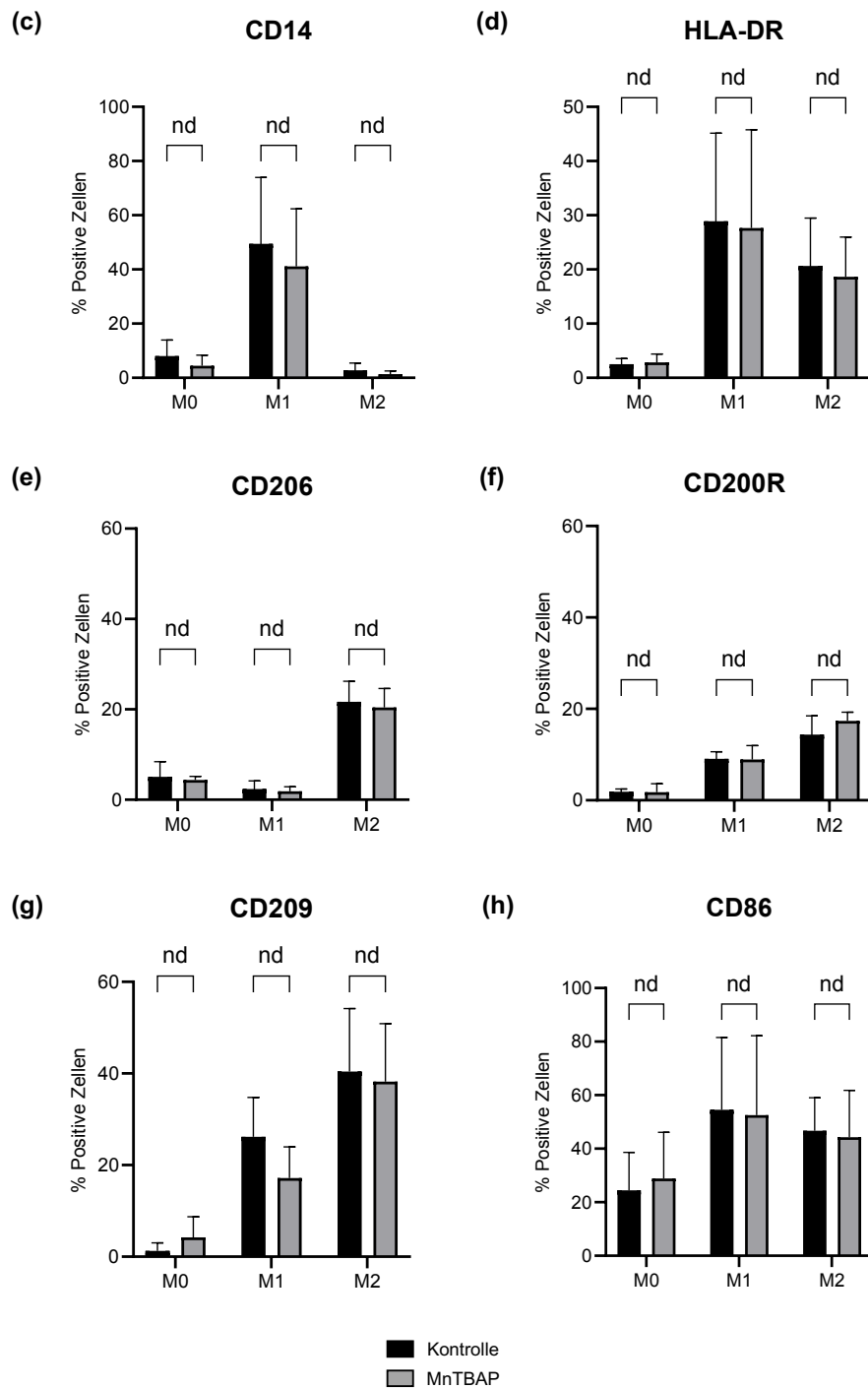


Abbildung 19: Die Behandlung mit MnTBAP hat keinen signifikanten Effekt auf die Oberflächenmarkerexpression der Makrophagensubtypen. Mit 50 nmol/l PMA behandelte THP-1-Zellen wurden in verschiedene Makrophagensubtypen differenziert und vor der Differenzierung für 24 h mit 100µmol/l MnTBAP behandelt. Die Oberflächenmarkerexpression wurde mittels FACS bestimmt (a-h). Die Oberflächenmarkerexpression wird hier als prozentualer Anteil der gemessenen Zellen angegeben. n = 5. nd = no discovery.

3.3.2. Bestimmung der Zytokinausschüttung der mit MnTBAP behandelten THP-1-Zellen mittels ELISA

Die mit MnTBAP behandelten und anschließend differenzierten THP-1-Zellen wurden für 72 h in frischem DMEM-Medium inkubiert. Anschließend wurde die Zytokinkonzentration in den zellfreien Überständen bestimmt. Analog zu den vorherigen Versuchen erfolgte die Bestimmung von TNF- α , IL-6, IL-10 und CCL18 in den Überständen der Zellen (siehe **Abbildung 20**). Die Zytokinkonzentration der mit MnTBAP behandelten Zellen unterschied sich kaum von der Kontrollgruppe. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

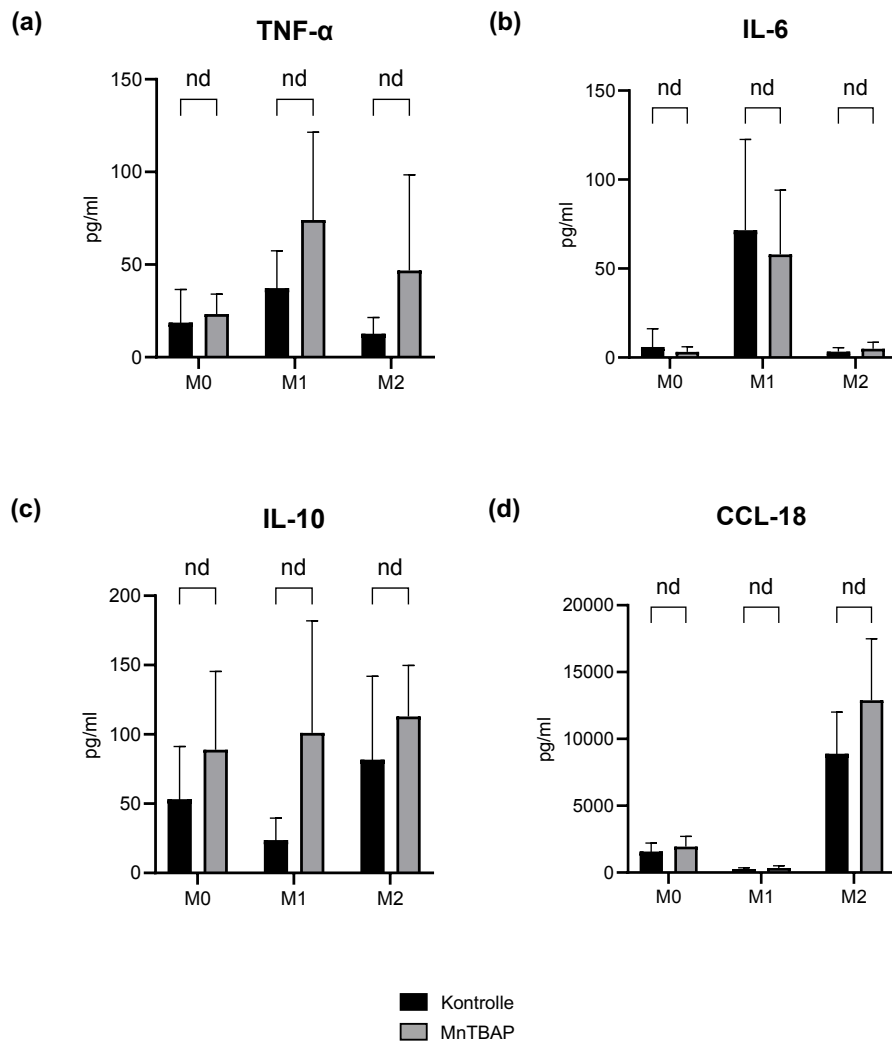


Abbildung 20: Die Behandlung mit MnTBAP hat keinen Effekt auf die Zytokinkonzentration in den zellfreien Überständen der Makrophagensubtypen. Mit PMA behandelte THP-1-Zellen wurden in verschiedene Makrophagensubtypen differenziert und vor der Differenzierung für 24 h mit 100 μ mol/l MnTBAP behandelt. Die Zytokinkonzentration wurde in den zellfreien Überständen bestimmt (a-d). Die Konzentration wird in pg/ml angegeben. n = 5. nd = no discovery.

Zusammenfassend konnte weder durch die Expression von Oberflächenmarkern im FACS noch durch die Bestimmung der Zytokinkonzentration im ELISA ein Einfluss von MnTBAP auf die Polarisation von differenzierten THP-1-Zellen nachgewiesen werden.

3.4. Einfluss konditionierter Medien der Makrophagensubtypen auf das Proliferationsverhalten von Huh7- und HepG2-Zellen

Der Einfluss der Makrophagenpolarisation auf die Proliferation von Huh7- und HepG2-Zellen wurde mithilfe von konditionierten Medien der differenzierten THP-1-Zellen untersucht. Hierzu wurden die zellfreien Überstände der differenzierten Makrophagen verwendet, um die Huh7- und HepG2-Zellen über einen Zeitraum von 24 h zu inkubieren. Anschließend wurde die Zellviabilität der Huh7- und HepG2-Zellen untersucht, um Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten der HCC-Zelllinien zu ziehen.

3.4.1. Zellviabilität von Huh7- und HepG2-Zellen nach der Behandlung mit konditionierten Medien

Zur ersten Einschätzung der Zellviabilität der Huh7- und HepG2-Zellen wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Hierzu wurde die Zellviabilität der beiden Zelllinien Huh7- und HepG2-Zellen spektrophotometrisch im Mikroplatten-Reader (FluoStar Optima®) bestimmt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit DMEM-Medium inkubiert wurden.

Zu Beginn der Versuche wurden die konditionierten Medien differenzierter THP-1-Zellen nach 24, 48 und 72 h gesammelt. Dabei zeigte sich, dass die Überstände nach 48 und 72 h kaum einen Effekt auf die Zellviabilität der Huh7- und HepG2-Zellen hatten (siehe **Abbildung 21**). Alle weiteren Versuche wurden daher mit zellfreien Überständen aus einer 24-stündigen Kultivierung mit differenzierten THP-1-Zellen durchgeführt.

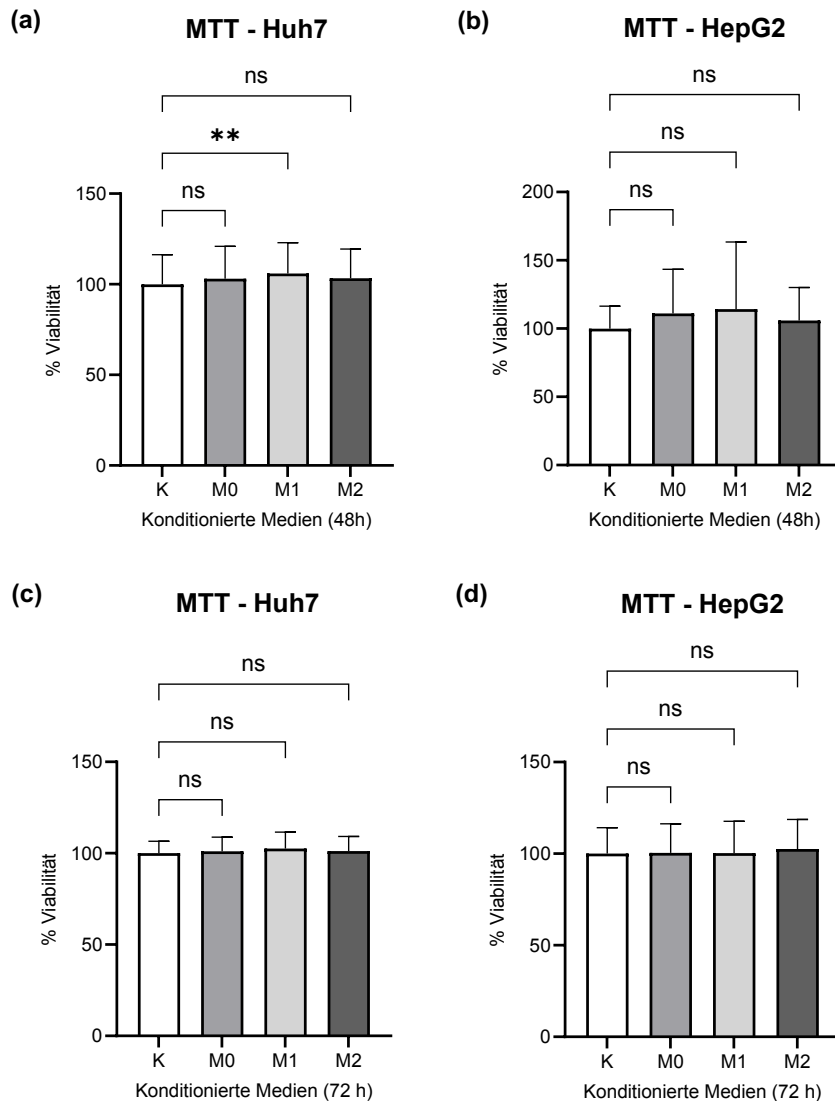


Abbildung 21: Die Zellviabilität der Huh7- und HepG2-Zellen zeigt kaum Veränderungen nach der Behandlung mit konditionierten Medien aus 48- und 72-stündiger Kultivierung. Huh7- und HepG2-Zellen wurde für 48 h (a-b) und 72 h (c-d) mit zellfreien Überständen von in M0-, M1- und M2- differenzierten THP-1-Zellen inkubiert. Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Als Kontrolle dienen in DMEM-Medium inkubierte Huh7- und HepG2-Zellen. Die Darstellung erfolgt in % der Kontrolle. Die Kontrolle wurde auf 100 % festgelegt. n = 8. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ns = nicht signifikant.

Unter Verwendung der konditionierten Medien nach 24 h konnte bei den Huh7- und HepG2-Zellen ein statistisch signifikanter Effekt der M2-Medien festgestellt werden. In einzelnen Versuchen konnte beobachtet werden, dass das konditionierte Medium von M2-Makrophagen zu einer erhöhten Zellviabilität der Huh7-Zellen und zu einer reduzierten Zellviabilität der HepG2-Zellen führte (siehe **Abbildung 22**). Der Effekt bei

den Huh7- und den HepG2-Zellen verhielt sich demnach genau umgekehrt. In weiteren Versuchssets konnte diese Beobachtungen nicht reproduziert werden.

