



Vrije Universiteit Brussel

FACULTEIT WETENSCHAPPEN EN BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN

Vakgroep Toegepaste Biologische Wetenschappen

Onderzoeksgroep Cellulaire en Moleculaire Immunologie

Moleculaire en functionele heterogeniteit van tumor-geassocieerde macrofaag- subpopulaties in een muis- longkankermodel

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van Master in de
Bio-ingenieurswetenschappen Cel-en Gentechnologie door

Eva Van Overmeire

Academiejaar: 2009 – 2010

Promotor: Prof. Dr. P. De Baetselier

Co-Promotor: Dr. Ir. J. Van Ginderachter

Begeleider: Drs. Ir. D. Laoui



AUGUSTUS 2010



Vrije Universiteit Brussel

FACULTEIT WETENSCHAPPEN EN BIO-INGENIEURSWETENSCHAPPEN

Vakgroep Toegepaste Biologische Wetenschappen

Onderzoeksgroep Cellulaire en Moleculaire Immunologie

Moleculaire en functionele heterogeniteit van tumor-geassocieerde macrofaag- subpopulaties in een muis- longkankermodel

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van Master in de
Bio-ingenieurswetenschappen Cel-en Gentechnologie door

Eva Van Overmeire

Academiejaar: 2009 – 2010

Promotor: Prof. Dr. P. De Baetselier

Co-Promotor: Dr. Ir. J. Van Ginderachter

Begeleider: Drs. Ir. D. Laoui



AUGUSTUS 2010

De promotor, de co-promotor en de auteur geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.

Getekend te Brussel,

17 augustus 2010

Prof. Dr. P. De Baetselier

Dr. ir. J. Van Ginderachter

Eva Van Overmeire

Woord vooraf

Het is moeilijk te geloven dat vijf jaar Bio-Ingenieur er bijna op zitten en met het risico in clichés te spreken: het is voorbijgevlogen! Dat geldt ook voor dit jaar, hoewel er natuurlijk wel momenten waren dat de dagen (en nachten!) in het labo maar niet leken te eindigen. Het schrijven van deze thesis is de apotheose van een volledig jaar werken, maar dit alles zou echter nooit tot stand gekomen zijn zonder de hulp van een heleboel mensen.

Mijn promotor, Prof. Dr. Patrick De Baetselier, in de eerste plaats, die mij in tweede Bachelor liet kennismaken met de –voor mij tot dan toe onbekende- wereld van de immunologie. Mijn fascinatie voor dit domein werd opgewekt en is sindsdien niet afgenomen. Ik wens hem daarnaast ook te danken voor de kans om mijn thesis in het labo Cellulaire en Moleculaire Immunologie te doen. Mijn co-promotor, Dr. Ir. Jo Van Ginderachter, dank ik voor de kans om onderzoek te kunnen voeren naar kanker en zijn nooit aflatende suggesties en enthousiasme tijdens dit onderzoek. Uiteraard ook dank aan Drs. Ir. Damya Laoui, mijn begeleidster, bij wie ik altijd en overal terecht kon voor vragen en wiens positieve ingesteldheid ik immens bewonder. Haar kritische ingesteldheid en wetenschapsvoering zijn een inspiratie voor mij en ik kan mij geen betere begeleidster voorstellen. Daarnaast ook dank aan Ella Omasta, die als geen ander de muizen temt, maar ook aan Marie-Therèse en Maria en natuurlijk Martijn Baeten, wiens FACS expertise een zegen is geweest tijdens de ontelbare sorts. Verder, alle andere CMIM leden voor nuttige tips en raadgevingen, in het bijzonder Jan, Kia, Yannick, Elio, Benoit, Nick, Lea, Geert,... Dank aan Prof. Dr. Dominique Maes voor haar advies bij de statistische verwerking van mijn data.

Ook mijn mede CMIM-thesisstudenten ben ik dankbaar voor hun steun en afleiding die ze brachten, niet alleen in het labo, maar ook daarbuiten: dus dank aan Flo, Camille, Sarah, Gunther, Jozef,... De vele avonden op café (met uiteraard de introductie in het kicken) waren een heerlijke afleiding van alle stress... Maar ook dank aan alle andere vrienden voor de vele pret tijdens het jaar, zowel overdag tussen wachttijden van proeven door, als op de etentjes, TDs,... Dank aan Ellen, Freya, Sanne, Eline en alle anderen! Jullie waren dit jaar een gigantische steun, maar ook de voorbije jaren kon ik op jullie rekenen. Tot slot wil ik mijn familie en in het bijzonder mijn ouders en broers (Ben! Sam! Roel!) bedanken, die tijdens de weekends mijn stilzwijgendheid en soms norsheid, meestal zonder al te veel kritiek, verduurden.

Inhoudsopgave

Afkortingen.....
1. Inleiding.....	1
2. Literatuurstudie.....	3
2.1. Het immuunsysteem	3
2.1.1. Inleiding	3
2.1.2. De componenten van het immuunsysteem	3
2.1.3. Oorsprong van de cellen	3
2.1.4. Natuurlijke immuniteit	4
2.1.4.1. Inleiding.....	4
2.1.4.2. De dendritische cel	5
2.1.5. Adaptieve immuniteit.....	6
2.1.5.1. Inleiding.....	6
2.1.5.2. T cellen	6
2.1.5.3. B cellen	9
2.2. Kanker.....	9
2.2.1. Inleiding	9
2.2.2. Tumor <i>immunosurveillance</i>	11
2.3. Tumor-geassocieerde macrofagen.....	11
2.3.1. Inleiding	11
2.3.2. Monocyten	12
2.3.3. Infiltratie van de tumor.....	13
2.3.4. De macrofaag en zijn mogelijke activeringstoestanden.....	13
2.3.5. Activeringstoestand van TAMs.....	17
2.3.6. Moleculaire signalisatiewegen	18
2.3.6.1. Inleiding.....	18
2.3.6.2. NF- κ B	18
2.3.6.3. Hypoxie en de HIFs.....	20
2.3.6.4. Verband tussen HIF en NF- κ B.....	21

2.3.6.5. STATs	22
2.3.7. Rol van TAMs.....	25
2.3.7.1. Pro-tumorale rol	25
2.3.7.2. Potentiële anti-tumorale rol.....	28
2.3.8. Heterogeniteit	28
2.3.8.1. Inleiding.....	28
2.3.8.2. Heterogeniteit van TAMs in het TS/A model.....	28
3. Doelstelling.....	30
4. Materiaal en methoden.....	31
4.1. Media en buffers.....	31
4.2. Proefdieren	32
4.3. Cellijnen en cultuurcondities.....	32
4.4. <i>In vitro</i> celculturen	32
4.4.1. Tumor digestie	33
4.4.2. Oogsten van miltcellen.....	33
4.4.3. Isoleren van cDCs	33
4.4.4. Isoleren van peritoneale cellen.....	33
4.5. Zuiveren van cellen via magnetische celsortering (MACS)	34
4.5.1. Opzuiveren van CD11b ⁺ myeloïde cellen	34
4.5.2. Opzuiveren van CD4 ⁺ en CD8 ⁺ T cellen	34
4.5.3. Opzuiveren van cDCs.....	34
4.6. Antilichamen.....	35
4.7. <i>Flow</i> cytometrische analyse en sortering van cellen met de <i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i> (FACS)	36
4.7.1. Werkingsprincipe	36
4.7.2. <i>Flow</i> cytometrische analyses.....	37
4.7.2.1. Extracellulaire <i>flow</i> cytometrie.....	37
4.7.2.2. Intracellulaire <i>flow</i> cytometrie	38
4.7.2.3. Fosfospecifieke <i>flow</i> cytometrie of Phosflow	39
4.7.2.4. Detectie van hypoxie.....	39
4.7.3. Sorteren van cellen	40
4.7.3.1. Sorteren van de MHCII ^{laag} en MHCII ^{hoog} subpopulaties.....	40

4.7.3.2.	Sorteren van cDCs	40
4.7.3.3.	Sorteren van peritoneale macrofagen	40
4.8.	Kwantitatieve Reverse Transcriptase Polymerasekettingreactie (RT-PCR).....	40
4.8.1.	Bereiding van totaal RNA	40
4.8.2.	Reverse transcriptie	41
4.8.3.	Real-time PCR	42
4.8.3.1.	Principe	42
4.8.3.2.	Experimentele uitvoering	42
4.9.	Arginase activiteit en NO meting	45
4.10.	Analyse van de suppressie van de gemengde leukocyt reactie (MLR)	46
4.11.	Analyse van de suppressie van polyclonale T-cel proliferatie	47
4.12.	Cocultuur van 3LL-R met de TAM subpopulaties	47
4.13.	Western Blotting.....	48
4.13.1.	Lysaten	48
4.13.2.	Nucleaire extractie	48
4.13.3.	Bepaling van de proteïneconcentratie.....	49
4.13.4.	Detectie van de proteïnen	49
4.14.	Statistische analyse	49
5.	Resultaten.....	50
5.1.	3LL-R tumoren worden sterk geïnfiltreerd door een heterogene myeloïde celpopulatie ..	50
5.2.	Gen- en proteïne-expressie van de MHCII ^{laag} en MHCII ^{hoog} TAMs	52
5.2.1.	De MHCII ^{laag} en MHCII ^{hoog} TAMs vertonen een differentieel genexpressie profiel	52
5.2.2.	De proteïne-expressie bevestigt de heterogeniteit van de TAM subpopulaties	57
5.2.2.1.	De meeste M2 oppervlaktemerkmers komen tot hogere uitdrukking op de MHCII ^{laag} TAMs	57
5.2.2.2.	Arginase en iNOS vertonen een verschillend expressiepatroon in de TAM subpopulaties	58
5.2.2.3.	De productie van tumor necrosis factor α verschilt niet tussen de TAM subpopulaties	61
5.3.	De functionaliteit van de TAM subpopulaties	62
5.3.1.	De TAMs vertonen een laag antigeenpresenterend potentieel in combinatie met een T-cel suppressieve capaciteit	62

5.3.2.	Tijdens de polyclonale T-cel activatie oefenen de TAM subpopulaties een iNOS-gemedieerd suppressief effect uit.....	64
5.3.3.	De TAM subpopulaties hebben een verschillend effect op de proliferatie van 3LL-R cellen	66
5.4.	Effect van de micro-omgeving op het TAM fenotype	67
5.4.1.	Hypoxie speelt een rol in de heterogeniteit van de TAM subpopulaties	67
5.4.1.1.	De TAM subpopulaties lokaliseren zich verschillend ten opzichte van hypoxische regio's	68
5.4.1.2.	De <i>hypoxia inducible factor 2α</i> kan gedetecteerd worden in de TAM subpopulaties	69
5.4.2.	De MHCII ^{laag} TAMs vertonen een hogere NF-κB activatie.....	70
5.4.3.	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> (STAT) activatie in de TAM subpopulaties.....	70
5.4.3.1.	STAT1 fosforylatie verschilt niet na IFN-γ stimulatie	71
5.4.3.2.	STAT6 wordt niet differentieel geactiveerd in de TAM subpopulaties na IL-4 stimulatie	72
5.4.3.3.	De MHCII ^{hoog} TAMs vertonen een hogere STAT3 fosforylatie na stimulatie met IL-10	73
6.	Discussie.....	75
7.	Besluit.....	80
	Samenvatting.....	
	Summary	
	Literatuur.....	

Afkortingen

AF	Alexa Fluor	HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>	HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
Angpt	Angiopoietine	HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
APC	(i). AntigenPresenterende Cel (ii). AlloPhycoCyanine	HP-1	HypoxyProbe-1
Arg	Arginase	HPRI	<i>Human Placental Ribonuclease Inhibitor</i>
BCA	<i>BiCinchoninic Acid</i>	HRE	<i>Hypoxia Response Elements</i>
BI	BetrouwbaarheidsInterval	HRP	<i>HorseRadish Peroxidase</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>	IDO	Indoleamine 2,3- DiOxygenase
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>	IFN	InterFeroN
CBP	<i>CREB-Binding Protein</i>	Ig	ImmunoGlobuline
CCL	CC-chemokine Ligand	IHC	ImmunoHistoChemie
CCR	CC-chemokine Receptor	IκB	Inhibitorisch κB
cDC	conventionele Dendritische Cel	IKK	IκB Kinase
Cdh1	Cadherine-1 / E-cadherine	iNOS	induceerbaar NO Synthase
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>	IL	InterLeukine
CE	Cytoplasmatisch Extract	i.p.	intraperitoneaal
CM	Compleet Medium	ISPF	Isonitrosopropiophenone
COX	Cyclo-Oxygenase	iTreg	<i>induced regulatory T-cell / geïnduceerde regulatorische T-cel</i>
C _t	Threshold Cycle	JAK	JAnus Kinase
CTL	Cytotoxische T Lymfocyt	KT	KamerTemperatuur
CTLA	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen</i>	LLC	Lewis Long Carcinoma
CPM	<i>Counts Per Minute</i>	L-Arg	L-Arginine
CSF	<i>Colony-Stimulating Factor</i>	L-NMMA	N ^G -MonoMethyl-L-Arginine
CX ₃ CR	CX ₃ C-chemokine Receptor	LPS	LipoPolySacharide
CXCL	CXC-chemokine Ligand	MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting / Magnetische celsortering</i>
DC	Dendritische Cel	MCP	<i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
DTT	DiThioTreitol	MFI	<i>Median Fluorescence Intensity</i>
ECL	<i>Enhanced ChemiLuminescence</i>	Mgl	Macrofaag Galactose-type C-type Lectine
ECM	ExtraCellulaire Matrix	MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
EDTA	EthyleenDiamineTetraÄcetaat	MIF	<i>Migration Inhibitory Factor</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>	MLR	<i>Mixed Leukocyte Reaction/gemende leukocyt reactie</i>
EGTA	EthyleenGlycolTetraÄcetaat	MMP	Matrix MetalloProteïnase
ER	Endoplasmatisch Reticulum	MMR	Macrofaag Mannose Receptor
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>	NΔMFI	<i>Normalized Delta MFI</i>
FC	Flow Cytometrie	NE	Nucleair Extract
FcyR	<i>Crystallisable Fragment γ Receptor</i>	NF-κB	<i>Nuclear Factor κB</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum / Foetaal Kalfserum</i>	NK	<i>Natural Killer</i>
FIH	<i>Factor Inhibiting HIF</i>	Nor-NOHA	<i>N^ω-Hydroxy-nor-L-arginine</i>
FITC	Fluoresceïne IsoThioCynaat	NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
FIZZ	<i>Found in Inflammatory Zone</i>		
FOLR	<i>FOLate Receptor</i>		
FSC	<i>Forward SCatter</i>		
GAS	<i>Growth Arrest-Specific</i>		

nTreg	<i>natural regulatory T-cell / natuurlijke regulatorische T- cel</i>	Th	T helper
		TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
OD	Optische Densiteit	TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
PAF-AH	<i>Platelet-Activating Factor AcetylHydrolase</i>	TP	Thymidine Fosforylase
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern / pathogeen-geassocieerd moleculair patroon</i>	tPA	<i>Tissue Type Plasminogen Activator</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	tpm	Toeren per minuut
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction / Polymerasekettingreactie</i>	TREM	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells</i>
PD-L	<i>Programmed Death Ligand</i>	uPA	<i>urokinase Plasminogen Activator</i>
PE	<i>PhycoErythrin</i>	VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
PEM	PERitoneale Macrofagen	VHL	Von Hippel Lindau E3 ubiquitine ligase
PerCP-Cy	<i>Peridinin-Chlorophyll Protein- Cyanine</i>	WB	Western Blot
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>	WCL	<i>Whole Cell Lysaat</i>
PHD	<i>Prolyl Hydroxylase Domain- containing enzymes</i>		
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptor/ patroon-herkende receptoren</i>		
RANTES	<i>Regulated on Activation Normal T cells Expressed and Secreted</i>		
RNI	<i>Reactive Nitrogen Intermediate / reactieve stikstofintermediair</i>		
ROI	<i>Reactive Oxygen Intermediate / reactieve zuurstofintermediair</i>		
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>		
RT	<i>Reverse Transcriptie</i>		
s.c.	subcutaan		
SD	StandaardDeviatie		
Sema4D	Semaphorin 4D		
SeP	SelenoProteine P		
SH	STAT Src-Homologie		
SPC	SPlenoCyten / miltcellen		
SR	<i>Scavenger Receptor</i>		
SSC	<i>Side SCatter</i>		
Stab-1	Stabiline-1		
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>		
TADC	<i>Tumor-Associated DC / Tumor-geassocieerde DC</i>		
TAM	<i>Tumor-Associated Macrophage / tumor- geassocieerde macrofaag</i>		
TCR	T-Cel Receptor		
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>		

1. Inleiding

In 2008 waren er 12,4 miljoen nieuwe gevallen van kanker en 7,6 miljoen kankergerelateerde doden wereldwijd. Van alle kankers is longkanker, in termen van voorkomen en mortaliteit, bij de ergste met zo een 1,3 miljoen doden (Boyle & Levin, 2008). Het genezen van deze ziekte is moeilijk en er is een nood aan alternatieve doeltreffende methoden naast de conventionele chemo- en radiotherapie.

Het onderzoek naar kanker concentreerde zich in het verleden voornamelijk op de getransformeerde, malignante kankercellen (Hanahan, 2000). Een tumor is echter geen homogene massa, maar omvat naast de kankercellen ook onder meer immuuncellen. Onder deze laatsten bevinden zich macrofagen, meerbepaald de tumor-geassocieerde macrofagen of TAMs. In klinische studies werd een correlatie vastgesteld tussen de dichtheid van TAMs en een slechte prognose (Bingle *et al.*, 2002). De TAMs zorgen dan ook voor de progressie van de tumor via een resem aan mechanismen waaronder angiogenese, immunosuppressie, bevordering van kankercel proliferatie, migratie en invasie en metastase ondermeer door afbraak van de extracellulaire matrix (Pollard, 2004).

Vroeger werden TAMs beschouwd als een vrij uniforme populatie (Mantovani *et al.*, 2002). Macrofagen zijn echter erg plastische cellen, die afhankelijk van hun omgeving een verschillend fenotype kunnen aannemen (Mosser & Edwards, 2008) en het is reeds gebleken dat de TAMs deze plasticiteit ook vertonen binnen een tumor. In het TS/A borstkankermodel in BALB/c werden namelijk de zogenaamde 'TAM subpopulaties' ontdekt en gekarakteriseerd. Het blijkt dat deze cellen een grote heterogeniteit vertonen en verschillende functies in de tumor bewerkstelligen (Movahedi *et al.*, 2010). Het is nu echter nodig om deze observatie te extrapoleren naar andere kankermodellen en vervolgens na te gaan wat de drijvende factor is van de TAM heterogeniteit. Hiervoor werden een aantal signalisatiewegen uitgekozen waarvoor reeds een rol in het TAM fenotype werd gesuggereerd. Het onderzoek naar de actieve signalisatiewegen in de subpopulaties is interessant in het opzicht dat op deze manier het "andere deel van de tumor" kan getroffen worden (Mantovani *et al.*, 2008). Dit kan een potentiële aanvulling vormen op de meer conventionele empirische behandelingswijzen van kanker zoals chemo- en radiotherapie (Balkwill *et al.*, 2005) en kan een aantal voordelen bieden. Eén daarvan is dat deze immuuncellen wel over een stabiel genoom beschikken, en dus veel minder frequent resistenties ontwikkelen (Condeelis & Pollard, 2006; Sawyers, 2004). Daarenboven kunnen belangrijke groeifactoren ontnomen worden aan de kankercellen en valt zo de ondersteuning van de micro-omgeving weg (Sica & Bronte, 2007).

In dit onderzoek wordt nu gebruik gemaakt van het 3LL-R longkankermodel, een variant van het Lewis Longkanker Carcinoom, afkomstig van een spontaan ontstaan longcarcinoom in de C57BL/6 muis. De C57BL/6 stam biedt als voordeel ten opzichte van BALB/c dat hierin meer *knockouts* beschikbaar zijn. De TAM subpopulaties zullen in dit model volledig gekarakteriseerd worden op het moleculair niveau, zowel wat betreft gen- als proteïne-expressie. Vervolgens zullen een aantal functionele aspecten onderzocht worden. Tot slot zullen bepaalde signalisatiewegen in de subpopulaties nader bekeken worden om zo de drijvende factor van de heterogeniteit van de TAMs in de tumor te ontleden.

2. Literatuurstudie

2.1. Het immuunsysteem

2.1.1. Inleiding

Immunologie is de studie van de verdedigingsmechanismen van het lichaam tegen infectie (Abbas & Janeway, 2000). Deze verdediging wordt gehandhaafd door het immuunsysteem en is noodzakelijk gezien elk organisme blootgesteld wordt aan de buitenwereld. Die bevat immers een immense variëteit aan pathogene micro-organismen, virussen en schadelijke substanties zoals toxines. Het immuunsysteem moet over vier verschillende functies beschikken. Allereerst: immunologische herkenning, wat betekent dat potentieel gevaarlijke moleculen of organismen geïdentificeerd kunnen worden (herkenning van 'zelf' en 'niet-zelf'). Vervolgens moet het immuunsysteem in staat zijn om deze uit te schakelen. Hiernaast moet er ook een zekere immune regulatie zijn, zodat bij eliminatie geen schade aan het lichaam zelf berokkend wordt. Tot slot is er nood aan een immunologisch geheugen, zodat bij herhaalde blootstelling aan een antigen er een snellere en sterkere respons is. Dit laatste wordt vervuld door het adaptieve immuunsysteem (Murphy *et al.*, 2008).

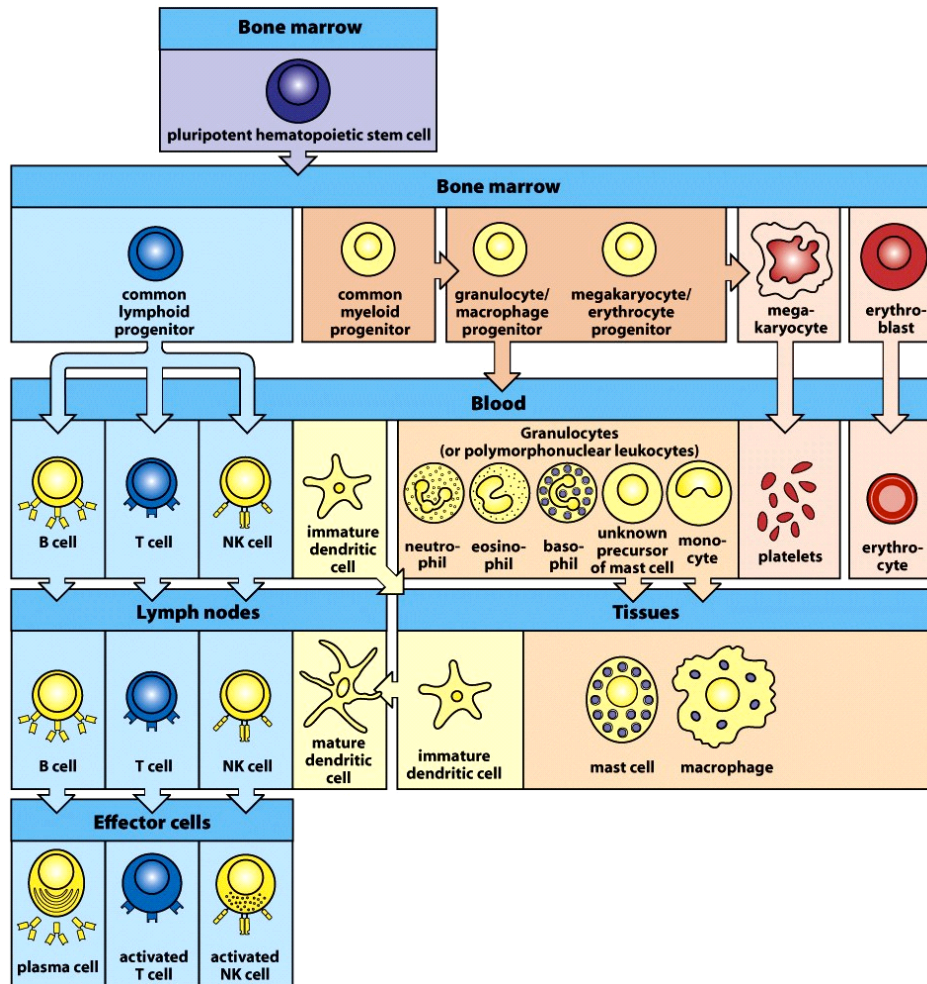
2.1.2. De componenten van het immuunsysteem

Bij vertebraten bestaat het immuunsysteem uit twee verschillende componenten: de natuurlijke en de adaptieve immuniteit. De natuurlijke immuniteit is genetisch geprogrammeerd om invariante kenmerken van micro-organismen te herkennen. De adaptieve immuniteit daarentegen gebruikt antigenreceptoren die niet gecodeerd zijn, maar *de novo* gegenereerd worden en in theorie in staat zijn om elk antigen te herkennen (Iwasaki & Medzhitov, 2010). Terwijl de natuurlijke immuniteit een vrij snelle respons genereert, is het adaptieve immuunsysteem eerder traag, maar flexibeler. Er is een sterke interactie tussen de twee delen van het immuunsysteem, waarbij elementen van beide, zowel cellulaire als niet-cellulaire, invloed uitoefenen op elkaar (Clark & Kupper, 2005).

2.1.3. Oorsprong van de cellen

De cellen van het immuunsysteem (Figuur 2.1) worden gevormd door de witte bloedcellen of leukocyten. Deze zijn, samen met de rode bloedcellen en de bloedplaatjes,

afkomstig van de pluripotente hematopoïetische stamcellen die zich in het beenmerg bevinden. Deze stamcellen geven aanleiding tot de voorlopers van de rode bloedcellen en de twee categorieën van leukocyten: de myeloïde en lymfoïde cellen. Veel van de leukocyten ontwikkelen zich in het beenmerg en ondergaan er hun proces van maturatie (Murphy *et al.*, 2008).



Figuur 2.1. De cellen van het immuunsysteem. De pluripotente hematopoïetische stamcel differentieert en geeft aanleiding tot de cellen van het natuurlijk en adaptief immuunsysteem (uit Murphy *et al.*, 2009).

2.1.4. Natuurlijke immuniteit

2.1.4.1. Inleiding

De natuurlijke of aangeboren immuniteit vormt de eerste barrière tegen infectie. Het treedt onmiddellijk in werking en zorgt voor een vlugge vernietiging van een micro-organisme, echter zonder een immunologisch geheugen te genereren. Dit deel van het immuunsysteem wordt bemiddeld door cellen zoals monocyt, dendritische cellen

(DCs), macrofagen en niet-cellulaire moleculen, zoals het complement systeem en antimicrobiële peptiden (Abbas & Janeway, 2000).

De huid en de muceuze membranen vormen de eerste bescherming tegen pathogenen. Om de integriteit van de muceuze membranen te bewaren, worden bacteriën actief verwijderd door mechanismen zoals het slaan van cilia in de longen en neus. Daarnaast zijn er antilichamen die zorgen voor opsonisatie (waarbij de bacterie bedekt wordt door Igs) en is een grote variëteit aan antimicrobiële peptiden aanwezig. Dit zijn korte, positief geladen peptiden zoals bijvoorbeeld defensines, die resistent zijn tegen enzymatische degradatie (Hornef *et al.*, 2002). Ze kunnen pathogenen rechtstreeks doden door cellyse, maar induceren daarnaast ook de chemotaxie van monocyten, DCs en T cellen (Clark & Kupper, 2005).

Voor immune herkenning gebruikt het immuunsysteem van een vertebraat drie verschillende strategieën: herkenning van 'microbieel niet-zelf', 'ontbrekend zelf' en 'geïnduceerd of gewijzigd zelf' (Medzhitov & Janeway, 2002). De herkenning van een micro-organisme ('microbieel niet-zelf') is gebaseerd op de aanwezigheid van *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Dit zijn relatief invariante patronen, die zowel op pathogene als commensale microben aanwezig zijn en kenmerkend zijn voor een bepaalde klasse van micro-organismen. Hieronder vallen de lipopolysachariden (LPS) van gram-negatieve bacteriën en het peptidoglycaan van de gram-positieve bacteriën. Herkenning van de patronen gebeurt door de *pattern-recognition receptors* (PRRs) die onderverdeeld worden in de gesecreteerde, transmembranaire en de cytosolische klassen. De bekendste transmembranaire PRRs zijn de *Toll-like receptors* (TLRs), die zowel op het plasmamembraan als op het endosomaal of lysosomaal membraan aanwezig kunnen zijn (Iwasaki & Medzhitov, 2010). Het concept 'ontbrekend zelf' is gebaseerd op de aanwezigheid van bepaalde constitutief uitgedrukte, gespecialiseerde merkers van 'zelf' op normale gezonde cellen van de gastheer. Hierdoor wordt onder andere de fagocytose van de gezonde cel en doding door *natural killer* (NK) cellen vermeden. Een voorbeeld van zo een merker is de *major histocompatibility complex I* (MHCI) molecule, die ten gevolge van een virale infectie of transformatie van de cel tot lagere uitdrukking kan gebracht worden. Een viraal geïnfekteerde of getransformeerde cel ('geïnduceerd of gewijzigd zelf') drukt dus vaak andere proteïnen uit, zoals ook het RAE-1, dat een signaal is voor apoptose. Hierdoor wordt verspreiding van een virus en ontwikkeling van kanker tegengegaan (Medzhitov & Janeway, 2002).

2.1.4.2. De dendritische cel

De professionele antigenpresenterende cellen (APCs) van het lichaam zijn de DCs. Deze zijn aanwezig onder de huid en in de mucosale epithelia, dus op die plaatsen waar er

frequent contact is met de externe omgeving. Daar zoeken ze voortdurend naar invaderende micro-organismen. In de muis is het *cluster of differentiation* (CD) 11c integre de voornaamste merker van de meeste DCs. De DCs in de periferie zijn immatuur en gespecialiseerd als fagocytische cellen, uitermate geschikt voor het opvangen van microbiële antigenen. Echter, ze zijn nog niet in staat om dit antigen te verwerken en te presenteren. Ook beschikken ze voorlopig nog niet over de nodige costimulatorische signalen, die vereist zijn voor T-cel activatie. Hun maturatie wordt geïnduceerd door de blootstelling aan gevaarsignalen zoals PAMPs en cytokines. Dit zorgt voor de expressie van chemokine receptoren en adhesiemoleculen en leidt tot de migratie van de DC. Volgeladen met antigen en aangetrokken door chemokines komen ze dan als mature DCs aan in de lymfeknopen. Nu drukken ze, naast costimulatorische moleculen zoals CD80 en CD86, hoge niveaus van MHCII moleculen uit, waarmee ze de peptiden presenteren aan de daar aanwezige lymfocyten (Abbas & Janeway, 2000; Clark & Kupper, 2005; Tan & O'Neill, 2005). De mature DC kan dan zorgen voor de activatie van de T cellen in de lymfeknoop (zie §2.1.5.2.).

2.1.5. Adaptieve immuniteit

2.1.5.1. Inleiding

Wanneer een micro-organisme voorbij de eerste linies van defensie, namelijk die van het natuurlijk immuunsysteem, raakt, treedt het adaptief immuunsysteem in werking. Dit deel van het immuunsysteem levert een zeer specifieke respons, te danken aan de enorme receptordiversiteit. De antigenreceptoren worden gecodeerd door genen die het resultaat zijn van onder andere somatische recombinatie tijdens de maturatie van de cellen. Daarnaast is er ook een immunologisch geheugen, namelijk de mogelijkheid van het immuunsysteem om sneller en krachtiger op te treden bij opeenvolgende blootstellingen aan eenzelfde antigen. De actieve componenten zijn voornamelijk de T en B cellen (Abbas & Janeway, 2000). De adaptieve immuniteit werkt echter niet onafhankelijk van de natuurlijke immuniteit en de immunerespons wordt deels gedirigeerd door deze laatste (Clark & Kupper, 2005).

2.1.5.2. T cellen

De voornaamste oppervlaktemoleculen van een T cel bestaan uit het T-cel receptor (TCR):CD3 complex dat peptiden, gepresenteerd op MHC moleculen, kan herkennen (de zogenaamde duale specificiteit) en de coreceptor CD4 of CD8. Op basis van deze laatste, wordt het onderscheid gemaakt tussen enerzijds de CD8⁺ cytotoxische lymfocyt (CTL) en

de CD4⁺ helper T cel (Reiner, 2007). De coreceptor en dus de functie van de T cel bepaalt ook het type MHC molecule dat herkend wordt.

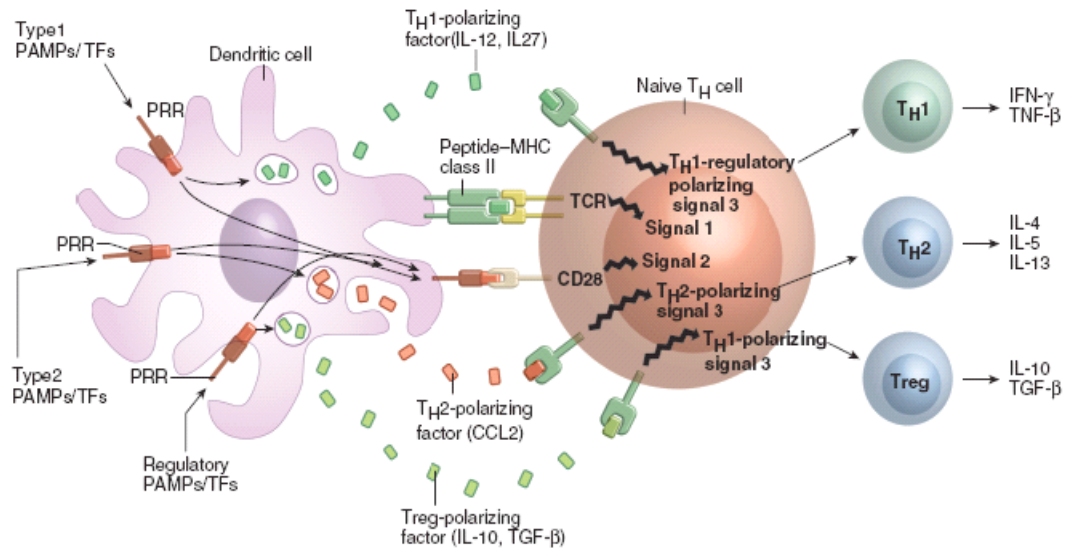
Er is een differentiële expressie van MHC moleculen: de MCHI molecule komt voor op zowat alle genucleëerde lichaamcellen, terwijl MHCII voornamelijk op APCs aanwezig is. De twee klassen, MCHI en MHCII, presenteren peptides die afkomstig zijn van verschillende cellulaire compartimenten. Proteïnen in het cytosol worden door het proteasoom afgebroken tot peptidische fragmenten en verplaatst naar het endoplasmatisch reticulum (ER), waar ze associëren met MCHI moleculen en gepresenteerd worden aan CD8⁺ T cellen (Abbas & Janeway, 2000). Dit is van belang gezien elke cel geïnfecteerd kan worden door een virus of een transformatie kan ondergaan en dus een potentieel gevaar inhoudt voor het voortbestaan van het organisme. De MHCII moleculen kunnen in het ER geen binding aangaan met peptiden omdat ze geblokkeerd zijn met de invariante keten, maar associëren wel met peptiden gegenereerd in het endosomaal-lysosomaal systeem (Cresswell, 1996). Herkenning gebeurt in dit geval door CD4⁺ T cellen.

Activatie van de T cel

Om te zorgen dat een immuunrespons alleen plaatsvindt wanneer er nood aan is, zijn minstens twee signalen nodig voor de T cel om te prolifereren en differentiëren (Figuur 2.2). Het eerste signaal is de specifieke antigenherkenning, dus MHC/peptide-TCR interactie. Dit op zich is echter onvoldoende en zorgt voor clonale anergie, wat van belang is om activatie in de context van zelfantigenen te voorkomen (Abbas & Janeway, 2000; Chambers & Allison, 1999). Het tweede signaal zorgt voor de co-signalisatie die nodig is om te kunnen reageren op antigen. Hiervoor moeten de costimulatorische moleculen op het oppervlak van de DC herkend worden door de constitutief uitgedrukte CD28 receptor van de T cel. De bekendste zijn de liganden B7.1 (CD80) en B7.2 (CD86), die enkel uitgedrukt worden op professionele APCs na activatie door microbiële producten. Deze activatie kan *in vitro* nagebootst worden door het gebruik van anti-CD3 en anti-CD28 antilichamen. Om te zorgen dat de T-cel activatie niet eindeloos doorgaat, worden ook negatieve costimulatorische moleculen geïnduceerd op het oppervlak van de T cel. De bekendste is de CD28 homolog *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4), die de T cel respons inhibeert, doordat deze een hogere affiniteit vertoont voor de B7 moleculen (Abbas & Janeway, 2000; Andersen *et al.*, 2006; Chambers & Allison, 1999).

Na activatie drukken de T cellen CD40L uit. Dit zet de APCs aan tot verhoogde uitdrukking van B7 moleculen en secretie van cytokines die de differentiatie van de T cellen induceert (Abbas & Janeway, 2000). De cytokines gelden als een derde signaal,

wat de functionele polarisatie van de T cel zal bepalen (T helper [Th] type). Tot slot ontvangen ze nog slecht gekarakteriseerde signalen van de omgeving en de DCs, wat een soort spatiale polarisatie zou teweegbrengen (Clark & Kupper, 2005).



Figuur 2.2. Vereiste signalen voor de activatie en polarisatie van de T cel. De interactie tussen de APC, in dit geval een DC en de T cel kan leiden tot de activatie van de T cel. Hiervoor zijn minimum twee signalen vereist, namelijk een antigenspecifiek en een costimulatorisch signaal (naar Clark & Kupper, 2005).

Helper T cellen

Sommige $CD4^+$ cellen zijn al gedifferentieerd wanneer ze de thymus verlaten, zoals de natuurlijke regulatorische cellen (nTreg) en de *natural killer* T cel. Andere zijn nog naïeve $CD4^+$ helper T cellen, die onder invloed van hun micro-omgeving differentiëren. Ze worden meestal ingedeeld in vier types: de Th1, Th2, Th17 en de geïnduceerde (i)Tregs. Afhankelijk van het te bestrijden pathogeen is er immers nood aan een verschillend cytokine en chemokine profiel om de immunrespons te organiseren (Reiner, 2007; Zhu & Paul, 2008).

Th1 cellen worden gekenmerkt door de productie van interferon- γ (IFN- γ) en interleukine-(IL) 2 en spelen een rol in de strijd tegen intracellulaire pathogenen. Th2 cellen zijn vooral betrokken in het bestrijden van extracellulaire parasieten en maken IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 en IL-25 aan. De Th17 cellen produceren IL-17a, IL-17f, IL-21 en IL-22 en zijn betrokken bij het verwijderen van extracellulaire bacteriën en fungi, voornamelijk bij mucosale oppervlakken, waarvoor IL-17a en IL-17f neutrofielen rekruteren en activeren. Het is belangrijk dat de activiteit van bovenvermelde cellen gereguleerd wordt, om collaterale weefselschade bij de controle van een infectie te voorkomen; dit is de perifere tolerantie. Deze wordt onder meer geregeld door de Tregs,

waarvan er twee categorieën bestaan: de nTreg, de natuurlijk voorkomende CD4⁺CD25⁺ cellen die in de thymus ontstaan en de iTreg, die in de periferie worden geïnduceerd. Verschillende mechanismen bestaan voor hun suppressieve activiteit waaronder cel-cel contact en de productie van suppressieve cytokines zoals *transforming growth factor β* (TGFβ) en IL-10 (Zhu & Paul, 2008; Zhou *et al.*, 2009).

Cytotoxische T lymfocyten

CTLs hebben voornamelijk een effector functie. Hierbij inspecteren ze alle cellen van het lichaam, klaar om deze die mogelijk een bedreiging voor het multicellulaire organisme vormen, te vernietigen. Dit houdt de destructie in van viraal geïnfecteerde cellen en malignante cellen, waarbij de CD8⁺ T cel het gewijzigde peptide repertoire op de MHC I moleculen detecteert. De CTL heeft verschillende mechanismen om de doelwitcel uit te schakelen, wat ofwel via de cytokines IFN-γ en tumor necrosis factor α (TNF-α) gebeurt, of via direct celcontact. Dit laatste is dan, ofwel via de interactie tussen het Fas ligand van de CTL en de Fas receptor op de doelwitcel, ofwel via de secretie van perforine en granzymes in de intercellulaire ruimte (Andersen *et al.*, 2006).

