

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie

Die Rolle von Toll-like Rezeptor 4-abhängigen Signalwegen bei der  
Entstehung von Kolitis-assoziiertem Darmkrebs

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Tabea Faßnacht  
aus Horb a.N.  
2021

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/78300

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20230425-084537-2



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung 4.0 Lizenz (CC BY 4.0) genutzt werden.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. rer. nat. A. Westendorf

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. U. Treichel

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Januar 2023

Publikation:

**Inhibition of TLR4 Signaling Impedes Tumor Growth in Colitis-Associated Colon Cancer**

Eva Pastille, Tabea Faßnacht, Alexandra Adamczyk, Nhi Ngo Thi Phuong, Jan Buer and Astrid M. Westendorf

*Institute of Medical Microbiology, University Hospital Essen, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany*

Front. Immunol.

published: 07 May 2021

doi: 10.3389/fimmu.2021.669747

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG.....	6
1.1 Das Immunsystem.....	6
1.1.1 Das intestinale Immunsystem .....	6
1.1.2 Immunsystem in Tumorgenese .....	13
1.2 Toll-like Rezeptoren .....	17
1.2.1 TLR-Signalkaskade .....	18
1.2.2 Physiologische Funktion und Rolle in Tumorgenese .....	20
1.3 Kolitis-assoziiertes Kolonkarzinom.....	22
1.3.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) .....	22
1.3.2 Kolorektale Karzinome .....	26
1.3.3 Das AOM/DSS-Mausmodell .....	31
2 FRAGESTELLUNG .....	32
3 MATERIAL UND METHODEN.....	33
3.1 Material.....	33
3.1.1 Mauslinien .....	33
3.1.2 Chemikalien .....	33
3.1.3 Medien und Puffer .....	34
3.1.4 Kits und Enzyme.....	35
3.1.5 Primerpaare .....	36
3.1.6 Antikörper .....	36
3.2 Methoden .....	37
3.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	37
3.2.2 Tierexperimentelle Methoden.....	39
3.2.3 Zellbiologische Methoden .....	41

3.2.4	Statistische Analysen .....	44
4	ERGEBNISSE.....	45
4.1	Expressionsmuster von TLRs im AOM/DSS-Modell .....	45
4.2	<i>In vitro</i> Inhibition von TLR4 auf Peritonealmakrophagen .....	47
4.3	Inhibition des TLR4-Signalweges im murinen AOM/DSS-Modell .....	48
4.3.1	Späte TLR4-Inhibition .....	49
4.3.2	Frühe TLR4-Inhibition .....	51
5	DISKUSSION .....	66
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	76
7	SUMMARY .....	77
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	78
9	ANHANG.....	90
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	90
9.2	Abbildungsverzeichnis.....	93
9.3	Tabellenverzeichnis .....	94
10	DANKSAGUNG.....	95
11	LEBENS LAUF .....	96

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Immunsystem

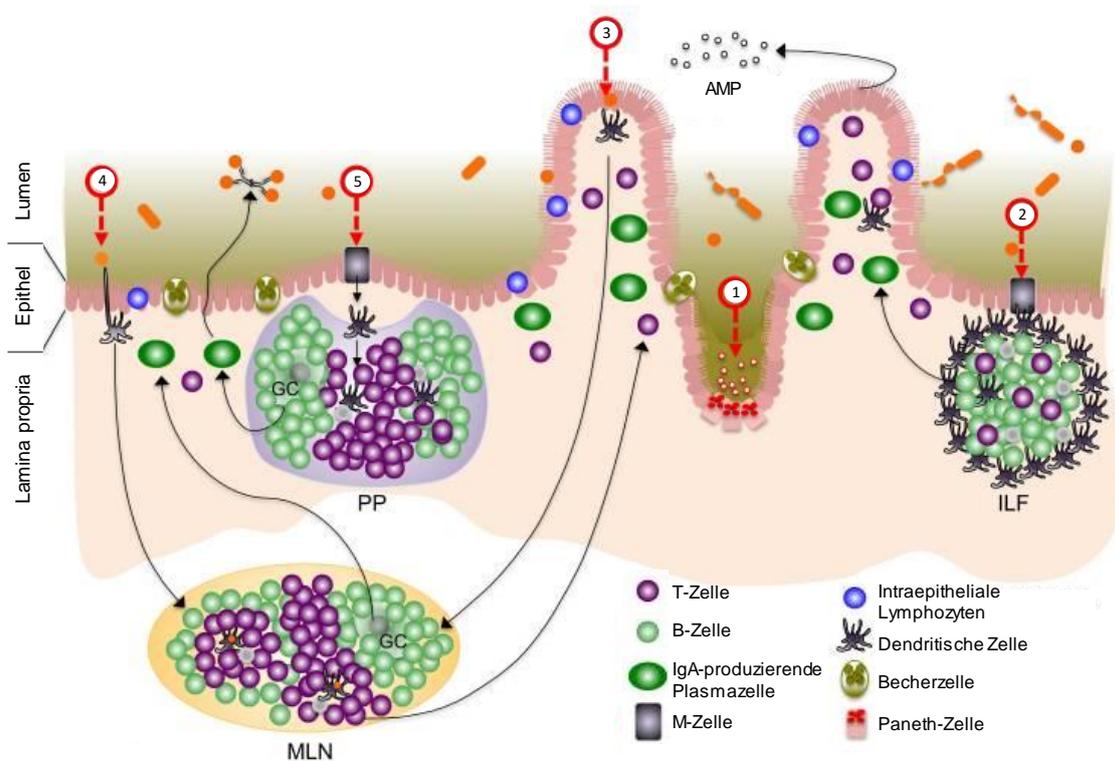
Das Immunsystem ist für die Abwehr pathogener Bakterien, Viren und Parasiten zuständig. Gleichzeitig ist eine immunologische Toleranz gegenüber ungefährlichen Strukturen erforderlich. Das Immunsystem muss also in der Lage sein, konsequent zwischen körpereigenen und körperfremd sowie kommensalen und parasitären Mikroorganismen zu unterscheiden und dementsprechend zu reagieren.

Grundsätzlich kann das Immunsystem in das angeborene und das erworbene Immunsystem unterteilt werden. Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem nutzt Zellen und lösliche Bestandteile, bei denen man von der humoralen Immunantwort spricht. Das angeborene Immunsystem besteht hauptsächlich aus Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen (engl. *dendritic cells*, DCs) und humoralen Bestandteilen, den antimikrobiellen Peptiden und dem Komplementsystem. T-Lymphozyten und Plasmazellen, die sich aus B-Lymphozyten entwickeln und Immunglobuline (Ig) produzieren, bilden das adaptive Immunsystem (Yatim and Lakkis, 2015).

### 1.1.1 Das intestinale Immunsystem

Eine besondere Herausforderung für das Immunsystem stellt der Gastrointestinaltrakt dar, der eine Oberfläche von etwa 300 m<sup>2</sup> besitzt, täglich unzähligen Nahrungsmittelantigenen ausgesetzt ist und 100 Trillionen kommensale Bakterien beherbergt, die hauptsächlich das distale Ileum und das Kolon besiedeln. Diese besonderen Herausforderungen haben wie in Abbildung 1.1 dargestellt zu spezifischen Anpassungen des Gastrointestinaltrakts und des intestinalen Immunsystems geführt. Zwischen den Bakterien und den Immunzellen befindet sich eine biochemische Barriere in Form des einschichtigen Epithels und einer darauf liegenden, von Becherzellen gebildeten Muzinschicht. Diese verhindert den direkten Kontakt des Epithels mit den Bakterien, enthält von Plasmazellen sezerniertes Immunglobulin A (IgA) und überwiegend von Paneth-Zellen gebildete antimikrobielle Peptide (AMP), die bakterizid wirken, indem sie Bakterien lysieren und durch ihre Wirkung als Chemokine einen direkten Einfluss auf das Immunsystem ausüben (Maynard et al., 2012).

Es befinden sich rund 70 % aller Immunzellen in der intestinalen Mukosa und das intestinale Immunsystem ist durch das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (engl. *gut-associated lymphoid tissue*, GALT) anatomisch speziell angepasst. Das GALT besteht im Kolon aus isolierten Lymphfollikeln (ILF) und im Dünndarm aus aggregierten Lymphfollikeln, die Peyer-Plaques (PP) genannt werden. Ergänzt werden diese Lymphfollikel durch die mesenterialen Lymphknoten (engl. *mesenteric lymph nodes*, mLN) und ein spezialisiertes Epithel, das Antigen transportierende Mikrofaltenzellen (M-Zellen) enthält (Jung et al., 2010).



**Abbildung 1.1: Das mukosale Immunsystem.** Auf dem einschichtigen Epithel befindet sich eine von Becherzellen gebildete Muzinschicht, welche IgA und antimikrobielle Peptide (AMP) enthält. (1) Insbesondere die Paneth-Zellen, produzieren AMP zur Abwehr von Bakterien. (2) Im Epithel befinden sich oberhalb der Lymphfollikel der Lamina propria M-Zellen, welche luminal Antigenen durch das Follikel-assoziierte Epithel (FAE) transportieren. Anschließend werden die Antigene von dendritischen Zellen (DCs) endozytiert, prozessiert und in einem isolierten Lymphfollikel (ILF) direkt oder indirekt über T-Zellen einer Plasmazelle präsentiert. Plasmazellen wandern danach über den Blutstrom in die Lamina propria ein, um dort IgA zu produzieren. IgA wird in das Lumen abgegeben. (3) Alternativ können Antigene und Bakterien mittels Transzytose durch Enterozyten zu den DCs gelangen. (4) Außerdem sind DCs in der Lage, luminal Antigenen direkt aus dem Lumen über ihre Dendriten aufzunehmen. (5) Außer in den ILFs kann die Antigenpräsentation auch in den Peyer-Plaques (PP) oder in mesenterialen Lymphknoten (mLN) stattfinden, was dort nicht nur die IgA-Produktion induziert, sondern auch die Differenzierung von T-Zellen. Aktivierte Lymphozyten können dann als intraepitheliale Lymphozyten ins Epithel einwandern (modifiziert nach Maynard et al., 2012).