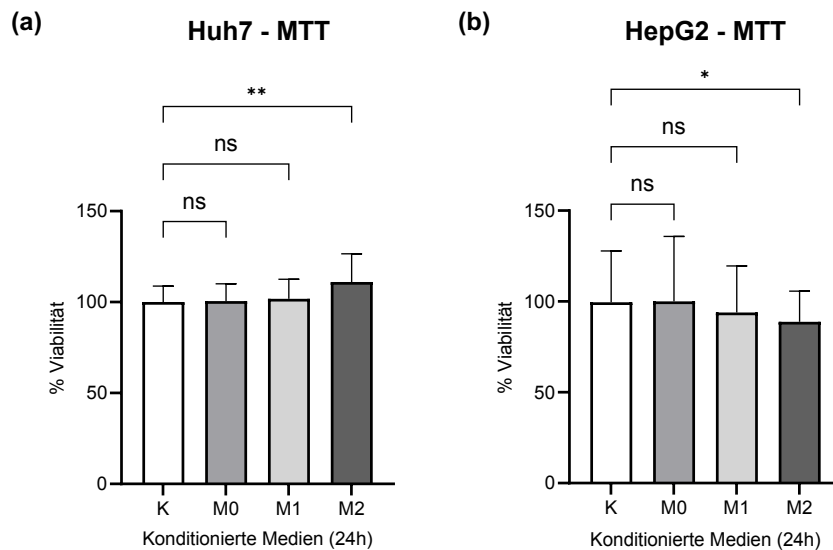


Abbildung 22: Huh7- und HepG2-Zellen zeigen eine Veränderung der Zellviabilität nach Behandlung mit konditionierten Medien von M2-Makrophagen. Huh7- und HepG2-Zellen wurden für 24 h mit dem zellfreiem Überstand von in M0-, M1- und M2- differenzierten THP-1-Zellen inkubiert. (a-b). Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Als Kontrolle dienen in DMEM-Medium inkubierte Huh7- und HepG2-Zellen. Die Darstellung erfolgt in % der Kontrolle. Die Kontrolle wurde auf 100 % festgelegt. n = 8. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, ns = nicht signifikant.

3.4.2. Färbung mit Propidiumiodid und Messung mittels FACS

Zur Abschätzung des Anteils toter Zellen in den unterschiedlich behandelten Gruppen von Huh7- und HepG2-Zellen erfolgte eine Färbung mittels PI, gefolgt von einer Messung des Anteils der PI-exprimierenden Zellen mittels FACS. Die Zellen wurden 24 h mit den Überständen von M0-, M1 und M2-Makrophagen behandelt. Anschließend wurden die Zellproben mit 100 μ l PI-Lösung für die Messungen vorbereitet. Die Messung erfolgte im Gerät BD FACS Verse, die Auswertung mit FlowJo®.

Der Anteil PI-exprimierender und damit toter Zellen in der Zellpopulation lag bei Huh7- und HepG2-Zellen zwischen 10 % und 17 %. Der Anteil PI-negativer Zellen lag somit in allen Behandlungsgruppen zwischen 83 % und 90 % (siehe **Abbildung 23**). Es

zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen der Huh7- und HepG2-Zellen.

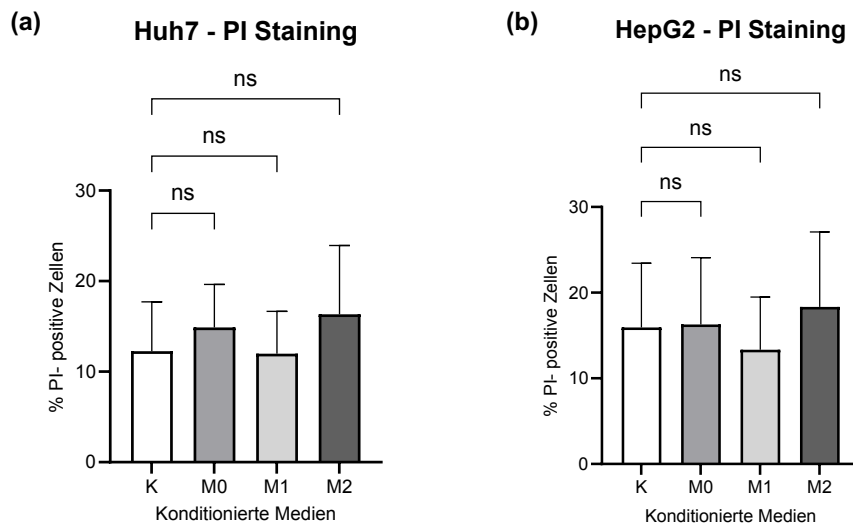


Abbildung 23: Die Inkubation von Huh7- und HepG2-Zellen mit konditionierten Medien von differenzierten THP-1-Zellen hat keinen Einfluss auf die Propidiumiodid-Expression im FACS. Huh7- und HepG2-Zellen wurden für 24 h mit dem zellfreiem Überstand von in M0-, M1- und M2- differenzierten THP-1-Zellen inkubiert. Der Anteil toter Zellen wurde mit einer PI-Färbung im FACS quantifiziert. Als Kontrolle (K) dienen in DMEM-Medium inkubierte Huh7- und HepG2-Zellen. **(a)** Huh7; **(b)** HepG2. Die Darstellung erfolgt als prozentualer Anteil der gesamten Zellpopulation. n = 8. *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001. ns = nicht signifikant.

Zusammenfassend konnte in diesem Versuch kein signifikanter Einfluss der von differenzierten Makrophagen gewonnenen Überstände auf den Anteil toter Zellen der Huh7- und HepG2-Zellen festgestellt werden.

4. Diskussion

Zur Erforschung der Interaktion zwischen Tumoren und Immunzellen ist zunächst die Etablierung von Versuchsmodellen erforderlich, die zu reproduzierbaren Ergebnissen führen und mechanistische Untersuchungen ermöglichen. Die direkte Translation von *in-vitro*-Versuchen auf die klinische Forschung mit menschlichen Proben ist vielversprechend. *In-vitro*-Versuche sorgen häufiger für schnelle und reproduzierbare Ergebnisse und sind weniger störanfällig für Umgebungsfaktoren.(128) Die Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen ist ein weit verbreitetes Modell zur Untersuchung von Immunzellfunktionen im Kontext von Tumorerkrankungen.(54,62) Zwar sind zahlreiche *in-vitro*-Modelle zur Differenzierung von Makrophagensubtypen publiziert worden, doch sind diese nur teilweise reproduzierbar (siehe **Tabelle 1**).(11,28,44,54,97,105,137,148) Im Rahmen dieser Promotion wurden verschiedene Protokolle zur Differenzierung von Makrophagen recherchiert und hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit sowie ihrer Reproduzierbarkeit bewertet. Dabei stand neben der phänotypischen Charakterisierung der THP-1-Zellen anhand spezifischer Oberflächenmarker insbesondere die funktionelle Analyse ihrer Zytokinexpression im Vordergrund. Mithilfe der systematischen Evaluation der verschiedenen Ansätze konnte schließlich ein etabliertes Differenzierungsprotokoll entwickelt werden, das die zuverlässige Generierung distinkter Makrophagensubtypen mit charakteristisch unterschiedlichen Oberflächenmarker- und Zytokinprofilen ermöglicht. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für die nachfolgende Diskussion der beobachteten funktionellen Unterschiede von Makrophagensubpopulationen und ihrer potenziellen biologischen Relevanz.

4.1. Differenzierung der Makrophagensubtypen M0, M1 und M2 aus der humanen Zelllinie THP-1

4.1.1. Differenzierung monozytärer THP-1-Zellen zu M0-Makrophagen mit PMA

Der erste Schritt der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen wurde durch die Behandlung monozytärer THP-1-Zellen mit PMA eingeleitet. PMA ist ein etablierter Stimulus zur Induktion einer makrophagenähnlichen Morphologie und Funktion.

Zur Untersuchung der inflammatorischen Funktion von Makrophagen hat sich die Zelllinie THP-1 in zahlreichen Studien als verlässliches *in-vitro*-Modell erwiesen, das realistische und reproduzierbare Ergebnisse liefert.(102,170) Aufgrund ihrer Stabilität gegenüber Umweltbedingungen und ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen Stimulanzen eignet sich die Zelllinie zur Untersuchung grundlegender Zellfunktionen.(4) Die einfache Handhabung macht die Versuche reproduzierbar und führt zu konsistenten Forschungsergebnissen.(4) Um die Versuchsbedingungen an die *in-vivo*-Situation anzunähern, könnten in zukünftigen Experimenten auch *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs), also von Spendern gewonnene periphere Blutmonozyten, verwendet werden. Allerdings weisen PBMCs eine höhere interindividuelle Variabilität durch patientenbezogene Faktoren wie Alter, Gesundheitszustand oder medikamentöse Behandlung auf. Das erschwert wiederum deutlich die Vergleichbarkeit und statistische Auswertung der Ergebnisse.(128) Hinzu kommen praktische Limitationen, wie die aufwendige Materialgewinnung, die anspruchsvolle Kultivierung und die eingeschränkte Lagerfähigkeit in Stickstoff.(128) Im Gegensatz zu PBMCs können THP-1-Zellen kontinuierlich kultiviert, kryokonserviert und bei Bedarf in identischer Qualität erneut verwendet werden. Unter Berücksichtigung der Unterschiede zwischen THP-1-Zellen und PBMCs, beispielsweise in Bezug auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker, stellt die Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen eine ideale Basis dar, um die Rolle von Makrophagen in pathologischen *in-vitro*-Experimenten zu untersuchen.(11,97,128) Allerdings sollten die Unterschiede zwischen Zelllinien wie THP-1 und PBMCs bei der Interpretation von Forschungsergebnissen berücksichtigt werden.

Aufgrund der zuvor diskutierten Vorteile der THP-1-Zelllinie als standardisierbares und reproduzierbares Modell wurde in dieser Arbeit die PMA-induzierte Differenzierung von THP-1-Monozyten zu makrophagenähnlichen Zellen untersucht. Dieses Verfahren ist in zahlreichen Studien etabliert und dient der Untersuchung grundlegender Mechanismen der Makrophagenaktivierung und inflammatorischen Signalweiterleitung.(28,81) Unter der Behandlung mit PMA nehmen die Monozyten eine sternförmige Morphologie an, wachsen adhärent und verändern ihre Oberflächenmarkerexpression.(4) Trotz der breiten Anwendung des Differenzierungsmodells zeigen Studien erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Konzentration und Dauer der PMA-Behandlung.(11,100,137) Diese Variabilität beeinflusst die Vergleichbarkeit der Ergebnisse und unterstreicht die

Bedeutung einer sorgfältigen Protokolloptimierung. Es ist bekannt, dass die PMA-Konzentration nicht nur die Effizienz der Differenzierung, sondern auch die Sensitivität der Zellen gegenüber nachfolgenden inflammatorischen Signalen bestimmt.(102) Während in der Literatur PMA-Konzentrationen zwischen 8 bis 500 nmol/l (entsprechend ca. 5 bis 300 ng/ml) verwendet werden, weisen mehrere Studien darauf hin, dass bereits PMA-Konzentrationen von mehr als 50 nmol/l (entsprechend ca. 30 ng/ml) zytotoxische Effekte hervorrufen könnten.(15,21) Eine Stimulation mit hohen PMA-Konzentrationen könnte bereits ohne weitere Signale zur Differenzierung eines inflammatorischen Phänotyps führen, wodurch die Interpretation funktioneller Analysen erschwert wird.(28,80) Gleichzeitig zeigten geringe Konzentrationen unter 8 ng/ml (ca. 10 nmol/l) keine ausreichende Wirkung.(94,95) Eine genaue Abstimmung von PMA-Konzentration und Behandlungsdauer ist entscheidend, um eine annähernd physiologische Differenzierung der THP-1-Zellen zu gewährleisten. Darüber hinaus scheint auch die Zelldichte der THP-1-Zellen deren Empfindlichkeit gegenüber der Behandlung mit PMA zu beeinflussen.(4) In den meisten Publikationen wurde die Zahl der ausgesäten THP-1-Zellen so gewählt, dass die Zellen subkonfluent wuchsen.[74] Somit ist je nach Versuchsaufbau auf eine Optimierung der Zellzahl zur Gewährleistung eines homogenen Zellwachstums zu achten.

Während der Optimierung des Differenzierungsprotokolls konnten wir zeigen, dass eine geringere Zelldichte, eine reduzierte PMA-Konzentration von 50 nmol/l (entsprechend ca. 30 ng/ml) sowie eine anschließende 24-stündige Ruhephase in frischem Kulturmedium die Morphologie und Vitalität der THP-1-Zellen deutlich verbesserten. Die Zellen zeigten nach Optimierung der Versuchsbedingungen eine deutlichere morphologische Veränderung und einen höheren Anteil an vitalen Zellen. Dies wird durch mehrere Studien untermauert, die positive Effekte einer mindestens 24-stündigen Ruhephase im frischen Kulturmedium belegen. Die Einführung einer Ruhephase ging mit einer verbesserten Zellmorphologie und stabileren Expressionsprofilen einher.(21,62,80).

4.1.2. Differenzierung der Makrophagensubtypen M1 und M2

Aufbauend auf der durch PMA-Behandlung erfolgte im nächsten Schritt die funktionelle Polarisation der THP-1-Makrophagen in proinflammatorische M1- und antiinflammatorische M2-Subtypen. Hierzu wurden die THP-1-Zellen mit IFN- γ und LPS

zur Induktion des M1-Phänotyps und mit IL-4 und IL-13 zur Induktion des M2-Phänotyps stimuliert. Die Konzentration von IL-4 wurde dabei auf 20 ng/l festgelegt.

Der Fokus vieler Differenzierungsprotokolle liegt auf der Differenzierung von M1-Makrophagen und ihren proinflammatorischen Funktionen. Daher ist für M1-Makrophagen häufiger eine klare methodische Herangehensweise etabliert.[32,74] Der experimentelle Umgang mit M2-Makrophagen unterliegt dagegen deutlich mehr Variabilität. Während IFN- γ und LPS in nahezu allen etablierten Protokollen zur Differenzierung von M1-Makrophagen verwendet werden, gibt es bei der Differenzierung von M2-Makrophagen deutliche methodische Unterschiede in den Differenzierungsprotokollen.(11) IL-4 und IL-13 sind die am häufigsten eingesetzten Substanzen zur Differenzierung von M2-Makrophagen, auch wenn in einigen Studien IL-10 oder TGF- β verwendet wurden.(11,62,118,147) In anderen Studien wurde nur eine der beiden Substanzen oder andere Kombinationen verwendet. Je nach verwendeter Differenzierungssubstanz erfolgt die Einteilung in die Subtypen M2a, M2b, M2c und M2d.(20,118) Die daraus resultierende Vielfalt an Protokollen und Markerprofilen erschwert den Vergleich der experimentellen Ergebnisse und unterstreicht das Fehlen einheitlicher Richtlinien für die Differenzierung von M2-Makrophagen.