2.1.5.3. B cellen

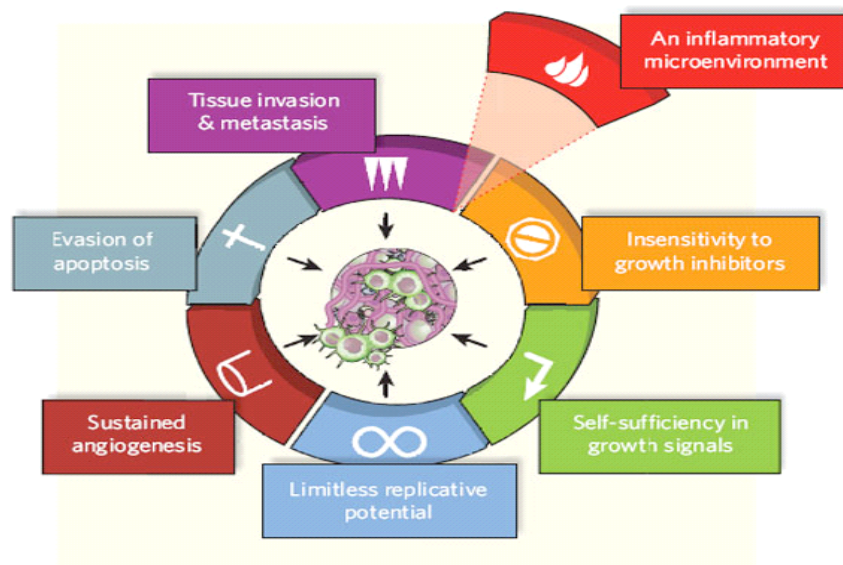
Net als de T cellen vinden de B cellen hun oorsprong in het beenmerg. De naïeve B cel moet door een helper T cel, specifiek voor hetzelfde antigeen (maar niet perse dezelfde epitoot) gestimuleerd worden om te prolifereren en differentiëren. Eerst produceren de B cellen het pentamerische immunoglobuline (Ig) M. Echter, onder invloed van cytokines, vindt de *isotype switch* plaats die leidt tot de productie van IgG subtypes, IgE of IgA. De antilichamen kunnen een pathogeen of toxine direct neutraliseren door op het oppervlak te binden, maar kunnen ook leiden tot de vernietiging ervan via de interactie met het natuurlijke immuunsysteem. Dit kan door initiatie van de complement cascade, maar ook door opsonisatie, waarbij interactie van de Igs met de Fc-receptor voor verhoogde fagocytose zorgt (Abbas & Janeway, 2000; Clark & Kupper, 2005).

2.2. Kanker

2.2.1. Inleiding

Kanker is een complexe ziekte die zeer variabel is van patiënt tot patiënt in zijn voorkomen, ontwikkeling en uitkomst. Dezelfde heterogeniteit en variabiliteit is ook aanwezig op het cellulair en moleculair niveau (Boyle & Levin, 2008).

De ontwikkeling van kanker is een meerstapsproces en elk van deze stappen reflecteert een genetische verandering die de transformatie van normale cellen in malignante afgeleiden drijft. Elke verandering geeft een of ander groeivoordeel aan de cel via een proces analoog aan Darwiniaanse evolutie. Er zijn zes essentiële veranderingen (Figuur 2.3) in de fysiologie van de cel bij deze transformatie, namelijk: ongevoeligheid voor groei-inhiberende signalen, zelfvoorziening in groesignalen, een onbeperkt replicatief potentieel, angiogenese, ontwijken van apoptosise en tot slot weefselinvasie en metastase. Er zijn velerlei manieren waarop deze tot stand kunnen komen, wat mede aan de basis ligt van de voorvermelde heterogeniteit (Hanahan, 2000).



Figuur 2.3. De kenmerken van kanker. Aan de zes typische kenmerken van kanker (ongevoeligheid voor groei-inhiberende signalen, zelfvoorziening in groesignalen, een onbeperkt replicatief potentieel, angiogenese, ontwijken van apoptosise, weefselinvasie en metastase) zoals voorgesteld door Hanahan (2000), werd recent een zevende toegevoegd, namelijk inflammatie. Deze kenmerken worden in bijna alle tumoren teruggevonden (uit Mantovani, 2009).

Recent onderzoek onder de vorm van epidemiologische en klinische studies en werk met transgene muizen, voegt een zevende kenmerk toe aan deze lijst: inflammatie (Balkwill *et al.*, 2005; Mantovani, 2009; Mantovani *et al.*, 2008). Inflammatoire cellen en afgeleiden zijn aanwezig in -wat lijkt- alle tumoren, onafhankelijk van hun oorsprong (Mantovani *et al.*, 2008). Dus terwijl het kankeronderzoek zich vroeger voornamelijk concentreerde op de getransformeerde malignante cellen, weet men nu dat een tumor geen homogene massa is, maar eerder een micro-omgeving, waar een uitgebreide interactie plaatsvindt tussen de kanker- en stromale cellen (Hanahan, 2000; Van Ginderachter *et al.*, 2006). Deze laatste omvatten een hele resem aan cellen, waaronder de 'residente' adipocyten en fibroblasten, maar ook 'geïnfiltreerde' hematopoietische cellen, zoals macrofagen, neutrofielen, eosinofielen en T cellen, die differentieel verdeeld zijn en verschillen afhankelijk van het tumortype (Condeelis &

Pollard, 2006; Pollard, 2004). Ze beïnvloeden bijna elk aspect van de kanker zoals tumorgroei, angiogenese, metastase en de respons op chemotherapie (Mantovani, 2009; Mantovani *et al.*, 2008).

2.2.2. Tumor *immunosurveillance*

Naast de zes veranderingen die een tumor moet ondergaan om te groeien en overleven (Hanahan, 2000), speelt de natuurlijke immuunrespons tegen de tumor ook een belangrijke rol (Dunn *et al.* 2002). De *immunosurveillance* hypothese, geïntroduceerd door Burnet en Thomas, stelt dat "het immuunsysteem getransformeerde cellen kan herkennen en vernietigen". Tegenwoordig spreekt men eerder over *immunoediting*, waarbij een duale rol wordt toegeschreven aan het immuunsysteem. Deze omvat zowel de *immunosurveillance* hypothese, namelijk het beschermen van het organisme tegen kanker, naast de selectie van tumoren met een gereduceerde immunogeniciteit.

Het proces van *immunoediting* bestaat uit drie fasen: eliminatie, evenwicht en evasie. Bij de eerste fase, de eliminatie, zouden zowel het natuurlijke als het adaptieve immuunsysteem betrokken zijn. Hierbij worden bepaalde structuren op de getransformeerde cellen herkend door lymfocyten, wat een immunologische respons genereert. Indien deze succesvol is, gaan de twee andere fasen niet door (Dunn *et al.*, 2002; Dunn *et al.*, 2004). Het gebrek aan immunogeniciteit van een tumor komt eerder doordat deze niet in staat is om het immuunsysteem te activeren, dan door een gebrek aan tumorantigenen (Van Pel & Boon, 1982). De tweede fase, het evenwicht, is een dynamisch evenwicht tussen het immuunsysteem en de tumorcel variant die het eliminatieproces heeft overleefd. Tijdens deze periode is er een selectieproces, waarbij de oorspronkelijke tumorvarianten vernietigd worden, maar nieuwe varianten met verschillende mutaties en een mogelijk verminderde immunogeniciteit verschijnen. Deze fase kan resulteren in eliminatie, permanent verblijf in de evenwichtsfase door een controle van de immuniteit, of een ontsnapping aan de druk van het immuunsysteem. Dit leidt tot de laatste fase, evasie, wanneer een tumorvariant opduikt die ongevoelig is geworden voor immunologische detectie en/of eliminatie. Deze kan dan in een ongecontroleerde manier expanderen (Dunn *et al.*, 2002; Dunn *et al.*, 2004).

2.3. Tumor-geassocieerde macrofagen

2.3.1. Inleiding

De meeste tumoren worden geïnfiltrerd door macrofagen, genaamd tumor-geassocieerde macrofagen of TAMs. Klinische studies leggen het verband tussen een

hoge infiltratie van TAMs in de tumor en een slechte prognose; hiervoor zijn overtuigende data voor borst-, baarmoederhals- en blaaskanker. Voor bepaalde kankers, bijvoorbeeld maagkanker, bestaan ook studies die eerder een goede prognose voorspellen bij hoge TAM infiltratie. Echter, indien alle studies in rekening worden gebracht, toont meer dan 80% een significante correlatie tussen TAM densiteit en een slechte prognose (Bingle *et al.*, 2002; Pollard, 2004).

2.3.2. Monocyten

Monocyten vinden hun oorsprong in het beenmerg. Een *common myeloid progenitor* geeft daar aanleiding tot de verschillende soorten granulocyten (neutrofielen, eosinofielen en basofielen), de mestcellen en monocyten (Mosser & Edwards, 2008). De monocyten komen vervolgens in het bloed terecht, waar ze circuleren en onder inflammatoire omstandigheden de weefsels binnendringen. Daar kunnen ze aanleiding geven tot macrofagen, maar ook tot inflammatoire DCs (Geissmann *et al.*, 2010).

Monocyten worden gekenmerkt door hun boonvormige nucleus, expressie van CD11b, CD115 en F4/80 in de muis en het ontbreken van B, T, NK en DC merkers (Geissmann *et al.*, 2003; Geissmann *et al.*, 2010). Ze zijn uitgerust met adhesie- en chemokinereceptoren die de migratie van het bloed naar de weefsels mediëren (Geissmann *et al.*, 2010).

Geissmann *et al.* (2003) toonden aan dat er ten minste twee functionele monocyt subpopulaties bestaan in het bloed, die onderscheiden worden op basis van hun chemokinereceptoren. De onderverdeling is gebaseerd op de expressie van CC-chemokinereceptor 2 (CCR2), Ly-6C, *cluster of differentiation 62 ligand* (CD62L) en de CX₃C-chemokine receptor 1 (CX₃CR1). Er bestaat enerzijds de CX₃CR1^{laag}CCR2⁺CD62L⁺Ly-6C^{hoog} 'inflammatoire' subset en anderzijds de CX₃CR1^{hoog}CCR2⁻CD62L⁻Ly-6C^{laag} 'residente' subset van monocyten (Geissmann *et al.*, 2003). De uitdrukking van CCR2 en dus de capaciteit om te migreren naar het CC-chemokine ligand 2 (CCL2), is consistent met de rol van dit chemokine in het rekruteren van monocyten naar inflammatoire lesies. Een gelijkaardige functie wordt door CD62L uitgeoefend. Deze subsets corresponderen met de twee menselijke subpopulaties van monocyten, wat het mogelijk maakt om deze heterogeniteit in muizen te bestuderen (Gordon & Taylor, 2005; Sunderkötter *et al.*, 2004). De inflammatoire Ly-6C^{hoog} monocyten geven aanleiding tot macrofagen en DCs in verschillende infectieuze modellen (Geissmann *et al.*, 2010) en ook in een kankermodel (Movahedi *et al.*, 2010).

2.3.3. Infiltratie van de tumor

Monocyten dringen tumoren binnen via bloedvaten, zowel in het vroege stadium wanneer vascularisatie optreedt, als in laat-stadium tumoren die invasief en metastatisch zijn. Onlangs werden de infiltrerende monoccyten die aanleiding geven tot de TAMs geïdentificeerd als inflammatoir, namelijk met het $CX_3CR1^{\text{laag}}CCR2^+CD62L^+Ly-6C^{\text{hoog}}$ fenotype (Movahedi *et al.*, 2010). Een heleboel chemokines spelen een rol bij de aantrekking van deze leukocyten, waaronder verschillende CC chemokine liganden: CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 (of *regulated on activation normal T cells expressed and secreted* [RANTES]) en CCL8 (Lewis & Pollard, 2006; Mantovani *et al.*, 2002; Murdoch & Lewis, 2005; Sica & Bronte, 2007). Vooral CCL2 of *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) zou een belangrijke chemotactische factor zijn in velerlei tumoren (Sica *et al.*, 2006). Hiernaast spelen cytokines en groeifactoren een soortgelijke rol, zoals *colony-stimulating factor-1* (CSF-1) (Lin *et al.*, 2001) en *vascular endothelial growth factor* (VEGF) via de VEGF receptor *flt-1*, die uitgedrukt wordt op monoccyten (Bingle *et al.*, 2002). In de tumor zelf drukken TAMs lage niveaus van CCR2 uit, wat ten dele in verband staat met de overgang van monoccyt naar macrofaag, naast een mogelijk mechanisme om de macrofagen in de tumor vast te houden (Mantovani *et al.*, 2002).

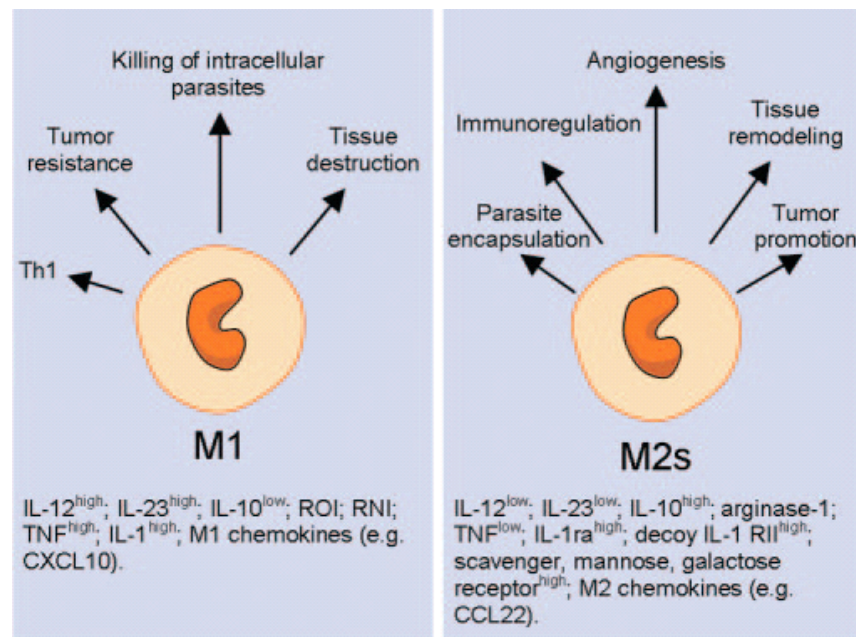
2.3.4. De macrofaag en zijn mogelijke activeringstoestanden

Macrofagen bezitten naast immuunfuncties (zie *infra*), ook belangrijke homeostatische functies gelinkt aan hun fagocytotische capaciteiten. Zo spelen ze een rol in het recycleren van hemoglobine, het verwijderen van cellulair debris bij het hermodelleren van weefsel en ruimen ze cellen op die apoptose hebben ondergaan. Dit zijn processen die uitgevoerd kunnen worden door niet-gestimuleerde macrofagen en is hun primaire rol als "conciërge van het lichaam" (Mosser & Edwards, 2008).

Macrofagen vertonen een hoge graad van plasticiteit en kunnen hun fenotype aanpassen in functie van de micro-omgeving waarin ze zich bevinden (Murdoch *et al.*, 2008). De bekomen heterogeniteit is onder meer een weerspiegeling van de specifieke functie die moet uitgevoerd worden door een macrofaag op een bepaalde plaats. Naast de heterogeniteit tussen verschillende organen, kan dit dus ook geobserveerd worden binnen een enkel orgaan (Gordon & Taylor, 2005).

Meestal worden ze onderverdeeld in de M1 (klassiek geactiveerde) en M2 (alternatief geactiveerde) fenotypes (Figuur 2.4), naar het voorbeeld van de classificatie in de T-cel literatuur. In tegenstelling tot T cellen, die uitgebreide epigenetische modificaties

ondergaan tijdens hun differentiatie, behouden macrofagen een grotere plasticiteit en blijven ze antwoorden op omgevingssignalen (Mosser & Edwards, 2008). Er moet rekening mee gehouden worden dat elke vorm van classificatie de complexiteit van de *in vivo* situatie niet kan weergeven en dat de macrofaag ook gemengde profielen zal aannemen in plaats van de mogelijke extremen (Mantovani *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2004; Van Ginderachter *et al.*, 2006).



Figuur 2.4. Het M1/M2 paradigma. Macrofagen worden onderverdeeld in de M1 en M2 macrofagen met typische geassocieerde cytokines, chemokines, receptoren en functies zoals weergegeven wordt (uit Mantovani, 2006).

De klassiek geactiveerde macrofaag

De klassieke of M1 macrofaag activatie gebeurt ten gevolge van blootstelling aan microbiële producten en IFN- γ . De macrofaag is dan in staat om micro-organismen en tumorcellen te vernietigen door productie van een overvloedige hoeveelheid pro-inflammatoire cytokines, zoals IL-12 en TNF en reactieve zuurstof en stikstof intermediairen. Daarnaast wordt deze ook gekarakteriseerd door een hoge antigen presenterende capaciteit (Mantovani *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2004; Sica *et al.*, 2006).

De alternatief geactiveerde macrofaag

M2 is een algemene naam voor verschillende vormen van alternatief geactiveerde macrofagen. De M2 macrofagen worden onderverdeeld in drie verschillende vormen

afhankelijk van hun inducerende stimulus, wat bij de M2a macrofagen IL-4 of IL-13 is, bij M2b immuuncomplexen en agonisten van TLRs of IL-1R is en tot slot bij M2c uit blootstelling aan IL-10 en glucocorticoïde hormonen bestaat (Mantovani *et al.*, 2002; Mantovani *et al.*, 2004; Martinez *et al.*, 2009).

De M2 macrofagen zijn eerder betrokken in het dempen van inflammatoire reacties en Th1 immuniteit, het opruimen van cellulair debris, het promoten van angiogenese en hermodellieren en herstel van weefsel (Mantovani *et al.*, 2004). Ghassabeh *et al.* (2006) identificeerden een algemene consensus gensignatuur voor *in vivo* geïnduceerde M2 macrofagen, onafhankelijk van het ziektemodel, de muisstam en het orgaan van herkomst. Deze kan gebruikt worden bij de bepaling van de activeringstoestand van macrofagen (Ghassabeh *et al.*, 2006).

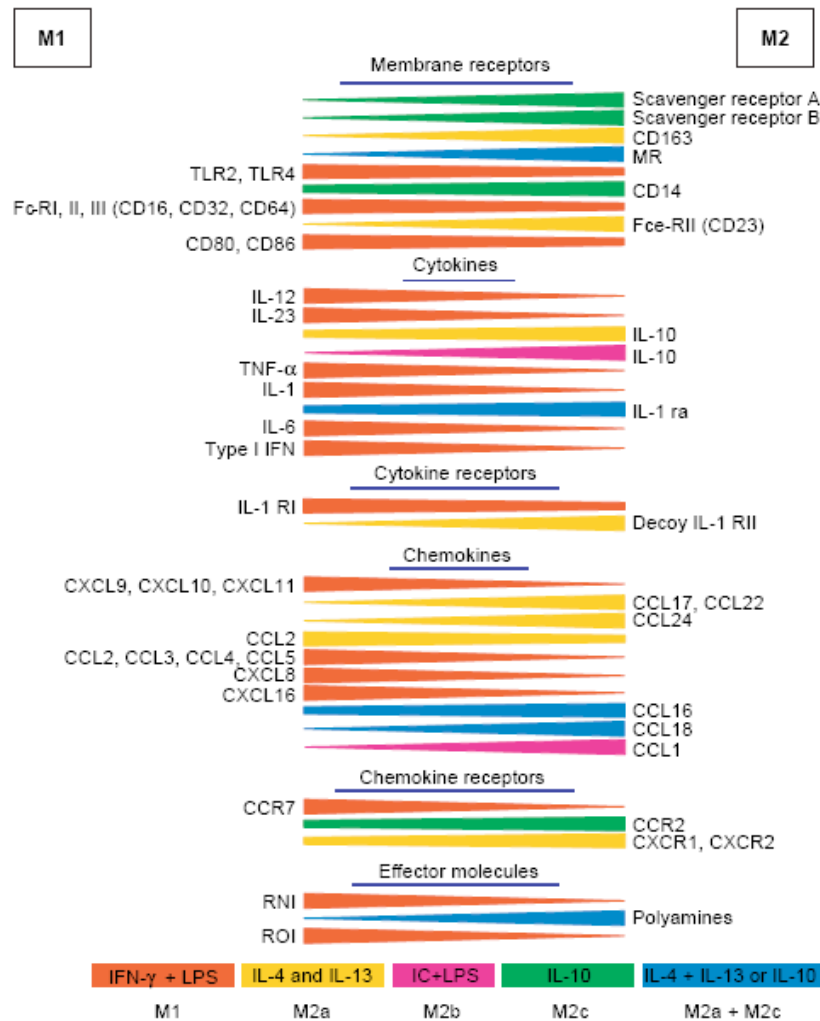
Er is differentiële expressie qua receptor expressie, cytokine en chemokine productie en effector functie tussen de M1 en M2 macrofagen

De populaties van gepolariseerde macrofagen verschillen wat betreft hun receptor expressie, cytokine en chemokine productie en dus ook in hun effector functie (Figuur 2.5).

Qua receptoren beschikken de M1 macrofagen eerder over opsonische receptoren zoals CD16 of FcγR (*Crystallisable Fragment γ Receptor*) III, waar tegenover de hogere expressie van niet-opsonische receptoren bij de M2 macrofagen staat. Zo leidt de activatie door IL-4 tot de verhoogde expressie van onder andere de macrofaag mannose receptor (MMR) en de scavenger receptor A (SR-A) (Martinez *et al.*, 2009; Sica *et al.*, 2006).

Daarnaast is de cytokine productie ook essentieel voor het onderscheid. Typisch voor de M1 macrofaag is het IL-10^{laag} en IL-12^{hoog} fenotype met productie van inflammatoire cytokines, wat tegengesteld is aan het cytokine profiel van de M2 macrofaag (met uitzondering van de M2b macrofaag die wel nog inflammatoire cytokines produceert).

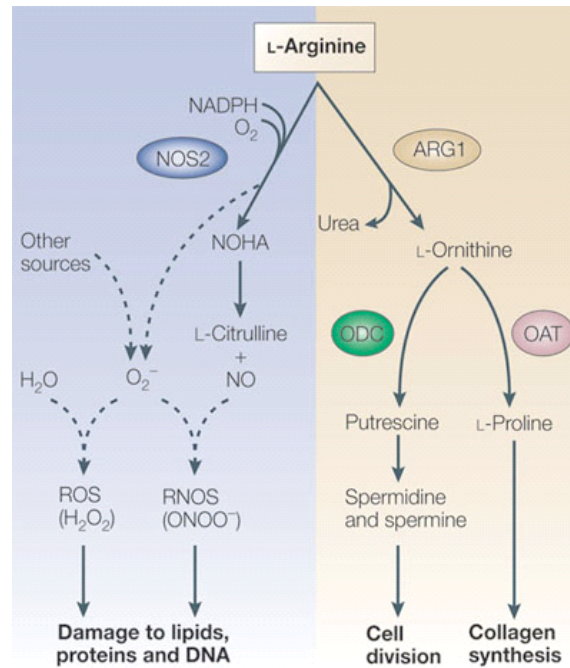
De M1 macrofaag produceert eerder inflammatoire chemokines ten gevolge van LPS activatie zoals CXC-chemokine ligand (CXCL) 1, 2, 3, 5, 8, 9 en 10 en CCL2, 3, 4, 5, 11, 17 en 22. Door LPS en IFN-γ worden de chemokines CXCL9, CXCL10 en CCL5 geïnduceerd die eerder Th1 cellen aantrekken. Deze chemokines worden in het algemeen geïnhibeerd door M2 inducerende signalen. IL-4 en IL-13 induceert CCL24, maar ook CCL17 en CCL22. Deze zijn eerder geassocieerd met een Th2 respons (Mantovani *et al.*, 2004).



Figuur 2.5. Het M1/M2 paradigma op moleculair vlak. De M1 en M2 (M2a, M2b en M2c) macrofagen verschillen op het vlak van membraanreceptoren, cytokines, cytokine receptoren, chemokines, chemokine receptoren en effector moleculen (uit Mantovani *et al.*, 2004). (MR: macrofaag mannose receptor; RNI: *reactive nitrogen intermediate* of reactieve stikstofintermediair; ROI: *reactive oxygen intermediate* of reactieve zuurstofintermediair)

Het *L*-arginine metabolisme is een belangrijke factor bij de bepaling van het macrofaag fenotype.

Het metabolisme van *L*-arginine (*L*-Arg) draagt ook bij tot het onderscheid tussen de M1 en M2 macrofagen. Dit aminozuur (Figuur 2.6) vormt een substraat voor zowel het *inducible nitric oxide synthase* (iNOS of NOS2) als arginase-1 (Arg1) (Bronte & Zanovello, 2005). De activatie van NOS2 is een kenmerk van de M1 macrofagen en dit enzym katalyseert de omzetting van *L*-Arg naar stikstofoxide (NO) en citrulline. Daarentegen is de activatie van Arg1 kenmerkend voor de M2 macrofaag. Arg1 zet *L*-Arg om naar ureum en *L*-ornithine. Deze laatste is een precursor van polyamines, die een belangrijke rol spelen in celdeling en collageenvorming, wat bijdraagt aan de productie van de extracellulaire matrix (ECM) (Mosser & Edwards, 2008; Sica & Bronte, 2007).



Figuur 2.6. Het L-Arginine metabolisme. L-Arginine ageert als substraat van zowel NOS2 als ARG1, wat afhankelijk van de balans van beide, respectievelijk een eerder M1- of M2-achtige respons genereert. De volle lijnen staan voor de voornaamste metabolische activiteit, terwijl de stippellijnen alternatieve wegen visualiseren. Zo kunnen, wanneer de concentratie L-Arg limiterend is, elektronen getransfereerd worden naar zuurstofgas (O₂), wat superoxide anion (O₂⁻) genereert. Dit kan met NO combineren tot peroxynitriet (ONOO⁻) of met water (H₂O) waarbij waterstofperoxide wordt geproduceerd (H₂O₂) (uit Bronte & Zanovello, 2005). (ROS: *Reactive Oxygen Species* of reactieve zuurstofintermediaren; NOHA: *N^G-hydroxy-L-arginine*; OAT: ornithine aminotransferase; ODC: ornithine decarboxylase; RNOS: *Reactive Nitrogen-Oxide Species* of reactieve stikstofoxide intermediaren)

2.3.5. Activeringstoestand van TAMs

TAMs worden voornamelijk beschreven als een vrij homogene populatie van alternatief geactiveerde macrofagen, die hoge niveaus van Arg1, IL-10, Dectin-1, *macrophage galactose-type C-type lectin 1* (Mgl1), TGF-β, SR-A, MMR en de IFN-induceerbare cytokines CXCL9, CXCL10 en CXCL16 uitdrukken en lage niveaus van IL-12, IL-6, TNF-α en NOS2 (Biswas *et al.*, 2006; Mantovani *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2009; Sica & Bronte, 2007). Verder worden ze beschreven als slechte antigen presenterende cellen (Sica *et al.*, 2006).

De verschillende pro-tumorale functies (zie §2.3.7.1) van de TAMs zouden elk door een verschillend moleculair mechanisme beïnvloed worden (DeNardo *et al.*, 2009). Zo zou het TAM profiel onder meer gedirigeerd worden door FcγR signalisatie en dus een link vertonen met B cellen en humorale immuniteit (Andreu *et al.*, 2010). Het cytokine IL-4 wordt ook een rol toegekend door twee studies (DeNardo *et al.*, 2009; Gocheva *et al.*, 2010). DeNardo *et al.* (2009) vonden dat in een borst adenocarcinoom de CD4⁺ T cellen, via de productie van IL-4, een M2 fenotype induceren in TAMs, dat de invasieve en metastatische activiteit van de kankercellen bevordert via de productie van *epidermal*

growth factor (EGF) (zie §2.3.7.1) (DeNardo *et al.*, 2009). In een kankermodel van de pancreatische eilanden induceert IL-4 productie, ditmaal afkomstig van de kankercellen, de aanmaak van cathepsines B en S die een rol spelen in de groei, angiogenese en invasie van de kanker. Ook hier speelt het cytokine een rol in het M2 fenotype (Gocheva *et al.*, 2010). Dat de interactie met kankercellen een effect heeft op het moleculaire fenotype van de TAMs werd al eerder vastgesteld (Hagemann *et al.*, 2006).

2.3.6. Moleculaire signalisatiewegen

2.3.6.1. Inleiding

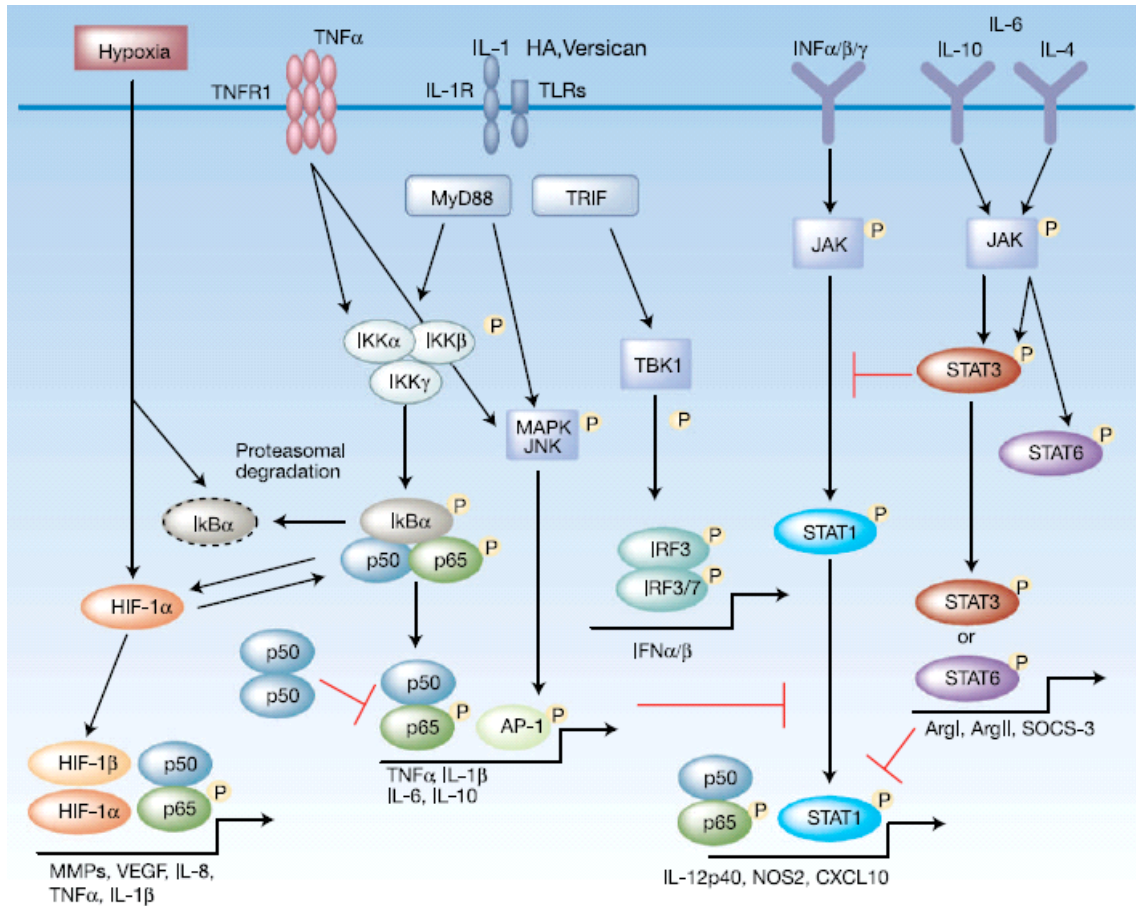
Er wordt in de literatuur melding gemaakt van verschillende moleculaire signalisatiewegen die potentieel betrokken zijn in de bepaling van het TAM fenotype (Figuur 2.7). Hiervan zullen de belangrijkste besproken worden: in de eerste plaats *nuclear factor κB* (NF-κB) en de *hypoxia-inducible factors* (HIFs) en hun onderling verband. Daarnaast zullen de *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STATs) besproken worden. Deze stellen belangrijke moleculaire signalisatiewegen samen via dewelke cytokine receptoren signaliseren (Murray, 2007).

2.3.6.2. NF-κB

NF-κB omvat een familie van transcriptiefactoren die een sleutelrol spelen in veel fysiologische processen, waaronder de natuurlijke en adaptieve immuunrespons, celproliferatie, celdood en inflammatie. De familie bestaat uit vijf leden: p50 (en zijn precursor p105), p52 (en precursor p100), p65 (RelA), c-Rel en RelB, dewelke homo- of heterodimeren kunnen vormen. De twee eerst vermelde leden beschikken niet over een transcriptie-activatie domein, waardoor deze de transcriptie kunnen onderdrukken. Een heleboel stimuli kunnen leiden tot NF-κB signalisatie, elk met hun eigen specifieke cascade. Deze convergeren ter hoogte van het IκB kinase (IKK) complex. NF-κB wordt immers in een inactieve toestand in het cytoplasma gehouden door associatie met een inhibitorisch κB (IκB) proteïne. De degradatie van IκB kan geïnitieerd worden door het IKK complex, dat uit de kinases IKKα en IKKβ en een regulatorische subeenheid IKKγ bestaat. Na degradatie van de inhibitor kan een NF-κB dimeer de kern binnendringen door middel van zijn nucleaire localisatie signalen en de promotor en *enhancer* regio's met de κB consensus sequentie binden, wat aanleiding geeft tot gentranscriptie (Hayden & Ghosh, 2008).

De activatie van NF-κB (Figuur 2.7) is essentieel voor macrofaag activatie als reactie op microbiële en inflammatorische signalen waaronder TLR liganden, TNF-α en IL-1β (Hagemann *et al.*, 2009). De rol van de NF-κB signalisatie in het M1 versus M2

macrofaag fenotype is echter nog niet goed begrepen (Timmer & Nizet, 2008). Er is een consensus over de centrale rol die NF- κ B vervult in het TAM fenotype (Hagemann *et al.*, 2009), maar het volledige mechanisme is nog niet ontrafeld.



Figuur 2.7. Moleculaire signalisatiewegen in TAMs. Verschillende signalisatiewegen spelen een rol bij de bepaling van het fenotype van TAMs. Een centrale rol wordt gesuggereerd voor NF- κ B, naast het belang van de HIF transcriptiefactoren en de STAT proteïnen. Het valt op te merken dat een aantal genen de simultane binding vereisen van meerdere transcriptiefactoren (uit Mancino & Lawrence, 2010).

De groep van Mantovani toonde aan dat TAMs een defectieve NF- κ B activiteit vertonen in een model van chemisch geïnduceerde fibrosarcoma met een IL-10^{hoog} en IL-12^{laag} profiel. De oorsprong van dit fenotype zou te wijten zijn aan de massale nucleaire accumulatie van het inhibitorische p50 NF- κ B homodimeer (Saccani *et al.*, 2006). Dit homodimeer voorkomt de transcriptie van pro-inflammatoire genen (IL-12p40, TNF- α) en houdt zo een M2-achtig fenotype (Porta *et al.*, 2009) van de TAMs in stand.

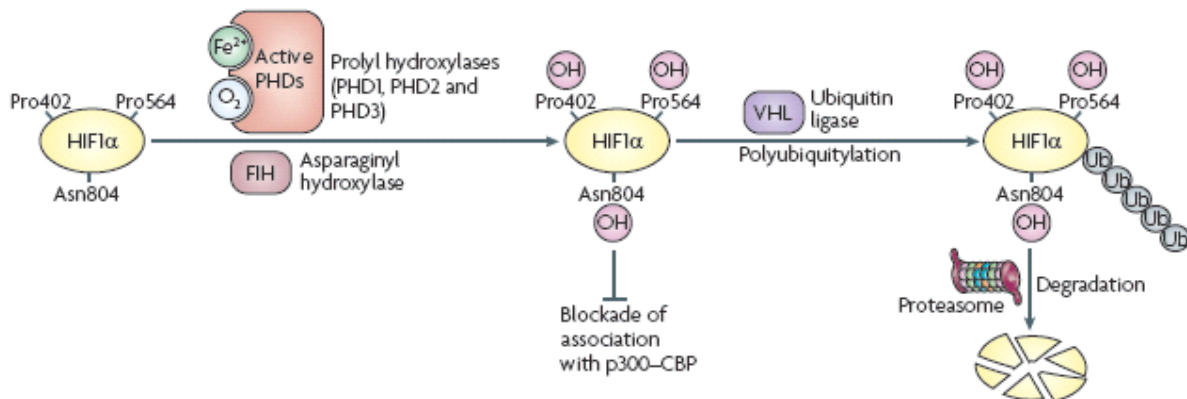
Een andere recente studie in TAMs van Hagemann *et al.* (2008) toont dat het uitschakelen van IKK β in TAMs in een model voor eierstokkanker hun tumordodende activiteit verhoogt en zorgde voor een eerder M1-achtig antitumor fenotype. Dit laatste wordt bereikt door middel van verhoogde expressieniveaus van NOS2 en IL-12

gemedieerde recruitering en activering van NK cellen. De macrofagen vertonen een gereduceerde productie van IL-10, TNF- α en Arg1 (Hagemann *et al.*, 2008).

2.3.6.3. Hypoxie en de HIFs

Wanneer een tumor zijn lokale bloedtoevoer te buiten gaat, vindt een hypoxische respons plaats, ten gevolge van de lagere zuurstofconcentratie. Deze respons wordt gecontroleerd door de transcriptiefactor HIF en moet in de eerste plaats zorgen dat de zuurstofvoorziening zo snel mogelijk hersteld wordt (Taylor, 2008). HIF is actief in alle zoogdiercellen en reguleert de expressie van meer dan 100 genen (Nizet & Johnson, 2009).

HIF is een heterodimerisch proteïne, dat bestaat uit de constitutief uitgedrukte β -subeenheid HIF-1 β en een zuurstof gevoelige α -subeenheid. Van de α -subeenheid bestaan drie isovormen: HIF-1 α , HIF-2 α en HIF-3 α . HIF-1 α en HIF-2 α kunnen interageren met *hypoxia response elements* (HRE) en de transcriptie van genen betrokken in onder andere het energiemetabolisme en angiogenese induceren (Pugh & Ratcliffe, 2003). De α -subeenheden zijn bij normoxische omstandigheden gevoelig aan post-translationele hydroxylatie (Figuur 2.8).



Figuur 2.8. Degradatie van de HIF α subeenheid. De HIF α subeenheid is onder normoxische omstandigheden gevoelig aan hydroxylatie, wat kan leiden tot degradatie of onvermogen om te interageren met zijn transcriptionele co-activator (uit Nizet & Johnson, 2009).

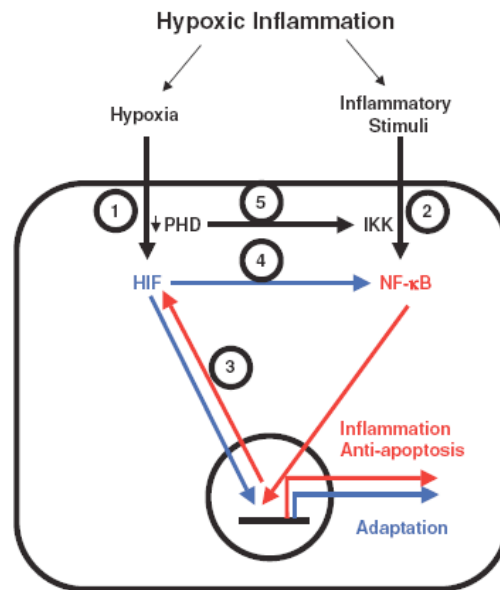
Dit kan enerzijds leiden tot proteosomale degradatie, wanneer gekatalyseerd door de *prolyl hydroxylase domain-containing enzymes* (PHD) 1, 2 of 3. Op deze manier worden de subeenheden gevoelig aan ubiquitinatie door het von Hippel Lindau E3 ubiquitine ligase (VHL) en de daaropvolgende degradatie door het proteasoom. Anderzijds kan dit leiden tot transcriptionele inactivatie ten gevolge van asparagine hydroxylatie door *factor inhibiting HIF* (FIH), doordat de interactie met de transcriptionele co-activator *p300-CREB-binding protein* (CBP) wordt voorkomen. De voorvernoemde enzymen vereisen zuurstofgas (O₂), ijzer (Fe²⁺) en 2-oxoglutaraat voor hun activiteit (Walmsley *et al.*,

2008). Dus, wanneer er hypoxie heerst, ontsnappen de HIF- α aan hun inactivatie (Pugh & Ratcliffe, 2003).