### ***1.1.1.1 Das angeborene mukosale Immunsystem***

Das angeborene Immunsystem ist der phylogenetisch ältere Teil des Immunsystems und gilt als unspezifisch, da es lediglich zwischen körpereigen und körperfremd unterscheiden kann. Hierzu werden Rezeptoren wie die *pattern recognition receptors* (PRR) genutzt. PRRs erkennen für Mikroorganismen charakteristische Muster, die so genannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Zu den PRRs gehören insbesondere die *Toll-like* Rezeptoren (TLR) und die *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like Rezeptoren (NLR). Nach der Erkennung eines Pathogens phagozytieren Makrophagen dieses oder induzieren mittels DCs eine adaptive Immunantwort (Yatim and Lakkis, 2015).

Makrophagen treffen als erste Zellen des angeborenen Immunsystems auf eindringende Pathogene, phagozytieren diese und töten sie in Phagolysosomen ab. Im Rahmen solcher Phagozytosevorgänge kommt es zur Ausschüttung von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen. Die sich in der intestinalen Lamina propria befindlichen Makrophagen erneuern sich aus zirkulierenden Monozyten und entwickeln sich unter dem Einfluss von mukosal-sezerniertem *Transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) weiter zu tolerogenen Makrophagen (Smythies et al., 2005). Diese sind charakterisiert durch eine hohe phagozytotische Aktivität, eine konstitutive Expression von Interleukin (IL)-10 und eine Desensibilisierung gegenüber TLRs. Somit führt die hohe Phagozytoseaktivität intestinaler Makrophagen nicht zur Expression proinflammatorischer Zytokine, sondern trägt zur Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase bei. Die Reifung der Makrophagen zu tolerogenen Makrophagen, die im Rahmen einer Kolitis unterbrochen ist, geht mit einer Hochregulierung des C-X3-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 1 (CX3CR1) einher, sodass die intestinalen Makrophagen als CX3CR1<sup>hoch</sup>, MHCII<sup>hoch</sup>, F4/80<sup>+</sup>, *Cluster of differentiation* (CD) 11b<sup>+</sup> und CD11c<sup>intermediär</sup> identifiziert werden können (Bain et al., 2013). Am Priming der T-Zellen sind die immobilen Makrophagen kaum beteiligt, jedoch üben sie einen indirekten Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung aus, indem sie über die Freisetzung von IL-10 die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) fördern (Denning et al., 2007). Darüber hinaus sind Makrophagen entscheidend für die intestinale Integrität, da sie unter dem Einfluss des Mikrobioms TLR-abhängig Wachstumsfaktoren ausschütten und die

Proliferationsvorgänge der intestinalen epithelialen Vorläuferzellen induzieren (Pull et al., 2005).

DCs befinden sich vor allem in der intestinalen Lamina propria und nehmen dort Antigene auf. Die Antigene überqueren das intestinale Epithel hauptsächlich durch die Transzytose der M-Zellen, die sich im Follikel-assoziierten Epithel (FAE) oberhalb der Lymphfollikel befinden (Jung et al., 2010). Wenige DCs befinden sich im Epithel und nehmen über Dendriten direkt luminale Antigene auf. Anschließend migrieren die DCs in mLN. Diese Fähigkeit zur Migration ist charakterisiert durch die Expression des C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptors 7 (CCR7) (Farache et al., 2013). In den mLN präsentieren DCs als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (engl. *antigen-presenting cells*, APCs) die Antigene den sich dort befindlichen T-Zellen und aktivieren diese. Somit agieren DCs als Vermittler zwischen dem angeboren und dem adaptiven Immunsystem. Welche Art der T-Zell-Antwort entsteht, hängt davon ab, welchen Differenzierungstyp die DCs in den T-Lymphozyten induzieren. In der intestinalen Mukosa befinden sich überwiegend CD103<sup>+</sup> DCs, welche über die Sekretion von TGF- $\beta$  und Retinsäure immunmodulatorische Tregs induzieren und somit zur Toleranzinduktion beitragen (Steimle and Frick, 2016). Intestinale DCs sind CD103<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>, teilweise CD11b<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup> und in Abgrenzung zu intestinalen Makrophagen F4/80<sup>-</sup> sowie CX3CR1<sup>-</sup> (Farache et al., 2013). Abbildung 1.1 zeigt, wie DCs in das mukosale Immunsystem eingebunden sind und als Bindeglied der angeborenen und erworbenen Immunität agieren.

### **1.1.1.2 Das erworbene mukosale Immunsystem**

Das erworbene Immunsystem ist der phylogenetisch jüngere Teil des Immunsystems und gilt als spezifisch, da es einzelne Antigene erkennt. Hierzu werden Rezeptoren mit singulärer Spezifität genutzt. Ein Lymphozyt besitzt ausschließlich Rezeptoren für ein spezifisches Antigen. Die Potenz des adaptiven Immunsystems ergibt sich erst durch die große Zahl an Lymphozyten, die durch mehrere kodierende Gene und den genetischen Mechanismus der somatischen Rekombination jeweils verschiedene, spezifische B- bzw. T-Zell-Rezeptoren tragen. Die Aktivierung eines solchen Rezeptors führt zur klonalen Expansion dieses Lymphozyten und ermöglicht eine zielgerichtete Immunantwort (Mahe et al., 2018).

Unterschieden werden die Lymphozyten je nach Ort der Reifung im Knochenmark (engl. *bone marrow*) oder Thymus in B- und T-Zellen, wobei zu den T-Zellen CD4<sup>+</sup> T-

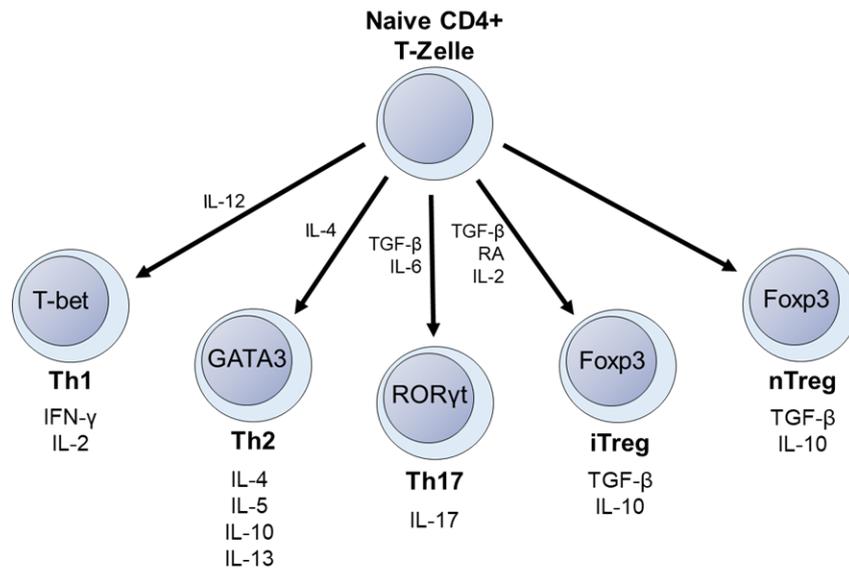
Helferzellen (Th-Zellen) und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen gezählt werden. Im Rahmen der Reifung entsteht in den primären lymphatischen Organen über Selektionsvorgänge die zentrale Toleranz. Selektiert werden Zellen, die über ihre Korezeptoren die körpereigenen MHC-Moleküle binden (Positivselektion), aber über deren T- bzw. B-Zell-Rezeptor nicht autoreaktiv wirken (Negativselektion). Autoreaktive Zellen verändern entweder mittels Rearrangement von Genen die Leichtketten ihrer Rezeptoren (engl. *receptor editing*) oder werden apoptotisch (Loh et al., 1989; Nemazee, 2017).

Naive CD4<sup>+</sup> Lymphozyten halten sich im Gastrointestinaltrakt in den Lymphfollikeln und Lymphknoten auf. Dort erkennen sie mittels des spezifischen T-Zell-Rezeptors Antigene, die über den Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) Klasse II von APCs präsentiert werden (Steimle and Frick, 2016). Zusätzlich sind kostimulatorische Signale zur Aktivierung der T-Zellen erforderlich. T-Lymphozyten exprimieren als kostimulatorische Moleküle CD28, einen induzierbaren Kostimulator (engl. *inducible costimulator*, ICOS), das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4 (CTLA-4) und *programmed death 1* (PD-1). Diese interagieren mit CD80 oder CD86 auf APCs. Dabei wirken CD28 und ICOS aktivierend auf die Proliferation und Zytokinsekretion von T-Zellen und CTLA-4 sowie PD-1 hemmend (Rudd et al., 2009). APCs sezernieren zusätzlich Zytokine und bestimmen wie in Abbildung 1.2 dargestellt durch das Zytokinprofil die Differenzierung in die unterschiedlichen Subpopulationen der CD4<sup>+</sup> Zellen.

Th1-Zellen entwickeln sich primär unter dem Einfluss von IL-12 und sezernieren selbst über den Transkriptionsfaktor T-bet die Zytokine IL-2, Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ). Th1-Zellen aktivieren insbesondere die Makrophagen und fördern die zelluläre Immunität gegen Viren und andere intrazelluläre Erreger sowie Tumorzellen. Die Differenzierung zu Th2-Zellen wird insbesondere durch IL-4 und IL-6 stimuliert. Th2-Zellen produzieren abhängig vom Transkriptionsfaktor GATA3 IL-4, -5, -10 sowie -13 und aktivieren durch die Erhöhung der Antikörperproduktion der B-Zellen die humorale Immunität gegen extrazelluläre Erreger wie Parasiten (Kidd, 2003; Romagnani, 1999). Einen weiteren wichtigen Typ der T-Effektorzellen (Teff) bilden die Th17-Zellen, die nach ihrem proinflammatorischen Hauptprodukt IL-17 benannt sind. Diese werden von reifen, IL-6 exprimierenden DCs über TGF- $\beta$  induziert und benötigen zur Stabilisierung zusätzlich IL-23. Ihr wichtigster

Transkriptionsfaktor ist ROR $\gamma$ t. Th17-Zellen leisten einen Beitrag zur Abwehr extrazellulärer Bakterien und zur Homöostase im mikrobiell besiedelten Intestinaltrakt (Weaver et al., 2006).