Auch die Konzentration der verwendeten Zytokine spielt hierbei eine entscheidende Rolle. In Studien variierte die IL-4-Konzentration zwischen 5 und 40 ng/ml.(11,128,137) Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Konzentration von 20 ng/ml die spezifische Expression von M2-Oberflächenmarkern am deutlichsten fördert, während höhere Konzentrationen von 40 ng/ml eine unspezifische oder partielle Aktivierung von M1-Markern begünstigen. Dies deutet darauf hin, dass eine übermäßige IL-4-Stimulation paradoxerweise proinflammatorische Funktionen induzieren kann, möglicherweise durch die Überlagerung regulatorischer Signalwege.

Die Stimulationsdauer der Makrophagendifferenzierung variierte in verschiedenen Studien zwischen sechs und 72 h, teilweise dauerte sie sogar bis zu 14 Tage an.(11,44,54,114,137) Bereits nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden mit den Differenzierungssubstanzen kam es in manchen Studien zur Expression spezifischer Oberflächenmarker.(118,137) Allerdings führte eine Verlängerung der Behandlungsdauer auch in diesen Studien zu einer ausgeprägteren

Oberflächenmarkerexpression.(118) Unsere Versuche begannen mit einer Differenzierungsphase von 48 h. Durch eine Verlängerung der Differenzierungsphase auf 72 h konnten wir im Vergleich eine stärkere Oberflächenmarkerexpression und eine deutlichere morphologische Veränderung der Makrophagensubtypen, insbesondere der M2-Makrophagen, erreichen. Unsere Ergebnisse verdeutlichen somit, dass eine ausreichend lange Behandlung und eine genaue Abstimmung der Konzentration der Differenzierungssubstanzen für die erfolgreiche Differenzierung essenziell sind. Sowohl die Dauer der Stimulation als auch die exakte Abstimmung der Zytokinkonzentrationen sind entscheidende Parameter für eine erfolgreiche und reproduzierbare Differenzierung der THP-1-Zellen in funktionell distinkte Makrophagensubtypen.

4.1.3. Oberflächenmarker von Makrophagen

Nach der Differenzierung und Polarisation wurden die entstandenen Makrophagensubtypen anhand von Oberflächenmarkern charakterisiert. Mithilfe dieser Analysen konnten wir die durch die jeweiligen Stimulationsbedingungen differenzierten Phänotypen nicht nur anhand morphologischer Merkmale, sondern auch auf funktioneller Ebene bestätigen. Unter unserem Protokoll zeigte sich bei M1-Makrophagen eine konsistent erhöhte Expression der Oberflächenmarker CD80, CD38, CD14 und HLA-DR, während M2-Makrophagen durch die Oberflächenmarker CD206, CD209 und CD200R gekennzeichnet waren. Andere Oberflächenmarker wie CD86 und CD11b wurden auf allen Makrophagensubtypen in vergleichbaren Anteilen exprimiert. Die Oberflächenmarker CD36, CD83, CCR7 und CD163 wurden dagegen nur gering exprimiert. In unserer Arbeit ermöglichte die Kombination mehrerer Oberflächenmarker und die Bildung spezifischer „Markerprofile“ eine klare und zuverlässige Abgrenzung der M0-, M1- und M2-Makrophagenpopulationen. Diese Vorgehensweise lieferte konsistente und reproduzierbare Ergebnisse und erlaubte eine präzise Zuordnung der differenzierten THP-1-Zellen zu den jeweiligen Phänotypen.

Unsere Daten stehen im Einklang mit Publikationen zur Charakterisierung monozytär-phagozytärer Zelllinien anhand der Oberflächenmarkerexpression.(120) Obwohl sich myeloide Zellen in der Expression ihrer Oberflächenmarker ähneln, unterscheiden sich die Marker in ihrer Spezifität für die einzelnen Zelltypen.(35) Einige der Oberflächenmarker, wie beispielsweise CD11c, CD14, CD86 oder HLA-DR finden

sich in unterschiedlichen Anteilen bei allen monozytär-phagozytären Zellpopulationen. Andere Oberflächenmarker, wie CD36, CD68 oder CD206, werden dagegen vorwiegend auf reifen Makrophagen exprimiert und dienen zur Bestätigung einer erfolgreichen Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen.(2,44) Die Oberflächenmarkerexpression von reifen Makrophagen ist dynamisch und kann durch inflammatorische Umgebungssignale induziert oder unterdrückt werden.(35)

In der Literatur variiert die Anwendung von Oberflächenmarkern zur Identifizierung von Makrophagensubpopulationen. Einige Oberflächenmarker zur Unterscheidung von Makrophagenphänotypen sind bereits etabliert, während andere Marker weniger häufig verwendet werden. Für den M1-Phänotyp gelten CD80, CD86, CD38 und HLA-DR als etablierte Marker, für den M2-Phänotyp wird häufig CD206 verwendet.(11,44,114,119) Der Oberflächenmarker CD14 wird in vielen Arbeiten zur Identifizierung monozytärer Zellen verwendet, ist aber auch vermehrt auf M1-Makrophagen zu finden.(44) Die Oberflächenmarker CD200R und CD209 werden hingegen häufiger von M2- als von M1-Makrophagen exprimiert, kommen insgesamt aber seltener zum Einsatz.(116,118) Nicht nur das Vorhandensein, sondern auch das Fehlen eines bestimmten Oberflächenmarkers kann mit einem Makrophagenphänotyp assoziiert sein. Beispielsweise exprimiert der M2-Phänotyp weniger CD80 und wird auch als *IL-12-low-Subtyp* bezeichnet.(97) Einige der häufig verwendeten Oberflächenmarker, wie CD163 und CCR7, werden primär auf der Oberfläche von PBMCs nachgewiesen.(5) Dies könnte die Abwesenheit der Marker auf THP-1-Zellen in unserer Arbeit erklären. Des Weiteren konnte CD163 auf differenzierten THP-1-Zellen in einer Studie lediglich durch die Stimulierung mit IL-10 induziert werden.(11) Andere Marker konnten immunhistochemisch detektiert werden und waren dabei der Messung im FACS überlegen. Das galt unter anderem für den Oberflächenmarker CD36, der immunhistochemisch zur Identifikation von M2-Makrophagen herangezogen wurde.(44) Während viele Studien lediglich einen Marker für den M1- oder M2-Subtyp verwenden, entschieden wir uns für die Bildung von Oberflächenmarkerprofilen.(33) Die von uns eingesetzte Kombination aus M1- und M2-Markern ist einzelnen Markern überlegen, da sie die funktionelle Plastizität von Makrophagen differenzierter und robuster abbildet. Ein „Markerprofil“ reduziert den Einfluss unspezifischer oder überlappender Expression (z.B. CD86/CD11c), der bei einzelnen Oberflächenmarkern zu Fehlklassifikationen führen kann. Dies wird durch Publikationen untermauert, die zeigen, dass die

Kombination mehrerer Oberflächenmarker und die quantitative Analyse der anteiligen Expression eine präzisere Charakterisierung der Makrophagensubpopulationen ermöglicht.(168)

Die funktionelle Aussagekraft der Oberflächenmarker stützt die Interpretation der Makrophagenpolarisation. So exprimierten beispielsweise Zellen mit hoher phagozytischer Aktivität vermehrt die Oberflächenmarker CD163, CD206 und CD209, typische M2-Marker.(116) Darüber hinaus kann die Expression von Makrophagen-Oberflächenmarkern in Tumorproben mit klinisch-pathologischen Eigenschaften von Tumorerkrankungen wie dem HCC korrelieren. So war eine geringe Expression von CD86 und eine hohe Expression von CD206 in HCC-Proben mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert, während eine hohe Expression von CD38 mit einer günstigen Prognose des HCC korrelierte.(33,72) Die Korrelation mit klinisch-pathologischen Eigenschaften verdeutlicht den Nutzen einer detaillierten Markeranalyse für die funktionelle Bewertung differenzierter Makrophagen.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass das in dieser Arbeit etablierte Protokoll eine zuverlässige Differenzierung und funktionelle Charakterisierung von THP-1-abgeleiteten Makrophagen ermöglicht. Die klare Unterscheidung zwischen M1- und M2-ähnlichen Phänotypen bildet eine solide Grundlage für weiterführende Analysen inflammatorischer Mechanismen und kann künftig zur Untersuchung von Modulatoren der Makrophagenpolarisation in unterschiedlichen pathophysiologischen Kontexten herangezogen werden.

4.1.4. Funktionelle Charakterisierung der Makrophagensubtypen anhand der Zytokinproduktion

Um die funktionelle Ausprägung der Polarisation zu überprüfen und die phänotypische Einteilung zu validieren, wurde im nächsten Schritt das Zytokinprofil der Makrophagen analysiert. Diese Untersuchung ermöglicht somit nicht nur eine funktionelle Bestätigung der Subtypisierung, sondern gibt auch Aufschluss über das immunologische Potenzial und die regulatorische Rolle der differenzierten Makrophagen unter kontrollierten *in-vitro*-Bedingungen.

Zur Identifikation der Makrophagensubtypen bestimmten wir die Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10, CCL18 und TGF- β mittels ELISA. Es wurden erhöhte Konzentrationen der Zytokine IL-6 und TNF- α für den M1-Phänotyp sowie IL-10 und CCL18 für den M2-Phänotyp beobachtet. Hiervon waren die Zytokine IL-6 (M1-Phänotyp) und CCL18 (M2-Phänotyp) signifikant erhöht. Die Zytokinprofile bestätigen die erfolgreiche funktionelle Differenzierung der Makrophagen unter Verwendung des hier etablierten Protokolls. In Kombination mit der Analyse der Oberflächenmarker ergibt sich somit ein robustes und reproduzierbares Verfahren zur Abgrenzung differenzierter Makrophagensubtypen *in vitro*.

Die in unserer Arbeit beobachtete erhöhte Produktion charakteristischer Zytokine wie TNF- α und IL-10 bestätigt die erfolgreiche *in-vitro*-Differenzierung der THP-1-Zellen, was mit anderen Studien übereinstimmt.(44) Insbesondere das seltener verwendete Chemokin CCL18 bietet im Vergleich zur bestehenden Literatur eine neue Möglichkeit, M2-Makrophagen anhand ihrer Zytokinproduktion zu charakterisieren und erweitert somit die bisherigen Charakterisierungsmöglichkeiten. Analog zu den Oberflächenmarkern kann auch das Verhältnis der Zytokinproduktion zwischen den Makrophagensubtypen zur genaueren Charakterisierung der Makrophagen herangezogen werden. Es ist jedoch zu beachten, dass die Zytokinproduktion stark vom Studiendesign abhängen kann. Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 β werden eher den M1-Makrophagen zugeordnet, während andere Zytokine wie z.B. IL-6 von allen Makrophagensubtypen in unterschiedlichen Konzentrationen sezerniert werden.(103) Darüber hinaus erlaubt die Bestimmung der Zytokinproduktion eine funktionelle Bewertung der *in-vitro*-differenzierten Makrophagen: IL-10 reguliert beispielsweise die gewebeerhaltende Funktion von M2-Makrophagen.(61)

In unserer Arbeit wiesen die Überstände nach 72 h die höchsten Konzentrationen der M1- als auch der M2-typischen Zytokine auf. Dieses Ergebnis spricht für eine höhere Zytokinproduktion nach einer längeren Inkubationszeit im Kulturmedium und ist konsistent mit einer fortschreitenden Entwicklung des Makrophagenphänotyps auch nach abgeschlossener Differenzierung in die jeweiligen Subtypen. In anderen Arbeiten wurden hingegen häufiger die Überstände nach 24 und 48 h verwendet.(36,49,122,163) Nach Stimulation von THP-1-Zellen mit LPS wurde sogar bereits nach wenigen Stunden die höchste Zytokinkonzentration beobachtet.(47,55) Eine zu frühe Bestimmung der

Zytokinkonzentration könnte allerdings auch durch einen transienten Aktivierungsprozess beeinflusst sein, der beispielsweise durch die Stimulation mit PMA, LPS oder anderen Zytokinen ausgelöst wird. Somit ist eine Zytokinmessung nach längerer Inkubationszeit möglicherweise eher auf eine erfolgreiche und stabile Differenzierung der Makrophagensubtypen zurückzuführen. Manche Unterschiede könnten außerdem durch den Einsatz unterschiedlicher Methoden zur intra- oder extrazellulären Bestimmung der Zytokine bedingt sein.(122)

Im Kontext von Tumorerkrankungen können die Funktionen von Zytokinen variieren. IL-6 gilt als proinflammatorisches Zytokin und Marker für M1-Makrophagen. Allerdings kann IL-6 je nach Signalen des *tumor microenvironment* entweder an der Tumorprogression oder an der anti-tumoralen Immunreaktion beteiligt sein.(108) Über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 beeinflusst IL-6 die Angiogenese sowie die Immunevasion und fördert die Entstehung einer immunsuppressiven Tumorumgebung.(58,78,158) TGF- β und IL-10, typische von M2-Makrophagen produzierte Zytokine, tragen durch zahlreiche immunsuppressive Eigenschaften und durch die Induktion der PD-L1-Expression auf monozytären Zellen zur Bildung eines immunsuppressiven *tumor microenvironment* bei.(73,103) Die Rolle von TGF- β im Tumormilieu ist nicht eindeutig und hängt vom jeweiligen Tumorstadium ab.(92) Unter anderem hemmt TGF- β die Funktion zytotoxischer T-Zellen und sorgt für eine verminderte Expression von MHC-I-Molekülen (MHC = *Major Histocompatibility Complex*) auf Tumorzellen, was deren Immunevasion erleichtert.(87) Die Rolle von CCL18 für die Tumorprogression ist bislang wenig erforscht. Makrophagen und andere Immunzellen sezernieren CCL18, was wiederum zu invasivem Tumorwachstum führen und die Migration von HCC-Zellen fördern kann.(77,140) TNF- α ist ein zentraler Mediator der entzündlich veränderten Tumorumgebung, vermittelt unter anderem NF- κ B-abhängige Signale und fördert dadurch die Zellproliferation.(103,141) Von TAM sezerniertes TNF- α fördert *in vitro* die Transition von HCC-Zellen zu Tumorstammzellen.(24) Auch IL-1 β als proinflammatorisches Zytokin trägt zur Aufrechterhaltung der chronischen Inflammation in der Tumormikroumgebung bei.(83) IL-1 β und TNF- α führen unter anderem durch die Dysregulation von durch NF- κ B regulierten Signalwege zu einer chronisch inflammatorischen Reaktion.(135)

Diese Zusammenhänge verdeutlichen, dass die funktionelle Einteilung von Makrophagen in M1- und M2-Subtypen sowie die Zuordnung spezifischer Zytokine im Kontext der Tumorerkrankungen mit Vorsicht zu interpretieren ist. Aufgrund der Plastizität der Makrophagen und ihrer komplexen Interaktion mit Tumorsignalen können sich überlappende Zytokinprofile ergeben. Eine präzise Charakterisierung der Makrophagensubtypen erfordert daher eine kombinierte Analyse von Oberflächenmarkern und funktionellen Parametern.