TAMs lokaliseren zich in hoge densiteiten in de minder gevasculariseerde gebieden van de tumor, in de nabijheid van kankercellen. Ze migreren naar deze regio's onder andere omdat ze worden aangetrokken door bepaalde hypoxie-geïnduceerde chemokines zoals endotheline 2 en VEGF. Het daar aanwezige necrotische debris zou een soortgelijk effect uitoefenen op de fagocyten (Lewis & Pollard, 2006). De hypoxische omgeving induceert veranderingen in het genexpressie profiel van de macrofaag en hierbij ook in zijn fenotype dat pro-tumoraal wordt (Murdoch & Lewis, 2005). Zo worden ondermeer HIF-1 α en 2 α geactiveerd, hoewel er nog geen zekerheid is welke isovorm de belangrijkste rol speelt in de TAM. Bepaalde studies wijzen in de richting van HIF-2 α , met een mogelijke rol in angiogenese (Leek *et al.*, 2002; Talks *et al.*, 2000), hoewel dan weer andere studies de rol van HIF-1 α benadrukken (Burke *et al.*, 2002; Murdoch & Lewis, 2005). In een recent *in vitro* model van tumor sferoïden werd aangetoond dat HIF-1 α ^{-/-} macrofagen een fenotype vertonen dat overeenkomt met dat van TAMs, met uitzondering van hun pro-angiogene capaciteiten (Werno *et al.*, 2010). Aansluitend is bevonden dat HIF-1 α tot hoge expressie komt in M1 macrofagen, terwijl HIF-2 α exclusief in M2 gepolariseerde macrofagen tot uitdrukking komt. Ze zouden een antagonistische rol vervullen in het NO metabolisme, waarbij iNOS synthese afhankelijk is van HIF-1 α transcriptie (Takeda *et al.*, 2010).

2.3.6.4. Verband tussen HIF en NF- κ B

Recent is gebleken dat er heel wat interacties zijn tussen de HIF en NF- κ B transcriptiefactoren, met andere woorden tussen hypoxie en de natuurlijke immuniteit (Figuur 2.9) (Nizet & Johnson, 2009; Taylor & Cummins, 2009). HIF-1 α proteïne kan geïnduceerd worden door een aantal niet-hypoxische stimuli (Taylor, 2008), waaronder stimulatie van macrofagen met LPS (Peyssonnaud *et al.*, 2005; Peyssonnaud *et al.*, 2007). Deze inductie blijkt NF- κ B afhankelijk te zijn en te ageren op het mRNA niveau (Taylor, 2008). Het werd aangetoond dat de transcriptie van HIF-1 α mRNA geïnduceerd wordt door IKK β responsieve NF- κ B. De basale HIF-1 α mRNA expressie is afhankelijk van NF- κ B en de promotor bevat dan ook een actieve NF- κ B bindingssite stroomopwaarts van de transcriptiestart (Figuur 2.9 (3)). Echter, de activatie van NF- κ B, zonder hypoxie, leidt niet tot de accumulatie van HIF-1 α (Rius *et al.*, 2008). Daarenboven zou de acute hypoxische respons, die bij Rius *et al.* (2008) onderzocht werd, verschillen van een toestand van chronische hypoxie, waarvoor onderzoek suggereert dat deze eerder onafhankelijk is van NF- κ B (Fang *et al.*, 2009).



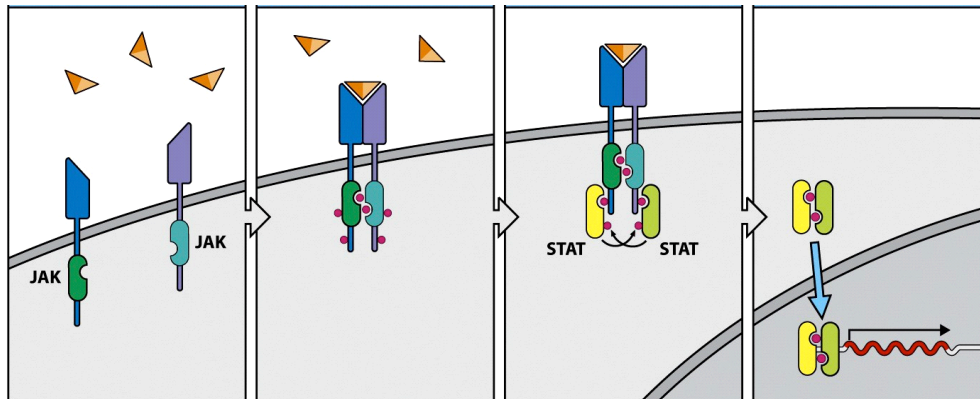
Figuur 2.9. De interactie tussen NF-κB en HIF. De interactie tussen beide transcriptiefactoren situeert zich op verschillende niveaus, zowel op gen- als proteïneniveau en creëert een ingewikkelde interactie tussen beide. Onder invloed van hypoxie (1) daalt de activiteit van de PHD enzymen, waardoor het HIF proteïne kan accumuleren in de cel. Inflammatorische stimuli (2) convergeren ter hoogte van het IKK complex, waardoor NF-κB naar de kern kan lokaliseren. NF-κB kan dan onder andere binden op zijn bindingssite in de promotor van HIF, wat voor extra transcriptie zorgt (3). Hiernaast moduleert het HIF proteïne nog verder de activiteit van NF-κB (4) en blijkt hypoxie ook een invloed te hebben op de NF-κB activiteit (5) door de interactie van de PHD enzymen met het IKK complex (uit Taylor, 2008).

De NF-κB signalisatieweg zou echter ook beïnvloed worden door hypoxie en deze gevoeligheid zou zich onder meer situeren ter hoogte van het IKK complex (Figuur 2.9 (5)). Het werd aangetoond door Cummins *et al.* (2006) dat PHD1 een negatieve modulator is van de activiteit van IKKβ, hoewel het mechanisme hiervoor nog niet volledig ontrafeld is (Cummins *et al.*, 2006). Terwijl hypoxie een sterke activator is van HIF signalisatie, bezit het een eerder modulerende rol in de regulatie van NF-κB en zijn genexpressie (Cummins *et al.*, 2006; Taylor & Cummins, 2009). Hiernaast zou het HIF-1α proteïne op zich, ook een invloed uitoefenen op NF-κB. Dit werd onderzocht in een transgeen model waar HIF-1α constitutief werd uitgedrukt in keratinocyten. Hierbij werd waargenomen dat HIF-1α zorgt voor een verhoogde IκB en p65 fosforylatie, wat allebei resulteert in een grotere transcriptionele activiteit van NF-κB (Figuur 2.9 (4)) (Scortegagna *et al.*, 2008).

2.3.6.5. STATs

De STAT familie bestaat uit zeven leden: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B en STAT6. Deze bezitten een duale rol, namelijk het overbrengen van signalen in het cytoplasma, naast een functie als transcriptiefactoren in de nucleus (Yu *et al.*, 2009). Om

de STATs te activeren (Figuur 2.10), moet er allereerst een signaal gegeven worden aan een receptor, die in sommige gevallen dimeriseert.



Figuur 2.10. STAT activatie. Een overzicht van de verschillende stappen die leiden tot STAT fosforylatie en dimerisatie, gevolgd door translocatie naar de kern (naar Murphy *et al.*, 2008).

De receptor beschikt ofwel zelf over een intrinsieke tyrosine kinase activiteit, zoals bepaalde groeifactor receptoren, of is geassocieerd met een Janus Kinase (JAK) zoals de meeste cytokine receptoren. De JAKs worden gefosforyleerd en zorgen voor de fosforylatie van de cytoplasmatische staart van de receptor. Deze fosfotyrosines kunnen de interactie aangaan met het STAT Src-homologie 2 (SH2) domein. JAK katalyseert dan de fosforylatie van het receptor-gebonden STAT, wat leidt tot hun homo- of heterodimerisatie. Dit wordt gevolgd door de nucleaire translocatie en binding aan specifieke DNA respons elementen in de promotorregio van de doelwitgenen (Aaronson & Horvath, 2002).

STAT1

STAT1 is vereist voor IFN signalisatie, wat duidelijk blijkt uit experimenten met STAT1-deficiënte muizen. Zij kunnen niet langer reageren op IFNs en zijn dus zeer gevoelig aan bacteriële en virale pathogenen. De signalen voor de activatie van STAT1 omvatten dus IFN- α/β en IFN- γ (Takeda & Akira, 2000). Verder is de transcriptiefactor noodzakelijk voor een efficiënte *tumorsurveillance* (Bromberg, 2002).

In macrofagen verhoogt IFN- γ de oppervlakte-expressie van MHCII en costimulatorische moleculen en zorgt het voor een activatie van de macrofaag (Takeda & Akira, 2000). Studies hebben aangetoond dat STAT1 de expressie van verschillende M1 genen reguleert zoals IL-12, NOS2 en waarschijnlijk ook andere zoals CXCL10 en CCL5 (Hagemann *et al.*, 2009). Er zijn tegengestelde bevindingen op het vlak van STAT1 activering in TAMs. Constitutieve fosfo-STAT1 (P-STAT1) expressie wordt waargenomen in niet-gestimuleerde TAMs door Biswas *et al.* (2006). Kusmartsev & Gabrilovich (2005) zagen ook een verhoogde activatie van STAT1 in TAMs en toonden een verband aan met

T-cel suppressie. Hiervan is echter geen sprake bij Hagemann *et al.* (2008). Zij namen waar dat de IKK β -gemedieerde onderdrukking van STAT1 fosforylatie het M1 fenotype en de tumoricidale activiteit van TAMs inhibeert (Hagemann *et al.*, 2008).

STAT3

STAT3 activatie kan op velerlei manieren bekomen worden via cytokine stimuli zoals IL-6 en IL-10, maar ook door groeifactoren zoals EGF, *platelet-derived growth factor* (PDGF) en VEGF (Murray, 2007; Takeda & Akira, 2000). STAT3 is een oncogenisch proteïne dat constitutief geactiveerd wordt. In kankercellen is er vaak een aanhoudende intrinsieke activatie van STAT3, die doorgegeven kan worden aan de stromale, inflammatoire cellen in de tumoromgeving. Dit gebeurt door middel van een *feedforwardloop* waarbij de doelwitgenen van STAT3 bepaalde cytokines en groeifactoren zijn, waarvan de geassocieerde receptoren STAT3 kunnen activeren in immuuncellen. STAT3 activatie beperkt de anti-tumor immuunrespons door het tegenwerken van de NF- κ B en STAT1 gemedieerde expressie van Th1 cytokines zoals IL-12 en IFN- γ (Yu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2009). STAT3 en NF- κ B zijn vaak samen geactiveerd in immuuncellen, gezien de expressie van STAT3 in die cellen afhankelijk is van activatoren die door doelwitgenen van NF- κ B worden gecodeerd. Op zijn beurt wordt NF- κ B echter ook door STAT3 geactiveerd. Ook hier is er sprake van een *feedforwardloop* (Yu *et al.*, 2009). Daarnaast is STAT3 ook een activator van genen die een rol spelen in immunosuppressie (Yu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2009). Zo werkt de IL-10 gemedieerde activatie van STAT3 in macrofagen als een negatieve regulator van inflammatoire genexpressie (Murray, 2007). STAT3-deficiënte macrofagen vertonen abnormaal geactiveerde fenotypes, met verhoogde expressie van inflammatoire cytokines en expressie van MHCII en B7.1 (Takeda & Akira, 2000). Daarnaast zou STAT3 ook vereist zijn voor HIF-1 α mRNA expressie, zowel in tumorcellen als in tumorgeassocieerde cellen (Niu *et al.*, 2008). STAT3 blijkt constitutief geactiveerd te zijn in verscheidene tumor-infiltrerende immuuncellen (Kortylewski *et al.*, 2005) en zou in TAMs de productie van IL-23 aandrijven, waarvoor een procarcinogene rol wordt gesuggereerd (Kortylewski *et al.*, 2009).

STAT6

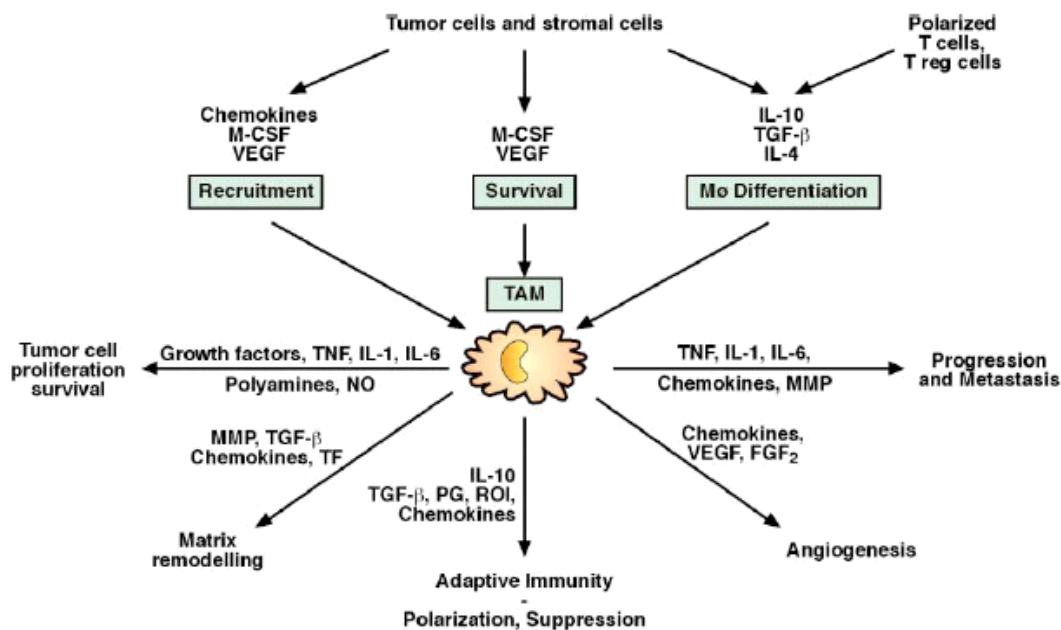
STAT6 kan geactiveerd worden door de cytokines IL-4 en IL-13 (Martinez *et al.*, 2008; Murray, 2007). In STAT6-deficiënte muizen wordt een verminderde Th2 respons waargenomen (Takeda & Akira, 2000) en ze vertonen een verhoogde *immunosurveillance* tegen primaire en metastatische 4T1 tumoren wat door IFN- γ

bemiddeld zou worden (Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2002). De activatie van STAT6 is geassocieerd met M2 macrofaag polarizatie (Sica & Bronte, 2007) en het werd aangetoond dat TAMs verhoogde activatieniveaus van deze transcriptiefactor vertonen (Kusmartsev & Gabrilovich, 2005).

2.3.7. Rol van TAMs

2.3.7.1. Pro-tumorale rol

TAMs spelen zowel een rol in tumor initiatie (Balkwill *et al.*, 2005; Mantovani *et al.*, 2008) als in de progressie van de tumor (Pollard, 2004). Dit bewerkstelligen ze door een functie te spelen in tumorgroei, invasie, immunosuppressie, angiogenese en metastase (Figuur 2.11).



Figuur 2.11. Overzicht van de pro-tumorale functies van TAMs. De TAMs ontvangen een hele resem aan signalen uit de tumor micro-omgeving (zie *supra*) die het TAM fenotype bepalen. De TAMs vervullen vervolgens hun voornamelijk pro-tumorale functies door middel van verschillende cytokines, chemokines en enzymen (uit Balkwill *et al.*, 2005).

Initiatie

Macrofagen vormen een belangrijke component van de inflammatoire respons en zorgen voor de massale productie van reactieve zuurstof- en stikstofintermediaren, naast cytokines zoals TNF- α , IL-6 en *migration inhibitory factor* (MIF). Deze kunnen leiden tot weefsel- en DNA schade waaronder de generatie van mutaties en zelfs chromosomale abnormaliteiten (Biswas *et al.*, 2008; Pollard *et al.*, 2004). Dit kan uiteindelijk aanleiding geven tot de vorming van malignante cellen. Verschillende studies suggereren dat IL-1 β ,

afkomstig van de micro-omgeving, een rol zou spelen in de tumorbevorderende functie van TAMs (Hagemann *et al.*, 2009).

Progressie

Tumorgroei

De mate van TAM aanwezigheid correleert met de mate van tumorcel proliferatie, zoals aangetoond in verschillende studies. TAMs drukken factoren uit die de proliferatie bevorderen zoals EGF, PDGF, TGF- β 1, *hepatocyte growth factor* (HGF) en *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (Pollard, 2004; Lewis & Pollard, 2006). Recent onderzoek toonde aan dat kankercellen de productie van *Growth arrest-specific gene 6* (Gas6) in TAMs promoten, om zo hun eigen groei te bevorderen (Loges *et al.*, 2010).

Angiogenese

Het transcriptoom van TAMs vertoont opgereguleerde transcripten die een rol spelen in angiogenese (Ojalvo *et al.*, 2009). Het is dan ook reeds waargenomen dat TAMs proangiogene cytokines en groeifactoren produceren zoals VEGF, TNF- α , IL-8 (CXCL8) en bFGF. De kankercellen kunnen de productie van angiogene factoren door de macrofagen versterken door TNF- α te secreteren (Hagemann *et al.*, 2006). Ook de productie van enzymen zoals de matrix metalloproteïnases (MMP) MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12 en cyclooxygenase-2 (COX-2) speelt een rol in angiogenese (Lewis & Pollard, 2006). MMP9 bijvoorbeeld, vervult deze rol door VEGF vrij te laten uit de ECM (Pollard, 2004). Daarnaast kunnen TAMs ook *urokinase plasminogen activator* (uPA) produceren, een proteïne dat een rol zou spelen in de afbraak van de ECM en zo de vasculaire infiltratie bevordert. De aanwezigheid van NO geproduceerd door iNOS zou dan weer zorgen voor vasodilatatie en een verhoogde vasculaire stroming (Pollard, 2004). De angiogene factor, thymidine fosforylase (TP) promoot endotheliale cel migratie *in vitro* en zijn niveaus van expressie correleren met tumor neovascularisatie (Allavena *et al.*, 2008). Recent werd *semaphorin 4D* (Sema4D) geïmpliceerd bij tumor angiogenese. Deze factor, aangemaakt door TAMs, is vereist voor de maturatie van de bloedvaten (Sierra *et al.*, 2008).

Immunosuppressie

De verhoogde expressie van Arg1 en indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) hebben een inhibitorisch effect op T-cel proliferatie (Mancino & Lawrence, 2010). TAMs produceren daarnaast immunosuppressieve cytokines zoals IL-10 en TGF- β (Mantovani *et al.*, 2002; Sacconi *et al.*, 2006) en secreteren CCL22 dat specifiek Tregs naar de tumor aantrekt,

die de reactie van tumorspecifieke T cellen kunnen onderdrukken (Curiel *et al.*, 2004). Hiernaast zorgen de TAMs ook voor een Th2 respons door de productie van CCL2, CCL17 (Mantovani *et al.*, 2002) en CCL18 dat naïeve T cellen aantrekt (Mantovani *et al.*, 2004). Het enzyme MMP-7 speelt ook een rol in immunosuppressie doordat het in staat is om het Fas ligand te verwijderen van naburige cellen, wat ervoor zorgt dat de kankercellen minder gevoelig worden aan lyse door NK en T cellen. Hierbij is de productie van IL-12, dat de cytotoxiciteit van T cellen en NK cellen bevordert, dan ook nog eens merkbaar lager in TAMs (Lewis & Pollard, 2006).

Tumor invasie

Hagemann *et al.* (2004) toonden aan dat de cocultuur van macrofagen met borstkankercellen hun invasieve eigenschappen bevordert op een wijze die afhankelijk is van TNF- α en MMPs geproduceerd door de macrofagen. TNF- α zorgt onder andere voor de expressie van het proinvasieve gen MIF, wat de vrijlating van MMPs door macrofagen bevordert (Lewis & Pollard, 2006). Een andere manier waarop de migratie gestimuleerd wordt, is via de productie van EGF door TAMs in een paracriene reciproke loop met CSF-1 dat afkomstig is van de tumor. Hierbij worden de invasieve eigenschappen van zowel de macrofaag als de kankercel op hetzelfde ogenblik verhoogd (Wyckoff *et al.*, 2004). Daarnaast zorgt de productie van cathepsines B en S door TAMs ook tot een verhoogde invasie van kankercellen in de omringende matrix (Gocheva *et al.*, 2010).

Metastase

In een Lewis long carcinoom model zorgde tumor-afgeleid versican ervoor dat de macrofagen TNF- α produceren onder invloed van TLR2/TLR6, hetgeen metastase bevordert. Uit dit onderzoek blijkt dat TNF- α een van de voornaamste metastatische factoren geproduceerd door myeloïde cellen is (Kim *et al.*, 2009). Ook MMP9 en VEGF zouden een rol spelen in de capaciteit van de TAMs om metastase te induceren (Pollard, 2004). TAMs produceren, zoals vermeld, verschillende soorten MMPs, die in staat zijn om de proteïnen van de ECM af te breken, naast activatoren van de MMPs zoals bepaalde chemokines die hun genexpressie kunnen induceren. Andere factoren die een rol spelen in deze desintegratie zijn TGF- β , PDGF, IL-6, uPA en *tissue type plasminogen activator* (tPA) (Allavena *et al.*, 2008).

2.3.7.2. Potentiële anti-tumorale rol

In principe zijn macrofagen in staat om tumorcellen te doden, wanneer ze passend gestimuleerd worden; de geschikte signalen hiervoor ontbreken echter in de tumor (Sica

et al., 2006). De tumoromgeving is eerder immunosuppressief (bijvoorbeeld via TGF- β 1, CSF-1, ...) en kan op deze manier de presentatie van antigenen en mogelijke cytotoxische activiteit van de macrofagen beletten (Pollard, 2004).

2.3.8. Heterogeniteit

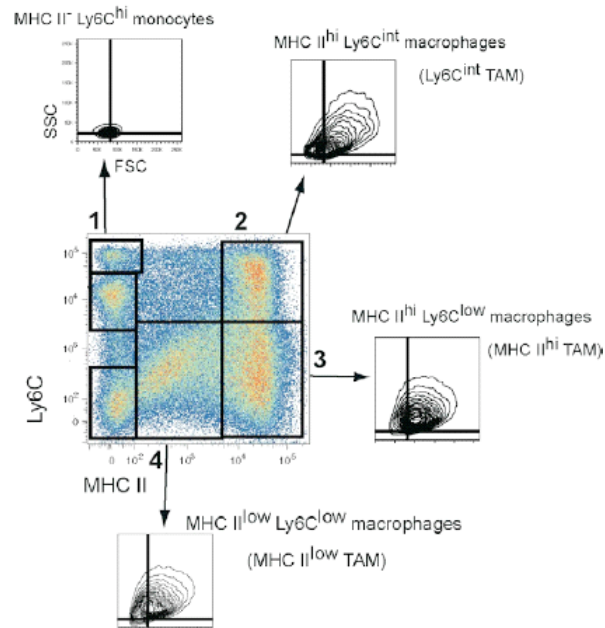
2.3.8.1. Inleiding

Zoals aangehaald zijn macrofagen zeer plastisch en kunnen ze heterogeniteit vertonen binnen een enkel orgaan (Gordon & Taylor, 2005). TAMs worden in het algemeen beschreven als 'M2-achtig' (zie §2.3.5.). Recent onderzoek spreekt dit echter tegen en het is gebleken dat er een grote heterogeniteit is in de TAMs (Biswas *et al.*, 2008; Movahedi *et al.*, 2010). Zo is er bewijs dat hun fenotype afhankelijk is van het stadium waarin de tumor zich bevindt, met een M1-achtig fenotype in de sites van tumorontwikkeling en een eerder M2 fenotype in de gevestigde tumor. Daarnaast kan de functie van de macrofaag, afhankelijk van zijn positie in de tumor, variëren (Biswas *et al.*, 2008). Dit concept van heterogeniteit werd onlangs bevestigd door de waarneming dat verschillende TAM populaties, die beschreven worden als M1 en M2-achtig, aanwezig zijn in verschillende muis tumormodellen (Movahedi *et al.*, 2010).

2.3.8.2. Heterogeniteit van TAMs in het TS/A model

Het concept van heterogeniteit van TAMs werd volledig uitgewerkt in het TS/A borstcarcinoom model in de BALB/c muizenstam (Figuur 2.12). Het blijkt dat de TAMs onderverdeeld kunnen worden in enerzijds een (Ly-6C^{laag}) MHCII^{hoog} en een MHCII^{laag} populatie. Op basis van gen- en oppervlaktemerkeren classificeert men deze als zijnde respectievelijk M1- en M2-achtig. Op genniveau werden *Arg1*, *Cd163*, *Stab1* (Stabilin-1) en *Mrc1* (MMR) hoger uitgedrukt in de MHCII^{laag} TAMs, tegenover de hogere expressie van genen zoals *Nos2*, *Cox2*, *Il1b*, *Il6* en *Il12b* in de MHCII^{hoog} TAMs.

Op proteïneniveau vertoonden de MHCII^{laag} TAMs hogere expressie van MMR, SR-A, IL-4R α , TNF- α en Arg1, met een hogere iNOS expressie in de MHCII^{hoog} TAMs. Ook qua lokalisatie en functie verschillen deze populaties: de MHCII^{laag} TAMs, die met de hypoxische regio's van de tumor geassocieerd zijn, vertonen onder meer een hogere angiogene capaciteit (Movahedi *et al.*, 2010).



Figuur 2.12. Heterogeniteit van TAMs. De TS/A tumor wordt geïnfiltreerd door een heterogene myeloïde populatie. De CD11b⁺ cellen worden in populaties onderverdeeld op basis van hun Ly-6C en MHCII expressie. Onder deze populaties vallen de monocyten (1), immature macrofagen (2) en de twee TAM subpopulaties: de MHCII^{laag} (4) en MHCII^{hoog} (3) TAMs (naar Movahedi *et al.*, 2010).

3. Doelstelling

Deze masterproef kadert binnen het onderzoek van het laboratorium Cellulaire en Moleculaire Immunologie, waar binnen de Cellulaire Immunologie gefocust wordt op de biologie van myeloïde cellen en macrofagen in het bijzonder. Hierbinnen valt onder meer het onderzoek naar de functies van deze cellen binnen de tumor micro-omgeving. Het onderwerp en onderzoek van deze masterproef vallen onder het IWT project van Drs. Ir. Damya Laoui, genaamd "Regulatie van de moleculaire en functionele heterogeniteit van tumor-geassocieerde macrofaag (TAM) populaties in borst- en longcarcinoommodellen". Dit project heeft als uiteindelijke doel achterhalen welke signalisatiewegen en receptoren het TAM fenotype bepalen, om op deze manier met nieuwe potentiële therapieën tegen kanker voor de dag te komen.

Het doel van deze masterproef is tweeledig. Allereerst zullen de TAM populaties (MHCII^{laag} en MHCII^{hoog}) in het 3LL-R model in C57BL/6 volledig gekarakteriseerd worden, zowel op moleculair als functioneel niveau. Dit laat toe om een vergelijking te maken met het TS/A model in BALB/c, waarvan ook een volledige karakterisatie beschikbaar is (Laoui D., 2008; Movahedi *et al.*, 2010). Dit zal hopelijk een verdere extrapolatie naar andere tumormodellen toelaten. Ook de verschillen tussen beide modellen zijn van interesse gezien deze in verband staan met de tumor micro-omgeving in een verschillende immunologische *background* (meer Th1 in C57BL/6 en meer Th2 in BALB/c). Vervolgens zullen verscheidene signalisatiewegen onderzocht worden en zal gekeken worden naar differentiële activatie in de MHCII^{hoog} en MHCII^{laag} TAMs. Dit zal de basis vormen voor later onderzoek waarin dan werk kan gemaakt worden van het specifiek uitschakelen van één van beide subpopulaties om het effect op tumorgroei en overleving na te gaan.

4. Materiaal en methoden

4.1. Media en buffers

In tabel 4.1. worden de belangrijkste buffers en media weergegeven.

Tabel 4.1. Media en buffers. Naam, samenstelling en fabrikanten van de gebruikte buffers en media.

Buffers en media	Samenstelling	Fabrikant
Compleet medium (CM)	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI)-1640 medium	Gibco ¹
	10% (v/v) hitte-geïnactiveerd foetaal kalfserum (FCS)	Gibco
	300 µg.ml ⁻¹ L-glutamine	Gibco
	100 U.ml ⁻¹ penicilline	Gibco
	100 µg.ml ⁻¹ streptomycine	Gibco
ME-medium	CM	
	0,02 mM β-mercaptoethanol	Merck ²
	1 mM natriumpyruvaat	Gibco
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS) pH 7,4	1 mM niet-essentiële aminozuren	Gibco
	8 g.l ⁻¹ NaCl	Merck
	0,2 g.l ⁻¹ KCl	Merck
	1,37 g.l ⁻¹ Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck
Erythrocyt-lysebuffer pH 7,2	0,2 g.l ⁻¹ KH ₂ PO ₄	Merck
	8,29 g.l ⁻¹ NH ₄ Cl	Merck
	1 g.l ⁻¹ KHCO ₃	Merck
MACS buffer	37,2 mg.l ⁻¹ ethyleendiaminetetraäcetaat (EDTA)	Duchefa ³
	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i> (HBSS)	Gibco
	0,5% (v/v) hitte-geïnactiveerd FCS	Gibco
Ureum buffer	2 mM EDTA	Duchefa
	6,9 M ureum	Duchefa
	8,6 mM Tris HCl pH 7,5	Sigma ⁴
	8,6% Glycerol	Duchefa
<i>Whole cell</i> lysaat (WCL) Buffer	0,86% SDS	Duchefa
	1% NP-40 (Igepal)	Sigma
	20 mM Hepes pH 7,9	Sigma
	250 mM NaCl	Merck
Nucleaire extractie buffer B1	1 mM EDTA	Duchefa
	10 mM Hepes pH 7,5	Sigma
	10 mM KCl	Merck
	1 mM MgCl ₂	Merck
	5% glycerol	Duchefa
	0,5 mM EDTA pH 7,5	Duchefa
Nucleaire extractie buffer B2	0,1 mM ethyleenglycoltetraäcetaat (EGTA) pH 7,5	Sigma
	20 mM Hepes pH 7,5	Sigma
	1% NP-40	Sigma
	1 mM MgCl ₂	Merck
	400 mM NaCl	Merck
	10 mM KCl	Merck
	20% glycerol	Duchefa
Transferbuffer	0,5 mM EDTA pH 7,5	Duchefa
	0,1 mM EGTA pH 7,5	Sigma
	20% methanol	Acros Organics ⁵
	3 g.l ⁻¹ Trizma	Sigma
	14,4 g.l ⁻¹ glycine	Acros Organics

Tabel 4.1. (vervolg)

Buffers en media	Samenstelling	Fabrikant
Western Blot Buffer W1	PBS 0,1% Tween-20 5% melkpoeder	Sigma Nestlé ⁶
Western Blot Buffer W2	PBS 0,1% Tween-20	Sigma

¹Gibco, Carlsbad, VSA; ²Merck, Darmstadt, Duitsland; ³Duchefa Biochemie, Haarlem, Nederland; ⁴Sigma-Aldrich, St. Louis, VSA; ⁵Acros Organics, Geel, België; ⁶Nestlé, Vevey, Zwitserland

4.2. Proefdieren

Binnen eenzelfde experiment werden pathogeen-vrije C57BL/6 (H-2b) (Harlan, Horst, Nederland) of BALB/c (H-2d haplotype) (Harlan) muizen van vergelijkbare leeftijd (6-8 weken) gebruikt. De dieren werden ondergebracht in het animalarium van de dienst Cellulaire en Moleculaire Immunologie (Vrije Universiteit Brussel, Etterbeek, België). Alle proefdierexperimenten en handelingen werden uitgevoerd volgens de richtlijnen van het *Belgian Council for Laboratory Animal Science* (BCLAS) geïnspireerd op de *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA).

4.3. Cellijnen en cultuurcondities

De 3LL-R kloon werd bekomen door selectie van het Lewis longcarcinoom (3LL of LLC) zoals voorheen beschreven (Remels & De Baetselier, 1987). De LLC lijn zelf, is afkomstig van een spontaan gevormd longcarcinoom van een C57BL/6 muis (Sugiura & Stock, 1955). De cellijn werd opgegroeid in weefselcultuurplaten in CM bij 37°C, 5% CO₂ en 100% luchtvochtigheid. Tumorinoculatie gebeurde via de subcutane (s.c.) injectie van 3.10⁶ 3LL-R cellen in 200 µl steriele HBSS (Gibco) in de rechterflank van een C57BL/6.

4.4. *In vitro* celculturen

Alle *in vitro* experimenten met celculturen werden uitgevoerd in de laminaire *flow*, gesteriliseerd met ethanol, volgens de basisregels van de steriliteit. Steriele cultuurplaten, tubes, pipetten, 96-well platen,... waren afkomstig van Falcon (Merck Eurolab, Leuven, België). Cellen werden geteld door een aliquot te verdunnen met een geschikte hoeveelheid 0,1% trypaan blauw (Merck) in PBS. Dode cellen kleuren hierdoor blauw en het aantal levende cellen werd bepaald aan de hand van een Burker hematocytometer, een telkamer met een telconstante van 10⁴ (totaal aantal cellen = aantal getelde cellen x verdunningsfactor x 10⁴).

4.4.1. Tumor digestie

De subcutane 3LL-R tumoren werden na 12 dagen tumorgroei verwijderd en op ijs bewaard in RPMI-1640 medium (Gibco). Ze werden in fijne stukjes gesneden en vervolgens 20 minuten bij 37°C geïncubeerd met 10 U/ml Collagenase type I (Worthington, New Jersey, VSA), 400 U/ml Collagenase type IV (Worthington) en 30 U/ml DNase I (Worthington). De gedissocieerde tumorsuspensie werd geplet en gefilterd over steriel gaas. Na centrifugatie (8 min, 1400 tpm, 4°C) werden de rode bloedcellen verwijderd door gebruik van erythrocyt-lysebuffer (5 ml, 2 min, kamertemperatuur [KT]). Na neutralisatie van deze buffer met een overmaat aan RPMI-medium en centrifugatie werden de cellen opgelost in Lymphoprep (Axis-shield, Oslo, Noorwegen) aan 10^7 cellen/ml. Deze celsuspensie werd traag bedekt met RPMI om zo een twee-fasige gradiënt te bekomen. Dit werd gecentrifugeerd (2000 tpm, 30 min, 20°C) en de interfase, die de gewenste, levende cellen bevat, werd gecollecteerd. RPMI-medium werd toegevoegd en de suspensie werd gecentrifugeerd (5 min, 2000 tpm, 4°C) als wasstap. Vervolgens werden de cellen aan de gewenste concentratie gebracht in RPMI of MACS buffer en op ijs bewaard.

4.4.2. Oogsten van miltcellen

Voor het oogsten van miltcellen en opzuiveren van CD4⁺ en CD8⁺ T cellen werden milten verwijderd en op ijs bewaard in RPMI-1640 medium. De milten werden geplet en de bekomen celsuspensie werd gefilterd over een steriel gaas. Na centrifugatie (8 min, 1400 tpm, 4°C) werden de cellen geresuspendeerd in erythrocyt-lysebuffer (5 ml, 2 min, KT). De lysebuffer werd geneutraliseerd met een overmaat medium en de cellen werden na filtratie gecentrifugeerd en geteld. Ze werden vervolgens aan de gewenste concentratie gebracht in RPMI of MACS buffer en op ijs bewaard.

4.4.3. Isoleren van cDCs

Voor de isolatie van conventionele dendritische cellen (cDCs) werden milten doorspoeld met 200 U/ml collagenase III (Worthington). Na 20 minuten incubatie bij 37°C werden ze geplet en gefilterd. De cellen werden gecentrifugeerd (1400 tpm, 8 min, 4°C) en geresuspendeerd in erythrocyt-lysebuffer (5 ml, 2 min, KT). Na filtratie werden de cellen geteld en opgelost in MACS buffer en op ijs bewaard.

4.4.4. Isoleren van peritoneale cellen

De cellen uit de buikholte werden geoogst door de binnenzijde van het peritoneum van geëuthanaseerde muizen krachtig door te spoelen met 10 ml van een steriele, visceuze

sucroseoplossing (11,6% sucrose [Duchefa Biochemie] in PBS) en deze onmiddellijk terug op te zuigen. Na centrifugatie (10 min, 1400 tpm, 4°C) werden de celpellets aan de gewenste concentratie gebracht in MACS buffer en op ijs bewaard.

4.5. Zuiveren van cellen via magnetische celsortering (MACS)

Voor de isolatie van CD11b⁺ myeloïde cellen uit de tumor celsuspensie en het selecteren van CD4⁺ en CD8⁺ T cellen en cDCs uit de miltpopulatie werd gebruik gemaakt van magnetische sortering (*magnetic activated cell sorting* of MACS). Deze zuiveringsmethode is gebaseerd op het gebruik van *beads* bestaande uit een antilichaam gekoppeld aan magnetische micropartikels, waarmee de celsuspensie geïncubeerd wordt. Dit wordt dan over een kolom gelopen die zich in een magnetisch veld bevindt, waardoor de gemerkte cellen in de kolom blijven. Zo kan er selectie of depletie van specifieke celpopulaties plaatsvinden. Het protocol en alle vereiste producten werden verkregen van Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Duitsland). Alles werd uitgevoerd volgens het protocol van de producent.

4.5.1. Opzuiveren van CD11b⁺ myeloïde cellen

Om de CD11b⁺ myeloïde cellen te isoleren uit de tumor celsuspensie, werd gebruik gemaakt van de *CD11b Microbeads* en een LS kolom, voor selectie van de cellen, geplaatst in een MACS Separator. De zuiverheid van de CD11b⁺ fractie werd door middel van FACS bepaald (zie §4.7). De selectie van myeloïde cellen werd uitgevoerd bij de opzuivering van de tumor-geassocieerde macrofaag (TAM) subpopulaties uit de 3LL-R tumoren en bij de opzuivering van peritoneale macrofagen (PEMs).

4.5.2. Opzuiveren van CD4⁺ en CD8⁺ T cellen

Om T cellen op te zuiveren uit de celsuspensie van de milt werd een CD11c depletie uitgevoerd op een LD kolom door middel van *CD11c Microbeads*. Daarna werden eerst de CD8⁺ T cellen geselecteerd met *CD8a Microbeads* en vervolgens de CD4⁺ T cellen met *CD4 Microbeads*, allebei met een LS kolom. De zuiverheid van de fracties werd door middel van FACS bepaald (zie §4.7).

4.5.3. Opzuiveren van cDCs

Ter aanrijking van cDCs werd een CD11c selectie uitgevoerd door middel van *CD11c Microbeads* op een LS kolom.

4.6. Antilichamen

In tabel 4.2. worden de antilichamen vermeld die gebruikt werden in de verschillende experimenten.