Unter physiologischen Bedingungen beherbergt der Intestinaltrakt kaum invasive Bakterienstämme und APCs induzieren über die Expression von TGF- $\beta$  und die fehlende Expression inflammatorischer Zytokine vorrangig immunmodulatorische Tregs. Man unterscheidet bei Tregs konstitutive oder natürliche (nTreg) von adaptiven oder induzierten (iTreg). nTregs werden als autoreaktive Zellen mit immunsuppressiver Aktivität konstitutiv im Thymus generiert und verlassen diesen als reife CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, *Forkhead-Box-Protein P3*<sup>+</sup> (Foxp3<sup>+</sup>) Zellen, die außerdem CD103 und den *glucocorticoid-induced TNF receptor* (GITR) exprimieren. Sie stellen in Mäusen 5 – 10 % der peripheren T-Zellen dar. nTregs entfalten ihre Wirkung in erster Linie durch einen Zell-Zell-Kontakt über das inhibitorisch wirkende kostimulatorische Molekül CTLA-4 (Mills, 2004). iTregs hingegen entwickeln sich in sekundären lymphatischen Organen unter dem Einfluss der APCs vergleichbar mit den Teff. TGF- $\beta$  induziert über die Hochregulierung des Transkriptionsfaktors Foxp3 CD25<sup>+</sup> Tregs, während es die Proliferation und Zytokinexpression der Teff hemmt. IL-2 und Retinsäure wirken synergistisch zu TGF- $\beta$  auf die Differenzierung der iTregs, wohingegen IL-6 die Differenzierung hemmt. Neben diesen Foxp3<sup>+</sup> Typ 1 regulatorischen T-Zellen (Tr1-Zellen) existieren Tr2-Zellen, die Foxp3<sup>-</sup> sind. Diese entstehen unter dem Einfluss von IL-10 und sezernieren selbst im Sinne der positiven Rückkoppelung IL-10 und TGF- $\beta$  (Sakaguchi et al., 2008).



**Abbildung 1.2: Differenzierung der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten.** Naive CD4<sup>+</sup> Lymphozyten binden den MHC-Klasse-II-Komplex und das darauf präsentierte Antigen. Von APCs freigesetztes IL-12 induziert die Differenzierung zu Th1-Zellen, die über den Transkriptionsfaktor T-bet IFN- $\gamma$  und IL-2 sezernieren. IL-4 aktiviert den Transkriptionsfaktor GATA3, was in Th2-Zellen zur Freisetzung von IL-4, 5, 10 und 13 führt. IL-17 exprimierende Th17-Zellen differenzieren unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  in Anwesenheit von IL-6. iTregs können Foxp3<sup>+</sup> oder Foxp3<sup>-</sup> sein, produzieren TGF- $\beta$  und IL-10 und ihre Differenzierung wird durch TGF- $\beta$ , RA und IL-2 stimuliert. TGF- $\beta$  und IL-10 exprimierende nTregs differenzieren im Thymus und verlassen diesen als reife Zellen (modifiziert nach Sakaguchi et al., 2008).

Ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Tregs und Teff ist entscheidend für die intestinale Homöostase. Teff sind entscheidend für die Abwehr pathogener Erreger. Ihre Überaktivität führt jedoch zu unkontrollierten Entzündungsvorgängen, Autoimmunerkrankungen und im Darm zum klinischen Bild einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED). Dabei dominiert die Th1-vermittelte Immunantwort bei Morbus Crohn (MC) und Th2-Zellen bei Colitis Ulcerosa (CU) (Zhang and Li, 2014). Das Fehlen von Tregs führt im Tiermodell zu spontaner Kolitis, während eine durch Zelltransfer von Teff induzierte Kolitis durch den Kotransfer von Tregs aufgelöst wird (Hooper and Macpherson, 2010).

Eine maßgebliche Rolle für das Gleichgewicht zwischen den CD4-Zellpopulationen übernimmt das Mikrobiom. Im Mausmodell zeigte sich nach Besiedelung von Mäusen, die keine Mikroorganismen enthalten (engl. *germ-free*, GF) mit benignen, nicht-invasiven Bakterien eine Expansion von iTregs und eine Aktivierung von nTregs sowie eine Abnahme der Th1- und Th17-Zellen in der Lamina propria des Kolons. Diese Veränderungen sind IL-10 abhängig, reversibel durch die Besiedelung des Darms mit invasiven Bakterienstämmen und demonstrieren die feine Regulierung des Verhältnisses der Teff zu Tregs (Geuking et al., 2011).

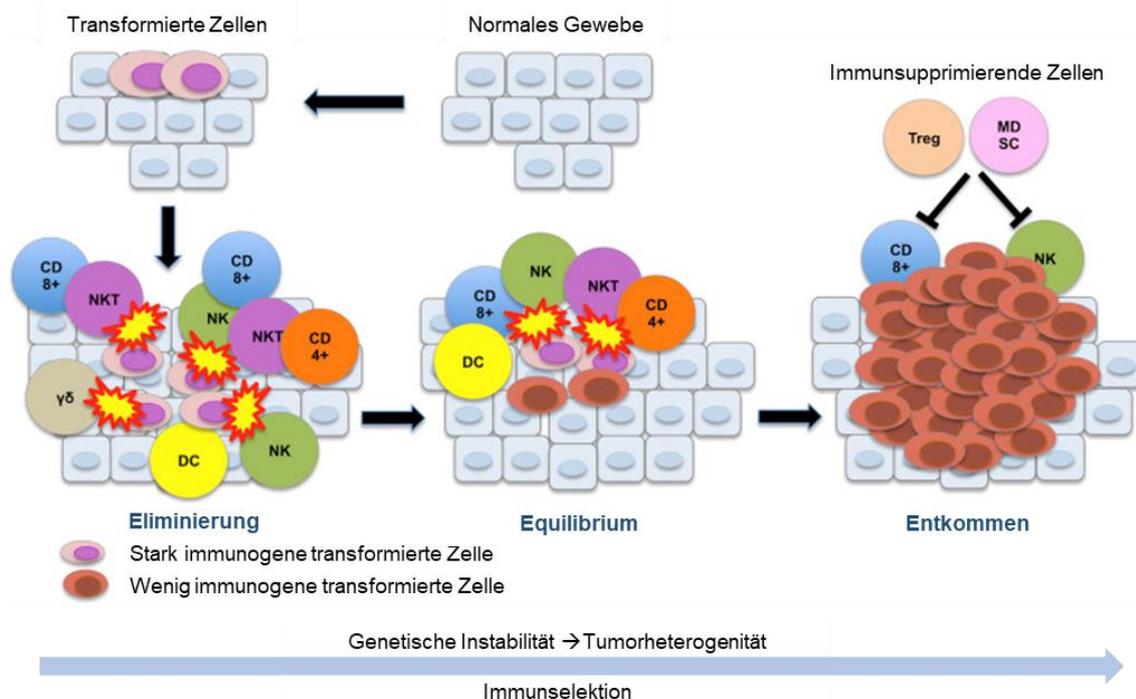
CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden auch zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) genannt und sind insbesondere bedeutsam bei der Eliminierung von Viren, intrazellulären Bakterien und Parasiten sowie maligne entarteten Zellen (Harty et al., 2000). Zur Stimulierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren DCs auf ihren MHC-Klasse-I-Komplexen Antigene. Dieser Prozess wird *cross presentation* genannt. Anschließend erkennen ZTLs über ihren T-Zell-Rezeptor (engl. *T cell receptor*, TCR) Antigene, die von infizierten Zellen auf deren MHC-Klasse-I-Komplexen präsentiert werden (Cresswell et al., 2005). Zur Abtötung der Zielzelle nutzen CD8<sup>+</sup> Zellen drei unterschiedliche Effektormechanismen. Zum einen führt die Exozytose von Granula zur Freisetzung des zytolytischen Proteins Perforin und der Proteasen Granzym A und B. Einen weiteren Mechanismus stellt die Hochregulierung des Liganden des Fas-Todesrezeptors (CD95) dar. Beide Signalwege münden über die Caspase-Kaskade in der Apoptose der Zielzelle. Schließlich sezernieren ZTLs auch Zytokine und Chemokine. Die größte Bedeutung erreichen dabei IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , die anti-tumorös und anti-mikrobiell wirken (Harty et al., 2000).

B-Lymphozyten differenzieren unter dem Einfluss von Antigenen, Zytokinen und T-Helferzellen zu Plasmazellen, deren Hauptaufgabe in der Sezernierung von Antikörpern liegt. Antikörper neutralisieren Antigene, aktivieren über Fc-Rezeptoren Makrophagen oder induzieren den klassischen Weg des Komplementsystems. Darüber hinaus stimulieren B-Zellen durch die Antigenpräsentation und Ausschüttung von Zytokinen T-Zellen. Ein kleiner Teil der B-Zellen exprimiert IL-10 und wirkt dadurch immunregulatorisch (Hoffman et al., 2016). Antigene werden den intestinalen CD20<sup>+</sup> B-Zellen von APCs in den ILF, PP und mLN präsentiert. Sie verlassen das lymphatische Gewebe und migrieren über den Blutstrom in die intestinale Lamina propria. Dort sezernieren sie IgA-Antikörper. IgA-Dimere werden mittels rezeptorvermittelter Transzytose ins endotheliale Lumen transportiert, wo sie als Bestandteil des Mukus ihre antimikrobielle Wirkung entfalten (Spencer and Sollid, 2016).

### **1.1.2 Immunsystem in Tumorgenese**

Die Interaktionen zwischen dem Immunsystem und Tumoren, genannt *Immunediting*, sind komplex und gewissermaßen konträr. Das Immunsystem eliminiert im Rahmen der Immunüberwachung potent entartete Zellen und Immunsuppression erhöht die Inzidenz von malignen Erkrankungen. Andererseits entstehen auch in immunkompetenten Organismen Tumorerkrankungen, wobei Tumorzellen der Immunabwehr entkommen.

Dieser Prozess wird *Tumor-Immunescape* genannt. Tatsächlich handelt es sich beim *Immuneediting* um einen dynamischen Prozess bestehend aus drei in Abbildung 1.3 dargestellten Phasen: Eliminierung, Equilibrium, Entkommen. Unter den heterogenen Tumorzellen werden dabei die weniger immunogenen selektiert (Dunn et al., 2002).