4.1.5. IL-1 β -Sekretion der verschiedenen Makrophagensubtypen nach Stimulation mit inflammatorischen Substanzen

Unter den proinflammatorischen Mediatoren spielt IL-1 β eine besondere Rolle. Neben seiner bereits erwähnten bekannten Funktion in der Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse ist IL-1 β auch direkt an der Regulation der Makrophagenpolarisation beteiligt.(157) Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass IL-1 β nicht nur die Aktivierung bereits differenzierter Makrophagen verstärkt, sondern auch die Induktion von M1-ähnlichen Eigenschaften in monozytären Vorläuferzellen unterstützt.(39,128) Diese Verbindung zwischen Entzündungssignalen und Differenzierung macht IL-1 β zu einem zentralen Faktor für die funktionelle Plastizität von Makrophagen und für die Modellierung entzündlicher Mikroumgebungen *in vitro*.

Das Modell der LPS- und ATP-induzierten IL-1 β -Sekretion zur Testung von Immunzellfunktionen ist weit verbreitet.(48,115) Die Analyse der IL-1 β -Sekretion gilt dabei als etablierter funktioneller Marker, um die Differenzierung von Monozyten in aktivierte, immunkompetente Makrophagen zu verifizieren.(55) Wie auch in unseren Versuchen, kommt es nach Priming mit LPS und anschließender Behandlung mit ATP zu einer verstärkten IL-1 β -Sekretion in den Überständen differenzierter THP-1-Makrophagen.(48,55) In unserer Arbeit reagierten die M1-Makrophagen mit einer etwa fünfmal höheren IL-1 β -Produktion (durchschnittlich 120 pg/ml) auf die Stimulation mit LPS und LPS + BzATP als die M2-Makrophagen. Die Ergebnisse verdeutlichen die erfolgreiche funktionelle Differenzierung der THP-1-Zellen mit unserem Protokoll. Die differenzierten M1-Makrophagen reagierten auf externe Stimuli mit einer ausgeprägten Sekretion des Schlüsselzytokins IL-1 β und trugen somit aktiv zur Aufrechterhaltung inflammatorischer Reaktionen bei.

Die Behandlung mit Nigericin führte in allen drei Gruppen zu einer starken IL-1 β -Sekretion, besonders aber in der Gruppe der M0-Makrophagen. Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Studien, die zeigen, dass unpolarisierte M0-Makrophagen infolge einer ausgeprägten Inflammasomaktivierung hohe Mengen an IL-1 β freisetzen.(40) Der Ionophor Nigericin ist dafür bekannt, die Elektrolyt-Homöostase zu stören und dadurch zellulären Stress auszulösen. Diese Effekte aktivieren verschiedene Signalwege, die zur Aktivierung des Inflammasoms und einer ausgeprägten Freisetzung von IL-1 β führen.(6) In unseren Versuchen diente die Stimulation mit Nigericin daher als Referenz für die maximal mögliche IL-1 β -Sekretion. Die Stimulation mit Nigericin bestätigt, dass undifferenzierte M0-Makrophagen das Potential haben, inflammatorische Substanzen wie IL-1 β zu produzieren und bereitzustellen. Im Gegensatz dazu sezernierten differenzierte M1-Makrophagen nach der Behandlung mit Nigericin geringere Mengen an IL-1 β , zeigten jedoch eine gesteigerte Freisetzungsreaktion auf die kombinierte Stimulation mit LPS und ATP. Die Ergebnisse unterstreichen, dass das angewandte Differenzierungsprotokoll dazu in der Lage ist, funktionell distinkte Makrophagensubtypen zu erzeugen, die charakteristische Unterschiede in ihrer IL-1 β -Sekretion aufweisen.

In der Literatur wird IL-1 β häufig ausschließlich als Marker des M1-Phänotyps beschrieben. Wir konnten jedoch auch bei M2-Makrophagen eine – wenn auch geringe – IL-1 β -Sekretion nachweisen.(44,91) Diese Beobachtungen unterstreichen, dass die funktionelle Polarisation von Makrophagen nicht strikt einem binären Modell folgt. Vielmehr verfügen Makrophagen über ein breites funktionelles Spektrum, das eine flexible Anpassung an mikroenvironmentale Signale ermöglicht. Aufgrund ihrer Fähigkeit potente Zytokine wie IL-1 β zu produzieren, tragen Makrophagen zur Aufrechterhaltung der chronischen Inflammation im HCC bei.(83) Die Produktion von IL-1 β kann wiederum eine Verstärkung der tumorfördernden Signale von Makrophagen bewirken.(158) In einer anderen Studie war die IL-1 β -Produktion mit der Metastasierung und Immunevasion im HCC assoziiert.(53)

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Analyse der IL-1 β -Sekretion in differenzierten Makrophagen zur Aufklärung der funktionellen Heterogenität und des tumorfördernden Potenzials tumorassoziierter Makrophagen beiträgt. Darüber hinaus bestätigen unsere

Versuche, dass das aus THP-1-Zellen etablierte Differenzierungsmodell ein geeignetes und reproduzierbares *in-vitro*-System zur Untersuchung makrophagenvermittelter Tumorprozesse, beispielsweise im HCC, darstellt.

4.2. Die Bedeutung der ROS-Modulatoren für die Differenzierung von THP-1-Zellen

Neben Zytokinen und anderen Signalen aus dem *tumor microenvironment* spielen auch oxidative Mechanismen eine zentrale Rolle. ROS wirken dabei als wichtige Signalmoleküle, die inflammatorische Signalwege aktivieren und so zur Ausbildung des jeweiligen Polarisationszustands von Makrophagen beitragen.(9,162) Gleichzeitig kann ein Ungleichgewicht im ROS-Haushalt zellulären Stress auslösen und die funktionelle Balance der Makrophagen verschieben.(64) Die Regulation und Wirkung von ROS stellt somit einen wesentlichen Mechanismus dar, über den das *tumor microenvironment* die Differenzierung und Aktivität von Makrophagen steuern kann. ROS beeinflussen sowohl M1- als auch M2-assoziierte Signalwege. Eine ausreichende ROS-Produktion ist für die Aktivierung proinflammatorischer Signaltransduktionskaskaden essenziell, die zur Ausbildung des M1-Phänotyps beitragen. Eine Reduktion der intrazellulären ROS-Level führt entsprechend zu einer verminderten Expression und Sekretion typischer M1-Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-12.(63,79) Neben ihrer Rolle als Signalmoleküle wirken ROS bakterizid und tragen durch die Aktivierung proinflammatorischer Signalwege wesentlich zur Immunabwehr und Aufrechterhaltung der Funktionen von M1-Makrophagen bei.(126) ROS sind ebenso essenziell für die Funktion von M2-Makrophagen. Es wurde gezeigt, dass M2-Makrophagen zwar über eine geringere intrazelluläre ROS-Konzentration verfügen, ihre Differenzierung jedoch dennoch von ROS-abhängigen Signalwegen gesteuert wird.(49)

Das Superoxiddismutase-Mimetikum MnTBAP kann Superoxidradikale mit einer konstanten und hohen Geschwindigkeit metabolisieren.(37) Durch die Beeinflussung von Apoptose und Lipidperoxidation hat MnTBAP außerdem Auswirkungen auf weitere Signalwege, die indirekt mit dem ROS-Haushalt der Zellen zusammenhängen.(10,43) Über diese Mechanismen kann MnTBAP die Sekretion proinflammatorischer Zytokine in Makrophagen hemmen und deren Polarisation beeinflussen.(125,132) In ersten Experimenten dieser Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Einfluss von MnTBAP auf

die Differenzierung von THP-1-Zellen festgestellt werden. Zwar deuteten initiale Beobachtungen auf eine mögliche Wirkung des ROS-Modulators auf die Differenzierung hin, doch ließ sich dieser Effekt in nachfolgenden Versuchen nicht reproduzieren.

In dieser Arbeit wurde MnTBAP nach der PMA-Behandlung, aber vor der Differenzierung in die verschiedenen Makrophagensubtypen zugegeben. Ziel war es, die intrazellulären ROS-Konzentrationen bereits vor Beginn der Differenzierung in die einzelnen Subtypen zu senken.(9,63) Ob die Zugabe von MnTBAP während der Differenzierung zu M1- und M2-Makrophagen einen anderen Effekt hat, blieb in unseren Experimenten offen. Zeitpunkt und Dauer der Differenzierung sowie die genauen ROS-Konzentrationen könnten die Empfindlichkeit der Makrophagensubtypen gegenüber ROS entscheidend beeinflussen.(27) Ebenso wurde die mögliche Wirkung von Antioxidantien auf die frühe Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen durch PMA in den Experimenten nicht erfasst. ROS scheinen insbesondere für die frühe Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen von Bedeutung zu sein und tragen somit zur initialen Reifung aller Makrophagensubtypen bei.(126)

Eine Veränderung des Anwendungszeitpunkts von MnTBAP oder der Einsatz anderer Antioxidantien könnte die beobachteten Ergebnisse wesentlich beeinflussen. Häufig verwendete Antioxidantien sind neben MnTBAP auch N-Acetylcystein und α -Tocopherol. N-Acetylcystein wirkt über eine Erhöhung der körpereigenen Cystein- und Glutathionkonzentrationen. In Studien, in denen N-Acetylcystein verwendet wurde, konnte ein Einfluss auf die *in-vitro*-Differenzierung von Makrophagen nachgewiesen werden.(111) So inhibierte N-Acetylcystein beispielsweise die Differenzierung in Richtung M1 und unterdrückte die Produktion proinflammatorischer Zytokine.[102] Auch das Vitamin-E-Analogon α -Tocopherol zeigte in Untersuchungen einen Einfluss auf die *in-vitro*-Differenzierung monozytärer Zelllinien.(148) Aufgrund ausbleibender Effekte von N-Acetylcystein und α -Tocopherol wurden die entsprechenden Versuche in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

4.3. Einfluss konditionierter Medien von Makrophagen auf die Viabilität von HCC-Tumorzelllinien

Die bisher beschriebenen Mechanismen, insbesondere die Rolle von ROS und die Regulation proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , unterstreichen die Bedeutung der sekretorischen Aktivität von Makrophagen für ihre funktionelle Ausprägung. Zur Untersuchung der Auswirkungen dieser Aktivität auf Tumorzellen über ins Medium sezernierte Faktoren eignet sich die Verwendung von zellfreien Zellkulturüberständen, den sogenannten konditionierten Medien.

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen Makrophagen und HCC-Zellen wurden in dieser Arbeit die konditionierten Medien der Makrophagensubtypen verwendet. Unsere Daten zeigen, dass ausschließlich die nach 24-stündiger Inkubation entnommenen Überstände von M2-polarisierten THP-1-Makrophagen einen kleinen, nicht konsistent reproduzierbaren Effekt auf die HCC-Zelllinien ausübten: Eine erhöhte Viabilität der Huh7-Zellen (7–8 %) und eine verminderte Viabilität der HepG2-Zellen (ca. 10 %). Die Überstände der M2-Makrophagen nach 48 und 72 h, sowie die Überstände der M0/M1-Makrophagen hatten dagegen keinen signifikanten Effekt. In der Literatur zeigen sich je nach Studiendesign unterschiedliche Ergebnisse, dennoch lässt sich eine Tendenz erkennen: Die Behandlung mit konditionierten Medien führte eher zu einer Stabilisierung oder leichten Zunahme der Zellviabilität von HCC-Zelllinien.(36,104) Beispielsweise konnte konditioniertes Medium von M1-Makrophagen die Zellproliferation von HCC-Zellen *in vitro* hemmen und einen Zellzyklusarrest induzieren.(36) In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass konditionierte Medien von THP-1-Zellen die Migration von Huh7- und HepG2-Zellen fördern.(137)

Eine mögliche Erklärung für die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse könnten die verschiedenen methodischen Ansätze sein. In unseren Experimenten wurden die konditionierten Medien durch eine mindestens 24-stündige Inkubation von Makrophagen, die anschließende Entnahme der Überstände und Zentrifugation zur Entfernung zellulärer Bestandteile hergestellt. In anderen Studien erfolgte die Reinigung der Überstände von zellulären Bestandteilen zusätzlich durch Filtration.(36,45,163) Eine stärkere Konzentrierung der im Medium gelösten Substanzen sowie die Gewinnung von Exosomen aus konditionierten Medien könnten die Effekte auf die Zellviabilität

verstärken und den Einfluss der sekretorischen Faktoren potenziell erhöhen.(104,105) Darüber hinaus sind die Ergebnisse vom verwendeten Differenzierungsprotokoll der Makrophagen sowie der Methode zur Bestimmung der Zellviabilität abhängig. Sowohl der MTT-Assay als auch die Färbung mit Propidiumiodid sind schnelle und praktikable Methoden zur Abschätzung der Zellviabilität. Sie dienen jedoch eher einer groben Quantifizierung vitaler Zellen und sind anfällig für methodische Verzerrungen, die beispielsweise durch Unterschiede im Zellmetabolismus und in der Mitochondrienaktivität verursacht werden.(46,121)

Der stärkere Effekt der konditionierten Medien nach 24 h steht im Einklang mit anderen Studien, in denen bevorzugt konditionierte Medien differenzierter THP-1-Zellen nach 24-stündiger Inkubation eingesetzt wurden.(13,105,137,163) Längere Kultivierungszeiten können zu Veränderungen im Zellmetabolismus und zu einer reduzierten Vitalität der THP-1-Zellen führen, wodurch sich wiederum die Zusammensetzung der konditionierten Medien verändert.(4) Für einige Zytokine ist außerdem eine hohe Konzentration innerhalb der ersten Stunden nach PMA-Stimulation nachgewiesen, was die frühe Verwendung der konditionierten Medien betont.(41,55) Allerdings steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu den von uns gemessenen, erhöhten Zytokinkonzentrationen in den Überständen nach 72 h. Die erhöhte Zytokinkonzentration in den Überständen nach 72 h könnte eher auf einen stabilen Makrophagensubtyp hinweisen als die sehr früh gemessenen Zytokinkonzentrationen unter 24 h. Zudem war der Effekt in unseren Experimenten mit konditionierten Medien nur minimal und teils widersprüchlich. Ergänzende Versuche mit Überständen aus längerer Kultivierung könnten dazu beitragen, potenzielle zeitabhängige Effekte klarer zu erfassen.