Tabel 4.2. Antilichamen. De gebruikte antilichamen in *flow* cytometrie (FC) en Western Blot (WB) (*fluorescein isothiocyanate* (FITC), *phycoerythrin* (PE), PE-cyanine (PE-Cy7), *allophycocyanine* (APC), *peridinin-chlorophyll proteïne-cyanine 5.5* (PerCP-Cy5.5), *alexa fluor* (AF), *horseradish peroxidase* (HRP))

Merker	Kloon	Isotype	Fabrikant	Toepassing
CD11b PE-Cy7	M1/70	rat IgG2b	BD Biosciences ¹	FC
Ly-6C AF647/AF488	ER-MP20	rat IgG2a	Serotec ²	FC
Ly-6G PE/FITC	1A8	rat IgG2a	BD Biosciences	FC
IA/IE PE	M5/114.15.2	rat IgG2b	BD Biosciences	FC
IA/IE PercpCy5.5	M5/114.15.2	rat IgG2b	Serotec	FC
IA/IE FITC	M5/114.15.2	rat IgG2b	eBioscience ³	FC
F4/80 PE/AF488	CI:A3-1	rat IgG2b	Serotec	FC
CD80 FITC	16-10A1	hamster IgG2	BD Bioscience	FC
CD86 FITC	GL-1	rat IgG2a	BD Bioscience	FC
CCR3 FITC	83101	rat IgG2a	R&D Systems ⁴	FC
CD11c PE	HL3	hamster IgG1	BD Bioscience	FC
PD-L2 PE	TY25	rat IgG2a	eBioscience	FC
CD62L PE	SK11	rat IgG2a	BD Bioscience	FC
B220 FITC	RA3-6B2	rat IgG2a	BD Bioscience	FC
MMR FITC	MR5D3	rat IgG2a	Serotec	FC
IL4Ra PE	mIL4R-M1	rat IgG2a	BD Biosciences	FC
TNFa APC	MP6-XT22	rat IgG1	BD Biosciences	FC
iNOS	polyclonaal	konijn IgG	Santa Cruz Biotechnology ⁵	FC
Rabbit APC	polyclonaal	geit IgG	Invitrogen ⁶	FC
MMR (CD206) PE	MR5D3	rat IgG2a	Serotec	FC
SR-A (CD204) PE	2F8	rat IgG2b	Serotec	FC
CCR3 PE	83101	rat IgG2a	R&D Systems	FC
Stab1 FITC	1.26	muis IgG1	Dr. S. Goerd ⁷	FC
Mgl FITC	ER-MP23	rat IgG2a	Serotec	FC
Cdh1 PE	ECCD2	rat IgG2a	Dr. M. Takeichi ⁸	FC
CCR2	MC-21	rat IgG1	Dr. M. Mack ⁹	FC
Fc block (CD16/CD32)	2.4G2	Rat IgG2b	BD Biosciences	FC
Stat1 (pY701) AF488	4a	Muis IgG2a	BD Biosciences	FC
Stat3 (pY705) AF488	4/P-STAT3	Muis IgG2a	BD Biosciences	FC
Isotype control	MOPC-173	Muis IgG2a	BD Biosciences	FC
HP-1 FITC	4.3.11.3	muis IgG1	HPI Inc. ¹⁰	FC
Stat1	polyclonaal	konijn IgG	Cell Signaling ¹¹	WB
Phospho-Stat1 (Tyr701)	polyclonaal	konijn IgG	Cell Signaling	WB
Stat3 (C20)	polyclonaal	konijn IgG	Santa Cruz Biotechnology	WB
p-Stat3 (B-7)	B-7	muis IgG2b	Santa Cruz Biotechnology	WB
Stat6 (M20)	polyclonaal	konijn IgG	Santa Cruz Biotechnology	WB

Tabel 4.2. (vervolg)

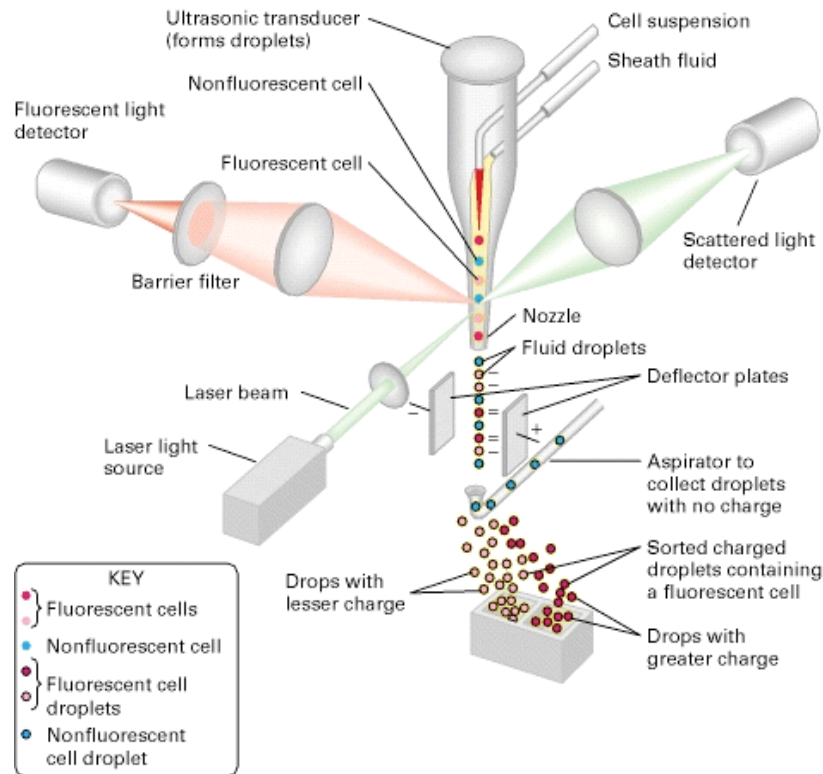
Merker	Kloon	Isotype	Fabrikant	Toepassing
p-Stat6 (Tyr641)	polyclonaal	konijn IgG	Santa Cruz Biotechnology	WB
NF-κB p65 (C-20)	polyclonaal	konijn IgG	Santa Cruz Biotechnology	WB
NF-κB p50 (C-19)	polyclonaal	geit IgG	Santa Cruz Biotechnology	WB
Histone H1 (AE-4)	AE-4	muis IgG2a	Santa Cruz Biotechnology	WB
HIF-1α (NB 100-449)	polyclonaal	konijn IgG	Novus Biologicals ¹²	WB
HIF-2α	polyclonaal	konijn IgG	Novus Biologicals	WB
β-actine (AC-15)	AC-15	muis IgG1	Abcam ¹³	WB
anti-goat-HRP (sc-2020)	polyclonaal	ezel IgG	Santa Cruz Biotechnology	WB
anti-Rabbit-HRP	polyclonaal	geit IgG	Sigma ¹⁴	WB
anti-Mouse-HRP	polyclonaal	geit IgG	Sigma	WB

¹BD Biosciences, Erembodegem, België; ²Serotec, Oxford, VK; ³eBioscience, San Diego, VS; ⁴R&D Systems, Minneapolis, VS; ⁵Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Duitsland; ⁶Invitrogen, Carlsbad, California, VSA; ⁷Dr. S. Goerdt (Universiteit van Heidelberg, Heidelberg, Duitsland); ⁸Dr. M. Takeichi (Universiteit van Kyoto, Kyoto, Japan); ⁹Dr. M. Mack (Universiteit van Regensburg, Regensburg, Duitsland); ¹⁰HPI Inc., Burlington, VSA; ¹¹Cell Signaling Technology, Leiden, Nederland; ¹²Novus Biologicals, Cambridge, VK; ¹³Abcam, Oxford, VK; ¹⁴Sigma-Aldrich, St. Louis, VSA.

4.7. Flow cytometrische analyse en sortering van cellen met de *Fluorescent Activated Cell Sorter* (FACS)

4.7.1. Werkingsprincipe

Flow cytometrie is een methode om cellen te scheiden op basis van verschillen in antigenexpressie. Hiermee kunnen het fenotype en de karakteristieken van cellen onderzocht worden en verschillende celtypes binnen een heterogene populatie geïdentificeerd worden. De cellen worden vóór analyse geïncubeerd met fluorescent gelabelde antilichamen, die specifiek kunnen zijn voor zowel extracellulaire oppervlakte- als intracellulaire moleculen. De celsuspensie passeert dan, cel per cel, in een stroom langs een laser, waarbij er enerzijds lichtbreking optreedt die informatie geeft over de grootte van de cel (*Forward Scatter*, FSC) en de dichtheid en granulositeit (*Side Scatter*, SSC). Daarnaast geeft de fluorescente emissie informatie over de aanwezigheid en expressieniveaus van de verschillende merkers. Naast het analyseren van celpopulaties kan een FACS ook populaties scheiden en collecteren op basis van multiparameter analyse (Figuur 4.1). Wanneer een cel gedetecteerd wordt die voldoet aan de parameters voor sortering, wordt een elektrische lading gegeven aan de druppel, die doorheen een elektrostatisch veld passeert en hierbij gedeflecteerd wordt om zo te belanden in de correcte opvangtube (Macey, 2007).



Figuur 4.1. Werking van een FACS. De celsuspensie wordt onder druk doorheen een *nozzle* of straalpijp gestuurd, waardoor een stroom met individuele cellen verkregen wordt. Detectie vindt plaats wanneer de cellen langs de laser passeren. Wanneer de FACS als *sorter* gebruikt wordt, kan aan een cel een lading gegeven worden, waardoor ze in een verzameltube belandt (uit Lodish *et al.*, 2000).

4.7.2. Flow cytometrische analyses

De antilichamen die gebruikt werden tijdens de *flow* cytometrische analyses zijn weergegeven in tabel 4.2. De data werd opgenomen met een FACSCanto II (BD Biosciences, Erembodegem, België) en geanalyseerd met FlowJo software (FlowJo, Ashland, VSA).

4.7.2.1. Extracellulaire *flow* cytometrie

Afhankelijk van het experiment werden 10^5 tot 10^6 cellen gebruikt per FACS-kleuring. De cellen werden eerst gedurende 20 minuten geïncubeerd met $1 \mu\text{g}$ rat anti-muis CD16/CD32, om de Fc receptoren op de cellen te blokkeren. Nadien werden de cellen gedurende 20 minuten geïncubeerd met fluorescent gemerkte antilichamen ($1 \mu\text{g}$ per 10^7 cellen) die de gewenste oppervlaktemarkers specifiek herkennen. Tijdens elke stap werden de cellen in het donker geïncubeerd op ijswater. Na de incubatie werden de cellen gewassen met 2 ml ijskoude MACS buffer en gedurende 8 minuten gecentrifugeerd aan 1400 tpm bij 4°C om ongebonden antilichamen te verwijderen. Vervolgens werd het supernatans afgegoten en werden de bekomen celpellets geresuspendeerd in $100 \mu\text{l}$ MACS buffer.

4.7.2.2. Intracellulaire *flow* cytometrie

Naast het detecteren van extracellulaire oppervlaktemerkers kunnen ook intracellulaire moleculen, zoals het cytoplasmatisch enzyme *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) en het gesecreterde cytokine tumor necrosis factor α (TNF- α), geanalyseerd worden met FACS. Afhankelijk van het experiment werden $5 \cdot 10^5$ tot 10^6 cellen (na gradiënt) in 200 μ l CM in cultuur gebracht in 96-*well* platen met ronde bodem.

Voor TNF- α kleuring werd, na 1h *in vitro* cultuur, Brefeldine A (BD Biosciences) toegevoegd. Dit is een lacton antibioticum, dat ervoor zorgt dat de cellen nog steeds cytokines kunnen produceren, maar deze niet meer via Golgi-vesikels kunnen secreteren. Hierdoor blijft TNF- α in de cel aanwezig. Dit incubeerde dan voor nog eens vijf uur. Daar iNOS niet wordt gesecreteerd, is er geen Brefeldine voor deze kleuring vereist. Omdat de intracellulaire kleuring van iNOS minder gevoelig is, werden deze culturen gedurende zes uur gestimuleerd met 10 U/ml interferon γ (IFN- γ) (BD Biosciences), 10 ng/ml *Escherichia coli* lipopolysacharide (LPS) of beide. Vervolgens werd voor beide kleuringen een analoog protocol gevolgd. Allereerst werd de 96-*well* plaat 5 minuten gecentrifugeerd aan 2000 tpm bij 4°C. Het supernatans werd verwijderd en er werd gedurende 20 minuten bij 4°C geïncubeerd met 1 μ g anti-CD16/32. Vervolgens werden de gelabelde antilichamen voor de extracellulaire oppervlaktekleuring toegevoegd om de subpopulaties te kunnen onderscheiden. Na 25 minuten incubatie bij 4°C werd er gewassen met ijskoude HBBS, waarna gecentrifugeerd werd (2000 tpm, 5 min, 4°C). Deze wasstap werd tweemaal herhaald. Vervolgens werden de cellen gefixeerd door ze 25 minuten te incuberen met 100 μ l Cytofix/Cytoperm fixatiebuffer (eBiosciences, San Diego, VSA) in het donker bij 4°C. Hierdoor ontstaan poriën in de cel via dewelke intracellulaire antilichamen hun doelwitmoleculen kunnen bereiken. Hierna werden de cellen tweemaal gewassen met Cytoperm permeabilisatiebuffer (eBiosciences). Vervolgens werden de fluorescent gelabelde antilichamen voor de intracellulaire detectie van cytokines, opgelost in permeabilisatiebuffer, aan de cellen toegevoegd. Na een incubatieperiode van 30 minuten werden de cellen tweemaal gewassen door toevoegen van permeabilisatiebuffer en centrifugatie van 5 minuten aan 2000 tpm op 4°C. Ten slotte werden de bekomen celpellets geresuspendeerd in 200 μ l koude HBBS en overgebracht naar FACS tubes.

Voor de analyse van de intracellulaire FACS data van iNOS werd gebruik gemaakt van de MFI. Dit is de *Median Fluorescence Intensity* en deze werd gebruikt in plaats van de *Mean Fluorescence Intensity*, gezien FACS plots logaritmische schalen hanteren en dat de beste schatting voor een 'logaritmisch gemiddelde' de mediaan is (Macey, 2007). Er werd gebruik gemaakt van een relatieve MFI, de Δ MFI, om rekening te houden met het

isotype. Dit werd tot slot genormaliseerd. De bekomen *normalized* Δ MFI, oftewel $N\Delta$ MFI werd gedefinieerd als $N\Delta$ MFI = $((MFI_{\text{anti-iNOS}} - MFI_{\text{isotype}}) / MFI_{\text{anti-iNOS}}) \times 100$.

4.7.2.3. Fosfospecifieke *flow* cytometrie of Phosflow

Met fosfospecifieke *flow* cytometrie of Phosflow kunnen intracellulaire signalisatiewegen in complexe celpopulaties geanalyseerd worden. Hierbij kunnen cellen in principe terzelfdertijd onderscheiden worden op basis van hun oppervlaktemerkerexpressie en niveau van fosfoproteïne (Kruzick *et al.*, 2005). Doordat de fixatiestap in het protocol de werking van de oppervlaktespecifieke antilichamen beïnvloedt (Kruzick *et al.*, 2005) en dit de identificatie van de subpopulaties erg bemoeilijkt, werd ervoor gekozen om eerst de TAM subpopulaties op te zuiveren (zie §4.7.3.1) en met deze cellen verder te werken. De FACS gesorteerde TAM subpopulaties werden op een concentratie van 10^6 /ml gebracht met ME-medium en in een 15 ml falcon overgezet. Dit werd twee uur bij 37°C geïncubeerd. Hierna werden de cellen overgebracht in een 48 *well* plaat (100 μ l per *well*). De cellen werden vervolgens ofwel ongestimuleerd gelaten of voor 5 of 15 minuten gestimuleerd bij 37°C met 100 U/ml IFN- γ voor P-STAT1 detectie of 100 U/ml IL-10 voor P-STAT3. Na stimulatie werd er gefixeerd met Lyse Fix Buffer (BD Biosciences) om de fosforylatie te behouden, waarna de plaat 10 à 15 min geïncubeerd werd bij 37°C. Er werd gecentrifugeerd (5 min, 2000 tpm, 4°C) en het supernatans verwijderd. De fixatiestap werd herhaald, met eenzelfde incubatie en centrifugatiestap. Opnieuw werd het supernatans verwijderd en de plaat werd gevortext. Permeabilisatie van de cellen volgde door toevoegen van Perm BufferIII (BD Biosciences) die vooraf bij -20°C was afgekoeld. Dit werd 30 min op ijs geïncubeerd, waarna twee wasstappen met HBSS +1% FCS volgden. De cellen werden vervolgens overgebracht in FACS tubes en hieraan werden de fosfospecifieke FACS antilichamen toegevoegd. Na 20 min incubatie bij KT werd tot slot nog tweemaal gewassen met HBSS +1% FCS.

4.7.2.4. Detectie van hypoxie

Om de lokalisatie van de TAM subpopulaties in hypoxische/normoxische regio's van de tumor te bepalen, werd gebruik gemaakt van pimonidazole hydrochloride (Hypoxyprobe-1, HP-1; HPI Inc., Burlington, VSA). Pimonidazole vormt chemische complexen met proteïnen in regio's van hypoxie en het zijn deze complexen die gedetecteerd kunnen worden door middel van intracellulaire FACS. Hiervoor werd enerzijds HBSS (controle), anderzijds 80 mg/kg HP-1 ingespoten in tumordragende C57BL/6 muizen en twee uur later werden de tumoren verwijderd en het protocol gevolgd zoals beschreven in §4.4.1. De complexen werden gedetecteerd met het anti-HP-1 antilichaam (Tabel 4.2). Net als bij de data-analyse van de intracellulaire FACS voor iNOS werd hier ook gebruik gemaakt

van Δ MFI waarden. De HP-1 Δ MFI werd hier gedefinieerd als: Δ MFI = $\frac{(MFI_{HP-1} - MFI_{controle})}{MFI_{HP-1}} \times 100$.

4.7.3. Sorteren van cellen

Cellen werden gesorteerd door middel van een BD FACSAria II (BD Biosciences). Na sortering werden de bekomen cellen gecentrifugeerd (1400 tpm, 8 min, 4°C) en geteld. Vervolgens werden ze op concentratie gebracht met het geschikte medium.

4.7.3.1. Sorteren van de MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} subpopulaties

De TAM subpopulaties werden typisch gesorteerd uit 6 individuele tumoren. Hierbij werd enerzijds gesorteerd voor de CD11b⁺Ly-6G⁻Ly-6C^{laag}MHCII^{laag} en de CD11b⁺Ly-6G⁻Ly-6C^{laag}MHCII^{hoog} cellen. De zuiverheid van de populaties lag altijd rond de 90% of hoger.

4.7.3.2. Sorteren van cDCs

Om de milt cDCs te sorteren, werd geselecteerd voor cellen die CD11c^{hoog}MHCII^{hoog}B220^{neg}CD11b^{hoog}Ly6C^{neg} zijn.

4.7.3.3. Sorteren van peritoneale macrofagen

Om de PEMs te bekomen, werd gesorteerd voor de CD11b⁺F4/80⁺Ly-6C⁻MHCII^{int} cellen.

4.8. Kwantitatieve Reverse Transcriptase Polymerasekettingreactie (RT-PCR)

4.8.1. Bereiding van totaal RNA

Alle handelingen met RNA-stalen gebeurden steeds op ijs en in RNase vrije condities (handschoenen, RNase-vrije agentia). Voor het bereiden van ruwe celextracten van gesorteerde TAM subpopulaties of peritoneale macrofagen werden ongeveer $5 \cdot 10^6$ cellen na centrifugatie geresuspendeerd in 1 ml TRIzol reagens (Invitrogen, Carlsbad, California, VSA) en overgebracht in een steriele en RNase vrije Eppendorf tube. Na 15 minuten lyseren bij KT werden de stalen bij -80°C ingevroren en bewaard tot verder gebruik.

De bereiding van totaal RNA uit cellen in 1 ml TRIzol gebeurde zoals beschreven door de fabrikant. Na toevoegen van 0,2 ml chloroform (Merck) en 15 sec schudden, werden de stalen gedurende 2 minuten geïncubeerd bij KT. Er werd gecentrifugeerd (15 min,

12000g, 4°C), waarna de RNA-bevattende waterige bovenste fase naar een verse, steriele, RNase-vrije Eppendorf tube werd getransfereerd. Hierin werd het RNA geprecipiteerd door 0,5 ml iso-propylalcohol (VWR International, Fontenay sous Bois, Frankrijk) toe te voegen en deze oplossing 10 minuten te incuberen bij KT. Na een tweede centrifugatiestap (10 min, 12000g, 4°C) werd het supernatans verwijderd en werd het RNA-pellet gewassen (5 min, 7500g, 4°C) in 1 ml 75% ethanol (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, VSA). Vervolgens werd het pellet aan de lucht gedroogd en werd het bekomen RNA opgelost in 25 µl DEPC-behandeld water (Sigma). Dit staal werd gedurende 10 minuten geïncubeerd bij 60°C alvorens bij -80°C gestockeerd te worden voor verder gebruik.

4.8.2. Reverse transcriptie

De hoeveelheid RNA werd gekwantificeerd door de optische dichtheid (OD) te meten bij 260 nm in een NanoDrop ND-1000 (Isogen Life Science, De Meern, Nederland). De zuiverheid van het RNA werd nagegaan via spectrofotometrische analyse ($OD_{260nm}/OD_{280nm} = 1,8$ à 2 voor zuiver RNA) en de RNA-concentratie werd bepaald (RNA concentratie = $OD_{260nm} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{verdunningsfactor}$). In de *reverse* transcriptie werd gebruik gemaakt van 500 ng à 1 µg totaal RNA in 10 µl DEPC-water om cDNA te produceren. Door gebruik te maken van oligo(dT) primers werd enkel mRNA met een poly-A staart omgezet in cDNA door Superscript II *reverse* transcriptase. De *reverse* transcriptie werd uitgevoerd op een T3 thermocycler (Whatman Biometra, Göttinger, Duitsland). De condities staan vermeld in tabel 4.3.

Tabel 4.3. Condities voor de *reverse* transcriptie. De samenstelling per reactie en het gebruikte *reverse* transcriptie programma worden weergegeven (DTT: dithiotreitol; HPRI: *human placental ribonuclease inhibitor*).

Samenstelling per reactie		RT programma	
Bestanddeel	Volume (µl)	Temperatuur (°C)	Tijd (min)
RNA (0,1 µg/µl)	10	72	10
Oligo(dT) (500 µg/ml)	1	Directe koeling op ijs	
5x First Strand Buffer ¹	4	42	50
0.1 M DTT ¹	2	70	15
10 mM dNTP Mix ¹	1	4	∞
HPRI (40 U/µl) ² Rnase Inhibitor	1/3		
DEPC-water	2/3		
Superscript II (200 U/µl) ¹	1		
	Σ 20		

¹Invitrogen, Carlsbad, California, VSA; ²Amersham Biosciences, Buckinghamshire, VK

4.8.3. *Real-time* PCR

4.8.3.1. Principe

Real-time PCR wordt gebruikt om amplificatie van een bepaalde cDNA-*template* te detecteren en laat toe de verschillen in genexpressie te kwantificeren. De detectie is gebaseerd op de aanwezigheid van een fluorochroom, waarvan het signaal rechtevenredig toeneemt met de hoeveelheid PCR product (Nolan *et al.*, 2006). Er werd gebruik gemaakt van SYBR Green (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, VSA), een intercalerend fluorescente reporter-molecule die weinig fluoresceert in ongebonden toestand. SYBR Green bindt specifiek in de kleine groef van dubbelstrengig DNA en zal in deze toestand sterk fluoresceren. Voor elk geanalyseerd staal werd de *threshold cycle* (C_t waarde) bepaald. Deze waarde geeft aan hoeveel cycli er nodig zijn om de fluorescentie intensiteit boven de drempelwaarde te laten komen. De C_t waarde is proportioneel met de initiële hoeveelheid DNA-*template*: als de PCR 100% efficiënt is, zal de C_t -waarde met 1 cyclus dalen wanneer de concentratie aan *template* verdubbelt.

4.8.3.2. Experimentele uitvoering

Real-time PCR experimenten werden uitgevoerd op een iCycler iQ (Bio-Rad Laboratories). Tabel 4.4. geeft de samenstelling van het reactiemengsel en het *real-time* PCR programma weer.

Tabel 4.4. Conditie voor de *real time* PCR. De samenstelling per reactie en het gebruikte PCR programma worden weergegeven.

Samenstelling per reactie		PCR programma		
Bestanddeel	Volume (μ l)	Temperatuur ($^{\circ}$ C)	Tijd	
Platinum SYBR Green supermix	12.5	40 cycli {	95	3'
10 pmol/ μ l sense primer	1		94	1'
10 pmol/ μ l antisense primer	1		54	45"
Water	6.5		72	1' 10"
cDNA (1/40 verdunning)	4			
Σ	25			

Ribosomaal proteïne S12 (muis) werd als huishoudgen (*housekeeping gene*) in elk experiment onderzocht om er zeker van te zijn dat de waargenomen verschillen in expressie niet te wijten waren aan ongelijke hoeveelheden *template* cDNA. In de analyses werd de expressie van elk gen steeds genormaliseerd ten opzichte van dit huishoudgen. De gebruikte primers voor de onderzochte genen worden weergegeven in tabel 4.5.

Tabel 4.5. Primers voor RT-PCR. De naam van het gen (muis) en de sequenties van de *sense* en *antisense* primers worden weergegeven.

	Sense Primer	Antisense Primer
<i>Ccl17</i>	CCCATGAAGACCTTCACCTC	CATCCCTGGAACACTCCACT
<i>Fizz1</i>	CCCAGGATGCCAACTTTGAA	GGCCCATCTGTTTCATAGTCT
<i>Ccr2</i>	CTCAGTTCATCCACGGCATA	CAAGGCTCACCATCATCGTA
<i>Cdh1</i>	ACTTGGGGACAGCAACATCA	GGGTTTAAATCGGCCAGCAT
<i>Cx3cr1</i>	CACCATTAGTCTGGGCGTCT	GATGCGGAAGTAGCAAAAGC
<i>Il-1β</i>	GTGTGGATCCAAAGCAATAC	GTCTGCTCATTTCATGACAAG
<i>Pgf</i>	GCACTGTGTGCCGATAAAGA	TACCTCCGGGAAATGACATC
<i>Ptgs2 (COX-2)</i>	CAGGCTGAACTTCGAAACAG	CAGCTACGAAAACCCAATCA
<i>Tek (Tie-2)</i>	ACTTCGCAGGAGAACTGGAG	AAGAAGCTGTTGGGAGGACA
<i>c-Rel</i>	TGGGATCAACTGGAGAAGGA	AGGCCCTTCTAGGAATGGAA
<i>Mmp2</i>	AGCGTGAAGTTTGAAGCAT	GCCCTCCTAAGCCAGTCTCT
<i>Cx3cl1</i>	ACTCCTTGATTGGTGGAAAGC	CAAAATGGCACAGACATTGG
<i>Cxcl11</i>	TCCTTTCCCAAATATCACG	CAGCCATCCCTACCATTTCAT
<i>THBS2 (TSP1)</i>	CGTTGCCATTGGAATAGAGA	TGGCAAAGAGTCAAAACTGG
<i>Mgl2</i>	GATAACTGGCATGGACATATG	TTTCTAATCACATAACACATTC
<i>Ym(1/2)</i>	GGGCATACCTTTATCCTGAG	CCACTGAAGTCATCCATGTC
<i>Cxcl10</i>	TCTGAGTCCTCGCTCAAGTG	CCTTGGGAAGATGGTGGTTA
<i>Mif</i>	CTTTTAGCGGCACGAACGAT	AAGAACAGCGGTGCAGGTAA
<i>Cxcl9</i>	TCAACAAAAGAGCTGCCAAA	GCAGAGGCCAGAAGAGAGAA
<i>Hif1a</i>	ATGGTAGCCACAATTGCACA	AAATGCCACATACCTTCCAGA
<i>Tnf</i>	CCTTCACAGAGCAATGACTC	GTCTACTCCCAGTTCTCTTC
<i>Pafah</i>	TGCACCAGAACTTTGACGAC	CAACTGTGTAACAAGCAAGTTC
<i>p50</i>	CACAGAGGCCATTGAAGTGA	TAGGTCCTTCCTGCCATAA
<i>Ccl5</i>	GTGCCACGTC AAGGAGTAT	AGCAAGCAATGACAGGGAAG
<i>RelB</i>	GGAATCGAGAGCAAACGAAG	GGATCATAGGCAAAGCCATC
<i>RelA</i>	CCCTCAGCACCATCAACTTT	CTTTGGAACAGGTGCAGACA
<i>THBS2 (TSP2)</i>	GAAAGCATACCTGGCTGGAC	ACAAAAGAGCCGTACCTGGA
<i>Ccl1</i>	GGATGTTGACAGCAAGAGCA	CTCATCTTCACCCCGGTTAG
<i>Trem2</i>	GTGCTGGAGGACCCTCTAG	GTCCAGTGAGGATCTGAAGT
<i>Stat3</i>	GACCCGCCAACAAATTAAGA	TCGTGGTAAACTGGACACCA
<i>Il-6</i>	GTCTTCTGGAGTACCATAG	GTCAGATACCTGACAACAGG
<i>angpt1</i>	CACAATTTGCCATGAAAGGA	AAGATGTGGTGGGAAGCATT
<i>Cxcl16</i>	GTCTCCTGCCTCCACTTTCT	CTAAGGGCAGAGGGGCTATT
<i>Vegf</i>	CAGGCTGCTGTAACGATGAA	AATGCTTTCTCCGCTCTGAA
<i>p52</i>	TTTCCTTCGAGCTAGCGATG	AACCGAACCTCAATGTCGTC
<i>Il-12p40</i>	GAAAGACCCTGACCATCACT	CCTTCTCTGCAGACAGAGAC
<i>Adamts1</i>	CTGGGCAAGAAATCTGATGA	TGGTTGTGGCAGGAAAGATA
<i>Il-1a</i>	TTTCAAAGGAAGGGGACAA	CCACCTAGAAAACCCTGCTG
<i>Mgl1</i>	ATGATGTCTGCCAGAGAACC	ATCACGCTTTCAGCAACCTTA
<i>SPP1</i>	GCTTGGCTTATGGACTGAGG	CTTGTCTTGTGGCTGTGAA
<i>Ccl2</i>	CACTCACCTGCTGCTACTCATTAC	GGATTCACAGAGAGGAAAAATGG
<i>Prosaposin</i>	GCCATTGTCATAGCACAGAG	CTTCACTCATGAGGTGAACAG
<i>Ccl11</i>	CTCCACAGCGCTTCTATTCC	CTTCTTCTTGGGGTTCAGCAC

Tabel 4.5. (vervolg)

	Sense Primer	Antisense Primer
<i>Ccl6</i>	ATGTCCAGCTTTGTGGGTTTC	AGGTCAGGTTCCGCAGATAA
<i>Cxcl1</i>	TCATAGCCACACTCAAGAATG	AAGCAGAAGTGAAGTACCATC
<i>Stat1</i>	CGAAGAGCGACCAAAAACAG	TGCTGGAAGAGGAGGAAGGT
<i>Ccl3</i>	CGGAAGATTCCACGCCAATTC	GGTGAGGAACGTGTCCTGAAG
<i>Arg1</i>	TCACCTGAGCTTTGATGTCTG	TTATGGTTACCCTCCCCTTG
<i>Tgfb</i>	CCAAGGAGACGGAATACAGG	TCTCTGTGGAGCTGAAGCAA
<i>Hif2a</i>	AAGCCCATCAGGCAAGAGTA	TAACGCTGAGGCAACAACAC
<i>Il-10</i>	ACTCAATACACTGCAGGTG	GGACTTTAAGGGTACTTGG
<i>Ccl7</i>	GACAAAGAAGGGCATGGAAG	CATTCCTTAGGCGTGACCAT
<i>Timp2</i>	ATCGAACCCAGAGTGGAATG	GCTAGAAACCCAGCATGAG
<i>Ctsd</i>	CCTTCGCGATTATCAGAATCC	TACTTATGGTGGACCCAGCA
<i>Ccl4</i>	CCCACCTCCTGCTGTTTCTC	GAGCAAGGACGCTTCTCAGT
<i>Nos2 (iNOS)</i>	GCTTCTGGTTCGATGTCATGAG	TCCACCAGGAGATGTTGAAC
<i>uPA</i>	TCTCCTGGGCAAGTGTAGGA	GCCTGTGCAGAGTGAACAAA
<i>Ccl12</i>	GCCTCCTGCTCATAGCTACC	GGGTCAGCACAGATCTCCTT
<i>Mrc1 (MMR)</i>	GCAAATGGAGCCGTCTGTGC	CTCGTGGATCTCCGTGACAC
<i>Il-4ra</i>	GCAGATGGCTCATGTCTGAA	CTCTGGGAAGCTGGGTGTAG
<i>angpt2</i>	GCATGTGGTCTTCCAACCTT	GATCCTCAGCCACAACCTTC
<i>Igf1</i>	TGACATGCCCAAGACTCAGA	AGGTTGCTCAAGCAGCAAAG
<i>Folr2</i>	GGAGCTACACAAGGCTGAC	TGTGACAGGGTGTGTGTTT
<i>Mmp9</i>	CATTCGAACACCACGCTGTG	GGAAAGGCGTGTGCCAGAAG
<i>Ccl8</i>	TCTACGCAGTGCTTCTTTGC	CCACTTCTGTGTGGGGTCTA
<i>Sep</i>	TTCTGCAGGCATCCAGATTG	CACAAGACGGCCACATCTGT
<i>Mmp14</i>	CCGGTACTACTGCTGCTCCT	CACACACCGAGCTGTGAGAT
<i>Gas6</i>	GATGTCAATGAGTGTGTCCAGAA	GCAAGCGAGAAGCCACTATG
<i>Lyve1</i>	CTGGCTGTTTGCTACGTGAA	CATGAAACTTGCCTCGTGTG
<i>Ccl22</i>	TGACTTGGGTCCCTTGCTCCTC	AAGGAAGCCACCAATGACAC
<i>Stab1</i>	ACGGGAAACTGCTTGATGTC	ACTCAGCGTCATGTTGTCCA
<i>Gas3</i>	GTAATGGACACACGACTGATC	GGAGTAGTCAGTGTGACATG
<i>CD163</i>	GAGCATGAATGAAGTGTCCG	TGCTGAAGTTGTCGTCACAC
<i>S12</i>	GGAAGGCATAGCTGCTGGAGGTGT	CCTCGATGACATCCTTGGCCTGAG

De bekomen data voor de MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs komen van drie onafhankelijke experimenten, uitgevoerd in triplicaat, waardoor een foutenanalyse mogelijk werd gemaakt. De data van de PEMs zijn afkomstig van één experiment uitgevoerd in triplicaat en dit werd dus niet statistisch geanalyseerd.

De genormaliseerde genexpressie van een gen x werd als volgt bepaald:

$$E_x = 2^{(40-Ct)}$$

$$E_{x,norm.} = E_{x,gem.} / E_{n,gem.}$$

Waarin

C_t = *threshold cycle* ;

E_x = expressie van gen x ;

$E_{x,norm.}$ = expressie van gen x genormaliseerd ten opzichte van huishoudgen ;

$E_{x,gem.}$ = gemiddelde expressie van gen x ;

$E_{n,gem.}$ = gemiddelde expressie van huishoudgen (S12) ;

Het is op de $E_{x,norm.}$ waarden dat een gepaarde student t-test werd uitgevoerd. De genormaliseerde genexpressie van de MHCII^{hoog} TAMs werd dan tenslotte relatief uitgedrukt, zowel ten opzichte van de genormaliseerde genexpressie van de MHCII^{laag} TAMs als ten opzichte van de PEMS.

$$E_{x,rel.norm.} = E_{x,norm.} / E_{r,norm.gem.}$$

Waarin

$E_{x,norm.}$ = expressie van gen x in de MHCII^{hoog} TAMs ten opzichte van het huishoudgen ;

$E_{r,norm.gem.}$ = gemiddelde expressie van gen x in het referentiestaal (de MHCII^{laag} TAMs of PEMS), genormaliseerd ten opzichte van het huishoudgen ;

$E_{x,rel.norm.}$ = relatieve genormaliseerde expressie van gen x, dit is relatief ten opzichte van het referentiestaal en genormaliseerd ten opzichte van het huishoudgen ;

Tot slot werd voor de $E_{x,rel.norm.}$ telkens een 90% geometrisch betrouwbaarheidsinterval bepaald.

4.9. Arginase activiteit en NO meting

Voor de arginase pellets werden $5 \cdot 10^5$ cellen van de gesorteerde TAM subpopulaties gecentrifugeerd (2000 tpm, 10 min, 4°C), waarna het pellet werd geresuspendeerd in 50 µl Triton X-100 (Sigma) en 15 minuten lyseerde op KT. Deze werden vervolgens ingevroren bij -20°C. Arginase katalyseert de omzetting van L-arginine tot ornithine en ureum en het is de concentratie van deze laatste die via een kleurreactie werd gedetecteerd. Hiervoor werd aan 17 µl lysaat, 17 µl 25 mM Tris-HCl (Sigma) en 6 µl 10 mM mangaanchloride (MnCl₂; Sigma) toegevoegd. Om het arginase te activeren werd dit 10 min bij 56°C in een PCR blok geïncubeerd. Voor de arginine hydrolyse werd 40 µl 0,5 M L-arginine (Sigma) toegevoegd en dit werd 60 min bij 37°C geïncubeerd. De reactie werd stopgezet door 320 µl *acid mix* (H₂SO₄ (96%)/H₃PO₄ (85%)/H₂O (1v/3v/7v))

(Merck) toe te voegen. Vervolgens werd 6 μl isonitrosopropiophenone (ISPF) (Sigma) toegevoegd en dit werd 30 min bij 95°C verhit en vervolgens afgekoeld tot KT. Aan de hand van een standaardcurve van ureum (100 mM - 0 mM) (Duchefa) werd de concentratie bepaald bij 540 nm in een Elx 808 IU Ultra Microplate Reader (BioTek Instrument Inc., Winooski, Vermont, VSA). Eén unit enzymatische activiteit wordt gedefinieerd als de hoeveelheid enzyme die de vorming van 1 μmol ureum per minuut katalyseert.

Voor de NO metingen werden $3 \cdot 10^5$ cellen uitgezet per 200 μl ME in een 96-well plaat. Na 24 en 48h incubatie bij 37°C, 5% CO₂ en 100% luchtvochtigheid, werd 75 μl supernatans genomen en dit werd ingevroren bij -20°C. De NO productie werd gemeten onder de vorm van nitriet (NO₂⁻) door middel van Griess reagens (Sigma). Al het gedetecteerde NO₂⁻ is hierbij afkomstig van NO. Hiervan werd 50 μl toegevoegd aan 50 μl supernatans waarna de absorptie werd gemeten bij 550 nm. De nitriet concentratie werd bepaald door middel van een natriumnitriet (NaNO₂; Merck) standaardcurve (Liu *et al.*, 2003).

4.10. Analyse van de suppressie van de gemengde leukocyt reactie (MLR)

Deze *assay* is gebaseerd op de aanwezigheid van alloreactieve T cellen (1 op 10³-10⁴). Dit zijn T cellen die de combinatie van peptide en allogeneïsche MHC moleculen herkennen, waar niet voor geselecteerd is geweest tijdens de thymische ontwikkeling (Felix & Allen, 2007). In een gemengde leukocyt reactie (*mixed leukocyte reaction* of MLR) worden *responder* lymfocyten samen met *stimulator* APCs van een allogeneïsche muisstam samen in cultuur gebracht. Uit de milt van naïeve BALB/c muizen werden CD4⁺ en CD8⁺ T cellen opgezuiverd zoals beschreven in §4.5.2. Deze werden aan $2 \cdot 10^5$ per well in 96-well platen met ronde bodem uitgezet in 200 μl ME. Teneinde te onderzoeken of de TAM subpopulaties de T-cel activering in een MLR kunnen onderdrukken werden deze in verschillende hoeveelheden (0,625.10⁴; 1,25.10⁴; 2,5.10⁴; 5.10⁴; 10⁵; 2.10⁵ cellen) aan de MLR toegevoegd in een finaal volume van 200 μl ME. Hiervoor werden, twaalf dagen na 3LL-R tumorinoculatie, TAMs opgezuiverd zoals vermeld in §4.7.3.1. Elke conditie werd steeds in triplicaat uitgevoerd. Als positieve controle werden cDCs gebruikt (Steinman & Witmer, 1978). Bij een vaste verhouding TAMs:CD4⁺/CD8⁺ T cellen van 1:4 werden inhibitoren toegevoegd, namelijk de iNOS inhibitor N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) (Sigma) (Hibbs *et al.*, 1987) aan een finale concentratie van 1 mM en de arginase inhibitor (Custot *et al.*, 1997) N^ω-Hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA) (Merck) aan een finale concentratie van 0,5 mM of beide. Na 3 dagen incubatie bij 37°C, 5% CO₂ en 100% luchtvochtigheid werd aan de wells 1 μCi methyl-[³H]-thymidine

(Amersham, Gent, België) toegevoegd. Thymidine wordt bij deling geïncorporeerd in het DNA van de cellen, zodat de hoeveelheid radioactiviteit in het DNA van de cellen een maat is voor hun proliferatie. Na 18 uur verdere proliferatie werden de platen ingevroren bij -20°C . Het oogsten van de cellen gebeurde door het lyseren van de cellen met water, en het afzuigen van de platen in een *Cell Harvester* (Wallac, Breda, Nederland). Hierbij werd het DNA op een glasvezelfilter opgevangen, die met water gewassen werd om niet-geïncorporeerd methyl- ^{3}H -thymidine zoveel mogelijk te verwijderen. Na drogen van de filter en additie van 5 ml OptiScint scintillatievloeistof (Wallac) werd de radioactiviteit in elk staal bepaald met behulp van een β -counter (Wallac). De T-cel proliferatie wordt uitgedrukt in *counts per minute* (cpm).