**Abbildung 1.3: Die drei Phasen des Krebs-Immuneediting-Konzepts.** 1) Transformierte Zellen werden von Immunzellen erkannt und insbesondere von CD8<sup>+</sup> Zellen, Natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) eliminiert. 2) Es etabliert sich ein Gleichgewicht (Equilibrium) zwischen Tumorzelleliminierung und Tumorzellproliferation. Es entsteht ein Selektionsdruck zugunsten weniger immunogener Tumorzellen. 3) Immunsuppressiv-wirkende Zellen wie *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) und Tregs unterdrücken auch im Immunkompetenten die Immunantwort. Die weniger immunogenen Tumorzellen entkommen der Immunüberwachung und proliferieren (modifiziert nach Bremnes et al., 2016).

An der Tumor-Immunüberwachung und dem Tumor-*Immunescape* sind die meisten Immunzellen beteiligt und werden im Folgenden beginnend mit den Zellen, die zur Eliminierung von Tumorzellen beitragen, vorgestellt.

CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten erkennen nach dem Priming durch DCs mittels *cross presentation* von Antigenen und unter kostimulatorischen Signalen von CD4<sup>+</sup> Lymphozyten über ihren TCR die von Tumorzellen auf MHC-Klasse-I-Komplexen präsentierten Tumorantigene und eliminieren daraufhin Tumorzellen. CD8<sup>+</sup> Zellen sind entscheidend für die Tumor-Immunüberwachung. Eine Unterdrückung ihrer zytolytischen Aktivität durch immunsupprimierende Einflüsse führt zum *Immunescape* von Tumorzellen. Die Wiederherstellung einer potenten CD8<sup>+</sup>-Zell-Funktion ist das Ziel zahlreicher anti-

tumoraler Immuntherapien (Farhood et al., 2019).  $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimieren in Abgrenzung zu konventionellen T-Zellen einen TCR bestehend aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette statt einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. Sie weisen ebenfalls zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen auf (Corvaisier et al., 2005).

Natürliche-Killerzellen (NK-Zellen) registrieren über ihre inhibitorisch oder aktivierend wirkenden Rezeptoren körpereigene Proteine, die von transformierten Zellen vermehrt exprimiert werden, und induzieren die Lyse dieser Zellen. Dementsprechend gilt eine Tumordinfiltration durch NK-Zellen als prognostisch günstig (Lakshmi Narendra et al., 2013). Natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) besitzen Charakteristika von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Sie erkennen Tumorantigene, die auf CD1d, einem MHC-Klasse-I ähnlichen Rezeptor, präsentiert werden und sezernieren daraufhin proinflammatorische Zytokine sowie Perforin und regulieren den Fas-Liganden hoch. In kolorektalen Karzinomen (engl. *colorectal cancer*, CRC) gilt eine Infiltration von NKT-Zellen als prognostisch günstig (Tachibana et al., 2005).

CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs sind in erhöhter Zahl in Tumoren und im peripheren Blut von Krebspatienten zu finden. Durch Chemokine wie CCL22 und CCL28 werden zirkulierende Tregs rekrutiert. DCs reifen im Tumormikromilieu zu tolerogenen DCs, die zusammen mit Tumorzellen IL-10 und TGF- $\beta$  sezernieren, damit naive CD4<sup>+</sup> Lymphozyten zu Tregs differenzieren. Tumor-infiltrierende Tregs sezernieren wiederum mehr IL-10 und TGF- $\beta$ , exprimieren in hohem Maße CTLA-4, induzieren immunsuppressive DCs und senken die Zahl sowie Aktivität CD8<sup>+</sup> ZTLs und NK-Zellen. Dadurch fördern Tregs das Tumor-*Immunescape*. Die Ablation von Tregs resultiert zwar in mehr Inflammation, reduziert allerdings die Tumorprogression. Insbesondere ein hoher Quotient von Tregs zu CD8<sup>+</sup> Zellen verschlechtert die Überlebenschancen (Facciabene et al., 2012; Pastille et al., 2014).

Makrophagen können klassisch aktiviert werden und weisen dann als M1-Makrophagen einen proinflammatorischen, Tumor-supprimierenden Phänotyp auf. Die alternative Aktivierung induziert M2-Makrophagen mit immunsupprimierendem, die Tumorprogression fördernden Charakter. Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) ähneln sehr dem M2-Phänotyp, so dass eine pro-tumoröse Wirkung trotz nicht eindeutiger Datenlage als wahrscheinlicher gilt. Die Bedeutung der TAMs zeigt sich auch in der Notwendigkeit der Tumordinfiltration durch Makrophagen für die Tumolvaskularisation

durch *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und das Tumorwachstum mittels Wachstumsfaktoren. M2-Makrophagen verändern unter anderem mittels Expression von Metalloproteinasen (MMP) die Extrazellulärmatrix (EZM) und begünstigen so die Gewebeeinfiltration durch Tumorzellen und die Metastasierung (Lin et al., 2006; Zhong et al., 2018).

DCs präsentieren als APCs Tumorantigene und sind dazu in der Lage, eine effektive Immunantwort zu induzieren. Die in Tumoren häufig vorherrschende Hypoxie verändert den Charakter der DCs und führt über die Freisetzung von VEGF zur Tumervaskularisation und zur Sezernierung proinflammatorischer Zytokine (Mancino et al., 2008). Hypoxie und von Tumorzellen-stammende Faktoren verhindern über den Transkriptionsfaktor *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) und die Hochregulierung von S100A9, auch Calprotectin genannt, die Differenzierung von DCs. Es kommt zur Anhäufung von myeloiden Vorläuferzellen und *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) (Cheng et al., 2008). MDSCs sind definiert als Granulozytenmarker 1 (Gr-1)<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup>. Sie senken die Anzahl sowie die Aktivität von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1, erhöhen die Zahl der nTregs und induzieren aus naiven CD4<sup>+</sup> Lymphozyten iTregs. Somit verhindern sie die Eliminierung von Tumorzellen und fördern das Tumor-*Immunescape*. Dies erklärt, dass MDSC mit größeren Tumoren, Metastasierung und schlechteren Überlebenschancen einhergehen (Bunt et al., 2006; Gabrilovich et al., 2012).

Die heterogene Gruppe der T-Helferzellen übt auf die Tumorgenese verschiedene Wirkungen aus. Th1-Zellen sind an der Immunantwort gegen Tumorzellen beteiligt. Eine direkte Wirkung entfalten sie über die Sekretion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sowie zytolytischen Granula. Indirekten Einfluss üben sie durch die Vermehrung sowie Aktivierung der CD8<sup>+</sup> ZTLs aus. Im Gegensatz dazu tragen Th2-Zellen durch die Induktion einer T-Zell-Anergie zum Tumor-*Immunescape* bei. Th17-Zellen werden über ihre Sekretion von IL-17 definiert. Die prognostische Bedeutung von Th17-Zellen ist nicht eindeutig geklärt und variiert je nach Differenzierungstyp und Art der sezernierten Zytokine (Lakshmi Narendra et al., 2013).

Tumoreigene Mechanismen, um der Eliminierung durch das Immunsystem zu entkommen, sind die Verringerung der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und die Sezernierung von IL-10 und TGF- $\beta$  und somit das Erschaffen eines immunsuppressiv-

wirkenden Tumormikromilieus. Durch die Expression inhibitorisch-wirkender kostimulatorischer Moleküle hemmen Tumorzellen direkt CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Bedeutsam sind dabei *programmed cell death-ligand 1* (PD-L1) und CD80/CD86, die mit auf T-Lymphozyten exprimierten PD-1 bzw. CTLA4 interagieren. Die therapeutische Ablation dieser Interaktion zeigt vielversprechende therapeutische Ergebnisse (Pernot et al., 2014).

## 1.2 Toll-like Rezeptoren

TLRs sind PRRs und übernehmen als solche eine wichtige Rolle im Immunsystem. Sie erkennen in Form Rezeptor-spezifischer Liganden Bestandteile von Pathogenen wie Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren und von beschädigten Zellen, *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) (Luddy et al., 2014).

13 Typen an TLRs sind bekannt, TLR1 - 10 kommen sowohl im Menschen als auch in der Maus vor. TLR10 ist nur im Menschen funktionstüchtig und TLR11 - 13 konnten nur in der Maus nachgewiesen werden (Yesudhas et al., 2014). Jeder dieser Rezeptoren besitzt, wie in Tabelle 1.1 im Detail dargestellt, spezifische Liganden.

**Tabelle 1.1: TLR Liganden.** Die verschiedenen TLRs erkennen unterschiedliche bakterielle, virale, parasitäre oder fungale Komponenten als spezifischen Liganden. Zum Teil existieren rezeptorspezifische synthetische Liganden.

	<b>Bakterien</b>	<b>Viren</b>	<b>Parasiten</b>	<b>Fungi</b>	<b>Synthetischer Ligand</b>
<b>TLR1/2</b>	Triacyl-Lipopeptid	-	-	Zymosan	-
<b>TLR2</b>	Peptidoglykan	Hämagglutinin	tGPI-Mutin	-	-
<b>TLR3</b>	-	dsRNA	-	-	Poly IC
<b>TLR4</b>	LPS	-	-	-	MPLA
<b>TLR5</b>	Flagellin	-	-	-	-
<b>TLR2/6</b>	Diacyl-Lipopeptid	-	-	Zymosan	-
<b>TLR7</b>	-	ssRNA	-	-	Imidazochinolin
<b>TLR8</b>	-	ssRNA	-	-	Imidazochinolin
<b>TLR9</b>	CpG DNA	DNA	-	-	-

dsRNA, doppelsträngige RNA (engl. *double-stranded RNA*); Poly IC, Polyinosin-/Polycytidyl-Säure; LPS, Lipopolysaccharid; MPLA, Monophosphoryl Lipid A; ssRNA, einzelsträngige RNA (engl. *single-stranded RNA*) (modifiziert nach Kawai and Akira, 2007a).