Ergänzend könnten direkte Zell-Zell-Interaktionen die Untersuchung dynamischer Veränderungen von Immunzellfunktionen im direkten Kontakt mit Tumorzellen ermöglichen.(89) Experimente mit konditionierten Medien in Kokulturversuchen aus Makrophagen und HCC-Zellen mit direkten Zell-Zell-Kontakten sowie funktionelle Untersuchungen, wie beispielsweise Migrationsassays, könnten wesentlich tiefere Einblicke in die Interaktion der beiden Zelltypen liefern. Die Kokultivierung von HCC-Zellen mit M2-polarisierten TAMs führte beispielsweise zu einer Steigerung der Tumorzellmigration.(22,152) Andere *in-vitro*-Studien zeigen, dass in umgekehrter Richtung auch konditionierte Medien von Tumorzellen die Polarisierung von

Makrophagen beeinflussen können.(13,45,75,105,163) Es konnte gezeigt werden, dass THP-1-Zellen ihren Phänotyp in Kokulturen in Abhängigkeit von der jeweiligen Tumorzelllinie verändern.(22,98) Durch die Verwendung konditionierter Medien konnte sowohl die Produktion pro- als auch antiinflammatorischer Zytokinen und ein gemischter M1-/M2-Phänotyp von Makrophagen induziert werden.(86,113) Die Ergebnisse stützen die Annahme, dass TAMs gleichzeitig Eigenschaften von M1- und M2-Phänotypen besitzen.

Insgesamt unterstreichen die Befunde die Komplexität der Interaktion zwischen Tumorzellen und Makrophagen. Sie werfen die Frage auf, inwieweit die strikte Einteilung von Makrophagen in die starren Subtypen M1 und M2 der tatsächlichen funktionellen Heterogenität und Plastizität von Makrophagen gerecht wird. Im Folgenden soll dieser Aspekt kurz näher beleuchtet werden.

4.4. Kritische Betrachtung der Makrophagenklassifikation

In zahlreichen Studien wird versucht, Makrophagen anhand ihrer Merkmale in das funktionelle Kontinuum zwischen M1- und M2-Makrophagen einzuteilen. Dabei stellen M1- und M2-Makrophagen zwei experimentell definierte Extreme dar, welche der Plastizität von Makrophagen nicht gerecht werden. Zur Charakterisierung von Makrophagenphänotypen werden verschiedene Methoden eingesetzt, darunter FACS, Immunhistochemie und Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), um Oberflächenmarker und transkriptionelle Profile zu analysieren. Ergänzend ermöglichen ELISA und Western Blots die Quantifizierung sekretierter Zytokine und die Detektion intrazellulärer Proteine. Neuere Ansätze kombinieren diese klassischen Verfahren mit *single-cell*-RNA-Sequenzierung oder *mass cytometry*, um die heterogene Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen im Kontext von Tumorprogression, chronischer Entzündung und Gewebeumbau präziser abzubilden.(56,91,146)

M1-Makrophagen wird eine proinflammatorische und das Tumorwachstum hemmende Funktion zugeordnet. Dennoch können auch M1-Makrophagen tumorfördernde Funktionen besitzen. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass TAMs auch Eigenschaften von M1-Makrophagen besitzen.(82,136,160) Unter anderem sind protumorale Funktionen von M1-typischen Zytokinen, wie IL-6 und TNF- α , beschrieben.(22) In einer

Untersuchung von HCC-Proben konnten M1-Makrophagen außerdem die PD-L1-Expression induzieren und dadurch die Immunevasion von HCC-Tumorzellen erleichtern.(169) M2-Makrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der Gewebereparatur und der Auflösung inflammatorischer Prozesse. Sie werden allgemein mit einer Tumorprogression in Verbindung gebracht.(23) Ihr Phänotyp wird daher als meistens als M2-Phänotyp bezeichnet.(143) Passend zum M2-Phänotyp sezernieren im HCC befindliche TAMs vermehrt die Zytokine IL-10, MMP-9, TGF- β und Arginase.(71) Im Vergleich zu M1-Makrophagen spiegeln M2-Makrophagen allerdings mehr funktionelle Diversität wider und sind in Experimenten schwieriger zu charakterisieren.(11,20) Genexpressionsanalysen zeigen außerdem, dass sich TAMs und M2-Makrophagen in ihrer Genexpression unterscheiden.(52) Die Verwendung der beiden Funktionszustände M1 und M2 sollte daher, insbesondere im Kontext von Tumorerkrankungen, kritisch interpretiert werden. Unterschiede in den Differenzierungsprotokollen und der Auswahl von Markern könnten die oft widersprüchlichen experimentellen Ergebnisse erklären.

Die Herkunft der Makrophagen erschwert zusätzlich die Subtyp-Charakterisierung. Makrophagen können entweder von gewebeständigen Kupffer-Zellen in der Leber oder von zirkulierenden Monozyten abstammen. Kupffer-Zellen und von Monozyten abstammende Makrophagen unterscheiden sich in ihrer Genexpression und in der Sekretion von immunwirksamen Substanzen.(51) Rekrutierte Makrophagen besitzen eine stärker ausgeprägte, immunmodulatorische Funktion als Kupffer-Zellen.(51) Unter inflammatorischen Bedingungen können rekrutierte Zellen aber auch als Ersatz für gewebeständige Kupffer-Zellen dienen und sich funktionell an diese anpassen.(117) Trotz dieser offensichtlichen funktionellen Unterschiede wird die Herkunft der Makrophagen in vielen Studien häufig nicht berücksichtigt, was die Interpretation und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zusätzlich erschwert. Trotz dieser kritischen Einordnung ist eine sorgfältige funktionelle Charakterisierung von Makrophagensubtypen unter Berücksichtigung der genannten Einschränkungen eine wichtige Voraussetzung für experimentelle Untersuchungen von TAMs und ihrer Rolle in der Tumorprogression.

4.5. Ausblick

Zuverlässige Protokolle zur *in-vitro*-Makrophagendifferenzierung stellen die zentrale Grundlage für die Untersuchung von Tumor-Immunzell-Interaktionen dar. Bereits

geringe Modifikationen der Versuchsbedingungen können die Funktionalität der differenzierten Makrophagen entscheidend beeinflussen und somit stabile und reproduzierbare Ergebnisse ermöglichen. Mit der Etablierung eines standardisierten Protokolls schafft diese Arbeit die Grundlage für zukünftige *in-vitro*-Studien, die sich mit der Funktion von TAMs bei der Tumorentwicklung und der Proliferation von HCC-Zellen wie Huh7 und HepG2 befassen.

Die Interaktion zwischen TAMs und HCC-Zellen ist bidirektional. Während TAMs das Tumorstadium und die Proliferation im HCC durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen beeinflussen, moduliert das *tumor microenvironment* die Polarisation der Makrophagen und kann deren immunmodulatorische und immunsuppressive Funktion verstärken. *In-vitro*-Untersuchungen konnten diese wechselseitigen Effekte zwischen TAMs und HCC-Zellen bereits reproduzierbar darstellen.(152,158) Allerdings liegen bislang nur begrenzte Daten zur Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf tierexperimentelle Modelle vor. Tiermodelle, insbesondere humanisierte Mausmodelle, sind fehleranfällig und liefern aufgrund artspezifischer Unterschiede bei der Immunantwort, dem Lebermetabolismus und der Tumorentwicklung häufig nur eingeschränkt übertragbare Ergebnisse.[60,70] Ein wesentlicher Grund dafür ist das Fehlen funktioneller humaner Immunzellpopulationen, welche an der Bildung des *tumor microenvironment* beteiligt sind.(94) Besonders in der Immunonkologie, etwa bei der Untersuchung von Checkpoint-Inhibitoren oder *T-cell Engagern*, zeigen sich die Limitationen tierischer Modelle deutlich: Aufgrund artspezifischer Unterschiede lassen sich immunologische Signalwege und Immunzellinteraktionen nur unzureichend abbilden.(25) Insbesondere die funktionelle Interaktion zwischen humanen Tumorzellen und Makrophagen kann in murinen Systemen aufgrund artspezifischer Unterschiede nur in begrenztem Umfang modelliert werden. Zudem rücken ethische und regulatorische Aspekte zunehmend in den Fokus, was den Einsatz tierischer Modelle weiter einschränkt. Die direkte Translation von *in-vitro*-Versuchen zu klinischen Studien gewinnt zunehmend an Bedeutung. Humanbasierte *in-vitro*-Modelle, wie Kokulturen aus HCC- und THP-1-abgeleiteten Makrophagen, ermöglichen eine präzisere Untersuchung humanrelevanter Signalwege. Sie bilden somit eine entscheidende Brücke zwischen molekularer Grundlagenforschung und klinischer Anwendung.

Langfristig eröffnet die Erforschung der Makrophagenpolarisation die Möglichkeit, zielgerichtete Therapiestrategien zu entwickeln. Diese umfassen die Depletion von TAMs, die Blockade ihrer Rekrutierung oder ihre gezielte Umprogrammierung hin zu tumorhemmenden Phänotypen. In Studien konnte durch die Blockade der CCL2/CCR2-Achse oder CSF-1/CSF-R1-Achse Effekte auf die Progression des HCC erzielt werden.(88,130,149) Ein zweiter Ansatz zielt auf die Depletion von TAMs in der Tumormikroumgebung des HCC ab. Hierfür wurden Substanzen wie Zoledronsäure oder Clodronat eingesetzt. In Studien zur Therapie des HCC konnte die Behandlung mit Zoledronsäure die Prognose des HCC nach transarterieller Chemoembolisation (TACE) verbessern.(161,166) Des weiteren könnten von TAM sezernierte Substanzen durch externe Substanzen neutralisiert werden. Eine Hemmung von IL-6, beispielsweise mit dem Antikörper Tozilumab, kann das Tumorwachstum des HCC hemmen.(57,66,136,138) Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Umprogrammierung von TAMs in Richtung tumorhemmender Funktionen. Dadurch könnte das Verhältnis zwischen tumorhemmenden Mechanismen und tumorfördernden Funktionen im *tumor microenvironment* beeinflusst werden. In einer Studie führte beispielsweise die Hemmung des IL-4-Rezeptors- α auf TAMs zur Umprogrammierung von TAMs in einen antitumoralen Phänotyp.(50) Durch die Blockierung des CSF-1-Rezeptors mit dem selektiven Inhibitor PLX3387 konnte die Polarisation von TAMs zugunsten von M1-Funktionen verändert und dadurch das Tumorwachstum des HCC gehemmt werden.(5) Die Inhibierung von auf TAM exprimiertem APOC1 führte zu Polarisation von M2- zu M1-Makrophagen im HCC-Gewebe.(52) Für einige Substanzen ist demnach ein tumorsupprimierender Effekt nachgewiesen, der bewiesenermaßen durch TAMs und die Veränderung ihrer Polarisation vermittelt wird. Die Kombination solcher TAM-modulierender Strategien mit etablierten systemischen Therapien könnte die Behandlung von HCC grundlegend verbessern.(164,165) Für zukünftige *in-vitro*-Experimente ist daher die präzise Definition von Differenzierungsprotokollen, der Polarisation von Makrophagen sowie der Analyse ihrer sekretorischen und funktionellen Eigenschaften entscheidend. Nur durch die Etablierung standardisierter, reproduzierbarer Modelle lassen sich die komplexen Mechanismen der TAM-HCC-Interaktion zuverlässig untersuchen, um neue diagnostische, prognostische und therapeutische Ansätze für das HCC zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines reproduzierbaren Protokolls zur Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen als Grundlage für zukünftige belastbare Analysen der Interaktion zwischen Makrophagen und hepatozellulären Karzinomzellen (HCC) *in vitro*. Hierfür wurden Versuchsbedingungen, wie die Konzentration der Substanzen und die Behandlungsdauer, variiert. Um eine möglichst genaue Charakterisierung der Zellen zu erreichen, wurden verschiedene Oberflächenmarker im FACS und Zytokine im ELISA getestet. Mithilfe des SOD-Mimetikums MnTBAP wurde der Einfluss von ROS auf die Makrophagendifferenzierung untersucht. Für die Untersuchung der Interaktion zwischen TAMs und den HCC-Zelllinien Huh7 und HepG2 kamen konditionierte Medien zum Einsatz. Eine optimierte Kombination aus geringerer Zelldichte der ausgesäten Zellen, einer reduzierten PMA-Konzentration von 50 nmol/l mit 24-stündiger Ruhephase und Polarisation für 72 h führte zur Generierung stabiler M1- und M2-Makrophagen, die funktionell mittels FACS und ELISA validiert wurden. M1-Makrophagen waren durch die Expression von CD80/CD38/CD14 und eine erhöhte Produktion von IL-6 (> 40 pg/ml) gekennzeichnet, M2-Makrophagen exprimierten CD206/CD200R/CD209 und sezernierten CCL18 bis $\sim 8\,000$ pg/ml. IL-10 und TNF- α zeigten keinen signifikanten Unterschied, TGF- β bleibt unverändert. Die IL-1 β -Freisetzung bestätigt die Polarisationsunterschiede, wobei M1-Makrophagen sensitiv auf eine Stimulation mit LPS/ATP reagierten, während Nigericin insbesondere in M0-Makrophagen eine maximale Antwort auslöste (bis $\sim 14\,000$ pg/ml). Konditionierte Medien von M2 Makrophagen (24 h) bewirkten kleine, insgesamt nicht reproduzierbare Veränderungen der Zellviabilität bei Huh7- ($\uparrow \sim 7\text{--}8\%$) und HepG2-Zellen ($\downarrow \sim 10\%$), wohingegen die Überstände nach 48 h und 72 h keinen Effekt zeigten. Die ROS-Modulation mit MnTBAP beeinflusste die Polarisation unter den getesteten Bedingungen nicht. Insgesamt stellt das etablierte Protokoll eine robuste und standardisierte Grundlage zur Differenzierung und funktionellen Charakterisierung von aus THP-1-Zellen differenzierten Makrophagensubtypen dar. Es ermöglicht die Etablierung reproduzierbarer *in-vitro*-Modelle zur Untersuchung von Tumor-Immunzell-Interaktionen im HCC und schafft damit eine Basis für translationale Ansätze in der Krebsforschung.