4.11. Analyse van de suppressie van polyclonale T-cel proliferatie

Bij de bepaling van de polyclonale T-cel proliferatie werden 96-*well* platen met vlakke bodem gevuld met $2 \cdot 10^5$ miltcellen (splenocyten, SPC) van naïve C57BL/6 muizen, geogst zoals beschreven in §4.4.2, in 200 μl ME. De cellen werden gestimuleerd met 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD3 monoclonaal antilichaam (Sigma), wat specifieke antigenherkenning door de T-cel receptor *in vitro* nabootst. Dit zet de T cellen aan tot polyclonale proliferatie. Hier werden ofwel opgezuiverde MHCII^{laag}, MHCII^{hoog} TAMs of cDCs aan toegevoegd in verschillende hoeveelheden ($0,625 \cdot 10^4$; $1,25 \cdot 10^4$; $2,5 \cdot 10^4$; $5 \cdot 10^4$; 10^5 ; $2 \cdot 10^5$ cellen) om het effect op de T-cel proliferatie na te gaan. Elke verhouding TAMs/cDC:SPC werd in triplicaat opgemeten. Ter controle werd ook proliferatie zonder anti-CD3 stimulatie en proliferatie zonder de aanwezigheid van TAMs of cDCs opgemeten.

Volledig analoog aan §4.10 werd ook hier het effect van inhibitoren nagegaan bij een 1:4 verhouding TAMs/cDCs:SPC. Na 24 uur incubatie bij 37°C , 5% CO_2 en 100% luchtvochtigheid werd 1 μCi methyl- ^{3}H -thymidine (Amersham) toegevoegd aan de *wells*. Na 18 uur werden de platen ingevroren bij -20°C tot verder gebruik. Het oogsten van de cellen en de bepaling van de proliferatie werd uitgevoerd zoals beschreven in §4.10.

4.12. Cocultuur van 3LL-R met de TAM subpopulaties

In deze *assay* werden de opgezuiverde TAM subpopulaties samen met 3LL-R cellen uitgezet in 96-*well* platen om het effect op de proliferatie van deze laatste te bepalen, analoog aan de cocultuur experimenten van Loges *et al.* (2010). De 3LL-R cellen werden

aan een vaste concentratie ($5 \cdot 10^3$ per *well*) uitgezet, waaraan verschillende verhoudingen van de TAM subpopulaties werden toegevoegd (3LL-R: TAM subpopulatie 1:0, 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1). Hiervoor werden, twaalf dagen na 3LL-R tumorinoculatie, TAMs opgezuiverd zoals vermeld in §4.7.3.1. Elke conditie werd steeds in triplicaat uitgevoerd. De incubatie, het toevoegen van 1 μCi methyl- ^{3}H -thymidine (Amersham) aan de *wells*, het invriezen en de meting verliepen zoals bij de polyclonale T-cel suppressie (zie §4.11).

4.13. Western Blotting

4.13.1. Lysaten

Na sortering van de TAM subpopulaties, zoals beschreven in §4.7.3.1, werden deze op een concentratie van 10^6 /ml gebracht met ME medium. Na uitzetten in een 48-*well* plaat werd ofwel 15 minuten gestimuleerd met 100 U/ml recombinant muis IFN- γ , IL-10 of IL-4 (BD Biosciences) bij 37°C ofwel werd geen stimulus toegevoegd. Vervolgens werden de cellen overgezet in eppendorf tubes en gecentrifugeerd (7600 g, 8 min, 4°C). Het supernatans werd verwijderd en het pellet werd tweemaal gewassen met 1 ml ijsskoude HBSS door centrifugatie (7600 g, 8 min, 4°C). Hierna werd het pellet opgelost in ofwel de ureum buffer of de WCL buffer aan 40 $\mu\text{l}/10^6$ cellen. Enkel voor de detectie van de HIF proteïnen werd de ureum buffer gebruikt, gezien hun gevoeligheid aan de gebruikte buffer. Aan deze buffers werd zowel de protease-inhibitor Complete Protease Inhibitor (Roche Diagnostics, Basel, Zwitserland) als de fosfatase-inhibitor PhosSTOP toegevoegd (Roche). Dit lyseerde vervolgens 15 minuten op ijs, waarna de lysaten bij -80°C werden ingevroren.

4.13.2. Nucleaire extractie

Voor een nucleaire extractie werd vertrokken van $4 \cdot 10^6$ cellen. Deze werden opgelost in HBSS en overgezet in een eppendorf. Dit werd gecentrifugeerd (14000 tpm, 30 s, 4°C), waarna zoveel mogelijk supernatans verwijderd werd. Het pellet werd geresuspendeerd in 200 μl B1 buffer en 15 minuten op ijs gezet. Hieraan werd 0,65% igepal (Sigma) toegevoegd. Vervolgens werd 20 seconden zacht gevortext, gevolgd door 1 seconde hard vortexen. Na centrifugatie (14000 tpm, 2 min, 4°C) werd het supernatans verwijderd: dit was het cytoplasmatische extract. Het pellet werd gewassen met de B1 buffer door centrifugatie (14000 tpm, 2 min, 4°C), waarna de nucleaire fractie opgelost werd in 50 μl B2 buffer. Aan alle buffers werden vooraf protease- en fosfatase-inhibitor toegevoegd. De extracten werden ingevroren bij -80°C en werden bij ontdooien eerst 30 minuten geschud bij 4°C.

4.13.3. Bepaling van de proteïneconcentratie

De proteïneconcentratie werd bepaald met behulp van een BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, Illinois, VSA). In alkalisch midden wordt Cu^{2+} gereduceerd tot Cu^+ door de aanwezige proteïnen in een Biuret reactie. *Bicinchoninic acid* (BCA) vormt chelaatcomplexen met de gevormde Cu^+ ionen en dit resulteert in een paarse kleur (Smith *et al.*, 1985). De concentratie werd gemeten bij 562 nm in een Elx 808 IU Ultra Microplate Reader (Bio-Tek Instrument Inc.) en bepaald door gebruik te maken van een standaardreeks (2 mg/ml – 0 mg/ml *Bovine Serum Albumine* of BSA [Thermo Fisher Scientific] in de gebruikte buffer).

4.13.4. Detectie van de proteïnen

De gewenste hoeveelheid lysaat werd gescheiden op een *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE; NuPAGE 10% Bis-Tris, Invitrogen) en getransfereerd naar een nitrocellulose membraan Hybond-C Extra (Amersham). De blot werd overnacht bij 4°C gebloekt met buffer W1. Het primair antilichaam (Tabel 4.2) werd toegevoegd en incubeerde 2h bij KT. Na wassen met buffer W1 werd het secundair antilichaam (Tabel 4.2), geconjugeerd met *horseradish peroxidase* (HRP), toegevoegd voor 1h incubatie bij KT. Vervolgens werd gewassen met buffer W2. De proteïnen werden gevisualiseerd met de *enhanced chemiluminescence* (ECL) methode en hiervoor werd het *Immobilon chemiluminescent horseradish peroxidase substrate* (Millipore, Billerica, Massachusetts, VSA) toegevoegd. Tot slot werden de proteïnen blootgesteld aan een autoradiografie Hyperfilm (GE Healthcare, Diegem, België) en ontwikkeld in een Fujifilm FPM-100A (FUJIFILM, Tokyo, Japan).

4.14. Statistische analyse

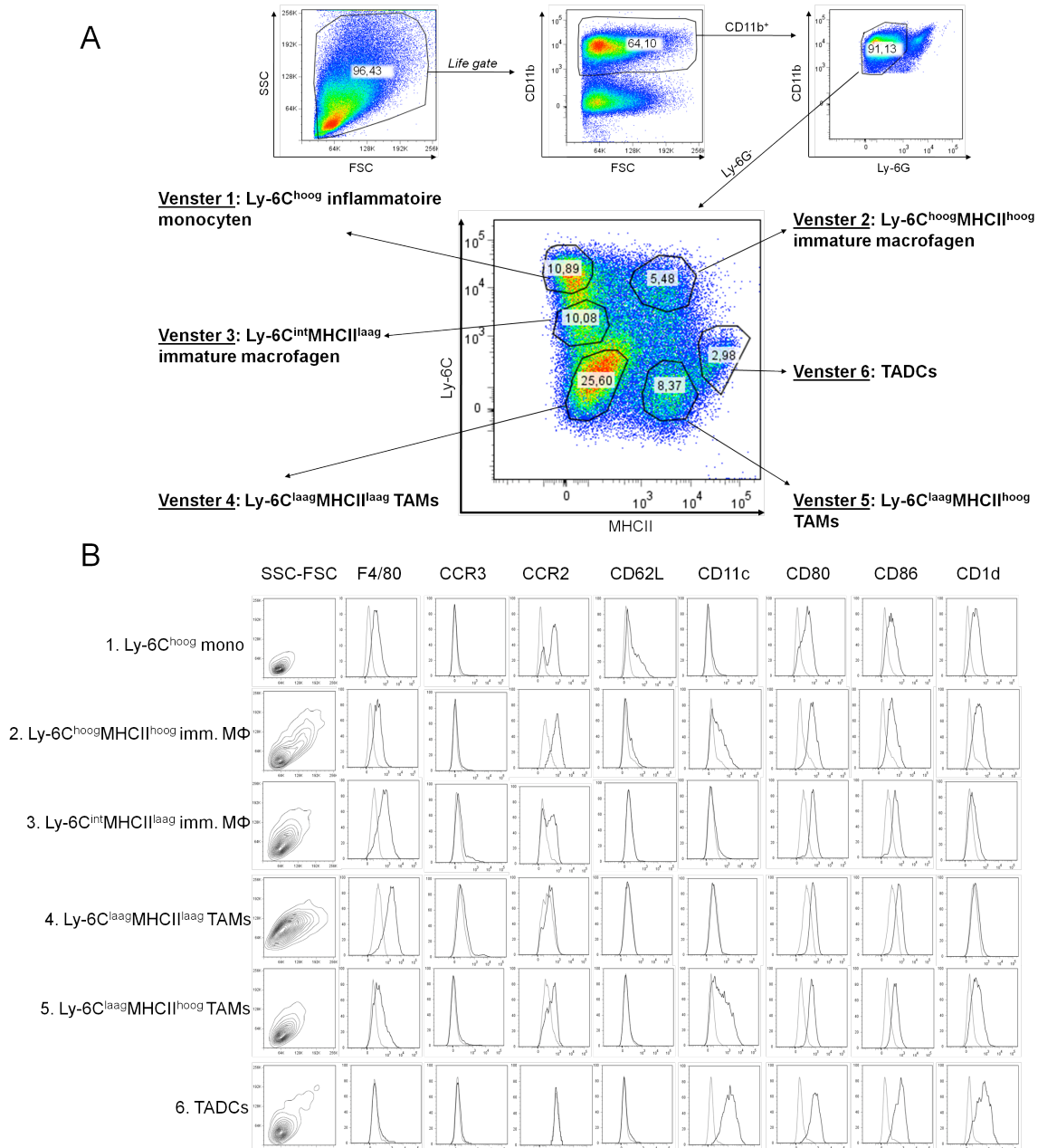
De statistische analyse van de data werd uitgevoerd met behulp van GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, Californië, VSA) en SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, VSA). Er werd standaard een gepaarde t-test uitgevoerd op de data, in de veronderstelling dat de data een normale verdeling kennen. Daarnaast werd ook de Wilcoxon test of Mann-Whitney uitgevoerd. Dit zijn niet-parametrische, robuuste testen, die langer vasthouden aan de nulhypothese. In het geval van de MLR, T-cel suppressie, cocultuur en intracellulaire iNOS FACS data werd daarenboven een meerwegs ANOVA (*Analysis of Variance*) uitgevoerd om het effect van de verschillende experimentele factoren na te gaan.

5. Resultaten

5.1. 3LL-R tumoren worden sterk geïnfiltréerd door een heterogene myeloïde cel populatie

Tumoren bestaan niet enkel uit getransformeerde cellen die ongelimiteerd prolifereren, maar worden ook geïnfiltréerd door immuuncellen (Hanahan, 2000). De aard van de infiltrerende cellen was dan ook het eerste dat onderzocht werd in de 3LL-R tumor. Hiervoor werden na twaalf dagen tumorgroei de tumoren verwijderd en enzymatisch behandeld om uiteindelijk een *single cell* suspensie te verkrijgen. Deze werd door middel van *flow* cytometrie onderzocht.

In de 3LL-R tumoren bleek een grote CD11b⁺ fractie aanwezig te zijn, ongeveer 65% van de cellen drukte deze myeloïde celmerker uit (Hickstein *et al.*, 1992). Hiervan was een klein aandeel positief voor de neutrofielmerker Ly-6G (Fleming *et al.*, 1993), zo een 5 tot 10% afhankelijk van de tumor (Figuur 5.1. A). In dit onderzoek werd echter de focus gelegd op de CD11b⁺Ly-6G⁻ fractie, waarin globaal gezien zes verschillende cel populaties onderscheiden konden worden. Dit gebeurde op basis van de merkers Ly-6C en MHCII (Figuur 5.1. A). De aard van de populaties kon bepaald worden op basis van de *side scatter-forward scatter* (SSC-FSC) grafieken, die informatie geven over de granulositeit en grootte van de cellen en daarnaast op basis van de expressie van verschillende celspecifieke merkers (Figuur 5.1. B). Het eerste venster stelt de Ly-6C^{hoog}MHCII^{laag} inflammatoire monocytén voor. Deze cellen waren klein, weinig granulair (SSC^{laag}FSC^{laag}) en F4/80⁺CCR2⁺CD62L⁺, wat typische merkers voor inflammatoire monocytén zijn (Geismann *et al.*, 2003). Daarnaast werd een grote heterogeniteit aan tumor-geassocieerde macrofagen (TAMs) vastgesteld (venster 2-5), waaronder twee immature populaties: de immature Ly-6C^{hoog}MHCII^{hoog} en Ly-6C^{int}MHCII^{laag} macrofagen (respectievelijk venster 2 en 3). Deze cellen vertoonden een macrofaag SSC-FSC profiel, naast de uitdrukking van CCR2 en de typische macrofaagmerker F4/80. De uitdrukking van het Ly-6C antigeen is, in het geval van macrofagen, kenmerkend voor een immatuur fenotype (Leenen *et al.*, 1994). Daarnaast werden ook twee mature TAM populaties teruggevonden (venster 4 en 5): de Ly-6C^{laag}MHCII^{laag} en Ly-6C^{laag}MHCII^{hoog} TAM subpopulaties of kortweg MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs. Ook deze beschikten over een macrofaag *scatter* profiel, naast expressie van F4/80. Beide populaties drukten de costimulatorische moleculen CD80 en CD86 uit, met een hogere expressie van CD1d door de MHCII^{hoog} TAMs. Ook CD11c expressie bleek verhoogd te zijn in deze populatie.



Figuur 5.1. Heterogeniteit van de myeloïde celpopulatie in 3LL-R tumoren. C57BL/6 muizen werden subcutaan (s.c.) geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd en *flow* cytometrisch geanalyseerd. **A. Overzicht van de CD11b⁺Ly-6G⁻ celpopulaties in de 3LL-R tumor.** Uit de levende cellen (*life gate*) werden de CD11b⁺ cellen geselecteerd. Hiervan werden vervolgens de Ly-6G⁻ cellen onderzocht op basis van hun Ly-6C en MHCII expressie. Het verkregen profiel bleek uit zes verschillende populaties te bestaan (venster 1-6). De kleurgradaties in de weergegeven FACS plot gaan van rood (veel cellen) tot donkerblauw (weinig cellen). **B. Karakterisatie van de populaties.** De verschillende populaties werden gekarakteriseerd volgens hun grootte (FSC) en granulositeit (SSC) en de expressie van verschillende oppervlaktemerkeren. De zwarte lijn stelt de expressie van het onderzochte proteïne voor, terwijl de grijze lijn de isotype controle weergeeft. Merk op dat hier een logaritmische schaal wordt gebruikt. De expressie van de verschillende merkeren liet de identificatie van zes populaties toe: 1. Ly-6C^{hoog} inflammatoire monocyten, 2. Ly-6C^{hoog}MHCII^{hoog} immature macrofagen, 3. Ly-6C^{int}MHCII^{laag} immature macrofagen, 4. Ly-6C^{laag}MHCII^{laag} TAMs, 5. Ly-6C^{laag}MHCII^{hoog} TAMs, 6. Tumor-geassocieerde DCs (TADCs) (SSC-FSC: *Side Scatter-Forward Scatter*; CCR: CC-chemokine receptor; CD: *cluster of differentiation*; MΦ: macrofaag; int: intermediair).

Tot slot was er nog een kleine populatie van tumor-geassocieerde DCs (TADCs) (venster 6) die bijna geen F4/80 uitdrukten, maar wel hoge niveaus van CD11c en de costimulatorische moleculen CD80, CD86 en CD1d (Banchereau & Steinman, 1998). Geen enkele van de geïdentificeerde populaties bleek positief te zijn voor de eosinofielmerker CCR3, wat aangaf dat de CD11b⁺Ly6G⁻ fractie geen infiltratie van eosinofielen kent. Verder onderzoek concentreerde zich op de geïdentificeerde mature TAM subpopulaties, namelijk de Ly-6C^{laag}MHCII^{laag} en Ly6C^{laag}MHCII^{hoog} TAMs (venster 4 en 5). De heterogeniteit van deze cellen, waarvan al een eerste indicatie te vinden is in figuur 5.1. B voor de merkers CD11c en CD1d, werd in meer detail onderzocht.

5.2. Gen- en proteïne-expressie van de MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs

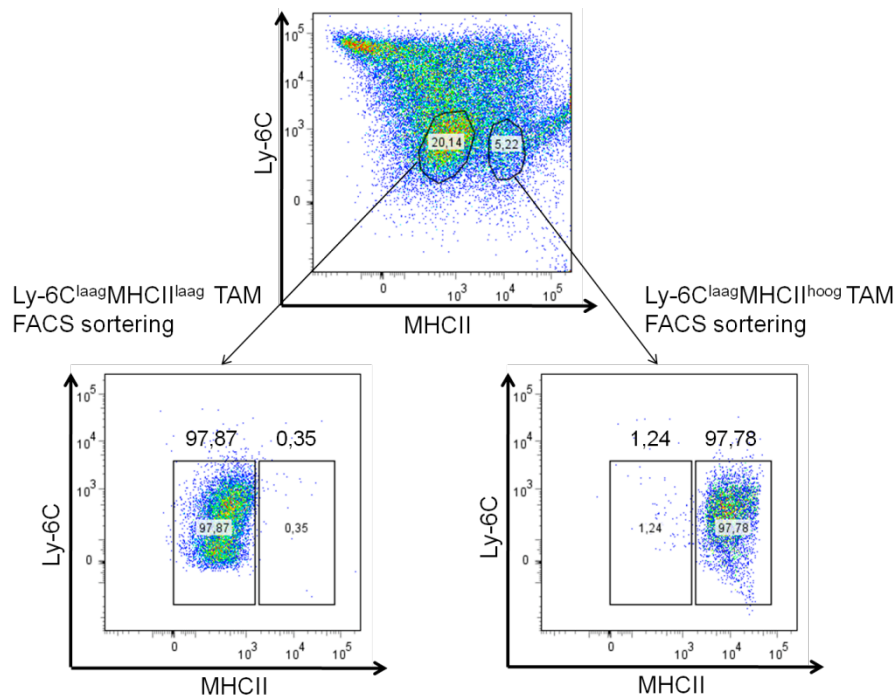
De heterogeniteit van de TAM subpopulaties werd eerst onderzocht op een moleculair niveau, zowel wat betreft gen- als proteïne-expressie. Hierbij werd in de eerste plaats de nadruk gelegd op de bepaling van de activeringstoestand (M1/M2) van de TAM subpopulaties.

5.2.1. De MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs vertonen een differentieel genexpressie profiel

De expressie van verschillende genen werd nagegaan bij FACS gesorteerde MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs door middel van kwantitatieve *reverse* transcriptase-PCR (RT-PCR). Hiervoor werden na twaalf dagen de tumoren verwijderd en onderworpen aan enzymatische digestie. De CD11b⁺ myeloïde cellen werden opgezuiverd via magnetische sortering, waarna sortering via FACS volgde. De zuiverheden van de TAM subpopulaties lagen altijd rond de 90% (Figuur 5.2.). Het RNA werd vervolgens geëxtraheerd en na *reverse* transcriptie werd het bekomen cDNA geamplificeerd via *real-time* PCR. Gesorteerde peritoneale macrofagen (PEMs) werden gebruikt als controle populatie in de RT-PCR (Tabel 5.1.).

Een eerste groep van genen die onderzocht werd, staat in verband met de activatietoestand van macrofagen. Hieronder vallen onder meer de dertien genen van het typische M2 genprofiel bepaald door Ghassabeh *et al.* (2006), namelijk *Arginase-1* (*Arg1*), *Found in inflammatory zone-1* (*Fizz1*), *Platelet-activating factor acetylhydrolase* (*Pafah*), *Prosaposine*, Selenoproteïne P (*Sep*), *Triggering receptor expressed on myeloid cells 2* (*Trem2*), *Growth arrest-specific gen 3* (*Gas3*), Macrofaag galactose-type C-type lectine 1 (*Mgl1*) en 2 (*Mgl2*), *Ym1/2*, Macrofaag Mannose Receptor (*Mrc1/MMR*), E-

cadherine of Cadherine-1 (*Cdh1*) en *Folate receptor 2* (*Folr2*). Hiernaast zijn er nog verschillende andere genen die als typisch M1 of M2 beschouwd worden (Mantovani *et al.*, 2004) waarvan de expressie ook werd nagegaan.



Figuur 5.2. Sortering van de Ly-6C^{laag}MHCII^{laag} en Ly-6C^{laag}MHCII^{hoog} TAMs. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd en onderworpen aan enzymatische digestie. Vervolgens werden de CD11b⁺ cellen via MACS opgezuiverd, waarna FACS sortering volgde. De zuiverheden van de opgezuiverde TAM subpopulaties worden weergegeven in de figuur in procent.

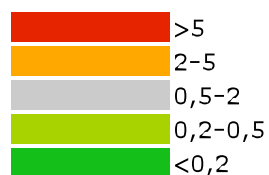
Veel van de M2-geassocieerde genen kwamen hoger tot uitdrukking bij de MHCII^{laag} TAMs ten opzichte van de MHCII^{hoog} TAMs, namelijk *Prosaposin*, *Arg-1*, *Mmr*, *Folr2*, *Sep* en *Gas3*. Ook *Lyve-1* en *Stabiline-1* kwamen tot hogere expressie in deze populatie en beide zijn geassocieerd met alternatief geactiveerde macrofagen (Politz *et al.*, 2002; Schledzewski *et al.*, 2006). Daarnaast werden ook andere, eerder M2-geassocieerde merkers zoals *Il-10*, *Il-4Ra*, *Ccl22* en *CD163* hoger uitgedrukt in deze subpopulatie (Mantovani *et al.*, 2004). In de MHCII^{hoog} subpopulatie konden slechts twee M2 genen teruggevonden worden, namelijk *Fizz1* en *Cdh1* (Van den Bossche *et al.*, 2009). Hiernaast kwamen genen, zoals *Il-1b* en *Ptgs2* (COX-2), die eerder als pro-inflammatoir beschouwd worden (Balkwill *et al.*, 2005), ook tot hogere uitdrukking in de MHCII^{hoog} TAMs. Op basis van deze data kon al een eerste beeld gevormd worden over de activatietoestand van de subpopulaties. Het bleek dat de MHCII^{laag} TAMs eerder M2 geactiveerd waren, terwijl dit complexer lag voor de MHCII^{hoog} TAMs, met vertoon van zowel M1 als M2-geassocieerde genen. Het is hierbij wel opmerkelijk dat *Nos2* (iNOS), dat zeer sterk geassocieerd wordt met het M1 fenotype, een hogere expressie kende in de MHCII^{laag} subpopulatie.

Tabel 5.1. Genexpressie profiel van MHCII^{hoog} en MHCII^{laag} TAMs. MHCII^{hoog} en MHCII^{laag} TAMs werden gesorteerd uit 12 dagen oude 3LL-R tumoren. RNA werd geëxtraheerd en de genexpressie werd geanalyseerd met kwantitatieve *real-time* PCR. De expressie van elk gen werd genormaliseerd ten opzichte van het S12 *housekeeping* gen en wordt weergegeven als de relatieve expressie van MHCII^{hoog} versus MHCII^{laag} TAMs (hoog/laag). De waarden zijn het geometrisch gemiddelde van 3 onafhankelijke experimenten, uitgevoerd in triplicaat en zijn gekleurd volgens het niveau van inductie (>5;2-5;0,5-2;0,2-0,5;<0,2). Het 90% betrouwbaarheidsinterval (BI) en de p-waarde werden bepaald (*: p<0,05; **: p<0,01). C_T stelt de *threshold cycle* voor. De ΔC_T werd bepaald voor de MHCII^{hoog} TAMs en wordt gedefinieerd als C_T(gen)-C_T(S12). De waarden stellen het gemiddelde±SD (*standard deviation*) voor. Een lagere waarde correspondeert met een hoger niveau van expressie voor dat gen, gezien het expressieniveau van het onderzochte gen dan dichter ligt bij dat van het abundante S12 gen. Daarnaast werden ook PEMS gesorteerd, RNA geëxtraheerd en na normalisatie ten opzichte van S12 werd de relatieve expressie ten opzichte van de MHCII^{hoog} TAMs bepaald (hoog/PEM), net als het 90% BI. ND= niet detecteerbaar in PEMS.

Gen	Hoog/Laag	Hoog/Laag	90% BI	p	ΔC _T hoog	Hoog/PEM	90% BI
<i>Ccl17</i>		88	[74 - 104]	**	5,6 ±0,1	297	[268 - 329]
<i>Fizz1</i>		17	[10 - 29]		5,7 ±1,5	0,95	[0,19 - 4,86]
<i>Ccr2</i>		8,7	[6,0 - 12,8]		6,9 ±0,6	1576	[853 - 2911]
<i>Cdh1</i>		8,3	[7,1 - 9,6]	**	5,9 ±0,1	754	[701 - 809]
<i>Cx3cr1</i>		5,5	[5,3 - 5,7]	*	10,3 ±0,3	69	[52 - 91]
<i>Il-1β</i>		4,7	[3,4 - 6,4]	**	3,5 ±0,0	7403	[6914 - 7925]
<i>Pgf</i>		2,7	[1,4 - 5,4]		7,9 ±0,4	ND	ND
<i>Ptgs2 (COX-2)</i>		2,3	[1,3 - 4,2]		6,1 ±0,2	567	[475 - 678]
<i>Tie-2</i>		1,9	[1,6 - 2,2]	*	5,7 ±0,3	1,0	[0,8 - 1,4]
<i>c-Rel</i>		1,8	[0,9 - 3,7]		7,0 ±0,3	76	[52 - 112]
<i>Mmp2</i>		1,7	[1,5 - 1,9]		10,6 ±0,4	76	[52 - 112]
<i>Cx3cl1</i>		1,7	[0,8 - 3,7]		14,9 ±1,0	9,2	[3,8 - 22,4]
<i>Cxcl11</i>		1,6	[1,1 - 2,4]		13,3 ±1,2	ND	ND
<i>Tsp1</i>		1,6	[1,4 - 1,7]	*	0,4 ±0,3	1,6	[1,1 - 2,3]
<i>Mgl2</i>		1,5	[1,2 - 2,1]		4,1 ±0,2	27	[21 - 33]
<i>Ym(1/2)</i>		1,5	[1,0 - 2,3]		8,8 ±0,5	6,3	[4,4 - 9,2]
<i>Cxcl10</i>		1,4	[1,1 - 1,7]		5,6 ±0,5	326	[180 - 589]
<i>Mif</i>		1,3	[1,0 - 1,8]		3,5 ±0,3	5,6	[3,8 - 8,3]
<i>Cxcl9</i>		1,2	[0,8 - 1,7]		9,4 ±0,7	ND	ND
<i>Hif1α</i>		1,1	[0,9 - 1,2]		4,1 ±0,5	6,1	[3,6 - 10,1]
<i>Tnf</i>		0,99	[0,76 - 1,28]		7,1 ±0,3	74	[55 - 100]
<i>Pafah</i>		0,93	[0,78 - 1,12]		3,8 ±0,5	4,5	[2,6 - 7,8]
<i>p50</i>		0,91	[0,76 - 1,09]		7,8 ±0,2	39	[30 - 52]
<i>Ccl5</i>		0,89	[0,76 - 1,04]		8,3 ±1,0	17	[5 - 51]
<i>RelB</i>		0,88	[0,66 - 1,18]		7,9 ±0,5	102	[60 - 173]
<i>RelA</i>		0,87	[0,68 - 1,10]		9,3 ±0,4	276	[193 - 394]
<i>Tsp2</i>		0,85	[0,26 - 2,83]		15,7 ±0,3	1,2	[0,9 - 1,7]
<i>Ccl1</i>		0,77	[0,48 - 1,23]		13,9 ±0,6	2,2	[1,1 - 4,2]
<i>Trem2</i>		0,76	[0,47 - 1,23]		5,4 ±0,4	30	[20 - 46]
<i>Stat3</i>		0,73	[0,67 - 0,80]		6,8 ±0,3	39	[26 - 57]
<i>Il-6</i>		0,71	[0,46 - 1,11]		11,1 ±0,3	15	[11 - 20]
<i>angpt1</i>		0,71	[0,42 - 1,21]		16,5 ±0,9	0,31	[0,11 - 0,93]
<i>Cxcl16</i>		0,68	[0,57 - 0,82]		6,1 ±0,5	9,8	[5,7 - 16,9]
<i>Vegf</i>		0,68	[0,40 - 1,18]		8,3 ±0,7	1002	[450 - 2232]
<i>p52</i>		0,68	[0,62 - 0,74]	**	7,4 ±0,1	490	[428 - 561]
<i>Il-12p40</i>		0,63	[0,40 - 0,97]		17,4 ±0,4	ND	ND
<i>Adamts1</i>		0,61	[0,32 - 1,17]		13,7 ±0,3	3,9	[2,8 - 5,5]
<i>Il-1α</i>		0,58	[0,42 - 0,80]		6,7 ±0,1	12	[10 - 13]
<i>Mgl1</i>		0,53	[0,33 - 0,85]		5,1 ±0,6	3,3	[1,7 - 6,4]

Tabel 5.2. (vervolg)

Gen	Hoog/Laag	Hoog/Laag	90% BI	p	ΔC_T hoog	Hoog/PEM	90% BI
<i>SPP1</i>		0,52	[0,39 - 0,71]		2,0 ± 0,1	876	[732 - 1048]
<i>Ccl2</i>		0,50	[0,42 - 0,59]		4,0 ± 0,5	62	[38 - 99]
<i>Prosaposin</i>		0,48	[0,18 - 1,32]		9,6 ± 0,9	14	[5 - 38]
<i>Ccl11</i>		0,47	[0,30 - 0,73]		13,4 ± 0,7	16	[7 - 36]
<i>Ccl6</i>		0,46	[0,35 - 0,61]	*	0,3 ± 0,3	14	[10 - 20]
<i>Cxcl1</i>		0,45	[0,42 - 0,49]		4,1 ± 0,3	28	[20 - 38]
<i>Stat1</i>		0,42	[0,14 - 1,22]		7,5 ± 1,3	71	[16 - 308]
<i>Ccl3</i>		0,40	[0,38 - 0,43]	*	3,5 ± 0,1	21	[19 - 24]
<i>Arg1</i>		0,39	[0,29 - 0,53]	**	2,2 ± 0,6	15	[8 - 28]
<i>Tgfβ</i>		0,36	[0,12 - 1,07]		5,5 ± 0,8	140	[53 - 366]
<i>Hif2α</i>		0,36	[0,18 - 0,71]		11,8 ± 0,5	0,025	[0,012 - 0,051]
<i>Il-10</i>		0,34	[0,24 - 0,50]		9,1 ± 1,0	57	[22 - 151]
<i>Ccl7</i>		0,30	[0,23 - 0,38]	*	2,0 ± 0,4	1393	[949 - 2045]
<i>Timp2</i>		0,29	[0,17 - 0,50]	**	6,0 ± 0,8	0,49	[0,20 - 1,20]
<i>Ctsd</i>		0,28	[0,26 - 0,31]		3,0 ± 0,2	451	[344 - 590]
<i>Ccl4</i>		0,28	[0,26 - 0,31]	*	4,5 ± 0,2	545	[437 - 679]
<i>Nos2 (iNOS)</i>		0,28	[0,07 - 1,23]		13,5 ± 1,5	24	[5 - 130]
<i>uPA</i>		0,26	[0,08 - 0,86]		8,8 ± 0,8	26	[10 - 68]
<i>Ccl12</i>		0,25	[0,19 - 0,33]	*	3,2 ± 0,2	1190	[949 - 1493]
<i>Mrc1 (MMR)</i>		0,24	[0,09 - 0,65]	*	4,2 ± 1,0	220	[68 - 713]
<i>Il-4ra</i>		0,19	[0,06 - 0,64]	*	7,1 ± 1,1	242	[99 - 589]
<i>angpt2</i>		0,18	[0,12 - 0,26]		12,5 ± 0,4	ND	ND
<i>Igf1</i>		0,17	[0,11 - 0,27]		9,4 ± 1,0	0,18	[0,06 - 0,53]
<i>Folr2</i>		0,17	[0,09 - 0,32]	*	5,1 ± 0,9	30	[11 - 81]
<i>Mmp9</i>		0,17	[0,13 - 0,21]	*	6,4 ± 0,5	23	[13 - 39]
<i>Ccl8</i>		0,16	[0,11 - 0,24]	*	4,7 ± 0,7	3423	[1697 - 6904]
<i>Sep</i>		0,16	[0,08 - 0,32]	**	3,1 ± 0,8	3,7	[1,5 - 8,9]
<i>Mmp14</i>		0,16	[0,05 - 0,53]		9,5 ± 0,9	28	[10 - 76]
<i>Gas6</i>		0,14	[0,09 - 0,22]	**	9,8 ± 0,5	ND	ND
<i>Lyve1</i>		0,13	[0,04 - 0,46]	**	8,7 ± 1,3	4,8	[1,1 - 20,9]
<i>Ccl22</i>		0,13	[0,04 - 0,46]	**	11,4 ± 0,2	3,5	[2,9 - 4,2]
<i>Stab1</i>		0,11	[0,07 - 0,20]	*	6,2 ± 0,7	59	[29 - 121]
<i>Gas3</i>		0,11	[0,05 - 0,26]	*	9,7 ± 1,1	0,35	[0,11 - 1,15]
<i>CD163</i>		0,036	[0,007 - 0,178]	*	11,9 ± 1,4	45	[7 - 213]



Vervolgens werd de expressie van chemokines onderzocht. De MHCII^{hoog} TAMs vertoonden een trend naar een licht verhoogde expressie van de chemokines *cx3cl1*, *cxcl9*, *10* en *11*. Deze zijn betrokken in de aantrekking van lymfocyten, onder andere T effectorcellen en NK cellen. De MHCII^{laag} TAMs toonden een hogere expressie van *ccl2*, *3*, *4* en *8* die in de attractie van monocytten betrokken zijn en van *ccl11*, dat eosinofielen en basofielen, maar ook lymfocyten van het Th2 type, aantrekt (Mantovani *et al.*, 2004; Moser & Loetscher, 2001). De differentiële expressie van *ccl17* en *ccl22*, liganden van de

CCR4 receptor, is opvallend gezien beide chemokines geassocieerd worden met een M2 fenotype (Mantovani *et al.*, 2004). Echter, aan CCL22 werd een pro-tumorale rol toegeschreven in de aantrekking van Tregs naar de tumor (Curiel *et al.*, 2004), terwijl CCL17 een anti-tumoraal effect vertoonde in een colorectaal kankermodel door het rekruteren van immune effector cellen (Kanagawa *et al.*, 2007). Kanagawa *et al.* (2007) speculeren dat het differentieel effect van CCL17 en CCL22, allebei heparine/heparan sulfaat bindende proteïnen, veroorzaakt wordt door een verschillende affiniteit voor heparine/heparan sulfaat.

Wat betreft genen die coderen voor proteïnen betrokken in angiogenese en hermodellering van de extracellulaire matrix, werd waargenomen dat beide subsets zowel proangiogene als angiostatische factoren produceerden. Zo was er een verhoogde expressie in de MHCII^{hoog} TAMs van zowel *Cox2* en *Mmp2*, als de angiostatische factor *Tsp1*. In de MHCII^{laag} TAMs werden zowel het proangiogene *Mmp9*, *Tgfβ*, *uPa*, *Vegf* en *angiopoietine 1 (angpt1)* als de angiostatische factoren *Tsp2*, *angpt2* en *Il-10* uitgedrukt (Carmeliet & Jain, 2000; Pollard, 2004).

GAS6, een mitogeen proteïne dat kankercel proliferatie bevordert, werd reeds waargenomen in TAMs door Loges *et al.* (2010). Onze data suggereren dat vooral MHCII^{laag} TAMs *Gas6* produceren, althans op mRNA niveau.

Ten slotte werden de signaalmoleculen betrokken bij de verschillende signalisatiewegen die het TAM fenotype zouden kunnen beïnvloeden (inflammatoire, hypoxische signalisatie) (zie §5.4) ook op genniveau onderzocht. Hiervan vertoonden enkel *Stat1* en *Hif2a* een hogere expressie in de MHCII^{laag} TAMs. Er werden geen grote verschillen waargenomen voor *p50*, *p52*, *RelA*, *RelB*, *c-Rel*, *Stat3* en *Hif1a*. Het dient echter opgemerkt dat het bij transcriptiefactoren veel relevanter is om het proteïneniveau te onderzoeken en de mate van fosforylatie en responsiviteit op stimuli. Dit geldt ook voor de HIF proteïnen die voornamelijk post-translationeel worden gereguleerd.