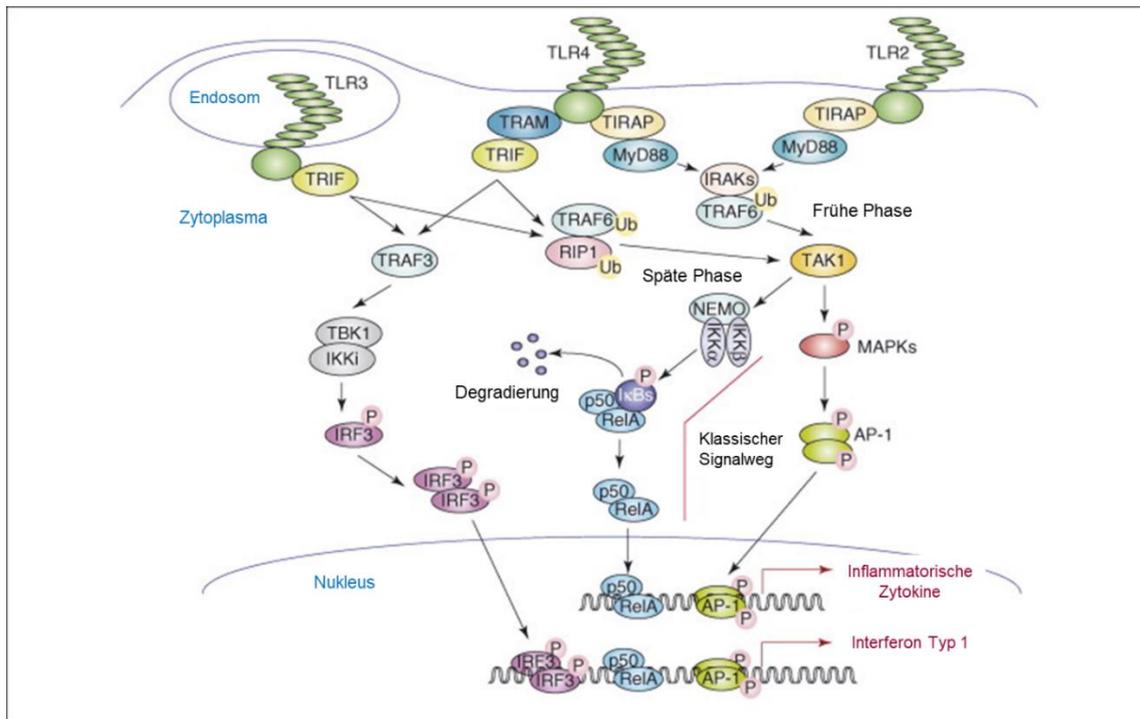
TLR3, 7, 8 und 9 erkennen Nukleinsäure als Liganden und sind deshalb im Inneren der Zellen in Endosomen, Lysosomen oder dem endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die anderen TLRs hingegen befinden sich an der Zelloberfläche. TLRs sind transzelluläre Proteine. Extrazellulär bestehen sie aus Leucin-reichen Wiederholungen (engl. *leucine-rich repeats, LRRs*), die für die Erkennung der Pathogenbestandteile zuständig sind. Das intrazelluläre C-terminale Ende hingegen ähnelt dem Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) und wird deshalb Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne genannt (Kawai and Akira, 2007a).

Die Expression von TLRs findet ubiquitär statt, variiert jedoch je nach Zelltyp, Lokalisation, Gewebe und den umgebenden Bedingungen, so dass die Expression über das Mikromilieu bestimmt wird. Einen weiteren Induktionsmechanismus stellt die Ligandenbindung dar (Shi et al., 2011). TLRs werden nicht nur von Immunzellen, sondern fast jedem Zelltyp exprimiert und sind auch in Epithelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten nachweisbar (Kawai and Akira, 2007a).

### 1.2.1 TLR-Signalkaskade

Die Aktivierung von TLRs durch die Bindung eines Liganden führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Diese induzieren die Transkription bestimmter Gene und regulieren darüber die Immunantwort.

Im Wesentlichen gibt es zwei verschiedene Signalwege zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren, die in Abbildung 1.4 ausführlich dargestellt sind: einen *myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)*-abhängigen sowie einen MyD88-unabhängigen, *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$*  (TRIF)-abhängigen Signalweg. TLR4 vermittelt über beide Signalwege, TLR3 über den TRIF-abhängigen Signalweg und die anderen TLRs über den MyD88-abhängigen Signalweg. Die Bedeutung der Adaptermoleküle MyD88 bzw. TRIF liegt darin, dass je nach Signalweg ein bestimmtes Genexpressionsprofil erzeugt wird (Kawai and Akira, 2007b). Dieses bestimmt, wie nachfolgend beschrieben, die Immunantwort des angeborenen Immunsystems, den Phänotyp der Zellen des erworbenen Immunsystems, den Einfluss auf die Wundheilung und weitere teils konträre Effekte der TLR-Aktivierung.



**Abbildung 1.4: Die TLR-Signalkaskade.** Die Aktivierung von TLRs durch die Bindung spezifischer Liganden führt zur Rekrutierung eines der vier verschiedenen Adapterproteine, die die TIR-Domäne enthalten. Dies sind MyD88, TIRAP, TRIF und TRAM. TLR2 und TLR4 rekrutieren TIRAP, welches MyD88 bindet. Das aktivierte Adapterprotein MyD88 rekrutiert IRAKs. Es sind verschiedene IRAKs bekannt, welche einen aktivierenden (IRAK1 und 4) oder hemmenden (IRAK-M) Charakter besitzen. Nach Phosphorylierung dissoziieren IRAK1 und IRAK4 von MyD88 und interagieren mit der Ubiquitin-Ligase TRAF6. TRAF6 aktiviert durch Ubiquitinierung (Ub) TAK1. TAK1 phosphoryliert den IKK-Komplex bestehend aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und NEMO. Dieser Komplex phosphoryliert I $\kappa$ B, woraus die Ubiquitinierung und konsekutiv der proteolytische Abbau von I $\kappa$ B resultiert. NF- $\kappa$ B, ein Heterodimer bestehend aus p50 und RelA, ist enthemmt und wird in den Nukleus transloziert. Gleichzeitig phosphoryliert (P) TAK1 MAPKs. Der Phosphorylierung von AP-1 durch MAPKs folgt die Translokation von AP-1 in den Zellkern. NF- $\kappa$ B und AP-1 induzieren als Transkriptionsfaktoren die Expression inflammatorischer Zytokine.

Die Bindung von TLR3 oder TLR4 an TRIF führt über die Ubiquitinierung von TRAF6 und RIP1 zur Aktivierung von TAK1. TAK1 vermittelt TRIF-abhängig die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in der späten Phase. TRIF interagiert zusätzlich mit TRAF3, das TBK1 und IKKi rekrutiert. Es folgt die Phosphorylierung und Dimerisierung von IRF3. Der IRF3-Homodimer induziert die Expression von IFN- $\alpha$  und - $\beta$ , den Interferonen des Typs 1.

TIR, Toll/IL-1-Rezeptor; MyD88, *myeloid differentiation primary response gene 88*; TIRAP, *TIR domain-containing adaptor protein*; TRIF, *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$* ; TRAM, *TRIF-related adaptor molecule*; IRAK, *IL-1 receptor-associated kinase*; TRAF6, *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*; TAK1, *transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1*; IKK, *inhibitor of nuclear factor kappa B kinase*; NF- $\kappa$ B, *nuclear factor kappa B*; NEMO, *NF- $\kappa$ B essential modifier*; I $\kappa$ B, *inhibitor of nuclear factor kappa B*; MAPK, *MAP kinase*; AP-1, *activator protein 1*; RIP1, *receptor interacting protein 1*; IFN $\beta$ , *Interferon  $\beta$* ; TBK1, *TANK-binding kinase 1*; IRF3, *Interferon regulatory factor 3*; ISRE, *IFN-stimulated response element*; Ub, *Ubiquitinierung*; P, *Phosphorylierung* (modifiziert nach Kawai and Akira, 2007a).

Der MyD88-abhängige Signalweg führt über die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 zur Transkription inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , aber auch von IL-10. Das Resultat sind eine Immunantwort des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems und reduzierte Wundheilung (Dasu and Isseroff, 2012; Kawai and Akira, 2007a).

TLR3 und 4 nutzen den TRIF-abhängigen Signalweg zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Dieser führt im Vergleich zur MyD88-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung wenig zur Transkription inflammatorischer Zytokine, primär dient der TRIF-abhängige Signalweg der Expression von Interferon Typ 1, insbesondere IFN- $\beta$ . Interferone vom Typ 1 sind bedeutsam für die Aktivität von B-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, besitzen eine immunmodulatorische Wirkung und aktivieren Wundheilungsprozesse. Die Hauptfunktion ist die Induktion einer Immunantwort gegen Viren und Malignome (Kasper and Reder, 2014; Kawai and Akira, 2007b).

### **1.2.2 Physiologische Funktion und Rolle in Tumorgenese**

Die Hauptfunktion von TLRs besteht in der Erkennung von Pathogenen und deren Abwehr. TLRs induzieren über komplexe Signalkaskaden die Expression von Zytokinen und Chemokinen. Diese aktivieren zur Abwehr der Pathogene sowohl Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems. Außerdem sind TLRs an der Regulation der prophylaktisch sezernierten AMPs und der IgA-Sekretion beteiligt (Yesudhas et al., 2014).

Die Aktivierung von TLRs durch PAMPs führt zur NF- $\kappa$ B-abhängigen Sezernierung von Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie Chemokinen, um das Immunsystem zu aktivieren und zu regulieren (Luddy et al., 2014). Insbesondere Interleukine sind wie oben dargestellt als Botenstoffe des Immunsystems an der Interaktion der Immunzellen und der Differenzierung der Immunzellpopulationen beteiligt. Die TLR-abhängige Induktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  kann therapeutisch unter anderem beim Urothelkarzinom der Harnblase genutzt werden. Chronisch erhöhte Zytokinspiegel gelten hingegen als tumorfördernd. Die therapeutische Blockade von TNF- $\alpha$ , IL-1 oder IL-6 führte in klinischen Studien bei verschiedenen Tumoridentitäten zu reduzierter Tumorprogression (Korneev et al., 2017). Chemokine sind Zytokine mit chemotaktischem Charakter. Unterschieden werden die C-C Motiv Chemokin Liganden (CCL) von den C-X-C Motiv Chemokin Liganden (CXCL). Es handelt sich bei Chemokinen um Proteine, die spezifisch einzelne Subtypen der Leukozyten zum Ort der Entzündung rekrutieren. Darüber hinaus sind Chemokine an der Stimulation von Immunzellfunktionen, Wundheilung und Angiogenese beteiligt (Graves and Jiang, 1995). In der Tumorgenese können Chemokine durch ihre veränderte Expression und Interaktion die Tumorprogression sowie Metastasierung fördern (Sarvaiya et al., 2013).