6. Summary

The aim of this study was to establish a reproducible macrophage differentiation protocol from THP-1-cells as a foundation for future, reliable *in-vitro*-analyses of the interaction between macrophages and HCC cells. To this end, experimental conditions, such as reagent concentrations and treatment durations, were systematically varied. For precise cellular characterization, we tested multiple surface markers by FACS and cytokines by ELISA. Using the SOD mimetic MnTBAP, we examined the influence of ROS on macrophage differentiation. Conditioned media were employed to investigate interactions between TAMs and the HCC cell lines Huh7 and HepG2. An optimized combination of lower seeding density, PMA at 50 nmol/L followed by a 24 h rest phase, and 72 h polarization generated stable M1 and M2 macrophage populations, which we functionally validated by FACS/ELISA. M1 macrophages were characterized by CD80/CD38/CD14 and increased IL-6 (> 40 pg/ml), whereas M2 macrophages displayed CD206/CD200R/CD209 and CCL18 ($\sim 8,000$ pg/ml). IL-10 and TNF- α showed no significant differences, and TGF- β remained unchanged. IL-1 β release confirmed polarization differences, as M1 macrophages were sensitive to stimulation with LPS/ATP, while nigericin elicited a maximal response particularly in M0 macrophages (up to $\sim 14,000$ pg/ml). Conditioned media from M2 macrophages (24 h) induced small, overall, non reproducible changes in viability (Huh7 $\uparrow \sim 7-8\%$) and HepG2 ($\downarrow \sim 10\%$) whereas 48 / 72 h conditioned media produced little functional impact despite higher cytokine levels, suggesting time window dependent paracrine signaling. ROS modulation with MnTBAP did not affect polarization under the tested conditions. Taken together, the protocol provides a robust, standardized basis for the differentiation and functional characterization of THP-1-derived macrophages. It enables the establishment of reproducible *in-vitro* models to study tumor-immune cell interactions in HCC and thereby strengthens the foundation for translational approaches in cancer research.

7. Verzeichnisse

7.1. Abkürzungsverzeichnis

APOC1	Apolipoprotein C1
Arg1	Arginase 1
ATP	Adenosintriphosphat
BzATP	2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosin-5'-triphosphat
CCL18	Chemokin-Ligand-18
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CSF-1	<i>colony-stimulating-factor 1</i>
CSFR-1	<i>colony-stimulating-factor-Rezeptor 1</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
CXCL	C-X-C Chemokin Ligand
CXCR	C-X-C Chemokin Rezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötales Kälberserum
FSC; FSC-A	<i>Forward Scatter</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage Colony-stimulating-factor</i>
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HO[•]	Hydroxidradikale
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor α
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HLA-DR	<i>human leucocyte antigen – D Related</i>
HO[•]	Hydroxidradikale
IFN-γ	Interferon γ
IGF	<i>insulin-like growth-factor</i>
IL	Interleukin
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MASH	<i>Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis</i>
MASLD	<i>Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease</i>
MiR-98	Micro-RNA
MMP; MMP-9	Matrix-Metallo-Proteinasen
MnSOD	manganese-dependent superoxide dismutase
MnTBAP	Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Natürliche Killerzellen

NOS; iNOS	<i>(inducible) Nitric oxide synthase</i>
NOX2	NADPH Oxidase 2
PBMCs	<i>peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PD-1	<i>programmed Cell Death Protein 1</i>
PD-L1	<i>programmed Cell Death Protein Ligand 1</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PPR	Pattern-Recognition-Rezeptoren
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SOD	Superoxiddismutase
SSC	<i>side Scatter</i>
STAT1	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen
TANs	Tumor-assoziierte Neutrophile
TGF-β	Transforming growth factor β
T_H1	Typ-1-T-Helferzellen
Tie2	<i>tyrosine Kinase with Immunoglobulin and Epidermal Growth Factor Homology Domains-2</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tregs	Regulatorische T-Zellen
VEGF	<i>vascular-endothelial-growth-factor</i>

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Überblick der Makrophagenfunktion.	8
Abbildung 2: Spezifische Eigenschaften von M1- und M2-Makrophagen.....	11
Abbildung 3: Tumor-assoziierte Makrophagen.	13
Abbildung 4: Risikofaktoren für die Entwicklung von HCC in Zentraleuropa.	14
Abbildung 5: Zellzählung mit Neubauer Zählkammer.	27
Abbildung 6: Darstellung des Ablaufs der Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen.	29
Abbildung 7: Bestimmung der Zytokinproduktion im Zellüberstand mittels <i>Enzyme-linked immune staining assay</i> (ELISA).	33
Abbildung 8: Lichtmikroskopische Kontrolle des Wachstumsverhalten von aus THP-1-Zellen differenzierten M0-Makrophagen.	41
Abbildung 9: Darstellung der verschiedenen Modifikationen zur Etablierung eines Protokolls zur Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen.....	42
Abbildung 10: Monozytäre THP-1-Zellen entwickeln sich nach der Behandlung mit PMA zu adhärenen M0-Makrophagen.	43
Abbildung 11: Zu M0, M1 und M2 differenzierte THP-1-Zellen entwickeln unterschiedliche morphologische Eigenschaften.	44
Abbildung 12: Expression M1-typischer Oberflächenmarker	46
Abbildung 13: Expression M2-typischer Oberflächenmarker	48
Abbildung 14: Expression der Oberflächenmarker CD11c und CD86.....	49
Abbildung 15: Expression unspezifischer Oberflächenmarker.....	50
Abbildung 16: Expression M1-typischer Zytokine.....	52
Abbildung 17: Expression M2-typischer Zytokine.....	53
Abbildung 18: Freisetzung von IL-1 β nach Stimulierung mit proinflammatorischen Substanzen.....	54
Abbildung 19: Die Behandlung mit MnTBAP hat keinen signifikanten Effekt auf die Oberflächenmarkerexpression der Makrophagensubtypen.	56
Abbildung 20: Die Behandlung mit MnTBAP hat keinen Effekt auf die Zytokinkonzentration in den zellfreien Überständen der Makrophagensubtypen.	58
Abbildung 21: Die Zellviabilität der Huh7- und HepG2-Zellen zeigt kaum Veränderungen nach der Behandlung mit konditionierten Medien aus 48- und 72-stündiger Kultivierung.	60

Abbildung 22: Huh7- und HepG2-Zellen zeigen eine Veränderung der Zellviabilität nach Behandlung mit konditionierten Medien von M2-Makrophagen.	61
Abbildung 23: Die Inkubation von Huh7- und HepG2-Zellen mit konditionierten Medien von differenzierten THP-1-Zellen hat keinen Einfluss auf die Propidiumiodid-Expression im FACS.	62

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Protokolle zur Makrophagendifferenzierung aus THP-1-Zellen	19
Tabelle 2: Laborgeräte	21
Tabelle 3: Verwendete Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.....	21
Tabelle 5: Antikörper für die Messungen mit FACS BDVerse™	24
Tabelle 6: ELISA-Kits (Human Quantikine ELISA R&D Systems® a biontech® brand, Minneapolis, MS, USA).....	25
Tabelle 7: Verwendete Antikörper-Farbstoff-Kombinationen zur Detektion von Oberflächenmarkern.....	31
Tabelle 8: Optimierung des Differenzierungsprotokolls für monozytäre THP-1-Zellen	39
Tabelle 9: Etablierte Oberflächenmarker zur Unterscheidung verschiedener Makrophagensubtypen nach <i>in-vitro</i> -Differenzierung	45
Tabelle 10: Etablierte Zytokine zur Unterscheidung verschiedener Makrophagensubtypen nach <i>in-vitro</i> -Differenzierung	51

8. Literaturverzeichnis

1. Abdelaziz MH, Abdelwahab SF, Wan J, Cai W, Huixuan W, Jianjun C, et al. Alternatively activated macrophages; A double-edged sword in allergic asthma. *J Transl Med.* 2020 Feb 5;18(1):58.
2. Abeles RD, McPhail MJ, Sowter D, Antoniadou CG, Vergis N, Vijay GKM, et al. CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14(hi) /CD16(neg) monocytes: Expansion of CD14(hi) /CD16(pos) and contraction of CD14(lo) /CD16(pos) monocytes in a. *Cytometry A.* 2012 Jul 26;81(10):823–34.
3. Abou-Alfa GK, Lau G, Kudo M, Chan SL, Kelley RK, Furuse J, et al. Tremelimumab plus Durvalumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *NEJM Evid.* 2022 Jun 6;1(8):EVIDoa2100070.
4. Aldo PB, Craveiro V, Guller S, Mor G. Effect of Culture Conditions on the Phenotype of THP-1 Monocyte Cell Line. *Am J Reprod Immunol.* 2013 Jul 1;70(1):80–6.
5. Ao JY, Zhu XD, Chai ZT, Cai H, Zhang YY, Zhang KZ, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor blockade inhibits tumor growth by altering the polarization of tumor-associated macrophages in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2017 Aug 1;16(8):1544–54.
6. Armstrong H, Bording-Jorgensen M, Chan R, Wine E. Nigericin Promotes NLRP3-Independent Bacterial Killing in Macrophages. *Front Immunol.* 2019 Oct 1;10:2296.
7. Atanasov G, Dino K, Schierle K, Dietel C, Aust G, Pratschke J, et al. Immunologic cellular characteristics of the tumour microenvironment of hepatocellular carcinoma drive patient outcomes. *World J Surg Oncol.* 2019 Jun 6;17(1):97.
8. Bao D, Zhao J, Zhou X, Yang Q, Chen Y, Zhu J, et al. Mitochondrial fission-induced mtDNA stress promotes tumor-associated macrophage infiltration and HCC progression. *Oncogene.* 2019 Jun 20;38(25):5007–20.
9. Barbieri SS, Eligini S, Brambilla M, Tremoli E, Colli S. Reactive oxygen species mediate cyclooxygenase-2 induction during monocyte to macrophage differentiation: Critical role of NADPH oxidase. *Cardiovasc Res.* 2003 Nov 1;60(1):187–97.

10. Batinic-Haberle I, Tovmasyan A, Roberts ERH, Vujaskovic Z, Leong KW, Spasojevic I. SOD therapeutics: latest insights into their structure-activity relationships and impact on the cellular redox-based signaling pathways. *Antioxid Redox Signal*. 2014 May 20;20(15):2372–415.
11. Baxter EW, Graham AE, Re NA, Carr IM, Robinson JI, Mackie SL, et al. Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J Immunol Methods*. 2020 Mar 1;478:112721.
12. Beatty GL, Winograd R, Evans RA, Long KB, Luque SL, Lee JW, et al. Exclusion of T Cells From Pancreatic Carcinomas in Mice Is Regulated by Ly6Clow F4/80+ Extratumoral Macrophages. *Gastroenterology*. 2015 Jul 1;149(1):201–10.
13. Benner B, Scarberry L, Suarez-Kelly LP, Duggan MC, Campbell AR, Smith E, et al. Generation of monocyte-derived tumor-associated macrophages using tumor-conditioned media provides a novel method to study tumor-associated macrophages in vitro. *J Immunother cancer*. 2019 May 28;7(1):140.
14. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V, Fearon DF, Merad M, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med*. 2018 May 1;24(5):541–50.
15. Biriken D, Yazihan N, Yilmaz S. Investigation of cytokine and midkine responses of human THP-1 leukemia cells induced by phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) at different concentrations and times. *Mikrobiyol Bul*. 2018 Apr 1;52(2):147–55.
16. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):2112–22.
17. Boutilier AJ, ElSawa SF. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2021 Jul 1;22(13):6995.
18. Capece D, Fischietti M, Verzella D, Gaggiano A, Ciccirelli G, Tessitore A, et al. The inflammatory microenvironment in hepatocellular carcinoma: a pivotal role for tumor-associated macrophages. *Biomed Res Int*. 2013;2013:187204.
19. Chanput W, Mes J, Vreeburg RAM, Savelkoul HFJ, Wichers HJ. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study

- inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food Funct.* 2010 Nov 30;1(3):254–61.
20. Chanput W, Mes JJ, Savelkoul HFJ, Wichers HJ. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct.* 2013 Feb;4(2):266–76.
 21. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol.* 2014 Nov 1;23(1):37–45.
 22. Che D, Pan B, Tian Q, Shang L, Liu F, Jin S, et al. Enhanced invasion of lung adenocarcinoma cells after co-culture with THP-1-derived macrophages via the induction of EMT by IL-6. *Immunol Lett.* 2014;160:1–10.
 23. Chen S, Saeed AFUH, Liu Q, Jiang Q, Xu H, Xiao GG, et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 May 22;8(1):207.
 24. Chen Y, Wen H, Zhou C, Su Q, Lin Y, Xie Y, et al. TNF- α derived from M2 tumor-associated macrophages promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness through the Wnt/ β -catenin pathway in SMMC-7721 hepatocellular carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2019 May 1;378(1):41–50.
 25. Chuprin J, Buettner H, Seedhom MO, Greiner DL, Keck JG, Ishikawa F, et al. Humanized mouse models for immuno-oncology research. *Nat Rev Clin Oncol.* 2023 Mar 3;20(3):192–206.
 26. Cota AM, Midwinter MJ. The immune system. *Anaesth Intensive Care Med.* 2015 Jul 6;16(7):353–5.
 27. Covarrubias A, Byles V, Horng T. ROS sets the stage for macrophage differentiation. *Cell Res.* 2013;23(8):984–5.
 28. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS One.* 2010 Jan 13;5(1):e8668.
 29. Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J. Assays of Cell Viability: Discrimination of Cells Dying by Apoptosis. *Methods Cell Biol.* 1994 Jan 1;41(C):15–38.
 30. Delire B, Henriët P, Lemoine P, Leclercq IA, Stärkel P. Chronic liver injury promotes hepatocarcinoma cell seeding and growth, associated with infiltration by macrophages. *Cancer Sci.* 2018 Jul 1;109(7):2141–52.
 31. Deng L, He K, Pan Y, Wang H, Luo Y, Xia Q. The role of tumor-associated