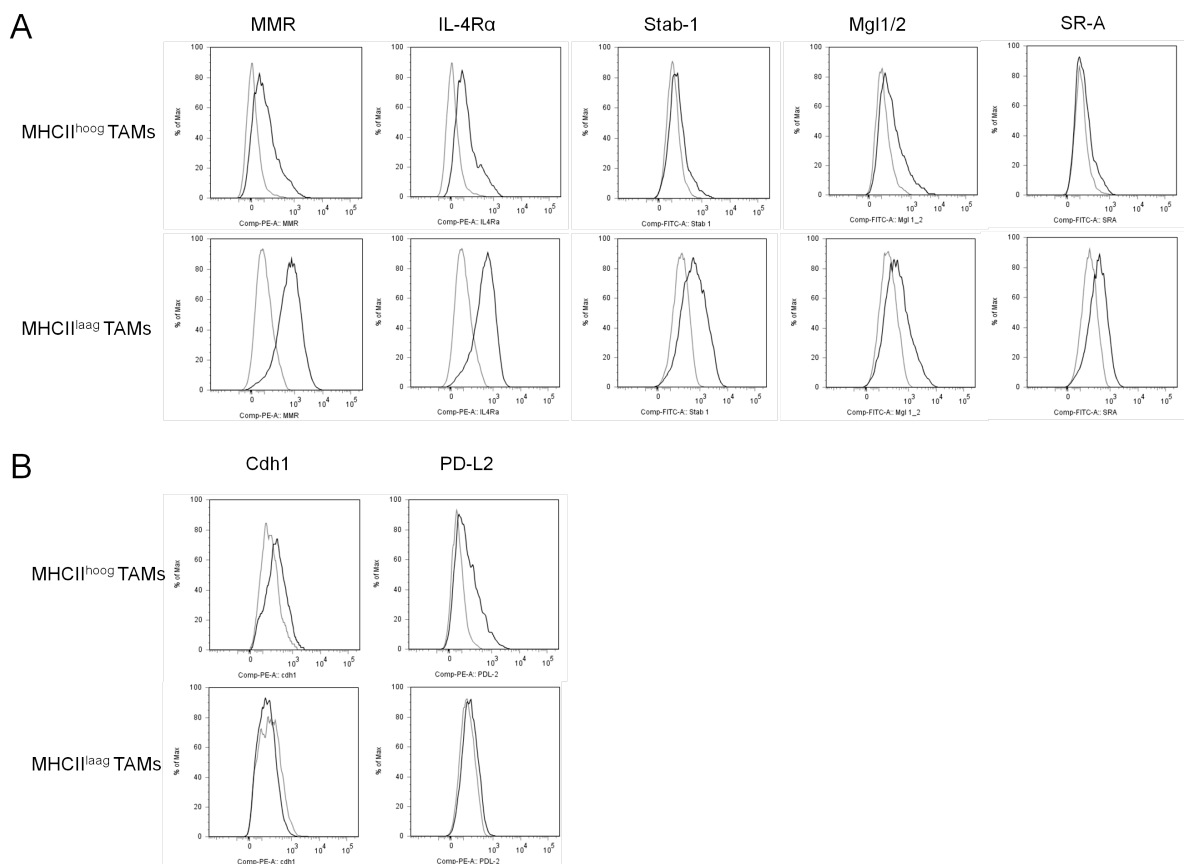
Slechts een beperkt aantal genen kwamen tot hogere expressie in onze controlepopulatie, de PEMs, dan in de TAM subpopulaties, namelijk *angpt1* en *Hif2a*. De verhoogde expressie van *Hif2a* in PEMs werd ook waargenomen door Takeda *et al.* (2010). Hetzelfde was in hun studie waar voor *Fizz1* en dit gen vertoont ook bij ons een licht verhoogde expressie in de PEMs. Hoewel het in hun studie ging over thioglycollaat-geïnduceerde PEMs (thio-PEMs), is de overeenkomst met de hier gebruikte ongestimuleerde PEMs toch opvallend en karakteriseerden zij de thio-PEMs als eerder M2 gepolariseerd (Takeda *et al.*, 2010).

5.2.2. De proteïne-expressie bevestigt de heterogeniteit van de TAM subpopulaties

Gezien RT-PCR data slechts een *snapshot* van de informatie omtrent de kwantiteit van een bepaald transcript in een cel voorstellen, moet er altijd voor additionele informatie gezorgd worden rond de regulatorische RNAs, proteïneniveaus en proteïne activiteit (Nolan *et al.*, 2006). Er werd dus onderzocht in hoeverre de bekomen data, op het proteïneniveau kon bevestigd worden, om zo de activatietoestand van de TAMs beter te kunnen bepalen.

5.2.2.1. De meeste M2 oppervlaktemerkers komen tot hogere uitdrukking op de MHCII^{laag} TAMs

Voor de differentieel uitgedrukte genen uit tabel 5.1. werd, indien het om een oppervlaktemerker ging en hiervoor een antilichaam beschikbaar was, het expressieniveau onderzocht op het oppervlak van de TAM subpopulaties door middel van FACS (Figuur 5.3.).



Figuur 5.3. Proteïne-expressie op het oppervlak van de MHCII^{hoog} en MHCII^{laag} TAMs. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de 3LL-R tumoren verwijderd en *flow* cytometrisch geanalyseerd. De zwarte lijn

stelt de expressie van de oppervlaktemerker voor, terwijl de grijze lijn de isotype controle weergeeft in de twee TAM subpopulaties. Merk op dat hier een logaritmische schaal wordt gebruikt.

A. Merkers met een hogere expressie op de MHCII^{laag} TAMs. De onderzochte merkers werden onderverdeeld in deze die hoger tot expressie komen op de MHCII^{laag} TAMs of MHCII^{hoog} TAMs. (MMR: Macrofaag mannose receptor; IL-4R α : Interleukine-4 receptor α ; Stab-1: Stabiline-1; Mgl1/2: Macrofaag galactose-type C-type lectine 1 ; SR-A: Scavenger Receptor-A) **B. Merkers met een hogere expressie op de MHCII^{hoog} TAMs.** (Cdh1: E-cadherine of Cadherine-1; PD-L: *Programmed Death Ligand*)

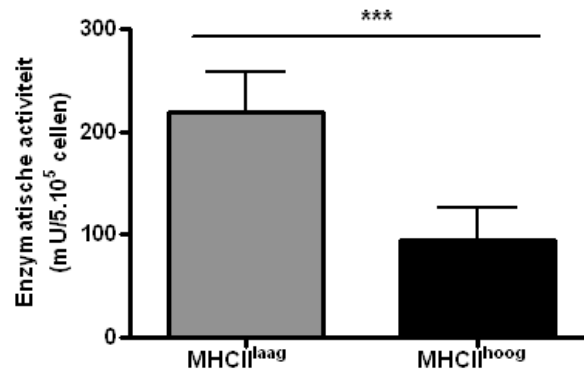
De MHCII^{laag} TAMs drukten hogere niveaus uit van de M2-geassocieerde proteïnen MMR, IL-4R α , Stabiline-1 en SR-A (Hallam *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2009). Mgl1/2 vertoonde een gelijke tot licht verhoogde expressie op de MHCII^{laag} TAMs vergeleken met de MHCII^{hoog} TAMs (Figuur 5.3. A). Dit is in overeenstemming met de RT-PCR data (Tabel 5.1). De MHCII^{hoog} TAMs vertoonden een licht hogere expressie voor Cdh1 en *Programmed Death-Ligand 2* (PD-L2) (Figuur 5.3. B). E-cadherine is, zoals reeds vermeld, geassocieerd met een M2 activatietoestand (Ghassabeh *et al.*, 2006; Van den Bossche *et al.*, 2009) en ook PD-L2 werd onlangs naar voren geschoven als een specifieke merker voor alternatief geactiveerde macrofagen (Huber *et al.*, 2010). Verder kwamen CD11c en CD1d ook tot hogere expressie op het oppervlak van de MHCII^{hoog} TAMs vergeleken met de MHCII^{laag} TAMs (Figuur 5.1. B).

5.2.2.2. Arginase en iNOS vertonen een verschillend expressiepatroon in de TAM subpopulaties

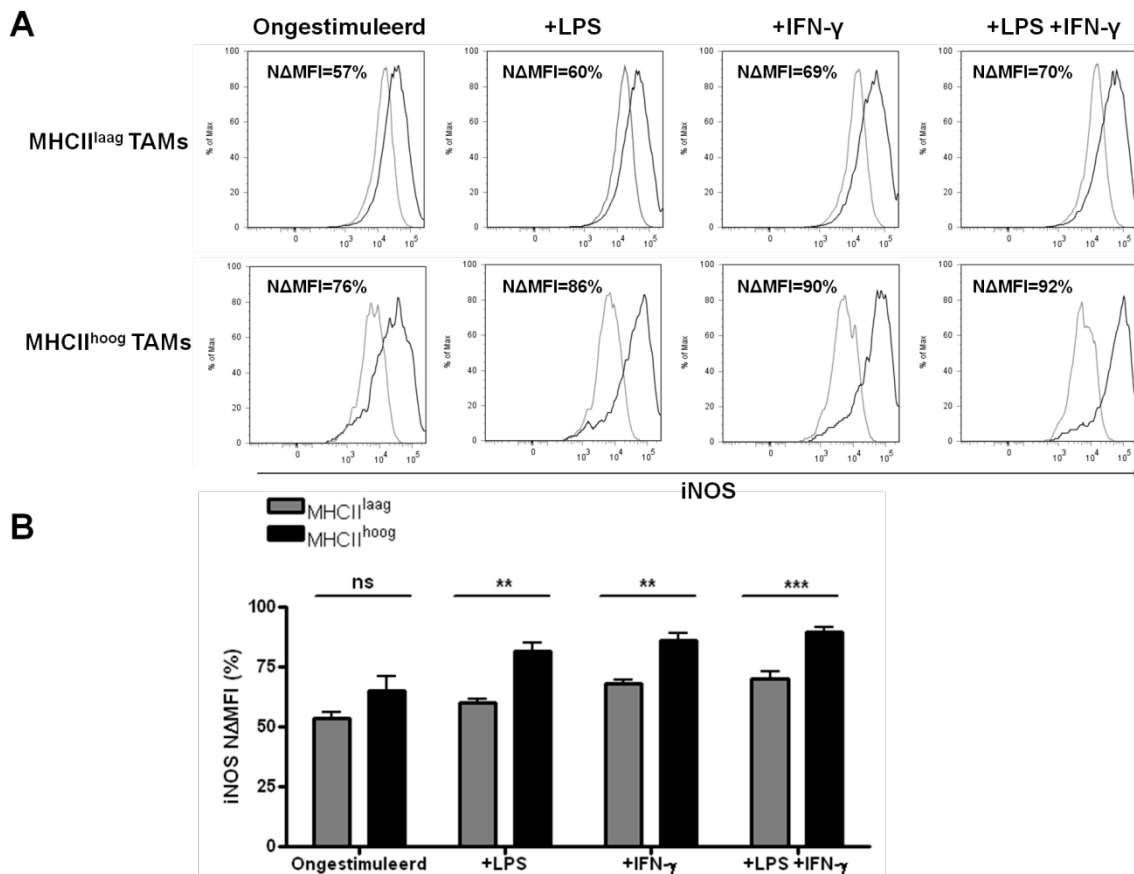
Vervolgens werden de enzymen betrokken in het *L*-arginine metabolisme onderzocht. De keuze om specifiek iNOS en arginase te onderzoeken, komt van het belang dat ze spelen in de M1/M2 indeling van macrofagen, met iNOS als typisch M1 en arginase als M2-geassocieerd proteïne (Bronte & Zanovello, 2005; Gordon, 2003; Hesse *et al.*, 2001; Munder *et al.*, 1998).

In de gesorteerde TAM subpopulaties werd de arginase enzymactiviteit bepaald. Uit figuur 5.4. blijkt dat beide subpopulaties over arginase activiteit beschikten, maar dat dit significant hoger was voor de MHCII^{laag} TAMs. Deze bevinding was in overeenstemming met de RT-PCR resultaten en het overwegend M2 profiel van deze TAM subpopulatie.

Het expressieniveau van het iNOS proteïne werd bepaald door intracellulaire FACS. De productie van iNOS in TAMs werd onder verschillende condities nagegaan, namelijk ongestimuleerd of na zes uur *in vitro* stimulatie met de iNOS-inducerende mediators LPS, IFN- γ of beide. Het allereerste wat hierbij werd waargenomen, is dat zelfs zonder *in vitro* stimulatie beide TAM subpopulaties iNOS produceerden. Deze productie werd nog groter na behandeling met de stimuli (Figuur 5.5. A).



Figuur 5.4. Arginase activiteit in de TAM subpopulaties. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd en onderworpen aan enzymatische digestie. De arginase enzymatische activiteit (mU) werd bepaald in de lysaten van $5 \cdot 10^5$ gesorteerde MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs. De waarden stellen het gemiddelde \pm standaarddeviatie (SD) voor van drie onafhankelijke experimenten. De statistische significantie werd bepaald door middel van een gepaarde t-test, zoals weergegeven in de figuur (***: $p < 0,001$). De niet-parametrische Wilcoxon test toonde ook een significant verschil aan ($p < 0,05$).

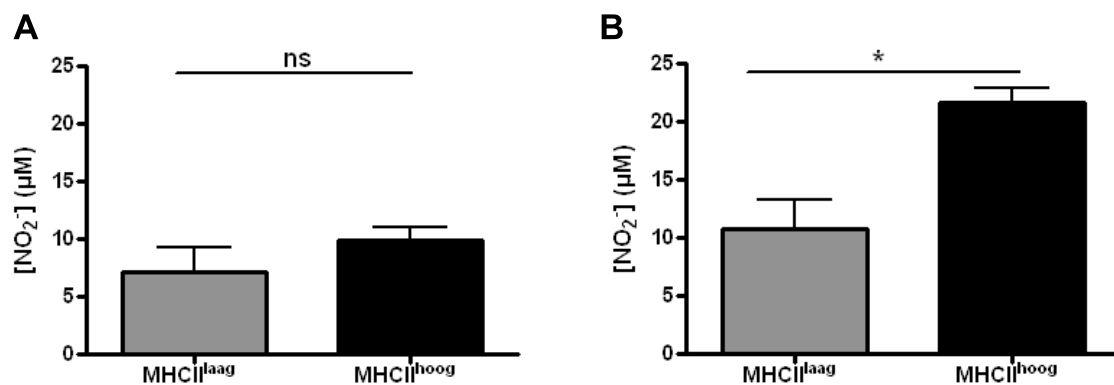


Figuur 5.5. Productie van iNOS door MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd. **A. iNOS expressie in de TAM subpopulaties onder verschillende omstandigheden.** Voor de intracellulaire iNOS kleuring werden de cellen ofwel ongestimuleerd, of in aanwezigheid van 10 ng/ml LPS, 10 U/ml IFN- γ of beide in cultuur gezet. Zes uur later werden de cellen gefixeerd, gepermeabiliseerd en gekleurd met anti-iNOS. Voor beide subpopulaties en elke conditie werd de *Median Fluorescence Intensity* (MFI) van de iNOS kleuring (zwarte lijn) en van het isotype bepaald (grijze lijn) en hieruit werd de *Normalized Delta MFI* berekend (NΔMFI).

Deze wordt als volgt gedefinieerd: $\Delta\text{MFI} = ((\text{MFI}_{\text{iNOS}} - \text{MFI}_{\text{isotype}}) / \text{MFI}_{\text{iNOS}}) \times 100$. De figuren en ΔMFI waarden zijn representatief voor zes tumoren van 2 onafhankelijke experimenten. Merk op in de figuren een logaritmische schaal wordt gebruikt. **B. Grafische voorstelling van de iNOS ΔMFI waarden voor de verschillende condities.** De gemiddelde $\Delta\text{MFI} \pm \text{SD}$ van de verschillende tumoren wordt weergegeven voor de subpopulaties. Dit werd statistisch geanalyseerd met een gepaarde t-test. Het resultaat hiervan wordt weergegeven in de figuur (ns: niet significant; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). De niet-parametrische Wilcoxon test hield vast aan de nulhypothese.

Een volledige analyse (Figuur 5.5. B) bevestigde de trend van hogere iNOS productie in de $\text{MHCII}^{\text{hoog}}$ TAMs vergeleken met de $\text{MHCII}^{\text{laag}}$ TAMs. Dit werd echter pas significant verschillend na behandeling met de iNOS-inducerende stimuli. De bekomen ΔMFI waarden werden geanalyseerd met ANOVA. Hieruit bleek dat zowel de TAM subpopulatie als de stimulus een significant effect hadden op de iNOS productie ($p < 0,001$), maar dat de stimulus eenzelfde effect veroorzaakte in beide subpopulaties. Dit suggereert dat de iNOS productie niet differentieel gereguleerd wordt door IFN- γ en/of LPS in de 3LL-R TAM subpopulaties.

Om na te gaan of de aanwezigheid van het iNOS proteïne zich ook vertaalde in de productie van stikstofoxide (NO), werden de TAM subpopulaties opgezuiverd en in cultuur gezet voor 24 en 48h. Nadien werd de concentratie NO onder de vorm van nitriet (NO_2^-), gedetecteerd in het supernatans (Figuur 5.6.). Hieruit bleek dat de $\text{MHCII}^{\text{hoog}}$ TAMs zowel na 24 als 48h cultuur meer NO produceerden dan de $\text{MHCII}^{\text{laag}}$ TAMs, hetgeen echter enkel significant verschillend was na 48h.



Figuur 5.6. De productie van NO door de TAM subpopulaties. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd en onderworpen aan enzymatische digestie. Gesorteerde $\text{MHCII}^{\text{laag}}$ en $\text{MHCII}^{\text{hoog}}$ TAMs werden uitgezet in cultuur. **A. NO_2^- concentratie in het supernatans van de TAM subpopulaties na 24h incubatie** en **B. NO_2^- concentratie in het supernatans van de TAM subpopulaties na 48h incubatie.** Na de vermelde incubatieperiodes werd het supernatans genomen en werd de concentratie NO_2^- (μM) bepaald. Al het gedetecteerde NO_2^- is hierbij afkomstig van NO. De waarden stellen het gemiddelde $\pm \text{SD}$ voor van drie onafhankelijke experimenten. Een gepaarde t-test werd gebruikt om de statistische significantie na te gaan en dit wordt weergegeven in de figuur (ns: niet significant, *: $p < 0,05$). De Wilcoxon test hield vast aan de nulhypothese.

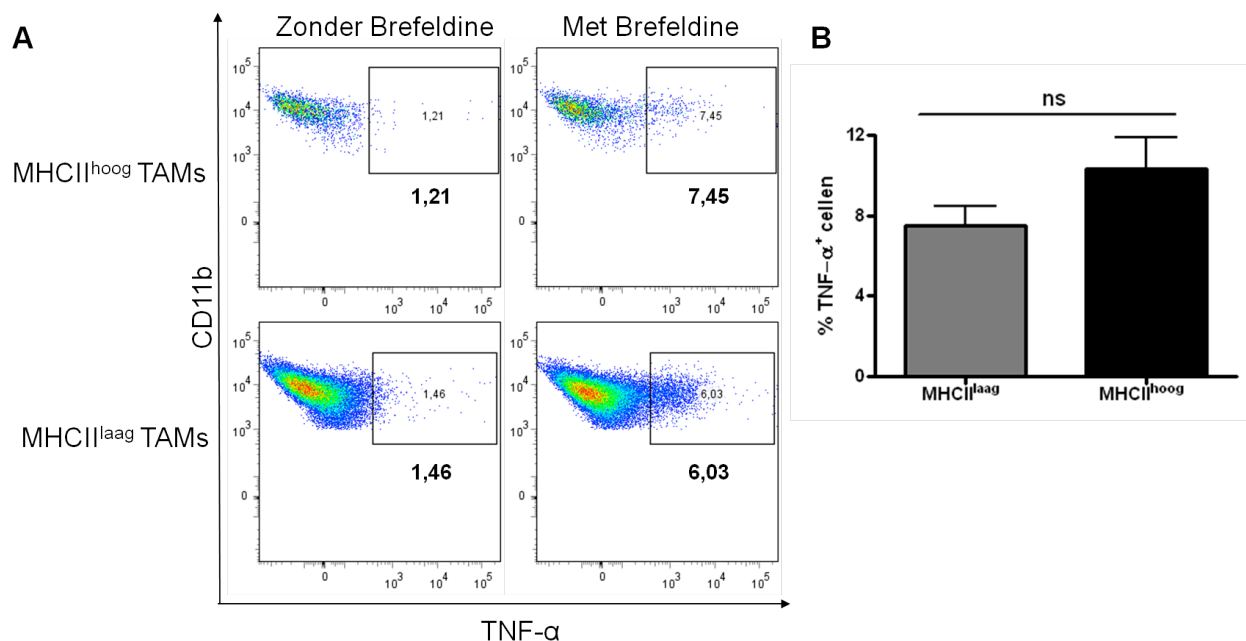
Hoewel iNOS op genniveau hoger tot expressie kwam in de $\text{MHCII}^{\text{laag}}$ TAMs, bleek dit niet het geval te zijn voor het proteïneniveau, met een merkelijk verhoogde aanwezigheid in

de MHCII^{hoog} TAMs, gecomplementeerd door een hogere NO productie. Deze waarneming is mogelijk te wijten aan post-transcriptionele regulatie (Söderberg *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009), hoewel het specifieke mechanisme dat hier de bepalende rol speelt niet gekend is. De arginase activiteit bevestigde het overwegende M2 profiel van de MHCII^{laag} TAMs, terwijl iNOS, dat toegeschreven wordt aan M1 gepolariseerde macrofagen, hier geassocieerd was met de MHCII^{hoog} TAMs die een intermediair fenotype vertoonden.

5.2.2.3. De productie van tumor necrosis factor α verschilt niet tussen de TAM subpopulaties

Hoge productie van tumor necrosis factor α (TNF- α) werd reeds beschreven als kenmerk van M2-georiënteerde TAMs (Hagemann *et al.*, 2006; Hagemann *et al.*, 2008; Movahedi *et al.*, 2010) en dus werd dit nagegaan in de subpopulaties.

TNF- α werd door middel van intracellulaire FACS gedetecteerd, echter na voorbehandeling van de celsuspensies met de Golgi-blokker Brefeldine. Dit inhibeert de secretie van TNF- α , waarna de detectie met het anti-TNF- α antilichaam plaatsvond. In figuur 5.7. A is duidelijk dat zonder de Brefeldine behandeling de cellen doorgaan met de secretie van het cytokine en dit dus nauwelijks intracellulair gedetecteerd werd.



Figuur 5.7. Productie van TNF- α door MHCII^{hoog} en MHCII^{laag} TAMs. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd en *flow* cytometrisch geanalyseerd. **A. TNF- α expressie door de TAM subpopulaties in de aan- of afwezigheid van Brefeldine.** Voor de intracellulaire TNF- α kleuring werd de celsuspensie één uur in cultuur gezet, waarna Brefeldine werd toegevoegd. Vijf uur later werden de cellen gefixeerd, gepermeabiliseerd en gekleurd met anti-TNF- α . Als controle werd de procedure ook zonder Brefeldine uitgevoerd, waardoor het TNF- α gesecreteerd werd en niet gedetecteerd kon worden. De kleurgradaties in de weergegeven FACS plot gaan van rood (veel cellen) tot

donkerblauw (weinig cellen). De figuren en percentages zijn representatief voor zes tumoren in twee onafhankelijke experimenten. **B. Percentage TNF- α positieve cellen in de TAM subpopulaties.** De percentages TNF- α ⁺ cellen van de verschillende tumoren werden bepaald. De waarden stellen het gemiddelde \pm SD voor. Een gepaarde t-test kon geen statistisch significant verschil aantonen ($p=0,06$).

De twee TAM subpopulaties vertonen een klein, doch insignificant verschil qua TNF- α productie, met een iets hoger percentage TNF- α ⁺ MHCII^{hoog} TAMs (Figuur 5.7. B). Zowel op gen- als proteïneniveau is er dus geen groot verschil in de productie van TNF- α door de TAM subpopulaties.

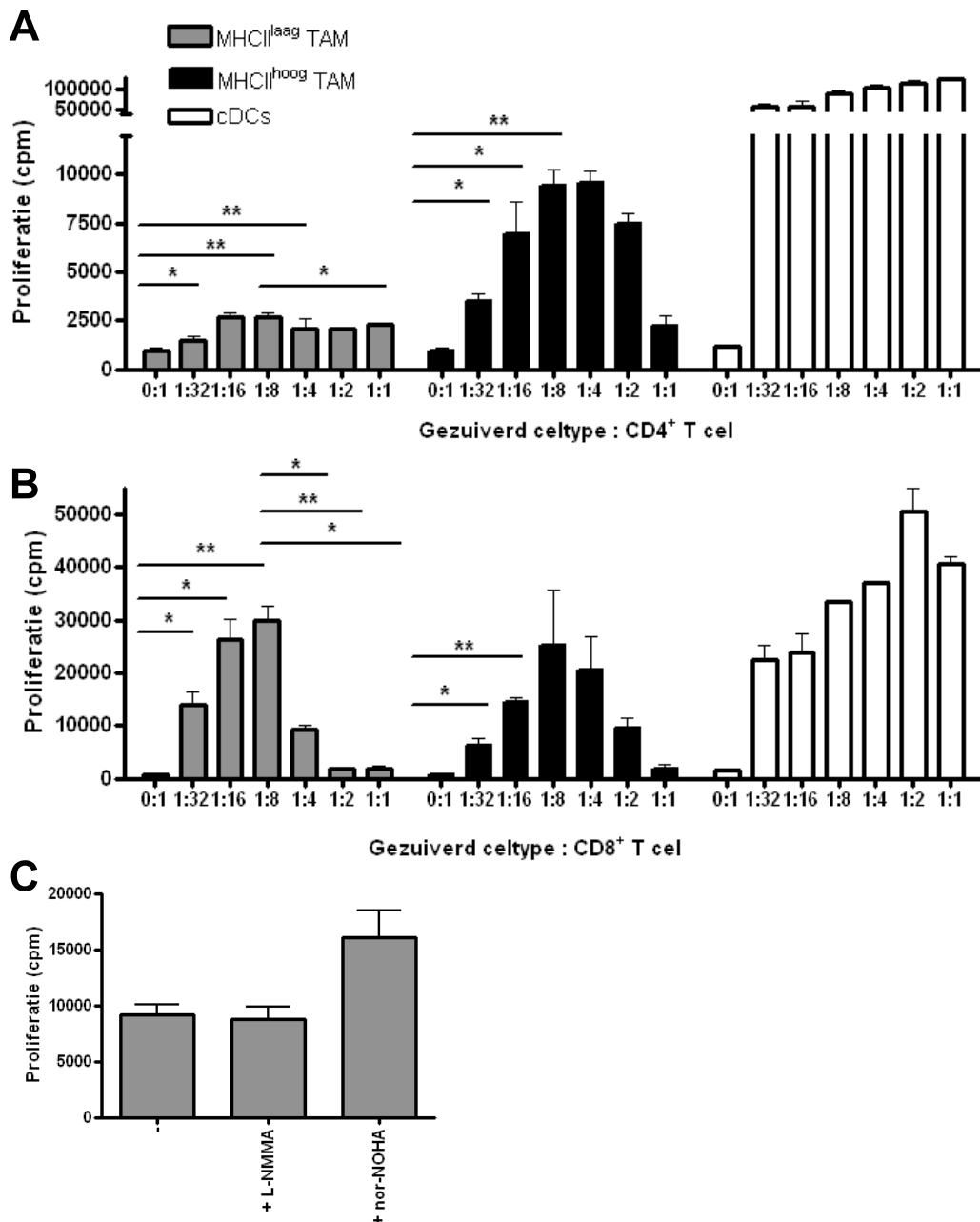
Op basis van al de voorgaande gen- en proteïne-expressie data blijkt dat de activeringstoestand van de TAM subpopulaties, vooral deze van de MHCII^{hoog} TAMs, niet zo eenduidig is als het M1/M2 paradigma. Aan de MHCII^{laag} TAMs kan vrij overtuigend een M2 activeringstoestand worden toegeschreven. De MHCII^{hoog} TAMs echter, vertonen dan wel typische M1 kenmerken, zoals de expressie van iNOS en verschillende pro-inflammatoire genen, maar drukken daarnaast ook Cdh1 en PD-L2 uit. Dit toont aan dat de macrofaag plasticiteit *in vivo* ook intermediaire fenotypes kan aannemen, in overeenstemming met de complexe micro-omgeving.

5.3. De functionaliteit van de TAM subpopulaties

Vervolgens werd nagegaan of de moleculaire heterogeniteit zich vertaalde op functioneel vlak en of de TAM subpopulaties zich verschillend gedroegen wat betreft antigenpresentatie, T-cel suppressie en de interactie met kankercellen. Dit niveau van karakterisatie is van belang, gezien het relevantere informatie levert over de specifieke rol van de macrofagen in de tumor.

5.3.1. De TAMs vertonen een laag antigenpresenterend potentieel gecombineerd met een T-cel suppressieve capaciteit

In de *Mixed Leukocyte Reaction* (MLR) kan de antigenpresenterende capaciteit van de macrofaag subpopulaties worden nagegaan. Deze *assay* is gebaseerd op de aanwezigheid van alloreactieve T cellen (0,1-0,01% van alle T cellen), die de combinatie van peptide en allogeneïsche MHC molecule herkennen (Felix & Allen, 2007). Hiervoor werden de opgezuiverde C57BL/6 MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAM subpopulaties in cultuur gezet met allogeneïsche BALB/c CD4⁺ of CD8⁺ T cellen (Figuur 5.8).



Figuur 5.8. Antigen presenterende capaciteit van de TAM subpopulaties. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd en onderworpen aan enzymatische digestie. Gesorteerde MHCII^{hoog} en MHCII^{laag} TAMs of milt cDCs afkomstig van C57BL/6 muizen werden in verschillende verhoudingen in cultuur gezet met $2 \cdot 10^5$ BALB/c T cellen. **A. MLR van MHCII^{laag}/MHCII^{hoog} TAMs/cDCs met CD4⁺ T cellen** en **B. MLR van MHCII^{laag}/MHCII^{hoog} TAMs/cDCs met CD8⁺ T cellen.** In beide MLRs werd de allogeneïsche T-cel proliferatie nagegaan. De grafieken stellen het gemiddelde niveau van ³H-thymidine incorporatie voor, uitgedrukt als *counts per minute* (cpm)±SD. De figuur is representatief voor twee onafhankelijke experimenten, uitgevoerd in triplicaat. **C. Effect van iNOS en arginase inhibitoren op de proliferatie.** Het effect van inhibitoren op de proliferatie werd nagegaan bij de 1:4 verhouding uit figuur B, waarbij de gesorteerde MHCII^{laag} TAMs in cultuur werden gebracht met $2 \cdot 10^5$ CD8⁺ T cellen, met of zonder (-) de aangegeven inhibitoren. De waarden stellen de gemiddelde cpm±SD voor. De figuur is afkomstig van een experiment uitgevoerd in triplicaat. Een gepaarde t-test werd gebruikt om de statistische significantie tussen de verschillende condities na te gaan en dit wordt weergegeven in de figuur (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Er werd nagegaan in welke mate de TAMs de T cellen kunnen activeren en aanzetten tot proliferatie. Gesorteerde milt $CD11c^{high}MHCII^{high}B220^{-}$ conventionele DCs (cDCs) dienden als een referentie T-cel stimulerende populatie (Steinman & Witmer, 1978).

Het eerste dat opvalt (Figuur 5.8. A en B) is dat tot de verhouding 1:8 (TAM:T cellen) de T-cel proliferatie toenam. Beide TAM subpopulaties vertoonden hier een antipresenterende capaciteit ten opzichte van zowel $CD4^{+}$ als $CD8^{+}$ cellen, die echter beperkter was vergeleken met de cDCs. In figuur 5.8. A is zichtbaar dat de $MHCII^{high}$ TAMs de $CD4^{+}$ cellen in hogere mate stimuleerden dan de $MHCII^{laag}$ TAMs, wat gerelateerd kan zijn aan hun hogere MHCII expressie.

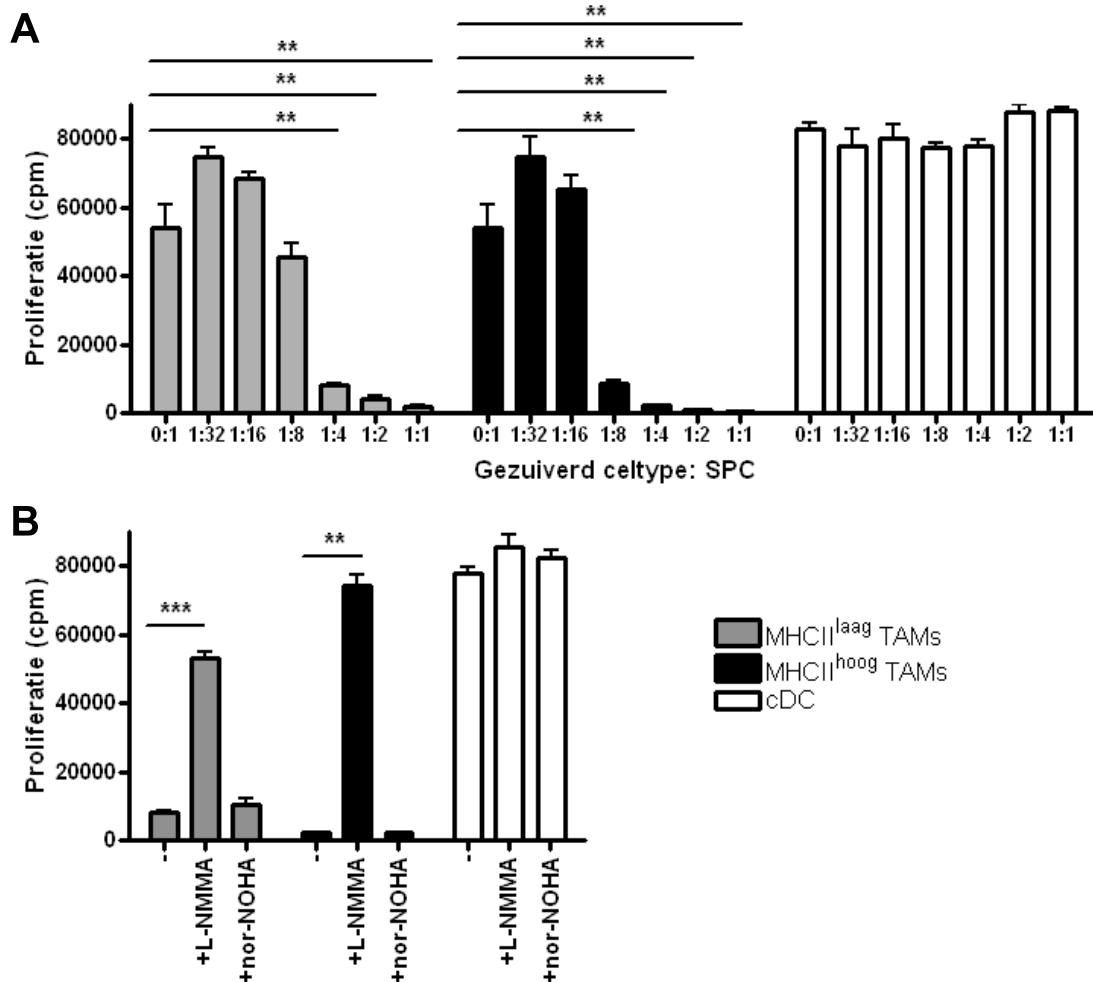
Bij hogere TAM:T cel verhoudingen was een daling van de proliferatie merkbaar, die niet voorkwam bij de cDCs en dus niet toegeschreven kan worden aan een mogelijk *crowding* effect. Dit effect kan zich namelijk voordoen indien cellen aan een te hoge dichtheid in een *well* aanwezig zijn om optimaal te prolifereren en elkaar beginnen te inhiberen in hun groei. De daling van de proliferatie kan er op duiden dat vanaf een 1:4 verhouding de TAMs een overwegend suppressief effect begonnen uit te oefenen.

Wanneer de $CD4$ MLR geanalyseerd werd door middel van een ANOVA bleek dat zowel de subpopulaties, de TAM: $CD4^{+}$ T cel verhouding als het gecombineerde effect een invloed hebben ($p < 0,001$) op de proliferatie van de T cellen. Voor de $CD8$ MLR (Figuur 5.8. B) bleken de TAM subpopulaties eenzelfde effect uit te oefenen op de T-cel proliferatie, doch was er wel een differentieel effect afhankelijk van de gebruikte TAM: $CD8^{+}$ T cel verhouding ($p < 0,001$).

Het suppressieve mechanisme van de TAMs werd voor de $CD8$ MLR onderzocht door bij een vaste verhouding van 1:4 (TAM: T cellen) inhibitoren toe te voegen (Figuur 5.8. C), namelijk N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) als inhibitor van iNOS (Hibbs *et al.*, 1987) en anderzijds N^O -Hydroxy-nor-L-arginine (Nor-NOHA) als inhibitor van Arginase (Custot *et al.*, 1997). Bij de 1:4 TAM:T cel verhouding vertoonden de $MHCII^{laag}$ TAMs suppressie en arginase bleek een rol te spelen in de suppressieve capaciteit, gezien behandeling met nor-NOHA de proliferatie verhoogde (Figuur 5.8. C). De $MHCII^{high}$ TAMs vertoonden bij een verhouding van 1:4 nog geen sterke suppressieve capaciteiten (Figuur 5.8. B), wat de behandeling met inhibitoren hier inconclusief maakte (data niet getoond).

5.3.2. Tijdens de polyclonale T-cel activatie oefenen de TAM subpopulaties een iNOS-gemedieerd suppressief effect uit

In een MLR spelen zowel antigenpresentatie als suppressie door de TAMs een rol. Teneinde het effect van antigenpresentatie te omzeilen en de suppressieve capaciteiten van de subpopulaties uit te vergroten, werd overgegaan tot een polyclonale T-cel suppressie assay (Figuur 5.9.).



Figuur 5.9. Suppressie van de polyclonale T-cel proliferatie door de TAM subpopulaties.
A. Polyclonale T-cel proliferatie in de aanwezigheid van de TAM subpopulaties. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd en onderworpen aan enzymatische digestie. De gesorteerde MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs of milt cDCs werden in verschillende verhoudingen toegevoegd aan $2 \cdot 10^5$ naïeve C57BL/6 miltcellen. Coculturen werden gestimuleerd met anti-CD3 en de proliferatie werd nagegaan. Het gemiddelde niveau van ^3H -thymidine incorporatie wordt voorgesteld, uitgedrukt als $\text{cpm} \pm \text{SD}$. **B. Het effect van iNOS en arginase inhibitoren op de polyclonale T-cel proliferatie.** De gesorteerde MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs of milt cDCs werden in een 1:4 vaste verhouding in cultuur gebracht met $2 \cdot 10^5$ C57BL/6 miltcellen en behandeld met anti-CD3, met of zonder (-) de aangegeven inhibitoren. De waarden stellen het gemiddelde $\pm \text{SD}$ voor. Alles werd uitgevoerd in triplicaat en de resultaten zijn representatief voor twee onafhankelijke experimenten. Een gepaarde t-test werd gebruikt om de statistische significantie tussen de verschillende condities na te gaan en dit wordt weergegeven in de figuur (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$).

Hierin werden syngeneïsche miltcellen (SPC), gestimuleerd door een anti-CD3 antilichaam, samen in cultuur gezet met de opgezuiverde TAM subpopulaties. Dit anti-CD3 antilichaam bootst de specifieke antigenherkenning door de T-cel receptor *in vitro*

na en activeert de T cellen. Een nadeel is echter dat door de massale activatie van de T cellen ook veel cytokines worden aangemaakt (onder andere IFN- γ) die het TAM fenotype en geassocieerde functionaliteit zouden kunnen beïnvloeden.

Net als in de MLR werd een daling van de T-cel proliferatie waargenomen onder invloed van de TAM subpopulaties, die niet aanwezig was bij de cDC controlepopulatie (Figuur 5.9. A). De suppressie van de T-cel proliferatie vond plaats bij stijgende TAM verhoudingen, vanaf ongeveer 1:8, waarbij de MHCII^{hoog} TAMs een sterkere onderdrukking van de proliferatie vertoonden. Bij nog hogere verhoudingen (1:2; 1:1) werd de proliferatie bijna herleid tot nul. Een analyse door middel van ANOVA leverde op dat zowel de TAM subpopulatie ($p < 0,05$) en de TAM:SPC verhouding ($p < 0,001$) een effect hebben. Daarenboven blijkt het effect van de verhouding te verschillen naargelang de beschouwde TAM subpopulatie ($p < 0,01$), zoals bijvoorbeeld zichtbaar is bij de 1:8 TAM:SPC verhouding.