Ein wichtiger Teil der bakteriziden Wirkung phagozytierender Zellen stellt die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) dar. ROS sind essentiell für die Eliminierung phagozytierter Bakterien, wirken chemotaktisch und beeinflussen die Apoptose (Dupre-Crochet et al., 2013). Mitochondrien bilden im Rahmen der Zellatmung ebenfalls ROS. TLRs erhöhen die Produktion von ROS, indem sie über TRAF-6 die mitochondriale ROS-Bildung stimulieren. Das dauerhaft erhöhte Vorkommen von ROS im Rahmen chronischer Entzündungsvorgänge führt zu Gewebsschäden und Strangbrüchen der Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA), welche Tumore initiieren können (West et al., 2011).

Infektion und Inflammation führen zu Gewebeschädigung. Diese erleichtert den Mikroorganismen die Invasion und aggraviert die Infektion. Zur Unterbrechung dieses Kreises induzieren TLRs im Rahmen der Pathogenabwehr nicht nur eine Immunantwort, sondern auch die Wundheilung. Die Proliferationsrate des intestinalen Epithels wird in Anwesenheit des Mikrobioms von PAMPs und im Rahmen eines sterilen Zelluntergang von DAMPs über TLR2/TLR4/MyD88 und Prostaglandin E2 (PGE2) erhöht. TLRs wirken über NF- $\kappa$ B anti-apoptotisch auf moderat gestresstes Epithel. Die TLR-Stimulation auf Fibroblasten führt zur Fibrogenese. Dauerhafte Proliferationsreize durch anhaltende TLR-Aktivierung können die Entstehung und Progression von Karzinomen fördern (Kluwe et al., 2009).

TLRs besitzen auch immunsuppressive Eigenschaften, um überschießende Immunreaktionen, Autoimmunerkrankungen, Nahrungsmittelallergien und eine Immunantwort gegenüber kommensalen Bakterien zu verhindern. Die TRIF-abhängige Expression von IFN- $\beta$  nach Stimulierung von TLR3 oder TLR4 induziert im Knochenmark Immunzellen mit immunsuppressivem Charakter (Opitz et al., 2009). In DCs und Mph führen TLRs MyD88-abhängig zur Expression des Zytokins IL-10 (Samarasinghe et al., 2006; Sanin et al., 2015). Über die erhöhte Expression von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10 und TGF- $\beta$  und immunmodulierenden Oberflächenmarkern wie PD-L1 können TLRs immunsuppressiv wirken und über die Differenzierung von DCs zu CD103<sup>+</sup> DCs Tregs induzieren. Überschießende Entzündungsvorgänge, aber auch eine anti-tumoröse Immunreaktion werden verhindert. Es kommt zum Tumor-*Immunescape* (Luddy et al., 2014).

Die Stimulierung von TLRs auf Leukozyten bewirkt eine Hochregulierung von Chemokinrezeptoren wie CCR7. Diese Rezeptoren ermöglichen den Leukozyten einen Zugang zum Lymphsystem (Seth et al., 2011). Die Expression weiterer Chemokinrezeptoren und Integrine ermöglicht Leukozyten die Extravasation zum Entzündungsherd (Montresor et al., 2012). Luddy et al. beschreiben, dass Tumorzellen diese Mechanismen zur Metastasierung in Lymphknoten bzw. zur hämatogenen Fernmetastasierung kopieren und TLRs bei der veränderten Expression von Chemokinrezeptoren und Integrinen auf Tumorzellen involviert sind. Man spricht bei den veränderten Eigenschaften der Tumorzellen von der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) sowie aufgrund der Verhaltensähnlichkeiten zu Immunzellen von Epithelial-leukozytischer Transition (ELT). An EMT und ELT sind TLRs beteiligt. Es besteht eine Korrelation der TLR-Expression zum Tumorgrad und zur Fernmetastasierung (Luddy et al., 2014).

### **1.3 Kolitis-assoziiertes Kolonkarzinom**

#### **1.3.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)**

CED sind definiert als eine rezidivierende oder kontinuierliche Entzündung des Gastrointestinaltrakts. Der klassische Verlauf ist schubförmig, ein äußerer Auslöser kann fehlen. Im Wesentlichen werden zwei Formen unterschieden, Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulcerosa (CU) (Nikolaus and Schreiber, 2007). In Deutschland gab es in den Jahren 2008 bis 2010 150 MC Patienten je 100.000 Einwohner, wobei 6 bis 7 auf 100.000 Einwohner jährlich neu erkrankten. CU tritt mit 40 bis 80 Erkrankten je 100.000 Einwohner und einer Inzidenz von 4 bis 6 je 100.000 seltener auf. Grundsätzlich können beide Erkrankungen in jedem Alter auftreten. Die Inzidenz von MC ist jedoch zwischen dem 16. und 35. Lebensjahr am höchsten. Der Erkrankungsgipfel der CU tritt etwas später auf (Stallmach et al., 2012).

MC und CU unterscheiden sich bezüglich ihrer Lokalisation, ihres endoskopischen Erscheinungsbildes und der Histopathologie. Bei MC kann der ganze Magen-Darm-Trakt betroffen sein, wobei Läsionen am häufigsten im terminalen Ileum und im rechtsseitigen Kolon zu finden sind, der Befall ist diskontinuierlich. Histopathologisch sind die nicht-verkäsenden Granulome pathognomisch. Bei CU ist im Gegensatz zu MC ausschließlich das Kolon betroffen. Die Entzündung ist auf die Mukosa begrenzt und breitet sich

kontinuierlich von rektal nach oral aus. Histopathologisch äußert sich CU durch eine ausgedehnte Kryptenarchitekturstörung mit begleitenden Kryptitiden und Kryptenabszessen (Magro et al., 2013).

Betroffene Patienten präsentieren sich in über 70 % der Fälle in der akuten Phase und klagen über abdominelle Schmerzen sowie andauernden und schmerzhaften Stuhldrang. Insbesondere bei CU berichten Patienten von blutiger Diarrhoe. Über die Hälfte der Patienten leidet im Laufe der Erkrankung zusätzlich an extraintestinalen Manifestationen insbesondere an der Haut, den Augen, der Leber und den Gallewegen (Nikolaus and Schreiber, 2007).

Wird aufgrund des klinischen Befundes der Verdacht auf MC oder CU gestellt, werden Entzündungswerte wie die Serumkonzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) erhoben, bildgebende Verfahren genutzt und eine Ileokoloskopie mit Stufenbiopsie durchgeführt. Der Koloskopie und der Histopathologie kommen bei der Diagnosestellung wegen ihrer Spezifität besondere Bedeutung zu. Bakterielle Infektionen müssen mittels mikrobiologischer Testung auf pathogene Bakterien in Stuhlkulturen ausgeschlossen werden. Nahrungsmittelunverträglichkeiten sollen anamnestisch und bei Verdacht weiterführend abgeklärt werden. Als fäkaler Entzündungsmarker kann Calprotectin im Stuhl bestimmt werden (Preiß et al., 2014).

### ***1.3.1.1 Ätiologie***

Eine CED ist eine multifaktorielle Erkrankung, deren genaue Pathogenese noch immer unklar ist. Die weitestgehend anerkannte Hypothese besagt, dass CED aufgrund einer fehlregulierten Immunantwort gegen das intestinale Mikrobiom entstehen. Ausgelöst wird diese Immunreaktion durch Umweltfaktoren in einem genetisch prädisponierten Organismus (Matsuoka and Kanai, 2015).

*Exposom* - Die geografische Verteilung von CED mit der höchsten Prävalenz in den Industriestaaten Nordamerikas sowie Nord- und Westeuropas legt die Bedeutung von Umwelteinflüssen bei der Entstehung von CED nahe. Ebenso die Tatsache, dass die Inzidenz von MC und CU in der 2. Hälfte des 20. Jahrhunderts rasant angestiegen ist (Moum et al., 2014). Eine besondere Stellung unter den Umweltfaktoren nimmt das Mikrobiom ein, das sich durch hygienischere Lebensverhältnisse sowie Änderungen im Lebensstil verändert hat (Blaser and Falkow, 2009). Es wird im Folgenden separat

beschrieben. Darüber hinaus werden zahlreiche Umweltfaktoren mit der Entstehung von CED assoziiert. Als bedeutsam gelten unter anderem Ernährungsgewohnheiten, Hygieneverhältnisse, Lebensstil und Stress, Antibiotika und andere Medikamente und eine Appendektomie. Rauchen scheint ein Risikofaktor für MC zu sein, allerdings gilt Nikotinkonsum gegenüber CU als protektiv (Ye et al., 2015).

*Mikrobiom* - Das Mikrobiom gilt als wichtiger Umweltfaktor bei der Entstehung von CED. Es interagiert mit dem intestinalen Epithel und dem mukosalen Immunsystem. Versuche mit GF Mäusen offenbarten ein deutlich unterentwickeltes intestinales Immunsystem (Round and Mazmanian, 2009). Außerdem entwickelten GF Mäuse im Gegensatz zu ihren Wurfgeschwistern keine Kolitis (Sellon et al., 1998). Weitere Versuche zeigten eine Proportionalität zwischen der Bakterienlast und dem Grad der Inflammation (Uronis et al., 2009). Nicht nur im Tiermodell, sondern auch am Menschen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem Mikrobiom und einer CED. Antibiotika finden Einsatz in der Therapie insbesondere von MC. Die antibiotische Therapie verändert die Zusammensetzung des Mikrobioms und senkt sowohl die Bakterienlast als auch die Entzündungsaktivität (Nitzan et al., 2016).

Die Gensequenzierungsmethode *next-generation sequencing* ermöglichte die Identifikation von Veränderungen der Zusammensetzung des Mikrobioms. Die Ergebnisse sind teils widersprüchlich, weitestgehend übereinstimmend fand man im Mikrobiom von CED Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden eine reduzierte Diversität und eine erhöhte Instabilität des Mikrobioms sowie eine Abnahme der Firmicutes-Spezies und eine Zunahme an Proteobakterien. Innerhalb eines Patienten lassen sich Veränderungen im Mikrobiom während eines akuten Schubes im Vergleich zur Remission erkennen. Unklar ist jedoch, ob diese Veränderungen des Mikrobioms der Grund oder die Folge einer CED sind (Matsuoka and Kanai, 2015).