- macrophages in primary hepatocellular carcinoma and its related targeting therapy. *Int J Med Sci.* 2021;18(10):2109–16.
32. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol.* 2009 Apr 1;27(1):519–50.
 33. Dong P, Ma L, Liu L, Zhao G, Zhang S, Dong L, et al. CD86+/CD206+, Diametrically Polarized Tumor-Associated Macrophages, Predict Hepatocellular Carcinoma Patient Prognosis. *Int J Mol Sci.* 2016 Mar 1;17(3):320.
 34. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest.* 2005 Jan 3;115(1):56–65.
 35. Elliott LA, Doherty GA, Sheahan K, Ryan EJ. Human Tumor-Infiltrating Myeloid Cells: Phenotypic and Functional Diversity. *Front Immunol.* 2017 Feb 6;8:86.
 36. Engström A, Erlandsson A, Delbro D, Wijkander J. Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2. *Int J Oncol.* 2014 Feb 1;44(2):385–92.
 37. Faulkner KM, Liochev SI, Fridovich I. Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase in vitro and substitute for it in vivo. *J Biol Chem.* 1994 Sep 23;269(38):23471–6.
 38. Finn RS, Qin S, Ikeda M, Galle PR, Ducreux M, Kim TY, et al. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med.* 2020 May 14;382(20):1894–905.
 39. Forrester MA, Wassall HJ, Hall LS, Cao H, Wilson HM, Barker RN, et al. Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell Immunol.* 2018 Oct 1;332:58–76.
 40. Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, Schmidt T, Schmid-Burgk JL, Rapino F, et al. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity.* 2016 Apr 19;44(4):833–46.
 41. Gao S, Hu J, Wu X, Liang Z. PMA treated THP-1-derived-IL-6 promotes EMT of SW48 through STAT3/ERK-dependent activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec 1;108:618–24.
 42. Garnelo M, Tan A, Her Z, Yeong J, Lim CJ, Chen J, et al. Interaction between tumour-infiltrating B cells and T cells controls the progression of hepatocellular

- carcinoma. *Gut*. 2017 Feb 1;66(2):342–51.
43. Gauuan PJF, Trova MP, Gregor-Boros L, Bocckino SB, Crapo JD, Day BJ. Superoxide dismutase mimetics: Synthesis and structure-activity relationship study of MnTBAP analogues. *Bioorganic Med Chem*. 2002 Sep 1;10(9):3013–21.
 44. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 2015 Aug 8;15(1):577.
 45. George S, Georgouli M, Sanz-Moreno V. Protocol to drive human monocyte-to-macrophage polarization in vitro using tumor conditioned media. *STAR Protoc*. 2022 Dec 16;3(4):101666.
 46. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 26;22(23):12827.
 47. Glue C, Hansen JB, Schjerling P, Jinquan T, Poulsen LK. LPS-induced cytokine production in the monocytic cell line THP-1 determined by multiple quantitative competitive PCR (QC-PCR). *Scand J Clin Lab Invest*. 2002;62(6):405–12.
 48. Grahames CBA, Michel AD, Chessell IP, Humphrey PPA. Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1 β release in human monocytes. *Br J Pharmacol*. 1999 Aug 1;127(8):1915–21.
 49. Griess B, Mir S, Datta K, Teoh-Fitzgerald M. Scavenging reactive oxygen species selectively inhibits M2 macrophage polarization and their pro-tumorigenic function in part, via Stat3 suppression. *Free Radic Biol Med*. 2020 Feb 1;147:48–60.
 50. de Groot AE, Myers K V., Krueger TEG, Brennen WN, Amend SR, Pienta KJ. Targeting interleukin 4 receptor alpha on tumor-associated macrophages reduces the pro-tumor macrophage phenotype. *Neoplasia*. 2022 Oct 1;32:100830.
 51. Gundra UM, Girgis NM, Ruckerl D, Jenkins S, Ward LN, Kurtz ZD, et al. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood*. 2014 May 15;123(20):e110–22.
 52. Hao X, Zheng Z, Liu H, Zhang Y, Kang J, Kong X, et al. Inhibition of APOC1 promotes the transformation of M2 into M1 macrophages via the ferroptosis pathway and enhances anti-PD1 immunotherapy in hepatocellular carcinoma

- based on single-cell RNA sequencing. *Redox Biol.* 2022 Oct 1;56:102463.
53. He Q, Liu M, Huang W, Chen X, Zhang B, Zhang T, et al. IL-1 β -Induced Elevation of Solute Carrier Family 7 Member 11 Promotes Hepatocellular Carcinoma Metastasis Through Up-regulating Programmed Death Ligand 1 and Colony-Stimulating Factor 1. *Hepatology.* 2021 Dec 1;74(6):3174–93.
 54. Heideveld E, Horcas-Lopez M, Lopez-Yrigoyen M, Forrester LM, Cassetta L, Pollard JW. Methods for macrophage differentiation and in vitro generation of human tumor associated-like macrophages. *Methods Enzymol.* 2020 Jan 1;632:113–31.
 55. Herzyk DJ, Allen JN, Marsh CB, Wewers MD. Macrophage and monocyte IL-1 beta regulation differs at multiple sites. Messenger RNA expression, translation, and post-translational processing. *J Immunol.* 1992 Nov 1;149(9):3052–8.
 56. Hoch T, Schulz D, Eling N, Gómez JM, Levesque MP, Bodenmiller B. Multiplexed imaging mass cytometry of the chemokine milieu in melanoma characterizes features of the response to immunotherapy. *Sci Immunol.* 2022 Apr 15;7(70):eabk1692.
 57. Hu YC, Yi ZJ, Zhou Y, Li PZ, Liu ZJ, Duan SG, et al. Overexpression of RIP 140 suppresses the malignant potential of hepatocellular carcinoma by inhibiting NF-KB-mediated alternative polarization of macrophages. *Oncol Rep.* 2017 May 1;37(5):2971–9.
 58. Huynh J, Chand A, Gough D, Ernst M. Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer — using tissue repair as a road map. *Nat Rev Cancer.* 2019 Feb 21;19(2):82–96.
 59. Jayasingam SD, Citartan M, Thang TH, Mat Zin AA, Ang KC, Ch'ng ES. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. *Front Oncol.* 2019 Jan 24;9:1512.
 60. Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MPJ, Donners MMPC. Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis.* 2014 Jan 8;17(1):109–18.
 61. Kambayashi T, Alexander HR, Fong M, Strassmann G. Potential involvement of IL-10 in suppressing tumor-associated macrophages. Colon-26-derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. *J Immunol.* 1995 Apr 1;154(7):3383–90.

62. Kao JK, Wang SC, Ho LW, Huang SW, Lee CH, Lee MS, et al. M2-like polarization of THP-1 monocyte-derived macrophages under chronic iron overload. *Ann Hematol*. 2020 Mar 1;99(3):431–41.
63. Kaplan M, Shur A, Tendler Y. M1 Macrophages but Not M2 Macrophages Are Characterized by Upregulation of CRP Expression via Activation of NFκB: a Possible Role for Ox-LDL in Macrophage Polarization. *Inflammation*. 2018 Aug 1;41(4):1477–87.
64. Karanam G, Arumugam MK. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction for the initiation of apoptotic cell death in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by a cyclic dipeptide Cyclo(-Pro-Tyr). *Mol Biol Rep*. 2020 May 1;47(5):3347–59.
65. Kim YK, Hwang JH, Lee HT. Differential susceptibility to lipopolysaccharide affects the activation of toll-like-receptor 4 signaling in THP-1 cells and PMA-differentiated THP-1 cells. *Innate Immun*. 2022 Apr 1;28(3–4):122–9.
66. Kong L, Zhou Y, Bu H, Lv T, Shi Y, Yang J. Deletion of interleukin-6 in monocytes/macrophages suppresses the initiation of hepatocellular carcinoma in mice. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016 Sep 2;35(1):131.
67. Kotsari M, Dimopoulou V, Koskinas J, Armakolas A. Immune System and Hepatocellular Carcinoma (HCC): New Insights into HCC Progression. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 14;24(14):11471.
68. Koulouris A, Tsagkaris C, Spyrou V, Pappa E, Troullinou A, Nikolaou M. Hepatocellular Carcinoma: An Overview of the Changing Landscape of Treatment Options. *J Hepatocell Carcinoma*. 2021 May;8:387–401.
69. Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and Management of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2019 Jan 1;156(2):477-491.e1.
70. Kurebayashi Y, Ojima H, Tsujikawa H, Kubota N, Maehara J, Abe Y, et al. Landscape of immune microenvironment in hepatocellular carcinoma and its additional impact on histological and molecular classification. *Hepatology*. 2018 Sep 1;68(3):1025–41.
71. Lahmar Q, Keirsse J, Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van Ginderachter JA. Tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2016 Jan 1;1865(1):23–34.
72. Lam JH, Ng HHM, Lim CJ, Sim XN, Malavasi F, Li H, et al. Expression of

- CD38 on Macrophages Predicts Improved Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Front Immunol.* 2019 Sep 4;10:2093.
73. Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ. Shaping Gene Expression in Activated and Resting Primary Macrophages by IL-10. *J Immunol.* 2002 Sep 1;169(5):2253–63.
 74. Langhans B, Nischalke HD, Krämer B, Dold L, Lutz P, Mohr R, et al. Role of regulatory T cells and checkpoint inhibition in hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2019 Dec 1;68(12):2055–66.
 75. Li L, Sun P, Zhang C, Li Z, Zhou W. MiR-98 suppresses the effects of tumor-associated macrophages on promoting migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by regulating IL-10. *Biochimie.* 2018 Jul 1;150:23–30.
 76. Li L, Yu R, Cai T, Chen Z, Lan M, Zou T, et al. Effects of immune cells and cytokines on inflammation and immunosuppression in the tumor microenvironment. *Int Immunopharmacol.* 2020 Nov 1;88:106939.
 77. Little AC, Pathanjeli P, Wu Z, Bao L, Goo LE, Yates JA, et al. IL-4/IL-13 Stimulated Macrophages Enhance Breast Cancer Invasion Via Rho-GTPase Regulation of Synergistic VEGF/CCL-18 Signaling. *Front Oncol.* 2019 May 31;9:456.
 78. Liu Y, Liu L, Zhou Y, Zhou P, Yan Q, Chen X, et al. CKLF1 enhances inflammation-mediated carcinogenesis and prevents doxorubicin-induced apoptosis via IL6/STAT3 signaling in HCC. *Clin Cancer Res.* 2019 Jul 1;25(13):4141–54.
 79. Lloberas J, Muñoz JP, Hernández-Álvarez MI, Cardona PJ, Zorzano A, Celada A. Macrophage mitochondrial MFN2 (mitofusin 2) links immune stress and immune response through reactive oxygen species (ROS) production. *Autophagy.* 2020 Dec 1;16(12):2307–9.
 80. Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods.* 2016 Mar 1;430:64–70.
 81. Maeß MB, Wittig B, Cignarella A, Lorkowski S. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *J Immunol Methods.* 2014 Jan 15;402(1–2):76–81.
 82. Mano Y, Aishima S, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, et al. Tumor-

- associated macrophage promotes tumor progression via STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Pathobiology*. 2013 Mar 1;80(3):146–54.
83. Mantovani A, Barajon I, Garlanda C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol Rev*. 2018 Jan 16;281:57–61.
 84. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002 Nov 1;23(11):549–55.
 85. Mauro E, de Castro T, Zeithoefer M, Sung MW, Villanueva A, Mazzaferro V, et al. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, diagnosis and treatment. *JHEP Reports*. 2025 Dec 1;7(12):101571.
 86. Meng YM, Liang J, Wu C, Xu J, Zeng DN, Yu XJ, et al. Monocytes/Macrophages promote vascular CXCR4 expression via the ERK pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology*. 2018 Mar 4;7(3):e1408745.
 87. Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J Pathol*. 2011 Jan 1;223(2):206–19.
 88. Mitchem JB, Brennan DJ, Knolhoff BL, Belt BA, Zhu Y, Sanford DE, et al. Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Res*. 2013;73(3):1128–41.
 89. Mu P, Zhou S, Lv T, Xia F, Shen L, Wan J, et al. Newly developed 3D in vitro models to study tumor-immune interaction. *J Exp Clin Cancer Res*. 2023 Apr 4;42(1):81.
 90. Murphy K, Weaver C. Die angeborene Immunität. In: Janeway Immunologie. 9. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 47–93.
 91. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):14–20.
 92. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, et al. Targeting the TGF β pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2015 Mar 1;147:22–31.
 93. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991 Jun 3;139(2):271–9.

94. Nishida-Aoki N, Gujral TS. Emerging approaches to study cell-cell interactions in tumor microenvironment. *Oncotarget*. 2019 Jan 22;10(7):785–97.
95. Nohl H. Physiological and pathophysiological significance of superoxide-radicals and the regulatory role of the enzyme superoxide dismutase. *Klin Wochenschr*. 1981;59(19):1081–91.
96. Obermajer N, Wong JL, Edwards RP, Odunsi K, Moysich K, Kalinski P. PGE2-Driven Induction and Maintenance of Cancer-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Immunol Invest*. 2012 Aug;41(6–7):635–57.
97. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol*. 2019 May 24;10:1084.
98. Padberg F, Hering H, Luch A, Zellmer S. Indirect co-cultivation of HepG2 with differentiated THP-1 cells induces AHR signalling and release of pro-inflammatory cytokines. *Toxicol Vitro*. 2020 Oct 1;68:104957.
99. Palacio JR, Markert UR, Martínez P. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflamm Res*. 2011;60(7):695–704.
100. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res*. 2007;56(1):45–50.
101. Peng Y, Zhou M, Yang H, Qu R, Qiu Y, Hao J, et al. Regulatory Mechanism of M1/M2 Macrophage Polarization in the Development of Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm*. 2023 Jun 8;2023:8821610.
102. Pinto SM, Kim H, Subbannayya Y, Giambelluca M, Bösl K, Kandasamy RK. Dose-dependent phorbol 12-myristate-13-acetate-mediated monocyte-to-macrophage differentiation induces unique proteomic signatures in THP-1 cells. *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory; 2020. p. 2020.02.27.968016.
103. Poh AR, Ernst M. Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Front Oncol*. 2018 Mar 12;8:49.
104. Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. *Lab Invest*. 1984 Dec 1;51(6):635–42.
105. Pritchard A, Tousif S, Wang Y, Hough K, Khan S, Strenkowski J, et al. Lung Tumor Cell-Derived Exosomes Promote M2 Macrophage Polarization. *Cells*.