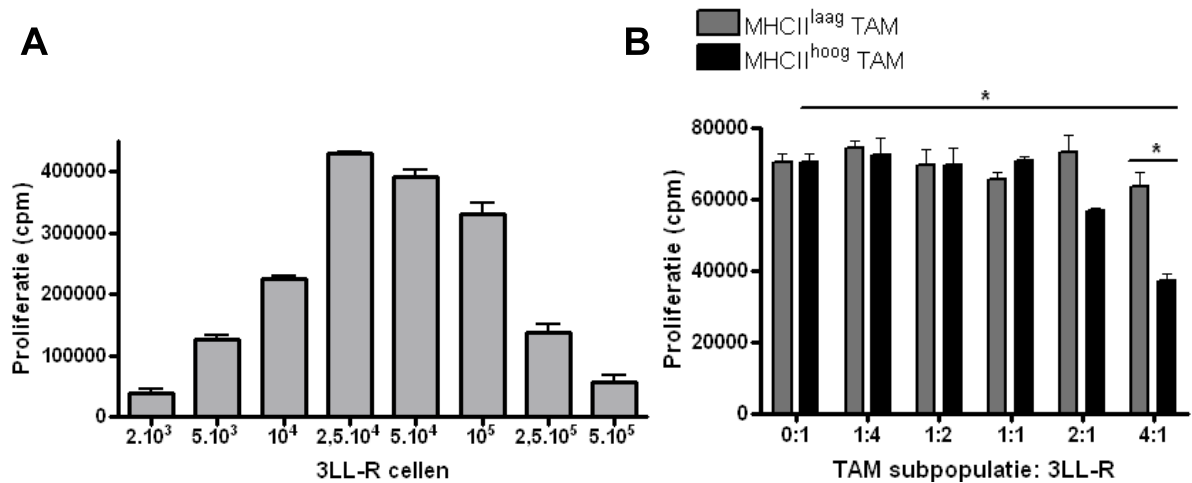
Om het mechanisme van deze suppressie te bepalen werd bij een vaste TAM:SPC verhouding van 1:4 gebruik gemaakt van de inhibitoren *L*-NMMA en nor-NOHA. Uit figuur 5.9. B blijkt dat beide TAM subpopulaties hun suppressie verwezenlijkten via iNOS, oftewel via NO, gezien behandeling met *L*-NMMA de proliferatie van de SPC herstelde.

5.3.3. De TAM subpopulaties hebben een verschillend effect op de proliferatie van 3LL-R cellen

Naast effecten op T cellen kunnen TAMs ook een rechtstreekse impact hebben op de proliferatie van kankercellen. Hierbij is het mogelijk dat de TAM subpopulaties een verschillende productie kennen van proteïnen die hetzij een mitogene, hetzij een anti-proliferatieve activiteit bezitten. Om dit na te gaan werden de opgezuiverde TAM subpopulaties in cultuur gezet met 3LL-R cellen in een 96-well plaat. Ter bepaling van de optimale hoeveelheid 3LL-R cellen werden deze eerst alleen in cultuur gezet en hun mate van proliferatie bepaald. Figuur 5.10. A vertoont een stijging tot $2,5 \cdot 10^4$ cellen, waarna de proliferatie afnam. Het is mogelijk dat vanaf die concentratie de 3LL-R cellen het reeds vermelde (zie §5.3.1) *crowding* effect vertoonden en elkaar inhibeerden in hun groei. Uit A werd als optimale hoeveelheid 3LL-R cellen $5 \cdot 10^3$ gekozen om zo *crowding* te vermijden en mogelijke mitogene capaciteiten duidelijk te kunnen waarnemen.

Vanaf de 1:1 ratio bleken de TAMs over een zekere anti-proliferatieve capaciteit te beschikken (Figuur 5.10. B). Dit is statistisch significant voor de MHCII^{hoog} TAMs, die een grotere anti-proliferatieve capaciteit vertoonden, vergeleken met de MHCII^{laag} TAMs, bij een 4:1 verhouding. Deze waarneming suggereert dat MHCII^{laag} TAMs de anti-proliferatieve activiteit van MHCII^{hoog} TAMs missen, of deze compenseren door de

productie van mitogene factoren. In deze context dient opgemerkt dat MHCII^{laag} TAMs hogere mRNA niveaus bezitten van het gekende mitogeen GAS6 (Loges *et al.*, 2010).



Figuur 5.10. Mitogene en anti-proliferatieve capaciteit van de TAM subpopulaties. A. Proliferatie van 3LL-R kankercellen. 3LL-R cellen werden in cultuur gezet en hun proliferatie werd bepaald door middel van ³H-thymidine incorporatie. Elke conditie werd in triplicaat uitgevoerd. Waarden stellen het gemiddelde±SD voor. **B. Cocultuur van 3LL-R en TAM subpopulaties.** C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met 3.10⁵ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd en onderworpen aan enzymatische digestie. Gesorteerde MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs werden in verschillende verhoudingen in cultuur gezet met 5.10³ 3LL-R cellen. De 3LL-R proliferatie werd nagegaan door het niveau van ³H-thymidine incorporatie, uitgedrukt als cpm. Elke conditie werd in triplicaat uitgevoerd. Waarden stellen het gemiddelde±SD voor. De statistische significantie werd nagegaan met een gepaarde t-test, dit wordt weergegeven in de figuur (*: p<0,05).

5.4. Effect van de micro-omgeving op het TAM fenotype

Uit het voorgaande werd duidelijk dat de 3LL-R TAM subpopulaties een moleculaire en functionele heterogeniteit vertoonden, analoog aan wat Movahedi *et al.* (2010) hebben vastgesteld in een ander tumormodel. Dit maakte het interessant om de drijvende factor achter deze diversiteit te achterhalen. Hiervoor werden een aantal signalisatiewegen onderzocht waarvan reeds in de literatuur vermeld werd dat ze een rol spelen in het bepalen van het TAM fenotype of meer algemeen in kankerbiologie.

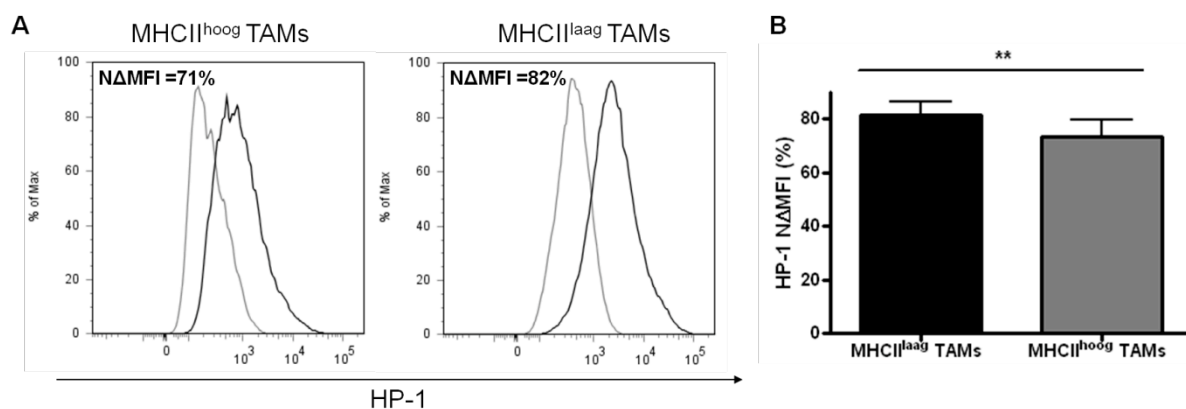
5.4.1. Hypoxie speelt een rol in de heterogeniteit van de TAM subpopulaties

De invloed van hypoxie op TAMs wordt frequent aangehaald in de literatuur en speelt onder meer een rol in de recruitering van de macrofagen naar de tumor (Murdoch &

Lewis, 2005). Bovendien namen Movahedi *et al.* (2010) reeds een verschillende lokalisatie waar van de TAM subpopulaties, waarbij de MHCII^{hoog} TAMs eerder geassocieerd waren met de normoxische regio's van de tumor en de MHCII^{laag} TAMs met de hypoxische gebieden. Het was dus interessant om het verband tussen hypoxie en de TAM subpopulaties verder te onderzoeken in het 3LL-R model.

5.4.1.1. De TAM subpopulaties lokaliseren zich verschillend ten opzichte van hypoxische regio's

Om de lokalisatie van de TAM subpopulaties in hypoxische of normoxische gebieden van de tumor te bepalen, werden tumordragende muizen intraperitoneaal (i.p.) geïnjecteerd met pimonidazole hydrochloride (Hypoxyprobe, HP-1) of HBSS als controle. Pimonidazole vormt chemische complexen met proteïnen in regio's van hypoxie en het zijn deze stabiele complexen die gedetecteerd kunnen worden. Twee uur na injectie werden de tumoren verwijderd en de celsuspensie geanalyseerd voor de aanwezigheid van HP-1 complexen door intracellulaire FACS. De Δ MFI werd bepaald als parameter voor de mate van hypoxie blootstelling. Beide subpopulaties vertoonden een vrij hoog HP-1 signaal (Figuur 5.11. A), dat echter systematisch hoger lag voor de MHCII^{laag} TAMs en daarenboven significant verschillend was (Figuur 5.11. B). Dit suggereert dat 3LL-R tumoren vrij sterk hypoxisch zijn –hetgeen zou overeenstemmen met het necrotische uiterlijk van deze tumoren en eerdere waarnemingen (Ziemer *et al.*, 2005)- doch dat MHCII^{laag} TAMs zich eerder preferentieel gaan lokaliseren in de sterkst hypoxische regio's.



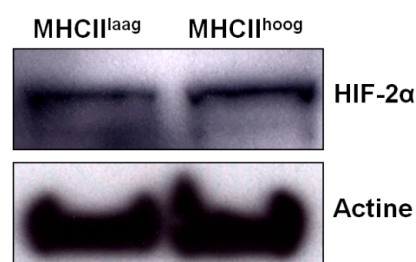
Figuur 5.11. Associatie van de TAM subpopulaties in de 3LL-R tumor met hypoxische regio's. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de dieren i.p. ingespoten met ofwel HypoxyProbe-1 (HP-1) of HBSS (controle). Na twee uur werden de dieren geëthanaseerd en de tumoren genomen en enzymatisch behandeld. De cellen werden gefixeerd, gepermeabiliseerd en gekleurd met anti-HP-1. **A. HP-1 expressie voor de TAM subpopulaties.** Het signaal wanneer de muizen behandeld werden met HP-1, wordt weergegeven in het zwart. De HBSS controle wordt getoond in het grijs. Merk op dat hier een logaritmische schaal wordt gebruikt. Voor beide TAM subpopulaties werd de Δ MFI waarde

bepaald, gedefinieerd als $\Delta\text{MFI} = ((\text{MFI}_{\text{HP-1}} - \text{MFI}_{\text{controle}}) / \text{MFI}_{\text{HP-1}}) \times 100$. De figuren en ΔMFI waarden zijn representatief voor vijf muizen. **B. Grafische voorstelling van de HP-1 ΔMFI waarden.** De gemiddelde ΔMFI waarde \pm SD van de verschillende tumoren wordt weergegeven voor de subpopulaties. Dit werd statistisch geanalyseerd met een gepaarde t-test. Het resultaat hiervan wordt weergegeven in de figuur (**: $p < 0,01$). De niet-parametrische Wilcoxon test toonde ook een significant verschil aan ($p < 0,05$).

Teneinde de co-lokalisatie van hypoxische regio's en TAM subpopulaties te visualiseren werden ook immunohistochemie (IHC) experimenten geïnitieerd. Hieruit bleek dat $\text{MHCII}^{\text{laag}}$ TAMs in hypoxische regio's teruggevonden konden worden en er geen associatie merkbaar was tussen de $\text{MHCII}^{\text{hoog}}$ TAMs en de hypoxische (HP-1) gebieden, hoewel dit slechts preliminaire resultaten zijn (D. Laoui, persoonlijke communicatie).

5.4.1.2. De *hypoxia inducible factor 2 α* kan gedetecteerd worden in de TAM subpopulaties

De *hypoxia inducible factors* (HIFs) zijn proteïnen die een rol spelen bij de hypoxische respons van een cel en onder hypoxische omstandigheden gestabiliseerd worden. De aanwezigheid van deze proteïnen werd dan ook nagegaan in de TAM subpopulaties via Western Blot. HIF-1 α kon niet gedetecteerd worden in gesorteerde TAM populaties, maar wel in de positieve controle (miltcellen gestimuleerd met de hypoxie-nabootser CoCl_2 of kobaltchloride; data niet getoond). Dit zou kunnen betekenen dat ofwel HIF-1 α inderdaad niet tot expressie kwam, ofwel dat HIF-1 α gedegradeerd werd tijdens de langdurige opzuiveringsprocedure. Het HIF-1 α proteïne heeft immers slechts een halfwaardetijd van ongeveer vijf minuten (Wang *et al.*, 1995). Het HIF-2 α proteïne, dat veel langer stabiel blijft na reoxygenatie (Elbarghati *et al.*, 2008), bleek in gelijkaardige mate aanwezig te zijn in beide TAM subpopulaties (Figuur 5.12.).



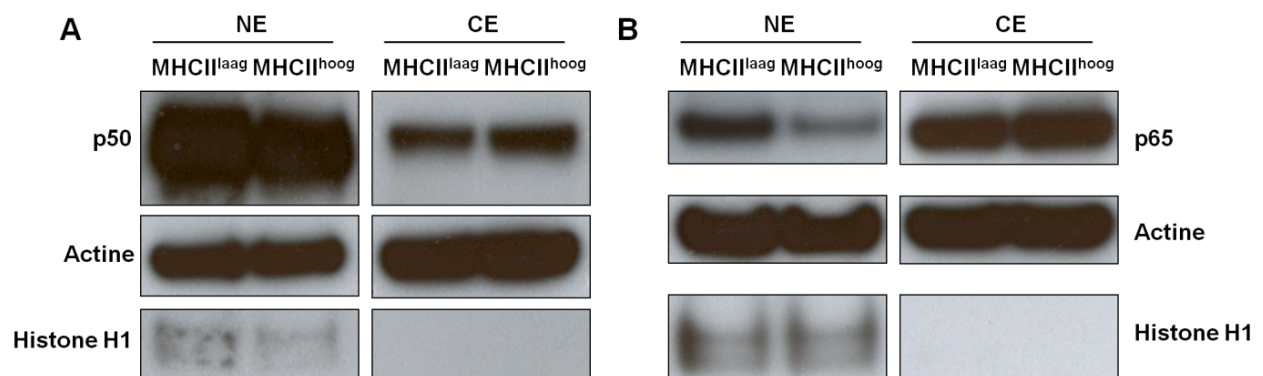
Figuur 5.12. Detectie van HIF-2 α door middel van Western Blot. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd, enzymatisch gedegradeerd en werden de $\text{MHCII}^{\text{laag}}$ en $\text{MHCII}^{\text{hoog}}$ TAMs gesorteerd en lysaten in ureumbuffer bereid. HIF-2 α werd gedetecteerd in de lysaten en actine werd gebruikt als ladingscontrole. De weergegeven figuren zijn afkomstig van één experiment met acht muizen.

Dit is in overeenstemming met het gegeven dat beide TAM subpopulaties hypoxie ondervinden, zoals aangetoond door HP-1 kleuringen en de waarneming dat HIF-2 α mogelijk niet toelaat het onderscheid te maken tussen meer en minder hypoxische regio's (Holmquist-Mengelbier *et al.*, 2006).

5.4.2. De MHCII^{laag} TAMs vertonen een hogere NF-κB activatie

Aan NF-κB wordt een 'centrale rol' toegeschreven in de vorming van het TAM fenotype (Hagemann *et al.*, 2009), maar een sluitend model over wat deze rol precies inhoudt, is er nog niet. Daarenboven lokaliseren de TAM subpopulaties zich differentieel ten opzichte van hypoxie, wat het extra interessant maakte om dit in meer detail te onderzoeken, gezien de vele verbanden die er bestaan tussen NF-κB activatie en hypoxie (Nizet & Johnson, 2009; Rius *et al.*, 2008).

Van de vers opgezuiverde, ongestimuleerde TAM subpopulaties werden nucleaire en cytoplasmatische extracten gemaakt, waarin door middel van Western Blot de aanwezigheid van de p50 en p65 NF-κB subeenheden werd nagegaan (Figuur 5.13.).



Figuur 5.13. Activatie van de NF-κB signalisatieweg in de TAM subpopulaties. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd. De MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs werden hieruit gesorteerd en nucleaire (NE) en cytoplasmatische extracten (CE) werden bereid. **A. Western Blot ter detectie van p50.** De aanwezigheid van p50 werd nagegaan in de NE en CE van de TAM subpopulaties. **B. Western Blot ter detectie van p65.** De aanwezigheid van p65 werd nagegaan in de NE en CE van de TAM subpopulaties. Actine en Histone H1 (nucleus specifiek) werden gebruikt als ladingscontroles.

p65 werd in een hogere hoeveelheid waargenomen in het nucleaire extract van de MHCII^{laag} TAMs ten opzichte van de MHCII^{hoog} TAMs, wat duidt op een hogere nucleaire translocatie en bijgevolg NF-κB activatie in de MHCII^{laag} subpopulatie. Dit gaat gepaard met een lagere cytoplasmatische aanwezigheid in de MHCII^{laag} TAMs ten opzichte van de MHCII^{hoog} TAMs (Figuur 5.13. B). Een gelijkaardige trend werd waargenomen voor p50, weliswaar minder duidelijk (Figuur 5.13. A).

5.4.3. *Signal transducer and activator of transcription* (STAT) activatie in de TAM subpopulaties

De STAT transcriptiefactoren werden ook onderzocht, gezien hun belang in zeer veel signalisatieprocessen (zie §2.3.6.5). Zo spelen de STATs een belangrijke rol in de Th1 en Th2 cytokine signalisatie en in de bepaling van het M1/M2 fenotype. Bovendien reguleren de STATs mee de expressie van merkers die geassocieerd zijn met enerzijds de MHCII^{laag} of MHCII^{hoog} TAMs. Zo is fosfo-STAT1 (P-STAT1) bijvoorbeeld betrokken in de expressie van onder andere MHCII en NOS2 (Takeda & Akira, 2000).

5.4.3.1. STAT1 fosforylatie verschilt niet na IFN- γ stimulatie

STAT1 is de belangrijkste signaal molecule *downstream* van de IFN- γ receptor en is dan ook belangrijk in het activeren van een M1 fenotype. Hagemann *et al.* (2008) toonden bovendien aan dat NF- κ B deficiënte macrofagen een verhoogde STAT1 fosforylatie vertoonden wanneer ze in cultuur werden gebracht met tumorcellen. Ze brachten de STAT1 activatie dan ook in verband met M1-gemedieerde tumoricidale activiteit (Hagemann *et al.*, 2008).

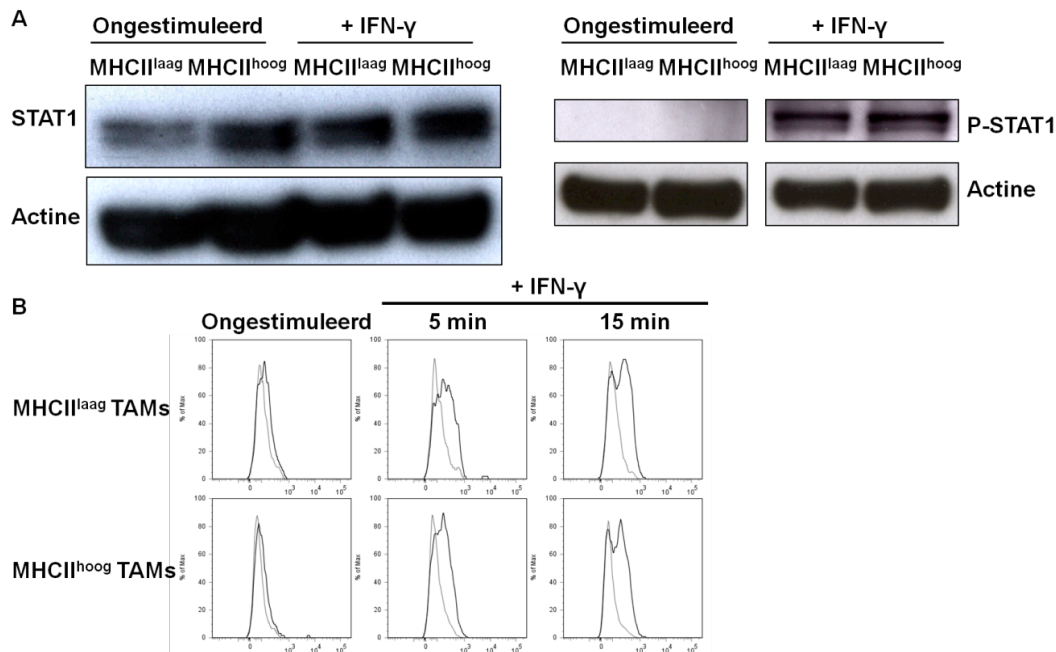
De aanwezigheid van STAT1 en P-STAT1 werd bijgevolg nagegaan in de opgezuiverde TAM subpopulaties en dit zowel via Western Blot als via 'Phosflow'. Dit laatste is een techniek die gebruik maakt van fosfospecifieke antilichamen, waar onder andere de fosforylatiestatus van proteïnen betrokken in signalisatie mee kan worden nagegaan. De cellen worden gestimuleerd, vervolgens gefixeerd, gepermeabiliseerd en na incubatie met de antilichamen, geanalyseerd. Er zijn een aantal voordelen verbonden aan deze techniek. Het voornaamste is dat in de plaats van een gemiddelde respons, het effect van de stimuli op cellulair niveau wordt nagegaan en de heterogeniteit in respons kan waargenomen worden (Krutzik *et al.*, 2004).

Er kon geen P-STAT1 gedetecteerd worden in niet-gestimuleerde TAMs (Figuur 5.14. A en B). Dit kan betekenen dat de TAM subpopulaties *in vivo* geen STAT1 fosforylatie bezitten of dat de fosforylatie verloren is gegaan tijdens de lange opzuiveringsprocedure. Gezien dit ook werd waargenomen bij P-STAT3 en P-STAT6 (zie *infra*) is deze laatste mogelijkheid waarschijnlijker, hoewel dit alleen uitgesloten kan worden door middel van IHC. Na stimulatie met IFN- γ werd P-STAT1 zowel in de MHCII^{laag} als MHCII^{hoog} TAMs gedetecteerd, zowel via Western Blot als Phosflow (Figuur 5.14. A en B). Ook totaal STAT1 werd in de IFN- γ gestimuleerde TAMs in gelijke hoeveelheden waargenomen in de subpopulaties, wanneer rekening gehouden werd met de ladingscontrole.

De Phosflow resultaten suggereren een zekere heterogeniteit binnen de TAM subpopulaties (Figuur 5.14. B), met een gedeelte van de cellen dat niet-responsief bleek te zijn en een ander deel dat wel responsief was op de IFN- γ stimulatie en STAT1

fosforyleerde ten gevolge van deze stimulatie. Dit kan echter ook een artefact zijn van de techniek gezien Krutzik *et al.* (2005) een gelijkaardige bimodale respons waarnamen na *in vitro* stimulatie van een celpopulatie, die echter na een *in vivo* stimulatie unimodaal bleek te zijn (Krutzik *et al.*, 2005).

Hieruit bleek dat beide TAM subpopulaties even responsief reageerden op IFN- γ stimulatie. De gebruikte techniek gaf ons echter geen informatie over de *in vivo* activatie van de signalisatieweg.



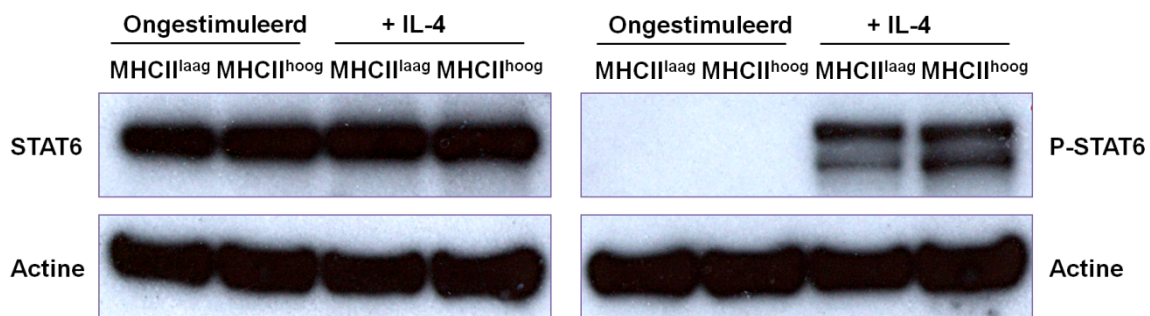
Figuur 5.14. Detectie van STAT1 fosforylatie in de TAM subpopulaties. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd, enzymatisch gedegradieerd en werden de MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs gesorteerd. **A. Western Blot voor de detectie van STAT1 en P-STAT1 in ongestimuleerde en IFN- γ gestimuleerde lysaten.** De aanwezigheid van STAT1 en P-STAT1 werd nagegaan in lysaten van vers opgezuiverde TAMs (ongestimuleerd) of TAMs die 15 min gestimuleerd waren met 100 U/ml IFN- γ . Actine werd gebruikt als ladingscontrole. **B. Detectie van P-STAT1 door middel van Phosflow.** De gesorteerde TAM subpopulaties werden gestimuleerd met 100 U/ml IFN- γ voor de aangeduide periode, gefixeerd, gepermeabiliseerd, geïncubeerd met het P-STAT1 specifieke antilichaam en onderworpen aan *flow* cytometrische analyse. De zwarte lijn geeft het signaal van het fosfo-specifieke antilichaam weer, de grijze lijn stelt het isotype voor. Merk op in de figuren een logaritmische schaal wordt gebruikt. De weergegeven figuren zijn afkomstig van één experiment met zes muizen.

5.4.3.2. STAT6 wordt niet differentieel geactiveerd in de TAM subpopulaties na IL-4 stimulatie

STAT6 activatie gebeurt onder invloed van de Th2 cytokines IL-4 en IL-13 en wordt dan ook algemeen geassocieerd met alternatief geactiveerde (M2) macrofagen (Martinez *et al.*, 2009). De lysaten van de opgezuiverde TAM subpopulaties werden op Western Blot

onderzocht. Totaal STAT6 bleek in gelijke hoeveelheden aanwezig te zijn in de subpopulaties, ook na stimulatie met IL-4 (Figuur 5.15.).

Ongestimuleerd werd geen P-STAT6 waargenomen, wat wel het geval was na IL-4 stimulatie. Net als voor P-STAT1 was hier geen merkbaar verschil aanwezig in STAT6 activatie tussen de TAM subpopulaties (Figuur 5.15.). Beide TAM subpopulaties reageerden dus even responsief op IL-4 stimulatie.



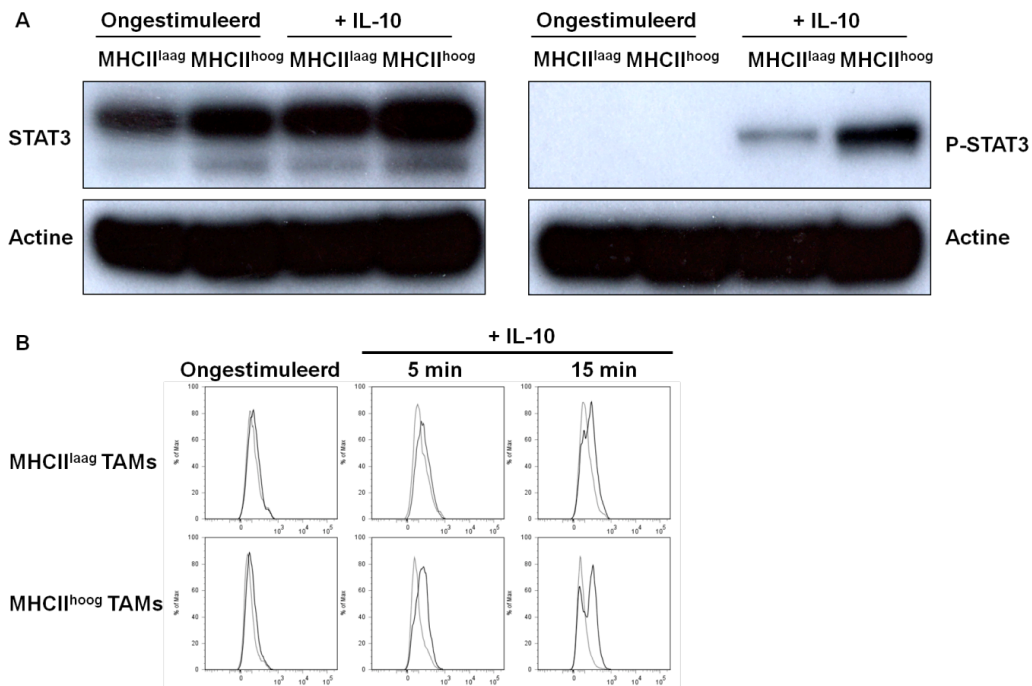
Figuur 5.15. Detectie van de activatie van de STAT6 signalisatieweg in de TAM subpopulaties via Western Blot. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd. De MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs werden gesorteerd en lysaten bereid. De aanwezigheid van STAT6 en P-STAT6 werd nagegaan in lysaten van vers opgezuiverde TAMs of TAMs die 15 min gestimuleerd werden met 100 U/ml IL-4. Actine werd gebruikt als ladingscontrole.

5.4.3.3. De MHCII^{hoog} TAMs vertonen een hogere STAT3 fosforylatie na stimulatie met IL-10

Vervolgens werd de aanwezigheid van STAT3 en P-STAT3 nagegaan, opnieuw zowel via Western Blot als Phosflow. Deze signalisatieweg, die geactiveerd wordt door onder andere cytokines zoals bijvoorbeeld IL-10, speelt onder meer een rol in de suppressie van inflammatoire genexpressie en wordt dus als immunosuppressief beschouwd (Murray, 2007).

Uit Western Blot bleek dat de TAM subpopulaties ongestimuleerd en na *in vitro* IL-10 stimulatie, wanneer rekening gehouden werd met de ladingscontrole, over ongeveer evenveel STAT3 beschikten (Figuur 5.16. A). Onder invloed van IL-10, werd P-STAT3 waargenomen, met een merkbaar hogere hoeveelheid in de MHCII^{hoog} TAMs (Figuur 5.16. A).

Ook op basis van Phosflow kon dit besloten worden, met een hoger signaal bij de MHCII^{hoog} TAMs, die opnieuw een zekere heterogeniteit in responsiviteit vertoonden (Figuur 5.16. B). Globaal betekenen deze data dat de MHCII^{hoog} TAMs een inherent hogere IL-10 responsiviteit vertoonden.



Figuur 5.16. Detectie van STAT3 fosforylatie in de TAM subpopulaties. C57BL/6 muizen werden s.c. geïnjecteerd met $3 \cdot 10^6$ 3LL-R kankercellen. Na twaalf dagen tumorgroei werden de tumoren verwijderd, enzymatisch gedegradeerd en werden de MHCII^{laag} en MHCII^{hoog} TAMs gesorteerd. **A. Western Blot voor de detectie van STAT3 en P-STAT3 in ongestimuleerde en IL-10 gestimuleerde lysaten.** De aanwezigheid van STAT3 en P-STAT3 werd nagegaan in lysaten van vers opgezuiverde TAMs (ongestimuleerd) of TAMs die 15 min gestimuleerd waren met 100 U/ml IL-10. Actine werd gebruikt als ladingscontrole. De weergegeven figuur is representatief voor twee experimenten. **B. Detectie van P-STAT3 door middel van Phosflow.** De gesorteerde TAM subpopulaties werden gestimuleerd met 100 U/ml IL-10 voor de aangeduide periode, gefixeerd, gepermeabiliseerd, geïncubeerd met het P-STAT3 specifieke antilichaam en onderworpen aan *flow* cytometrische analyse. De zwarte lijn geeft het signaal van het fosfo-specifieke antilichaam weer, de grijze lijn stelt het isotype voor. Merk op in de figuren een logaritmische schaal wordt gebruikt. De figuur is afkomstig van één experiment.

6. Discussie

Tumor-geassocieerde macrofagen of TAMs worden meestal beschreven als een homogene populatie van alternatief geactiveerde macrofagen (Biswas *et al.*, 2006; Mantovani *et al.*, 2002). Dit werd de laatste jaren gecontesteerd (Biswas *et al.*, 2008) en recent werd in het TS/A borstkankermodel de heterogeniteit van TAMs uitvoerig beschreven (Movahedi *et al.*, 2010). Onze data in het 3LL-R longkankermodel bevestigen dit niet alleen in een andere muizenstam, maar leggen ook potentieel drijvende factoren voor hun heterogeniteit bloot.

De 3LL-R tumor bleek een heterogene myeloïde celpopulatie te bevatten, waar, net als in het TS/A model, verschillende TAM subpopulaties in teruggevonden konden worden. Hun moleculaire karakterisering werd in eerste instantie op genexpressieniveau uitgevoerd. De MHCII^{laag} TAMs vertoonden hoge expressieniveaus van M2-geassocieerde genen zoals *CD163*, *Gas3*, *Stab1*, *Ccl22* en andere. De MHCII^{hoog} TAMs hadden een hoge expressie van de pro-inflammatoire genen *Il-1b* en *Ptgs2* (COX-2), maar ook van *Fizz1* en *Cdh1*, die als M2 worden beschouwd. Movahedi *et al.* (2010) bepaalden reeds een soortgelijk genexpressie profiel van de TAM subpopulaties in het TS/A borstcarcinoom model. Het was opvallend dat alle genen die geassocieerd worden met de MHCII^{laag} TAMs in het TS/A model, ook in het 3LL-R model hoger tot expressie kwamen in die subpopulatie. Daarnaast zijn de genen *Ccl17*, *Il-1b*, *Pgf* en *Ptgs2* in beide modellen geassocieerd met de MHCII^{hoog} TAMs. *Nos2*, *angpt2*, *Mmp9* en *Ccl22* die in het TS/A model hoger uitgedrukt worden in de MHCII^{hoog} TAMs, vertoonden in 3LL-R tumoren echter een hogere expressie in de MHCII^{laag} TAMs. Het dient opgemerkt te worden dat *Nos2*, *Mmp9* (Anderson, 2010) en *Angpt2* (Phelps *et al.*, 2006) onderhevig zijn aan post-transcriptionele regulatie op het vlak van mRNA stabiliteit, wat potentieel een rol speelt in deze discrepantie. Het 3LL-R TAM genexpressie profiel zou ook vergeleken kunnen worden met andere studies (Biswas *et al.*, 2006; Ojalvo *et al.*, 2009) om de bredere relevantie te onderzoeken. Echter, afhankelijk van het laboratorium wordt een verschillende isolatieprocedure voor de TAMs gebruikt, naast de verschillende definities voor TAMs die gehanteerd worden (vaak gedefinieerd als F4/80⁺ cellen). Omwille van deze reden wordt een vergelijking bemoeilijkt.

Een aantal merkers werden vervolgens op proteïneniveau nagegaan (Tabel 6.1.). Dit bevestigde verder dat de MHCII^{laag} TAMs M2 gepolariseerd waren, terwijl de MHCII^{hoog} TAMs eerder aanleunden bij het M1 fenotype, hoewel met vertoon van M2 kenmerken. Zo kwamen de M1-geassocieerde merkers MHCII, CD11c en iNOS tot hogere expressie in de MHCII^{hoog} TAMs en de M2 merkers arginase, MMR, IL-4Ra en SR-A in de MHCII^{laag}

TAMs. Echter, ook Cdh1 en PD-L2, typische M2 merkers (Huber *et al.*, 2010; Van den Bossche *et al.*, 2009), waren eerder geassocieerd met de MHCII^{hoog} TAMs. Deze twee merkers worden allebei specifiek geïnduceerd door middel van IL-4, wat interessant is, gezien aan IL-4 al eerder een rol in de vorming van het fenotype van de TAMs werd toegeschreven (DeNardo *et al.*, 2009; Gocheva *et al.*, 2010).

Tabel 6.1. Overzicht van het proteïne-expressie profiel van de TAM subpopulaties. De verschillende onderzochte proteïnen en hun niveau van expressie in de subpopulaties wordt weergegeven (-: geen expressie; +: expressie; ++: hoge expressie; +++: zeer hoge expressie).

	MHCII ^{laag} TAMs	MHCII ^{hoog} TAMs
MMR	+++	+
IL-4Rα	+++	+
Stab-1	++	-
Mgl1/2	+	+
SR-A	+	-
cdh1	-	+
PD-L2	-	+
Arginase	+++	+
iNOS/NO	+	++
CD11c	-	++
CD1d	-	++
TNF-α	+	+

Dus, terwijl in het TS/A model de M1 activatie van de MHCII^{hoog} TAMs vrij duidelijk is, was dit veel genuanceerder in het 3LL-R model. Hieruit blijkt onder meer dat de M1/M2 indeling die gehanteerd wordt in de literatuur, namelijk dat van klassieke en alternatief geactiveerde macrofagen (M1/M2 activatie), de complexiteit van de *in vivo* situatie niet ten volle weergeeft, zoals reeds aangehaald door anderen (Hallam *et al.*, 2009; Moser & Edwards, 2008).

De verschillen tussen ons onderzoek en dat van Movahedi *et al.* (2010) zijn waarschijnlijk toe te schrijven aan het gebruik van een verschillende muizenstam en tumormodel. Zo valt op dat de TAM subpopulaties in het BALB/c TS/A model, in tegenstelling tot de 3LL-R C57BL/6 TAMs, constitutief geen iNOS produceren. Dit kan gerelateerd zijn aan de gebruikte muizenstam: de C57BL/6 muis is een zogenaamde Th1 stam, in tegenstelling tot BALB/c die een Th2 stam is. Macrofagen van Th1 muizenstammen produceren in het algemeen meer NO en worden sneller geactiveerd tot de productie ervan, terwijl de arginase activiteit typisch lager is (Mills *et al.*, 2000). Dus, hoewel de 3LL-R MHCII^{laag} TAMs een hoge arginase activiteit vertoonden, was deze lager dan waargenomen bij beide TAM subpopulaties uit TS/A tumoren (Movahedi *et al.*, 2010). Naast de kleine verschillen, bleek de drijvende factor achter de TAM heterogeniteit echter bewaard gebleven, wat zich onder meer uitte in een opvallend geconserveerd gen- en

proteïneprofiel. Dit suggereert dat de TAM heterogeniteit grotendeels onafhankelijk is van zowel tumortype als muizenstam.

Naast de heterogeniteit in gen- en proteïne-expressie waren er ook verschillen tussen de TAM subpopulaties qua functionaliteit. Zo bleek uit de resultaten van de MLR dat de MHCII^{hoog} TAMs over een hogere antipresenterende capaciteit beschikten dan de MHCII^{laag} TAMs. De suppressieve capaciteit van de MHCII^{laag} TAMs werd in de MLR verwezenlijkt via arginase, terwijl dit in de polyclonale T-cel suppressie *assay* door iNOS werd gemedieerd. Arginase vervult een rol in T-cel suppressie door het verlies van de CD3ζ-keten, die een belangrijke component is van de TCR, te induceren. NO interfereert met de signalisatiecascade die vereist is voor T-cel activatie, door S-nitrosylatie van cruciale cysteïnes in de betrokken signalisatieproteïnen (Bronte & Zanovello, 2005). De tegenstrijdige waarneming heeft waarschijnlijk zowel te maken met de verschillende opzet van beide experimenten als met de Th1 aard van de gebruikte TAMs. De productie van NO is in deze stam namelijk zo overwegend, zeker wanneer geactiveerd door cytokines, zoals in de polyclonale T-cel suppressie *assay*, dat dit als factor makkelijk meespeelt. In dit opzicht is het opvallend dat arginase een rol bleek te spelen in de MHCII^{laag} TAM-gemedieerde suppressie tijdens de MLR. Een MLR is waarschijnlijk ook een betere opstelling om het *in vivo* suppressieve mechanisme te bepalen, vergeleken met de polyclonale T-cel suppressie, voornamelijk omdat de massale T-cel activatie in de laatste minder representatief is voor de *in vivo* situatie. Verder vertoonden de MHCII^{hoog} TAMs ook een sterkere anti-proliferatieve capaciteit ten opzichte van kankercellen, indicatief voor een anti-tumoraal potentieel. Dit kan mogelijk gemedieerd worden door NO, dat in hogere mate door MHCII^{hoog} TAMs geproduceerd werd ten opzichte van MHCII^{laag} TAMs. Inderdaad, voor NO werd reeds een anti-tumorale rol gesuggereerd (Bingle *et al.*, 2002). Movahedi *et al.* (2010) namen reeds een associatie van de MHCII^{laag} TAMs waar met de meer hypoxische regio's van de tumor en ook onze data in het 3LL-R model wijzen in deze richting. Hierbij moet wel worden opgemerkt dat de 3LL-R tumor in het algemeen meer hypoxie vertoont dan de TS/A tumor. Uit de HP-1 FACS resultaten (Figuur 5.11.) werd immers duidelijk dat de subpopulaties zich allebei lokaliseerden in hypoxische regio's, doch dat de MHCII^{laag} TAMs een voorkeur bezaten voor de meest hypoxische gebieden. Dit suggereert hypoxie als een bepalende factor van het TAM fenotype. Ohno *et al.* (2004) zagen dat in endometriale kanker TAMs geassocieerd met de gevasculariseerde, en dus waarschijnlijk minder hypoxische, gebieden van de tumor correleren met een goede prognose. Deze TAMs zouden kunnen overeenstemmen met onze MHCII^{hoog} TAM subpopulatie, hoewel dit speculatief is. Het is daarnaast ook interessant dat een associatie werd waargenomen tussen hypoxie en een verhoogde lipide-accumulatie in macrofagen (Boström *et al.*, 2006). De MHCII^{laag} TAMs vertoonden namelijk een verhoogde genexpressie van prosaposine en proteïne-expressie van

stabiline-1. Beide zijn geassocieerd met een verhoogd lipidemetabolisme (Van Ginderachter *et al.*, 2006). SR-A werd recent geassocieerd met lipide-accumulatie in tumor-geassocieerde DCs (Herber *et al.*, 2010) en zou in macrofagen een soortgelijke rol spelen (de Winther *et al.*, 2000). Ook deze receptor kwam tot hogere uitdrukking op de MHCII^{laag} TAMs. Hierbij is hun morfologie, die analoog is aan die van *foam* cellen in atherosclerose indicatief voor een verhoogd lipidemetabolisme (D. Laoui, persoonlijke communicatie).