*Genom* - Ein Zusammenhang von CED besteht nicht nur mit Umweltfaktoren, sondern auch mit genetischen Faktoren. Bisher wurden 163 Gene identifiziert, die eine Rolle bei der Entstehung von CED spielen. Dabei sind 30 Gene ausschließlich mit der Entstehung von MC assoziiert, 23 sind spezifisch für CU und 110 Gene findet man sowohl in MC als auch in CU Patienten. Gene, die mit CED assoziiert werden, sind häufig Bestandteile des

Immunsystems und führen zu Autophagozytosedefekten oder einem Funktionsverlust von IL-10 (Zhang and Li, 2014).

*Immunologie* - Die Bedeutung des Immunsystems ist bereits an den genetischen Veränderungen, die mit CED assoziiert sind, zu erkennen. Zahlreiche Mutationen wurden in Genen gefunden, die ihre Funktion im Rahmen von Immunreaktionen wahrnehmen, beispielsweise die erste beschriebene Mutation in einem PRR namens NOD2. Bei der Entstehung von CED sind Chemokine und Zytokine beteiligt. Dies ist unter anderem auf eine erhöhte Aktivität von TLRs zurückzuführen. Es kommt zur Gewebsinfiltration durch Makrophagen, Granulozyten und DCs und folglich zu Entzündungsvorgängen (Zhang and Li, 2014). Während eines akuten Schubes ist die Zahl der Makrophagen erhöht und die mukosalen DCs weisen einen inflammatorischen Charakter auf (Huang and Chen, 2016). Auch das erworbene Immunsystem ist bedeutsam. Die Beteiligung von T-Helferzellen unterscheidet sich dabei in MC und CU. MC ist charakterisiert durch eine Th1-Zell-Immunantwort. Hingegen haben in CU Th2-Zellen eine größere Bedeutung. Daneben spielen Th17-Zellen bei MC und CU eine Rolle (Zhang and Li, 2014). Tregs sind ebenfalls an der Pathogenese von CED beteiligt. Es liegt ein Ungleichgewicht zwischen den immunmodulierenden  $\text{Foxp3}^+$   $\text{CD4}^+$  Tregs und den Teff vor. Studien zeigten, dass CED Patienten weniger Tregs besitzen und in verschiedenen CED Mausmodellen führte der Transfer von Tregs zur Heilung inflammatorischer Läsionen (Yamada et al., 2016).

### ***1.3.1.2 Leitlinientreue Therapie***

Bei der Behandlung von CED wird zwischen der Behandlung akuter Schübe und der Langzeittherapie zur Remissionserhaltung unterschieden.

Bei einem akuten Schub des MC stützt sich die Therapie vor allem auf Glukokortikoide, wenn ausreichend lokal in Form von Budesonid. Bei ausgeprägtem Befund sollte frühzeitig eine immunsuppressive Therapie mit Azathioprin/6-Mercaptopurin oder alternativ Methotrexat begonnen und zur Remissionserhaltung fortgesetzt werden. Die Therapie im Intervall verzichtet weitestgehend auf Glukokortikoide. Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper wie Infliximab kommen in schweren oder refraktären Fällen zum Einsatz. Indiziert ist eine Langzeittherapie bei Patienten, die einen steroidabhängigen oder komplizierten Verlauf aufzeigen oder deren Remissionsinduktion erst durch Anti-TNF-

$\alpha$ -Antikörper erreicht werden konnte. Ergänzt wird diese Therapie durch supportive Maßnahmen wie der Schmerztherapie sowie komplementärmedizinische Elemente. Chirurgische Interventionen sind beim MC vor der Immunsuppression zu bedenken und bei 50 % der Patienten innerhalb von 10 Jahren indiziert (Preiß et al., 2014).

Die Therapie von CU Patienten ähnelt der von MC Patienten in den Grundprinzipien. Jedoch wird im akuten Schub mehr auf 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) als auf Glukokortikoide gesetzt. Bei Kontraindikationen oder Steroidrefraktärität stehen alternativ Immunsuppressiva wie Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper oder die Calcineurin-Inhibitoren zur Verfügung. Scheitern alle medikamentösen Therapieversuche, wird chirurgisch durch eine kurative Proktokolektomie interveniert. Dem Remissionserhalt dienen in erster Linie 5-ASA und zur Therapieeskalation Azathioprin und Infliximab. 5-ASA hat den zusätzlichen Vorteil, die Inzidenz kolorektaler Karzinome (engl. *colorectal cancer*, CRC) zu senken. Um CRC frühzeitig zu erkennen, werden CU-Patienten engmaschig endoskopiert (Dignass et al., 2011).

### **1.3.2 Kolorektale Karzinome**

CRC sind weltweit die dritthäufigsten Malignome und die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache. Weltweit erkranken jährlich 1,4 Millionen Menschen an CRC, während 700.000 daran versterben. Dabei variiert die Prävalenz geografisch stark und besitzt ihr Maximum in Industrieländern wie Deutschland (Arnold et al., 2017). Hierzulande betrug 2010 die Inzidenz 62.000 und es gab im selben Jahr 26.000 CRC-bedingte Todesfälle. Sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität sind in Deutschland tendenziell rückläufig (Brenner et al., 2016).

#### **1.3.2.1 Inflammation und Karzinogenese**

Der Zusammenhang zwischen Infektionen und Tumoren ist heute wohl bekannt. Insgesamt geht man davon aus, dass 25 % aller Karzinome aufgrund chronischer Infektionen oder chronischer Inflammation entstehen (Sipos et al., 2014). Bei Patienten mit CED treten kolorektale Karzinome sehr viel häufiger auf. Man nennt die CRC von CED Patienten Kolitis-assoziierte Karzinome (engl. *Colitis-associated cancer*, CAC). CU erhöht das kumulative Risiko an CRC zu erkranken nach 30 Jahren Krankheit auf 18 - 20 % und MC auf 8 %. Dabei steigt das Risiko mit dem Schweregrad und der Dauer der

Erkrankung. Das Risiko für CRC ist somit proportional zum Ausmaß der Inflammation (Grivennikov, 2013).

Ein Grund dafür ist, dass die Entzündungsvorgänge im Darm von CED Patienten zu oxidativem Stress führen. Zellen des angeborenen Immunsystems setzen ROS und reaktive Stickstoffspezies (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) frei. Diese können zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA-Stränge und modifizierten Nukleotiden führen. Genmutationen sind die Folge. Liegen diese Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen, können Tumore initiiert werden (Waldner and Neurath, 2015).

Durch die inflammatorischen Vorgänge kommt es zu Gewebsdefekten in der intestinalen Mukosa. Diese erfordern zur Regeneration die Proliferation der intestinalen Epithelzellen. Handelt es sich aber nicht um einen akuten, sondern einen länger anhaltenden Entzündungszustand wie im Falle einer CED, führen diese Regenerationsvorgänge zu Fibrose und dysreguliertem Wachstum bis hin zur Karzinogenese. TLR-abhängig exprimierte Zytokine sind dabei von Bedeutung (Sipos et al., 2014). Hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang TNF- $\alpha$  und IL-6. TNF- $\alpha$  wird von hämatopoetischen Zellen gebildet und aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. TNF- $\alpha$  ist für die Abwehr intestinaler Bakterien erforderlich und eine TNF-Defizienz führt zu Kolitis und CAC. Gleichzeitig ist TNF- $\alpha$  im Rahmen chronischer Entzündungen an der Initiation von Tumoren beteiligt, induziert DNA-schädigende reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (engl. *reactive oxygen and nitrogen species*, RONS), steigert die Proliferation und Invasivität von Tumoren und hemmt die Apoptose. IL-6 wird von Makrophagen, aber auch von mesenchymalen Zellen sezerniert und ist in Patienten mit CU sowie CRC erhöht. IL-6 wirkt über den JAK (Januskinase)/STAT3-Signalweg. IL-6 erhöht die Proliferationsrate sowie die Resistenz gegen Apoptose und steigert über die EMT die Invasivität von Tumoren. IL-6 führt zusätzlich zu Mikrosatelliteninstabilität, dem häufigsten DNA-Reparaturdefekt in CRC (Landskron et al., 2014; West et al., 2015). Eine therapeutische Blockade von IL-6 resultierte im Tiermodell in einer Reduktion der Tumormasse (Waldner et al., 2012).

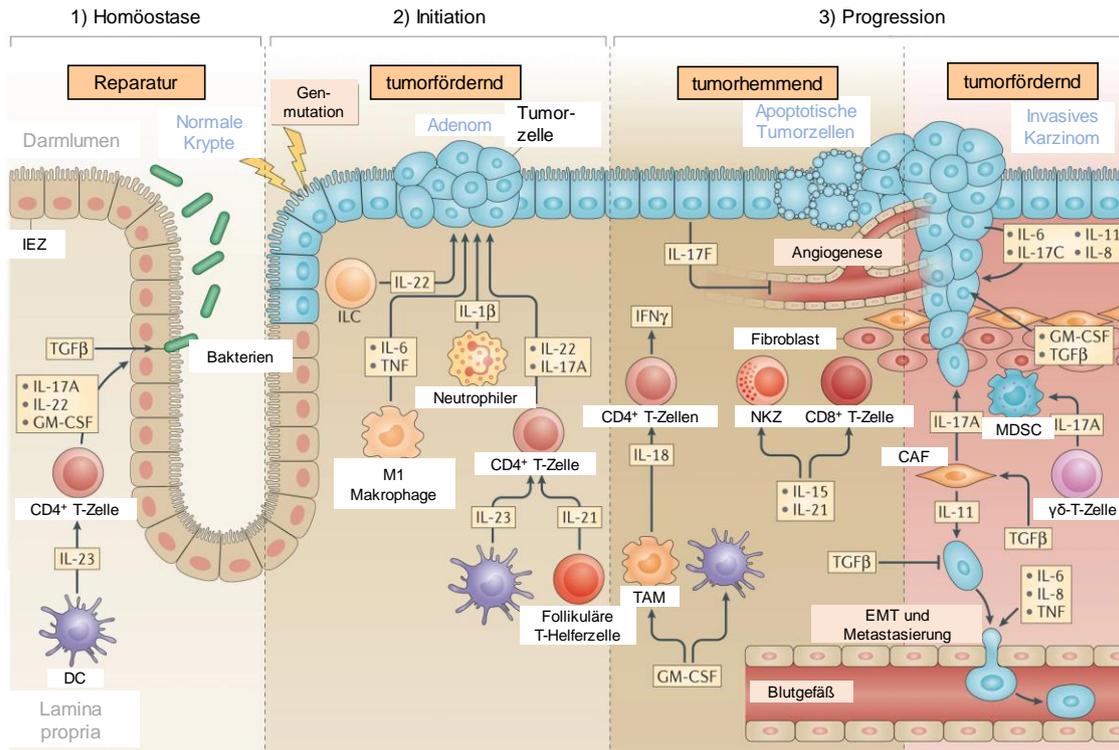
IL-1 $\beta$  scheint ebenfalls das Wachstum von CAC zu fördern. IL-1 $\beta$  wird von Neutrophilen und TAMs sezerniert und aktiviert NF- $\kappa$ B sowie den Wnt-Signalweg. IL-1 $\beta$  steigert die

Proliferation des intestinalen Epithels und der Tumorzellen und rekrutiert MDSCs (Mager et al., 2016; Wang et al., 2014).