2020 May 24;9(5):1303.

106. Ramos-Tovar E, Muriel P. Free radicals, antioxidants, nuclear factor-E2-related factor-2 and liver damage. *Vitam Horm.* 2023 Jan 1;121:271–92.
107. Ren CX, Leng RX, Fan YG, Pan HF, Li BZ, Wu CH, et al. Intratumoral and peritumoral expression of CD68 and CD206 in hepatocellular carcinoma and their prognostic value. *Oncol Rep.* 2017 Aug 1;38(2):886–98.
108. Rico Montanari N, Anugwom CM, Boonstra A, Debes JD. The Role of Cytokines in the Different Stages of Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2021 Sep 29;13(19):4876.
109. Ringelhan M, Pfister D, O'Connor T, Pikarsky E, Heikenwalder M. The immunology of hepatocellular carcinoma. *Nat Immunol.* 2018;19(3):222–32.
110. Rohr-Udilova N, Klinglmüller F, Schulte-Hermann R, Stift J, Herac M, Salzmann M, et al. Deviations of the immune cell landscape between healthy liver and hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 2018 Apr 18;8(1):6220.
111. Roux C, Jafari SM, Shinde R, Duncan G, Cescon DW, Silvester J, et al. Reactive oxygen species modulate macrophage immunosuppressive phenotype through the up-regulation of PD-L1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(10):4326–35.
112. Sas Z, Cendrowicz E, Weinhäuser I, Rygiel TP. Tumor Microenvironment of Hepatocellular Carcinoma: Challenges and Opportunities for New Treatment Options. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 29;23(7):3778.
113. Sawa-Wejksza K, Dudek A, Lemieszek M, Kaławaj K, Kandefer-Szerszeń M. Colon cancer–derived conditioned medium induces differentiation of THP-1 monocytes into a mixed population of M1/M2 cells. *Tumor Biol.* 2018 Sep 1;40(9):101042831879788.
114. Scheurlen KM, Snook DL, Gardner SA, Eichenberger MR, Galandiuk S. Macrophage Differentiation and Polarization into an M2-Like Phenotype using a Human Monocyte-Like THP-1 Leukemia Cell Line. *J Vis Exp.* 2021 Aug 2;2021(174):e62652.
115. Schindler R, Ghezzi P, Dinarello CA. IL-1 induces IL-1. IV. IFN-gamma suppresses IL-1 but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1. *J Immunol.* 1990 Mar 15;144(6):2216–22.
116. Schulz D, Severin Y, Zanutelli VRT, Bodenmiller B. In-Depth Characterization of Monocyte-Derived Macrophages using a Mass Cytometry-Based Phagocytosis Assay. *Sci Rep.* 2019 Feb 13;9(1):1925.

117. Scott CL, Zheng F, De Baetselier P, Martens L, Saeys Y, De Prijck S, et al. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells. *Nat Commun.* 2016 Jan 27;7(1):10321.
118. Shiratori H, Feinweber C, Luckhardt S, Linke B, Resch E, Geisslinger G, et al. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Mol Immunol.* 2017 Aug 1;88:58–68.
119. Shiratori H, Feinweber C, Luckhardt S, Wallner N, Geisslinger G, Weigert A, et al. An in vitro test system for compounds that modulate human inflammatory macrophage polarization. *Eur J Pharmacol.* 2018 Aug 15;833:328–38.
120. Steinbach F, Thiele B. Phenotypic investigation of mononuclear phagocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1994;174(1–2):109–22.
121. Stepanenko AA, Dmitrenko V V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene.* 2015 Dec 15;574(2):193–203.
122. Stokes J V., Moraru GM, McIntosh C, Kummari E, Rausch K, Andrea SVS. Differentiated THP-1 cells exposed to pathogenic and nonpathogenic borrelia species demonstrate minimal differences in production of four inflammatory cytokines. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016 Nov 1;16(11):691–5.
123. Su Q, Li L, Li X, Li W, Zhang X, Dong Y, et al. CD97 serves as a novel biomarker of immune cell infiltration in hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2022 Dec 4;20(1):382.
124. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May 4;71(3):209–49.
125. Szabó C, Day BJ, Salzman AL. Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett.* 1996 Feb 26;381(1–2):82–6.
126. Tan HY, Wang N, Li S, Hong M, Wang X, Feng Y. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2016 Jan 6;2016(1):2795090.

127. Tanaka A, Sakaguchi S. Targeting Treg cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2019 Aug 1;49(8):1140–6.
128. Tedesco S, De Majo F, Kim J, Trenti A, Trevisi L, Fadini GP, et al. Convenience versus biological significance: Are PMA-differentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when studying in vitro polarization? *Front Pharmacol*. 2018 Feb 22;9:71.
129. Tella SH, Kommalapati A, Mahipal A, Jin Z. First-Line Targeted Therapy for Hepatocellular Carcinoma: Role of Atezolizumab/Bevacizumab Combination. *Biomedicines*. 2022 Jun 2;10(6):1304.
130. Teng KY, Han J, Zhang X, Hsu SH, He S, Wani NA, et al. Blocking the CCL2-CCR2 axis using CCL2-neutralizing antibody is an effective therapy for hepatocellular cancer in a mouse model. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(2):312–22.
131. Teng Y, Xu L, Li W, Liu P, Tian L, Liu M. Targeting reactive oxygen species and fat acid oxidation for the modulation of tumor-associated macrophages: a narrative review. *Front Immunol*. 2023 Jul 21;14:1224443.
132. Tumurkhuu G, Koide N, Dagvadorj J, Hassan F, Islam S, Naiki Y, et al. MnTBAP, a synthetic metalloporphyrin, inhibits production of tumor necrosis factor α in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages cells via inhibiting oxidative stress-mediating p38 and SAPK/JNK signaling. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007 Mar 1;49(2):304–11.
133. Vannella KM, Wynn TA. Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annu Rev Physiol*. 2017 Feb 10;79(1):593–617.
134. Voesch AS, Bitzer M, Blödt S, Follmann M, Freudenberger P, Langer T, et al. S3-Leitlinie: Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms und biliärer Karzinome. *Z Gastroenterol*. 2022;60:131–85.
135. Vucur M, Roderburg C, Bettermann K, Tacke F, Heikenwalder M, Trautwein C, et al. Mouse models of hepatocarcinogenesis: what can we learn for the prevention of human hepatocellular carcinoma? *Oncotarget*. 2010;1(5):373–8.
136. Wan S, Zhao E, Kryczek I, Vatan L, Sadovskaya A, Ludema G, et al. Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal via STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells. *Gastroenterology*. 2014;147(6):1393–404.
137. Wang H, Wang X, Li X, Fan Y, Li G, Guo C, et al. CD68+HLA-DR+ M1-like macrophages promote motility of HCC cells via NF- κ B/FAK pathway. *Cancer*

- Lett. 2014 Apr 1;345(1):91–9.
138. Wang K, Zhu X, Zhang K, Yin Y, Chen Y, Zhang T. Interleukin-6 contributes to chemoresistance in MDA-MB-231 cells via targeting HIF-1 α . *J Biochem Mol Toxicol*. 2018 Mar 1;32(3):e22039.
 139. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Front Immunol*. 2014 Nov 28;5:614.
 140. Wang TT, Yuan JH, Ma JZ, Yang WJ, Liu XN, Yin YP, et al. CTGF secreted by mesenchymal-like hepatocellular carcinoma cells plays a role in the polarization of macrophages in hepatocellular carcinoma progression. *Biomed Pharmacother*. 2017 Nov 1;95:111–9.
 141. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 2008 Oct 6;27(45):5904–12.
 142. Wu Y, Kuang DM, Pan WD, Wan YL, Lao XM, Wang D, et al. Monocyte/macrophage-elicited natural killer cell dysfunction in hepatocellular carcinoma is mediated by CD48/2B4 interactions. *Hepatology*. 2013 Mar 1;57(3):1107–16.
 143. Xiao L, Wang Q, Peng H. Tumor-associated macrophages: new insights on their metabolic regulation and their influence in cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2023 Jun 22;14:1157291.
 144. Xu G, Mo Y, Li J, Wei Q, Zhou F, Chen J. Two tripartite classification systems of CD86⁺ and CD206⁺ macrophages are significantly associated with tumor recurrence in stage II-III colorectal cancer. *Front Immunol*. 2023 Jun 5;14:1136875.
 145. Xu Y, He X, Deng J, Xiong L, Chen B, Chen J, et al. ROS-Related miRNAs Regulate Immune Response and Chemoradiotherapy Sensitivity in Hepatocellular Carcinoma by Comprehensive Analysis and Experiment. *Oxid Med Cell Longev*. 2022 Jan 9;2022(1):4713518.
 146. Xue J, Schmidt S V., Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity*. 2014 Feb 20;40(2):274–88.
 147. Yang C, He L, He P, Liu Y, Wang W, He Y, et al. Increased drug resistance in breast cancer by tumor-associated macrophages through IL-10/STAT3/bcl-2 signaling pathway. *Med Oncol*. 2015 Feb 9;32(2):352.
 148. Yao RR, Li JH, Zhang R, Chen RX, Wang YH. M2-polarized tumor-associated

- macrophages facilitated migration and epithelial-mesenchymal transition of HCC cells via the TLR4/STAT3 signaling pathway. *World J Surg Oncol*. 2018 Jan 16;16(1):9.
149. Yao W, Ba Q, Li X, Li H, Zhang S, Yuan Y, et al. A Natural CCR2 Antagonist Relieves Tumor-associated Macrophage-mediated Immunosuppression to Produce a Therapeutic Effect for Liver Cancer. *EBioMedicine*. 2017 Aug 1;22:58–67.
 150. Yau T, Galle PR, Decaens T, Sangro B, Qin S, da Fonseca LG, et al. Nivolumab plus ipilimumab versus lenvatinib or sorafenib as first-line treatment for unresectable hepatocellular carcinoma (CheckMate 9DW): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet*. 2025 May 24;405(10492):1851–64.
 151. Yeung OWH, Lo CM, Ling CC, Qi X, Geng W, Li CX, et al. Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2015 Mar 1;62(3):607–16.
 152. Yin Z, Huang J, Ma T, Li D, Wu Z, Hou B, et al. Macrophages activating chemokine (C-X-C motif) ligand 8/miR-17 cluster modulate hepatocellular carcinoma cell growth and metastasis. *Am J Transl Res*. 2017;9(5):2403–11.
 153. Yu LX, Ling Y, Wang HY. Role of nonresolving inflammation in hepatocellular carcinoma development and progression. *npj Precis Oncol*. 2018 Feb 23;2(1):6.
 154. Yuan X, Wang B, Yang L, Zhang Y. The role of ROS-induced autophagy in hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2018 Sep 1;42(4):306–12.
 155. Zhang C, Yang M, Ericsson AC. Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. *Front Immunol*. 2021 Mar 8;12:620510.
 156. Zhang F, Wang H, Wang X, Jiang G, Liu H, Zhang G, et al. TGF- β induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget*. 2016 Aug 1;7(32):52294.
 157. Zhang J, Liu X, Wan C, Liu Y, Wang Y, Meng C, et al. NLRP3 inflammasome mediates M1 macrophage polarization and IL-1 β production in inflammatory root resorption. *J Clin Periodontol*. 2020 Apr 1;47(4):451–60.
 158. Zhang J, Zhang Q, Lou Y, Fu Q, Chen Q, Wei T, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α /interleukin-1 β signaling enhances hepatoma epithelial–mesenchymal transition through macrophages in a hypoxic-inflammatory microenvironment.

- Hepatology. 2018 May 1;67(5):1872–89.
159. Zhang M, He Y, Sun X, Li Q, Wang W, Zhao A, et al. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *J Ovarian Res.* 2014 Feb 8;7(1):19.
 160. Zhang Q, He Y, Luo N, Patel SJ, Han Y, Gao R, et al. Landscape and Dynamics of Single Immune Cells in Hepatocellular Carcinoma. *Cell.* 2019 Oct 31;179(4):829-845.e20.
 161. Zhang W, Zhu XD, Sun HC, Xiong YQ, Zhuang PY, Xu HX, et al. Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects. *Clin Cancer Res.* 2010 Jul 1;16(13):3420–30.
 162. Zhang Y, Choksi S, Chen K, Pobeziinskaya Y, Linnoila I, Liu ZG. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. *Cell Res.* 2013;23(7):898–914.
 163. Zhang Y, Zhang Z, Chen L, Zhang X. Tumor cells-derived conditioned medium induced pro-tumoral phenotypes in macrophages through calcium-nuclear factor κ B interaction. *BMC Cancer.* 2022 Dec 19;22(1):1327.
 164. Zhang Z, Zhu Y, Xu D, Li TE, Li JH, Xiao ZT, et al. IFN- α facilitates the effect of sorafenib via shifting the M2-like polarization of TAM in hepatocellular carcinoma. *Am J Transl Res.* 2021;13(1):301–13.
 165. Zheng H, Peng X, Yang S, Li X, Huang M, Wei S, et al. Targeting tumor-associated macrophages in hepatocellular carcinoma: biology, strategy, and immunotherapy. *Cell Death Discov.* 2023 Feb 15;9(1):65.
 166. Zhou DY, Qin J, Huang J, Wang F, Xu GP, Lv YT, et al. Zoledronic acid inhibits infiltration of tumor-associated macrophages and angiogenesis following transcatheter arterial chemoembolization in rat hepatocellular carcinoma models. *Oncol Lett.* 2017 Oct 1;14(4):4078–84.
 167. Zhou SL, Zhou ZJ, Hu ZQ, Huang XW, Wang Z, Chen EB, et al. Tumor-Associated Neutrophils Recruit Macrophages and T-Regulatory Cells to Promote Progression of Hepatocellular Carcinoma and Resistance to Sorafenib. *Gastroenterology.* 2016 Jun 1;150(7):1646-1658.e17.
 168. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010 Oct 21;116(16):e74–80.

169. Zong Z, Zou J, Mao R, Ma C, Li N, Wang J, et al. M1 Macrophages Induce PD-L1 Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells Through IL-1 β Signaling. *Front Immunol.* 2019 Jul 16;10:1643.
170. Zou M, Xi L, Rao J, Jing Y, Liao F, Yang X. Optimization and evaluation of an inflammatory cell model in LPS-stimulated PMA-differentiated THP-1 cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2017 Nov 1;33(11):1456–61.
171. Zou Z, Chang H, Li H, Wang S. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. *Apoptosis.* 2017;22(11):1321–35.

9. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Juliane Liese für die Betreuung während meiner Dissertation, für ihre fachliche Expertise und die hilfreichen Rückmeldungen während der gesamten Arbeit.

Ich danke auch dem Team der Sektion Experimentelle Chirurgie am Institut für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Transplantationschirurgie für die Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Die kollegiale Zusammenarbeit hat das Arbeiten im Labor zu einer lehrreichen und bereichernden Erfahrung gemacht.

Darüber hinaus danke ich meinen Freundinnen und Freunden und allen Menschen, die ich in Gießen kennenlernen durfte, für die wunderbare gemeinsame Zeit. Meiner Familie danke ich für die stetige Unterstützung und Motivation, die mir in allen Phasen dieser Arbeit Halt gegeben haben.