Vervolgens werd de aanwezigheid van de HIF transcriptiefactoren, die gerelateerd zijn aan hypoxie, nagegaan. Terwijl HIF-1 α niet gedetecteerd kon worden, bleek dat HIF-2 α in gelijkaardige mate aanwezig was in de TAM subpopulaties. Zowel HIF-1 α als HIF-2 α werden echter reeds waargenomen in TAMs uit klinische isolaten (Burke *et al.*, 2002; Talks *et al.*, 2000), wat een indicatie is dat de TAM subpopulaties ook over HIF-1 α zouden kunnen beschikken. Dit zou echter nagegaan moeten worden door middel van IHC, gezien de snelle degradatie van het HIF-1 α proteïne onder normoxie (in tegenstelling tot HIF-2 α). De gelijkaardige aanwezigheid van HIF-2 α in beide 3LL-R TAM subpopulaties suggereert nogmaals, analoog aan de HP-1 FACS resultaten, dat allebei waarschijnlijk lokaliseren in hypoxische regio's. Nu is het zo dat HIF-2 α al opgereguleerd wordt bij 5% O₂, in tegenstelling tot HIF-1 α , die pas bij lagere O₂ concentraties tot expressie komt (Holmquist-Mengelbier *et al.*, 2006). Het is dus mogelijk dat enkel HIF-1 α expressie informatie kan verschaffen over een eventueel verschillende hypoxie-toestand van de TAM populaties. Verder wordt HIF-2 α eerder geassocieerd met chronische hypoxische responsen zoals in een tumor, terwijl HIF-1 α eerder de snelle, meer acute repons zou mediëren. Dit werd waargenomen in verschillende celtypes, waaronder macrofagen (Elbarghati *et al.*, 2008; Holmquist-Mengelbier *et al.*, 2006; Uchida *et al.*, 2004) en onderstreept het potentieel belang van HIF-2 α in de tumoromgeving.

Daarnaast werd de activatie van een aantal signalisatiewegen nagegaan in de TAM subpopulaties. De waargenomen differentiële activatie van NF- κ B, met hogere activatie in de MHCII^{laag} TAMs, is in overeenstemming met de resultaten van Hagemann *et al.* (2008). Zij vonden dat NF- κ B activatie een tumorbevorderend, M2 fenotype in stand houdt. Inhibitie van NF- κ B activatie door middel van IKK β -deficiëntie (IKK β^{Δ}) liet M2 macrofagen, gekenmerkt door onder andere hoge SR-A expressie overgaan naar een M1 fenotype met verlaagde expressie van arginase-1 en verhoogde expressieniveaus van iNOS en MHCII (Hagemann *et al.*, 2008). Onze data suggereren een overeenstemming tussen de MHCII^{hoog} TAMs en IKK β^{Δ} macrofagen, die een meer tumoricidaal fenotype bezitten. Dit zou kunnen impliceren dat het fenotype van de TAM subpopulaties, mogelijk deels, veroorzaakt wordt door een differentiële NF- κ B activiteit. Aanvullend bij de waarnemingen van Hagemann *et al.* (2008) zagen Lee *et al.* (2010) dat TLR4 signalisatie in TAMs tumorgroei bevordert door middel van NF- κ B activatie. Dit is potentieel

gerelateerd aan endogene signaalmoleculen afkomstig van necrotische cellen in hypoxische regio's die via de TLR signaleren. Gezien NF- κ B de transcriptie van HIF-1 α induceert en op velerlei niveaus interageert met deze transcriptiefactor (Figuur 2.9) zou dit kunnen betekenen dat er minder HIF-1 α tot expressie komt in de MHCII^{hoog} TAMs dan in de MHCII^{laag} TAMs (Rius *et al.*, 2008). Dit kon, zoals vermeld, voorlopig niet worden nagegaan.

Vervolgens werd de activatie van de STATs nagegaan. Hierbij werd fosforylatie van zowel STAT1, STAT3 als STAT6 waargenomen na *in vitro* stimulatie van de TAM subpopulaties met de relevante cytokines. Constitutieve STAT fosforylatie in vers opgezuiverde TAMs werd niet waargenomen, meer dan waarschijnlijk door verlies van het signaal tijdens de lange opzuiveringsprocedure. De subpopulaties vertoonden een gelijkaardige P-STAT1 en P-STAT6 expressie na stimulatie met respectievelijk IFN- γ en IL-4, terwijl IL-10 merkbaar sterker P-STAT3 induceerde in de MHCII^{hoog} TAMs. Het is belangrijk om in deze context te beseffen wat de gebruikte technieken, namelijk Phosflow en Western Blot, specifiek detecteren. Dit is niet zozeer de hoeveelheid *in vivo* gefosforyleerde transcriptiefactor in de TAM subpopulaties, maar wel de responsiviteit van de celpopulaties op de gebruikte stimulus. In de *in vivo* situatie is de hoeveelheid gefosforyleerde transcriptiefactor bovendien het resultaat van de volledige interactie met de micro-omgeving en incorporeert dit meer dan één stimulus. Hetgeen door de technieken dus werd waargenomen is eerder gecorreleerd met de aanwezigheid van receptoren en gevoeligheid voor de gebruikte stimuli. De grote responsiviteit van de MHCII^{hoog} TAMs voor IL-10 bijvoorbeeld kan gerelateerd zijn aan een hogere IL-10 receptor expressie (data niet getoond, resultaten inconclusief). Het is echter ook mogelijk dat dit gelinkt is met een inherent hogere plasticiteit van de MHCII^{hoog} TAMs.

De data wijzen op een conservatie in het fenotype van de TAM subpopulaties uit verschillende tumormodellen, mogelijk aangedreven door de verschillende intratumorale regio's waarin ze zich bevinden. Dit onderzoek levert de basis voor het uitschakelen van TAM subpopulaties, als aanvulling voor conventionele antikanker therapieën. Er zou voor kunnen gekozen worden om specifiek de MHCII^{laag} TAMs uit te schakelen op basis van een van de geïdentificeerde oppervlaktemarkers zoals MMR. Een andere mogelijkheid is de modulatie van NF- κ B. Dit zou, gezien het belang van de NF- κ B signalisatieweg in longkanker (Meylan *et al.*, 2009), niet alleen de activiteit van de kankercellen zelf, maar ook die van de M2/MHCII^{laag} TAMs kunnen modificeren. In dit oogpunt is het interessant dat zeer recent in klinische data van *non-small cell* longkanker zowel M1 (MHCII⁺) als M2 (CD163⁺) geactiveerde TAMs werden waargenomen, met een verschillende lokalisatie. Een hogere M1/M2 TAM verhouding had bovendien een positief effect op de overlevingskans van de patiënt (Dai *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2010; Ohri *et al.*, 2009).

7. Besluit

De heterogeniteit van de tumor-geassocieerde macrofagen of TAMs werd aangetoond in het 3LL-R tumormodel in C57BL/6 muizen. De TAM subpopulaties werden hierbij gekarakteriseerd op een moleculair en functioneel niveau. Het onderzoek naar de drijvende factor van de heterogeniteit werd reeds geïnitieerd en leverde veelbelovende resultaten op onder de vorm van de betrokkenheid van hypoxie en de NF- κ B signalisatieweg. Dit moet echter verder onderzocht worden om zo een mechanistisch model te kunnen opstellen. Immunohistochemie experimenten zijn aangeraden, gezien de problemen die gepaard kunnen gaan met de langdurige opzuiveringsprocedure van de TAM subpopulaties, zoals ondervonden bij de HIF-1 α detectie. Verdere experimenten rond NF- κ B activatie zijn ook vereist, onder andere verdere Western Blots om de aanwezigheid van IKK β en andere betrokken componenten na te gaan. Eens de meeste gegevens verzameld zijn in het *wild type* kan dan overgegaan worden tot *knockout* modellen. Zo kunnen voor het ontrafelen van de betrokkenheid van hypoxie verder experimenten ondernomen worden in de PHD2^{+/-} muizen, die reeds geïnitieerd werden tijdens deze thesis (data niet getoond). Ook onderzoek met LysM-Cre muizen, waarbij een gen specifiek wordt uitgeschakeld in de macrofagen (en neutrofielen), is aangeraden. Dit soort macrofaag specifieke *knockouts* bestaat bijvoorbeeld voor de HIF transcriptiefactoren en ook voor IKK β . Gezien de overeenkomst met de resultaten van Hagemann *et al.* (2008) zou het zeer interessant zijn om deze met 3LL-R cellen te inoculeren en het fenotype en activiteit van de TAM subpopulaties na te gaan. Gezien de frequentie waarmee deze signalisatieweg mutaties ondergaat bij de ontwikkeling van kanker, is NF- κ B wat dat betreft zeker een interessant moleculair doelwit (Baud & Karin, 2009). De therapeutische effectiviteit van het *targetten* van NF- κ B is echter ook afhankelijk van het stadium van de tumor, gezien dit de polarizatiestatus van de infiltrerende leukocyten beïnvloedt (Balkwill *et al.*, 2005; Sica & Bronte, 2007; Yu *et al.*, 2009). Verder onderzoek is dus aangewezen, maar zal hopelijk op lange termijn leiden tot aanvullende kankertherapiën.

Samenvatting

Tumoren worden geïnfiltrerd door een hele resem immuuncellen, waaronder tumor-geassocieerde macrofagen of TAMs. Er werd reeds in klinische studies een verband gelegd tussen een hoge TAM infiltratie en een slechte prognose. Dit is te wijten aan de vele pro-tumorale functies die deze macrofagen vervullen. Reeds lang werden TAMs beschouwd als een uniforme populatie, gekenmerkt door een alternatieve activeringstoestand (M2). In de recente literatuur werd dit betwist en onlangs werd de heterogeniteit van TAMs uitgewerkt in het TS/A borstkankermodel. Dit concept van heterogeniteit en het bestaan van TAM subpopulaties werd bevestigd door onze data in het 3LL-R longkankermodel. Allereerst werden de TAM subpopulaties in de myeloïde fractie van de 3LL-R tumor geïdentificeerd, namelijk de Ly-6C^{laag}MHCII^{laag} en Ly-6C^{laag}MHCII^{hoog} TAMs. Vervolgens werden deze gekarakteriseerd op gen- en proteïneniveau, teneinde de activatietoestand van de subpopulaties te bepalen. De MHCII^{laag} TAMs bezaten een verhoogde expressie van vele M2-geassocieerde genen, zoals *CD163*, *Gas3*, *Stab1*, *Ccl22*, *Lyve1*, *Sep*,... data die gecomplementeerd werden door de verhoogde aanwezigheid van MMR, SR-A, IL-4Rα en Stab-1 proteïne op het celoppervlak. MHCII^{laag} TAMs waren dus duidelijk M2 gepolariseerd. De MHCII^{hoog} TAMs daarentegen vertoonden een verhoogde expressie van pro-inflammatorische genen en een hoge productie van iNOS, naast de aanwezigheid van enkele M2 proteïnen zoals E-cadherine en PD-L2. Deze subpopulatie is dus niet volledig M1 gepolariseerd, maar vertoonde een eerder intermediair fenotype. De moleculaire heterogeniteit van TAMs zette zich verder op functioneel vlak, waaruit bleek dat de MHCII^{hoog} TAMs beter in antigenpresentatie zijn. Daarnaast verschilden ze ook in hun interactie met 3LL-R cellen, gezien een lagere proliferatie werd waargenomen in cocultuur met de MHCII^{hoog} TAMs, indicatief voor een mogelijk anti-tumoraal potentieel. Gezien de conservatie van de TAM heterogeniteit, zowel tussen verschillende tumortypes als muizenstammen, leidde dit tot de hypothese dat er in de tumor micro-omgeving een of meerdere dominante factoren moeten aanwezig zijn die het TAM fenotype drijven. Dus werden signalisatiewegen, met een mogelijke betrokkenheid bij het bepalen van M1/M2 activatie, onder de loep genomen. Allereerst werd de lokalisatie ten opzichte van hypoxie onderzocht, gezien hypoxie reeds eerder naar voor was geschoven als een potentiële factor in de bepaling van het TAM fenotype. De TAM subpopulaties leken zich inderdaad verschillend te lokaliseren ten opzichte van hypoxie, waarbij de MHCII^{laag} TAMs geassocieerd waren met de hoogste hypoxie. Daarnaast bleek dat een differentiële NF-κB activatie, met hogere activatie in de MHCII^{laag} TAMs, ook een rol zou kunnen spelen in de bepaling van het TAM fenotype. Dit is interessant gezien de vele verbanden die er bestaan tussen hypoxie en

NF- κ B op het vlak van onderlinge regulatie. Tot slot bleken de MHCII^{hoog} TAMs een hogere P-STAT3 fosforylatie te vertonen als respons op IL-10 stimulatie, wat indicatief kan zijn voor een hogere plasticiteit van deze cellen.

Summary

Tumors are infiltrated by many immune cells, including tumor-associated macrophages or TAMs. Clinical studies have shown a correlation between a high TAM infiltration and a bad prognosis. This is due to the many pro-tumoral functions which these macrophages fulfill. Since long, TAMs have been considered as a uniform population, characterized by alternative activation (M2). Recent literature contests this and the heterogeneity of TAMs was developed in the TS/A breast cancer model. The concept of heterogeneity and the existence of TAM subpopulations was confirmed by our data in the 3LL-R lung cancer model. Firstly, the TAM subpopulations were identified in the myeloid fraction of the 3LL-R tumor, namely the Ly-6C^{low}MHCII^{low} and Ly-6C^{low}MHCII^{high} TAMs. Next, these TAMs were characterized at the gene and protein level, in order to determine the activation status of the subpopulations. The MHCII^{low} TAMs showed an elevated level of several M2-associated genes such as *CD163*, *Gas3*, *Stab1*, *Ccl22*, *Lyve1*, *Sep*,... data which were complemented by the presence of MMR, SR-A, IL-4R α and Stab-1 protein at the cell surface. The MHCII^{low} TAMs were clearly M2 polarized. The MHCII^{high} TAMs on the other hand, showed a raised expression of proinflammatory genes and a high production of iNOS, in addition to the presence of a few M2 proteins like E-cadherin and PD-L2. This subpopulation was not fully M1 polarized, but showed a more intermediate phenotype. The molecular heterogeneity of TAMs also persisted at the functional level, from which it was clear that the MHCII^{high} TAMs were better in antigen presentation. Moreover, they also differed in their interaction with 3LL-R cells, since a lower cancer cell proliferation was observed in the coculture with MHCII^{high} TAMs, indicative of a possible anti-tumoral potential. Given the conserved existence of TAM heterogeneity, irrespective of tumor type or mouse strain, the hypothesis was put forward that only a few dominant factors in the tumor micro-environment drive the TAM phenotype. Thus, signaling pathways with a possible involvement in the determination of the M1/M2 activation were evaluated. First of all, TAM localization with respect to hypoxic areas was examined, since hypoxia had been suggested as a potential factor in the determination of the TAM phenotype. The TAM subpopulations did seem to localize differently to oxygenated areas, whereby the MHCII^{low} TAMs were associated with the highest level of hypoxia. A differential NF- κ B activity, with higher activation in the MHCII^{low} TAMs, also appeared to be potentially involved in the determination of the TAM phenotype. This is interesting because of the many links that exist between hypoxia and NF- κ B at the level of reciprocal regulation. Finally, the MHCII^{high} TAMs showed a higher level of STAT3 phosphorylation in response to IL-10, which can indicate a higher plasticity of these cells.

Literatuur

Aaronson, D.S. & Horvath, C.M. (2002). A Road Map for Those Who Don't Know JAK-STAT. *Science* **296**, 1653-1655.

Abbas, A.K. & Janeway, C.A. (2000). Immunology: Improving on nature in the twenty-first century. *Cell* **100**, 129-138.

Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunological Reviews* **222**, 155-161.

Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P. & Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology* **126**, 32-41.

Andreu, P., Johansson, M., Affara, N.I., Pucci, F., Tan, T., Junankar, S., Korets, L., Lam, J., Tawfik, D., DeNardo, D.G. *et al.* (2010). FcγR Activation Regulates Inflammation-Associated Squamous Carcinogenesis. *Cancer Cell* **17**, 121-134.

Balkwill, F., Charles, K.A. & Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer cell* **7**, 211-217.

Banchereau, J. & Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.

Baud, V. & Karin, M. (2009). Is NF-κB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nature Reviews Drug Discovery* **8**, 33-40.

Bingle, L., Brown, N.J. & Lewis C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *Journal of Pathology* **196**, 254-265.

Biswas, S.K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Sacconi, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F. *et al.* (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumour-associated macrophages (defective NF-κB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* **107**, 2112-2122.

Biswas, S.K., Sica, A. & Lewis, C.E. (2008). Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *The Journal of Immunology* **180**, 2011-2017.

Boström, P., Magnusson, B., Svensson, P., Wiklund, O., Borén, J., Carlsson, L.M.S., Ståhlman, M., Olofsson, S.-O., Hultén, L.M. (2006). Hypoxia Converts Human Macrophages Into Triglyceride-Loaded Foam Cells. *Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology* **26**, 1871-1876.

Boyle, P. & Levin, B. (Eds.) (2008). *World Cancer Report 2008*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, Frankrijk, 524 pp.

Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. *Journal of Clinical Investigation* **109**, 1139-1142.

- Bronte, V. & Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by *L*-arginine metabolism. *Nature Reviews Immunology* **5**, 641-654.
- Burke, B., Tang, N., Corke, K.P., Tazzyman, D., Ameri, K., Wells, M. & Lewis, C.E. (2002). Expression of HIF-1 α by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy. *Journal of Pathology* **196**, 204-212.
- Carmeliet, P. & Jain, R.J. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-257.
- Chambers, C.A. & Allison, J.P. (1999). Costimulatory regulation of T cell function. *Current Opinion in Cell Biology* **11**, 203-210.
- Clark, R. & Kupper, T. (2005). Old Meets New: The Interaction Between Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Investigative Dermatology* **125**, 629-637.
- Condeelis, J. & Pollard, J.W. (2006). Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cell* **124**, 263-266.
- Cresswell, P. (1996). Invariant Chain Structure and MHC Class II Function. *Cell* **84**, 505-507.
- Cummins, E.P., Berra, E., Comerford, K.M., Ginouves, A., Fitzgerald, K.T., Seeballuck, F., Godson, C., Nielsen, J.E., Moynagh, P., Pouyssegur, J. *et al.* (2006). Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 18154-18159.
- Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Matthew Burow, M. *et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine* **9**, 942-949.
- Custot, J., Moali, C., Brollo, M., Boucher, J.L., Delaforge, M., Mansuy, D., Tenu, J.P. & Zimmermann, J.L. (1997). The New α -Amino Acid *N*^ω-Hydroxy-nor-*L*-arginine: a High-Affinity Inhibitor of Arginase Well Adapted To Bind to Its Manganese Cluster. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 4086-4087.
- Dai, F., Liu, L., Che, G., Yu, N., Pu, Q., Zhang, S., Ma, J., Ma, L. & You, Z. (2010). The number and microlocalization of tumor-associated immune cells are associated with patient's survival time in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* **10**, 220-229.
- DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N. & Coussens, L.M. (2009). CD4⁺ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. *Cancer Cell* **16**, 91-102.
- de Winther, M.P., van Dijk, K.W., Havekes, L.M. & Hofker, M.H. (2000). Macrophage scavenger receptor class A: a multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology* **20**, 290-297.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology* **3**, 991-998.

Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* **21**, 137-148.

Elbarghati, L., Murdoch, C. & Lewis, C.E. (2008). Effects of hypoxia on transcription factor expression in human monocytes and macrophages. *Immunobiology* **213**, 899-908.

Fang, H.-Y., Hughes, R., Murdoch, C., Coffelt, S.B., Biswas, S.K., Harris, A.L., Johnson, R.S., Imityaz, H.Z., Simon, M.C., Fredlund, E., Greten, F.R. *et al.* (2009). Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood* **114**, 844-859.

Felix, N.J. & Allen, P.M. (2007). Specificity of T-cell alloreactivity. *Nature Reviews Immunology* **7**, 942-953.

Fleming T.J., Fleming, M.L. & Malek, T.R. (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to (Gr-1) detects members of the Ly-6 granulocyte-differentiation antigen family. *Journal of Immunology* **151**, 2399-2408.

Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71-82.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M. & Ley, K. (2010). Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* **327**, 656-661.

Ghassabeh, G.H., De Baetselier, P., Brys, L., Noël, W., Van Ginderachter, J.A., Meerschaut, S., Beschin, A., Brombacher, F. & Raes, G. (2006). Identification of a common gene signature for type II cytokine-associated myeloid cells elicited in vivo in different pathologic conditions. *Blood* **108**, 575-583.

Gocheva, V., Wang, H.-W., Gadea, B.B., Shree, T., Hunter, K.E., Garfall, A.L., Berman, T. & Joyce, J.A. (2010). IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes & Development* **24**, 241-255.

Gordon, S. & Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology* **5**, 953-964.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* **3**, 23-35.

Hagemann, T., Biswas, S.K., Lawrence, T., Sica, A. & Lewis, C.E. (2009). Regulation of macrophage function in tumors: the multifaceted role of NFκB. *Blood* **113**, 3139-3146.

Hagemann, T., Lawrence, T., McNeish, I., Charles, K.A., Kulbe, H., Thompson, R.G., Robinson, S.C. & Balkwill, F.R. (2008). "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-κB. *The Journal of Experimental Medicine* **205**, 1261-1268.

Hagemann, T., Robinson, S.C., Schulz, M., Trumper, L., Balkwill, F.R. & Binder, C. (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-α dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* **25**, 1543-1549.

- Hagemann, T., Wilson, J., Burke, F., Kulbe, H., Li, N.F., Plüddemann, A., Charles, K., Gordon, S. & Balkwill, F.R. (2006). Ovarian Cancer Cells Polarize Macrophages Toward a Tumor-Associated Phenotype. *Journal of Immunology* **176**, 5023-5032.
- Hallam, S., Escorcio-Correia, M., Soper, R., Schultheiss, A. & Hagemann, T. (2009). Activated macrophages in the tumour microenvironment — dancing to the tune of TLR and NF- κ B. *Journal of Pathology* **219**, 143-152.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hayden, M.S. & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF- κ B Signaling. *Cell* **132**, 344-362.
- Herber, D.L., Cao, W., Nefedova, Y., Novitskiy, S.V., Nagaraj, S., Tyurin, V.A., Corzo, A., Cho, H.I., Celis, E., Lennox, B. *et al.* (2010). Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nature Medicine* **16**, 880-886.
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A.C., Schito, M., Fuentes, J.M., Cheever, A.W., Pearce, E.J. & Wynn, T.A. (2001). Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Metabolism. *Journal of Immunology* **167**, 6533-6544.
- Hibbs, J.B. Jr., Vavrin, Z. & Taintor, R.R. (1987). L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *Journal of Immunology* **138**, 550-565.
- Hickstein, D.D., Baker, D.M., Gollahon, K.A. & Back, A.L. (1992). Identification of the promoter of the myelomonocytic leukocyte integrin CD11b. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 2105-2109.
- Holmquist-Mengelbier, L., Fredlund, E., Löfstedt, T., Noguera, R., Navarro, S., Nilsson, H., Pietras, A., Vallon-Christersson, J., Borg, A., Gradin, K. *et al.* (2006). Recruitment of HIF-1 α and HIF-2 α to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 α promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* **10**, 413-423.
- Hornef, M.W., Wick, M.J., Rhen, M. & Normark, S. (2002). Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology* **3**, 1033-1040.
- Huber, S., Hoffmann, R., Muskens, F. & Voehringer, D. (2010). Alternatively activated macrophages inhibit T cell proliferation by STAT6-dependent expression of PD-L2. *Blood* Epub ahead of print.
- Iwasaki, A. & Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* **327**, 291-295.
- Kanagawa, N., Niwa, M., Hatanaka, Y., Tani, Y., Nakagawa, S., Fujita, T., Yamamoto, A. & Okada, N. (2007). CC-chemokine ligand 17 gene therapy induces tumor regression through augmentation of tumor-infiltrating immune cells in a murine model of preexisting CT26 colon carcinoma. *International Journal of Cancer* **121**, 2013-2022.
- Kim, S., Takahashi, H., Lin, W.-W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J.-L. & Karin, M. (2009). Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* **457**, 102-106.

Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., Wei, S., Zhang, S., Pilon-Thomas, S., Niu, G., Kay, H., Mulé, J., Kerr, W.G. *et al.* (2005). Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nature Medicine* **11**, 1314-1321.

Kortylewski, M., Xin, H., Kujawski, M., Lee, H., Liu, Y., Harris, T., Drake, C., Pardoll, D. & Yu, H. (2009). Regulation of the IL-23 and IL-12 Balance by Stat3 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **15**, 114-123.

Krutzik, P.O., Clutter, M.R. & Nolan, G.P. (2005). Coordinate Analysis of Murine Immune Cell Surface Markers and Intracellular Phosphoproteins by Flow Cytometry. *Journal of Immunology* **175**, 2357-2365.

Krutzik, P.O., Irish, J.M., Nolan, G.P. & Perez, O.D. (2004). Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. *Clinical Immunology* **110**, 206– 221.

Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D.I. (2005). STAT1 Signaling Regulates Tumor-Associated Macrophage-Mediated T Cell Deletion. *Journal of Immunology* **174**, 4880-4891.

Laoui, D. (2008). *Moleculaire en functionele karakterisering van tumor-geassocieerde macrofagen in een muis borstcarcinoom model*. Thesis, Vrije Universiteit Brussel, 71 pp.

Lee, C.-H., Wu, C.-L. & Shiau, A.-L. (2009). Toll-like Receptor 4 Signaling Promotes Tumor Growth. *Journal of Immunotherapy* **33**, 73-82.

Leek, R.D., Talks, K.L., Pezzella, F., Turley, H., Campo, L., Brown, N.S., Bicknell, R., Taylor, M., Gatter, K.C. & Harris, A.L. (2002). Relation of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) expression in tumor-infiltrative macrophages to tumor angiogenesis and the oxidative thymidine phosphorylase pathway in human breast cancer. *Cancer Research* **62**, 1326-1329.

Leenen, P.J.M., de Bruijn, M.F.T.R., Voerman, J.S.A., Campbell, P.A. & van Ewijk, W. (1994). Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods* **174**, 5-19.

Lewis, C.E. & Pollard, J.W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research* **66**, 605-612.

Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G. & Pollard, J.W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *The Journal of Experimental Medicine* **193**, 727-740.

Liu, Y., Van Genderachter, J.A., Brys, L., De Baetselier, P., Raes, G. & Geldhof, A.B. (2003). Nitric oxide-independent CTL suppression during tumor progression: association with arginase-producing (M2) myeloid cells. *Journal of Immunology* **170**, 5064-5074.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology*. Fourth Edition. W.H. Freeman, New York, VSA, 973 pp.

Loges, S., Schmidt, T., Tjwa, M., Van Geyte, K., Lievens, D., Lutgens, E., Vanhoutte, D., Borgel, D., Plaisance, S., Hoylaerts, M. *et al.* (2010). Malignant cells fuel tumor growth by educating infiltrating leukocytes to produce the mitogen Gas6. *Blood* **115**, 2264-2273.

- Macey, M.G. (Ed.) (2007). *Flow Cytometry Principles and Applications*. Humana Press, New Jersey, USA, 294 pp.
- Ma, J., Liu, L., Che, G., Yu, N., Dai, F. & You, Z. (2010). The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* **10**, 112-120.
- Mancino, A. & Lawrence, T. (2010). Nuclear Factor- κ B and Tumor-Associated Macrophages. *Clinical Cancer Research* **16**, 784-789.
- Mantovani A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* **454**, 436-444.
- Mantovani, A. (2006). Macrophage diversity and polarization: *in vivo veritas*. *Blood* **108**, 408-409.
- Mantovani, A. (2009). Inflaming metastasis. *Nature* **457**, 36-37.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* **25**, 677-686.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* **23**, 549-555.
- Martinez, F.O., Helming, L. & Gordon, S. (2009). Alternative activation of Macrophages: An immunologic Functional Perspective. *Annual Review of Immunology* **27**, 451-483.
- Medzhitov, R. & Janeway, C.A. Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**, 298-300.
- Meylan, E., Dooley, A.L., Feldser, D.M., Shen, L., Turk, E., Ouyang, C. & Jacks, T. (2009). Requirement for NF- κ B signalling in a mouse model of lung adenocarcinoma. *Nature* **462**, 104-108.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J. & Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology* **164**, 6166-6173.
- Moser, B. & Loetscher, P. (2001). Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunology* **2**, 123-128.
- Mosser, D.M. & Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* **8**, 958-969.
- Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P. & Van Ginderachter, J.A. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Research* **70**, 5728-5739.
- Munder, M., Eichmann, K. & Modolell, M. (1998). Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *Journal of Immunology* **160**, 5347-5354.

Murdoch, C. & Lewis, C.E. (2005). Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. *International Journal of Cancer* **117**, 701-708.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B. & Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer* **8**, 618-631.

Murphy, K.M., Travers, P. & Walport, M. (2008). *Janeway's Immunobiology*. Seventh Edition. Garland Science Publishing, New York, VSA, 928 pp.

Murray, P.J. (2007). The JAK-STAT Signaling Pathways: Input and Output Integration. *Journal of Immunology* **178**, 2623-2629.

Niu, G., Briggs, J., Deng, J., Ma, Y., Lee, H., Kortylewski, M., Kujawski, M., Kay, H., Cress, W.D., Jove, R. & Yu, H. (2008). Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Is Required for Hypoxia-Inducible Factor-1A RNA Expression in Both Tumor Cells and Tumor-Associated Myeloid Cells. *Molecular Cancer Research* **6**, 1099-1105.

Nizet, V. & Johnson, R.S. (2009). Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nature Reviews Immunology* **9**, 609-617.

Nolan, T., Hands, R.E. & Bustin, S.A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* **1**, 1559-1582.

Ohno, S., Ohno, Y., Suzuki, N., Kamei, T., Koike, K., Inagawa, H., Kohchi, C., Soma, G. & Inoue, M. (2004). Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. *Anticancer Research* **24**, 3335-3342.

Ohri, C.M., Shikotra, A., Green, R.H., Waller, D.A. & Bradding, P. (2009). Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *European Respiratory Journal* **33**, 118-126.

Ojalvo, L.S., King, W., Cox, D. & Pollard, J.W. (2009). High-Density Gene Expression Analysis of Tumor-Associated Macrophages from Mouse Mammary Tumors. *The American Journal of Pathology* **174**, 1048-1064.

Ostrand-Rosenberg, S., Clements, V.K., Terabe, M., Park, J.M., Berzofsky, J.A. & Dissanayake, S.K. (2002). Resistance to Metastatic Disease in STAT6-Deficient Mice Requires Hemopoietic and Nonhemopoietic Cells and Is IFN- γ Dependent. *Journal of Immunology* **169**, 5796-5804.

Peyssonnaud, C., Cejudo-Martin, P., Doedens, A., Zinkernagel, A.S., Johnson, R.S. & Nizet, V. (2007). Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1 α in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *Journal of Immunology* **178**, 7516-7519.

Peyssonnaud, C., Datta, V., Cramer, T., Doedens, A., Theodorakis, E.A., Gallo, R.L., Hurtado-Ziola, N., Nizet, V., & Johnson, R.S. (2005). HIF-1 α expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 1806-1815.

Phelps, E.D., Updike, D.L., Bullen, E.C., Grammas, P. & Howard, E.W. (2006). Transcriptional and posttranscriptional regulation of angiopoietin-2 expression mediated by IGF and PDGF in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology- Cell Physiology* **290**, C352-C361.

Politz, O., Gratchev, A., McCourt, P.A.G., Schledzewski, K., Guillot, P., Johansson, S., Svineng, G., Franke, P., Kannicht, C., Kzhyshkowska, J. *et al.* (2002). Stabilin-1 and -2 constitute a novel family of fasciclin-like hyaluronan receptor homologues. *Biochemical Journal* **362**, 155-164.

Pollard, J.W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer* **4**, 71-78.

Porta, C., Rimoldi, M., Raes, G., Brys, L., Ghezzi, P., Di Liberto, D., Dieli, F., Ghisletti, S., Natoli, G., De Baetselier, P. *et al.* (2009). Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor κ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 14978-14983.

Pugh, C.W. & Ratcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine* **9**, 677-684.

Reiner, S.L. (2007). Development in Motion: Helper T Cells at Work. *Cell* **129**, 33-36.

Remels, L.M. & De Baetselier, P.C. (1987). Characterization of 3LL-tumor variants generated by *in vitro* macrophage-mediated selection. *International Journal of Cancer* **39**, 343-352.

Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A.S., Nizet, V., Johnson, R.S., Haddad, G.G. & Karin, M. (2008). NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature* **453**, 807-812.

Saccani, A., Schioppa, T., Porta, C., Biswas, S.K., Nebuloni, M., Vago, L., Bottazzi, B., Colombo, M.P., Mantovani, A. & Sica, A. (2006). p50 Nuclear Factor- κ B Overexpression in Tumor-Associated Macrophages Inhibits M1 Inflammatory Responses and Antitumor Resistance. *Cancer research* **66**, 11432-11440.

Sawyers, C. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature* **432**, 294-297.

Schledzewski, K., Falkowski, M., Moldenhauer, G., Metharom, P., Kzhyshkowska, J., Ganss, R., Demory, A., Falkowska-Hansen, B., Kurzen, H., Ugurel, S. *et al.* (2006). Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue *in vivo* and in bone marrow cultures *in vitro*: implications for the assessment of lymphangiogenesis. *Journal of Pathology* **209**, 67-77.

Scortegagna, M., Cataisson, C., Martin, R.J., Daniel J. Hicklin, D.J., Schreiber, R.D., Yuspa, S.H. & Arbeit, J.M. (2008). HIF-1 α regulates epithelial inflammation by cell autonomous NF κ B activation and paracrine stromal remodeling. *Blood* **111**, 3343-3354.

Sica, A. & Bronte, V. (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *The Journal of Clinical Investigation* **117**, 1155-1166.

Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A. & Allavena, P. (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer* **42**, 717-727.

Sierra, J.R., Corso, S., Caione, L., Cepero, V., Conrotto, P., Cignetti, A., Piacibello, W., Kumanogoh, A., Kikutani, H., Comoglio, P.M. *et al.* (2008). Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 1673-1685.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Frovenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* **19**, 76-85.

Söderberg, M., Raffalli-Mathieu, F., Langa, M.A. (2007). Identification of a regulatory *cis*-element within the 3'-untranslated region of the murine inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA; interaction with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins I and L and role in the iNOS gene expression. *Molecular Immunology* **44**, 434-442.

Steinman, R.M. & Witmer, M.D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **75**, 5132-5136.

Sugiura, K. & Stock, C.C. (1955). The Effect of Phosphoramides on the Growth of a Variety of Mouse and Rat Tumors. *Cancer Research* **15**, 38-51.

Sunderkötter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A. & Leenen, P.J.M. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *The Journal of Immunology* **172**, 4410-4417.

Takeda, K. & Akira, S. (2000). STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **11**, 199-207.

Takeda, N., O'Dea, E.L., Doedens, A., Kim, J., Weidemann, A., Stockmann, C., Asagiri, M., Simon, M.C., Hoffmann, A. & Johnson, R.S. (2010). Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes and Development* **24**, 491-501.

Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. & Harris, A.L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *American Journal of Pathology* **157**, 411-421.

Tan, J.K.H. & O'Neill, H.C. (2005). Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *Journal of Leukocyte Biology* **78**, 319-324.

Taylor, C.T. & Cummins, E.P. (2009). The Role of NF- κ B in Hypoxia-Induced Gene Expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1177**, 178-184.

Taylor, C.T. (2008). Interdependent roles for hypoxia inducible factor and nuclear factor- κ B in hypoxic inflammation. *Journal of Physiology* **586**, 4055-4059.

Timmer, A.M. & Nizet, V. (2008). IKK β /NF- κ B and the miscreant macrophage. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 1255-1259.

Uchida, T., Rossignol, F., Matthay, M.A., Mounier, R., Couette, S., Clottes, E. & Clerici, C. (2004). Prolonged Hypoxia Differentially Regulates Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 α and HIF-2 α Expression in Lung Epithelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 14871-14878.

Van den Bossche, J., Bogaert, P., van Hengel, J., Guérin, C.J., Berx, G., Movahedi, K., Van den Bergh, R., Pereira-Fernandes, A., Geuns, J.M.C., Pircher, H. *et al.* (2009). Alternatively activated macrophages engage in homotypic and heterotypic interactions through IL-4 and polyamine-induced E-cadherin/catenin complexes. *Blood* **114**, 4664-4674.

Van Ginderachter, J.A., Movahedi, K., Ghassabeh, G.H., Meerschaut, S., Beschin, A., Raes, G. & De Baetselier, P. (2006). Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* **211**, 487-501.

Van Pel, A. & Boon, T. (1982). Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**, 4718-4722.

Walmsley, S.R., McGovern, N.N., Whyte, M.K.B. & Chilvers, E.R. (2008). The HIF/VHL Pathway: From Oxygen Sensing to Innate Immunity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **38**, 251-255.

Wang G. L., Jiang, B.-H., Rue, E. A. & Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 5510-5514.

Wang, X., Zhao, Q., Matta, R., Meng, X., Liu, X., Liu, C.-G., Nelin, L.D. & Liu, Y. (2009). Inducible Nitric-oxide Synthase Expression Is Regulated by Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 27123-27134.

Werno, C., Menrad, H., Weigert, A., Dehne, N., Goerdts, S., Schledzewski, K., Kzhyshkowska, J. & Brüne, B. (2010). Knockout of HIF-1 α in tumor-associated macrophages enhances M2 polarization and attenuates their pro-angiogenic responses. *Carcinogenesis* Epub ahead of print.

Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall, J. & Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Research* **64**, 7022-7029.

Yu, H., Kortylewski, M. & Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology* **7**, 41-51.

Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer* **9**, 798-809.

Zhou, L., Chong, M.M.W. & Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* **30**, 646-655.

Zhu, J. & Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**, 1557-1568.

Ziemer, L.S., Lee, W.M.F., Vinogradov, S.A., Sehgal, C. & Wilson, D.F. (2005). Oxygen distribution in murine tumors: characterization using oxygen-dependent quenching of phosphorescence. *Journal of Applied Physiology* **98**, 1503-1510.