IL-17 wird von Th17-Zellen sezerniert und muss in die einzelnen Subtypen unterschieden werden. Bedeutsam sind vor allem IL-17A und IL-17F. IL-17A ist ein inflammatorisches Zytokin, dessen Expression im Rahmen von CED und CAC erhöht ist und mit einer Verschlechterung der Prognose assoziiert ist. Tierexperimentell zeigten sich in einem Mausmodell für CAC mit Azoxymethan (AOM) und Natriumdextransulfat (engl. *Dextran sulfate sodium*, DSS) durch eine Defizienz von IL-17A neben einer Reduktion der Entzündung eine erniedrigte Proliferationsrate des intestinalen Epithels und weniger sowie kleinere Tumore (Hyun et al., 2012). Zudem induziert IL-17A mittels Chemokinen Angiogenese (Landskron et al., 2014). Im Gegensatz dazu ist die Expression von IL-17F im AOM/DSS-Modell und in menschlichen CRC reduziert und gilt als prognostisch positiv. Durch Inhibition der VEGF-Expression verhindert IL-17F die Angiogenese (Tong et al., 2012).

IL-10 gilt als anti-inflammatorisches Zytokin und wirkt über die Hemmung von NF- $\kappa$ B und STAT3. Eine IL-10-Defizienz stellt ein Modell für chronische Kolitis und insbesondere in Kombination mit AOM für CAC dar. Somit wirkt IL-10 durch die Reduktion inflammatorischer Vorgänge in der Phase der Tumorinitiation tumorhemmend. Durch die Suppression der Immunantwort gegen Tumore trägt IL-10 zum Tumor-*Immunescape* bei und weist somit tumorfördernde Eigenschaften auf. Bei zahlreichen Tumoren sind erhöhte Konzentrationen an IL-10 mit einer verschlechterten Prognose assoziiert (Landskron et al., 2014; Rothemich and Arthur, 2019).

Zahlreiche weitere Zytokine sind am Zusammenhang zwischen Inflammation und Karzinogenese beteiligt. Insgesamt besitzen diese oftmals pleiotrope Effekte und das Stadium der Tumorgenese ist entscheidend. Es muss dabei insbesondere die Phase der Tumorinitiation von der Tumorprogression unterschieden werden. Einen Überblick gibt Abbildung 1.6.



**Abbildung 1.5: Zytokine in der Pathogenese kolorektaler Karzinome.** Zahlreiche Zytokine sind in den verschiedenen Phasen der Karzinogenese von CRC beteiligt. 1) Unter Homöostase herrscht ein Gleichgewicht zwischen Erregerabwehr und Inflammation sowie Schädigung der intestinalen Barriere und Regeneration. Beteiligt daran sind insbesondere Interleukin (IL)-17A, IL-22, IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . 2) Bei überschießenden Proliferationsreizen resultieren die Regenerationsabsichten in der Tumorinitiation. 3) Zur Tumorprogression tragen zahlreiche Zytokine wie IL-6, IL-17A und TNF- $\alpha$  durch Steigerung der Proliferation, Hemmung der Apoptose, Förderung der Angiogenese, des Tumor-*Immunesca*pes und der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) bei. Gleichzeitig versucht das Immunsystem entartete Zellen zu eliminieren. Daran sind Interferon (IFN)- $\gamma$ , Natürliche Killerzellen (NKZ) und CD8<sup>+</sup> Zellen, die von IL-5 und IL-21 stimuliert werden, beteiligt. IEZ, intestinale Epithelzellen; DC, Dendritische Zellen; MDSC, *myeloid-derived suppressor cells*; TAM, Tumor-assoziierte Makrophagen; GM-CSF, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*; CAF, *cancer-associated fibroblast* (West et al., 2015).

Chemokine sind in Homöostase, Inflammation sowie Karzinogenese bedeutsam. Beispielsweise ist die Expression von CCL-5 in CRC erhöht und mit Tumorwachstum und Metastasierung assoziiert. CCL-5 steigert die Proliferationsrate und die Fähigkeit zur Migration von Tumorzellen. Zudem führt CCL-5 zur Rekrutierung von Tregs und Apoptose von tumoreliminierenden CD8<sup>+</sup> Zellen und trägt dadurch zum Tumor-*Immunescape* bei (Aldinucci and Colombatti, 2014).

Das Mikrobiom übt einen variablen Einfluss auf die Kolitis-assoziierte Tumorgenese aus. In Versuchen in einem CAC-Modell mit IL-10-defizienten Mäusen war die Entwicklung von Tumoren abhängig von der Anwesenheit von Mikroorganismen. IL-10-defiziente GF Mäuse wiesen signifikant weniger Tumore auf als IL-10-defiziente spezifisch pathogenfreie (SPF) Mäuse (Uronis et al., 2009). Im AOM/DSS-Modell zeigten sich in

GF Mäusen hingegen eine signifikant stärkere Kolitis und mehr Tumore als in SPF Mäusen (Zhan et al., 2013).

Intestinale Bakterien können die Tumorpromotion und -progression hemmen und fördern, indem sie die Immunantwort, die Regulation von Stammzellen oder Stoffwechseleigenschaften beeinflussen (Zou et al., 2018). Es zeigte sich, dass bestimmte Bakterien wie *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) und *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) vermehrt in Patienten mit CRC vorkommen. Diesen mit CRC assoziierten Bakterien wird eine tumorfördernde Wirkung zugesprochen (Gagniere et al., 2016).

### **1.3.2.2 Therapie des kolorektalen Karzinoms**

Vor Therapiebeginn findet ein ausführliches Staging statt, das unter anderem eine Sonografie, ein Röntgen-Thorax, die Ermittlung des Tumormarkers Carcinoembryonales Antigen (CEA) und eine Koloskopie mit Biopsieentnahme für ein histopathologisches *Grading* beinhaltet. Ein Kolon- wird von einem Rektumkarzinom mittels starrer Endoskopie differenziert, wobei ab einem Abstand von 16 cm von der Linea anocutanea definitionsgemäß ein Kolonkarzinom vorliegt, was therapeutische Konsequenzen mit sich bringt (Schmiegel and Pox, 2017).

Die chirurgische Therapie des Kolonkarzinoms sieht eine komplette mesokolische Exzision vor. Im *Union internationale contre le cancer* (UICC)-Stadium I ist die Therapie mit kurativer Intention damit bereits abgeschlossen. Im Stadium II eines Kolonkarzinoms kann eine adjuvante Chemotherapie folgen, allerdings nur in Risikosituationen wie zum Beispiel einem T4-Tumor. In Stadium III ist eine systemische Therapie obligat. Die Chemotherapie wird mit Oxaliplatin und alternativ mit Fluoropyrimidinen durchgeführt. Patienten mit Rektumkarzinomen im Stadium II und III erhalten hingegen in der Regel eine perioperative Therapie bestehend aus einer neoadjuvanten Bestrahlung oder Radiochemotherapie und einer adjuvanten Chemotherapie mit Fluorouracil, gegebenenfalls in Kombination mit Folinsäure. Tumore des oberen Rektums werden oftmals wie ein Kolonkarzinom behandelt.

Ab Stadium IV liegt eine palliative Situation vor. Die Therapie bedarf einer individuellen Gestaltung. Es wird primär medikamentös therapiert, eine chirurgische Tumor- und Metastasenresektion können aber zusätzlich indiziert sein (Schmiegel and Pox, 2017).

Nach bestmöglicher multimodaler Therapie liegt das Gesamtüberleben beim kurativ resezierten Kolonkarzinom (Stadium I-III) zwischen 44 – 93 % (Schmiegel et al., 2009).

### **1.3.3 Das AOM/DSS-Mausmodell**

CED erhöhen signifikant das Risiko für die Entwicklung von CRC. CAC entstehen durch wiederholte Zyklen aus Schädigung und Heilung des intestinalen Epithels. Mausmodelle werden genutzt, um die Mechanismen der Entstehung und Progression von CAC zu verstehen und neue therapeutische Möglichkeiten zu entwickeln. Diese Modelle beruhen typischerweise auf einer genetischen Modifikation oder sind eine Kombination aus karzinogenen und Kolitis-induzierenden Mechanismen (Snider et al., 2016).

Das in dieser Arbeit verwendete Modell ist das AOM/DSS-Modell. Die DSS-induzierte Kolitis entsteht durch einen chemisch induzierten Defekt in der intestinalen Barriere. Durch diesen lösen intestinale Bakterien und Nahrungsmittelbestandteile eine Immunreaktion mit der Folge einer Kolitis aus. Um eine chronische Kolitis nachzustellen, erhalten die Mäuse mehrere Zyklen DSS über das Trinkwasser. Histologisch zeigen sich nach dem ersten Zyklus eine Atrophie der Krypten und Ulzerationen, anschließend regenerative Veränderungen, eine gestörte Drüsenarchitektur sowie verkürzte und verzweigte Krypten und somit die gleichen Veränderungen wie bei der CU (Clapper et al., 2007). Klinisch äußern sich die Entzündungsvorgänge in Gewichtsverlust, Diarrhoe und intestinalen Blutungen (Thaker et al., 2012).

DSS führt außer zu Entzündung auch zur Entstehung von Tumoren. Um den Prozentsatz der Tiere mit neoplastischen Veränderungen zu erhöhen und das Modell zu beschleunigen, wird meist additiv AOM gegeben. AOM wird in der Leber hydroxyliert und glucuronidiert und gelangt über die Gallenflüssigkeit zum Darm. Dort wirkt es nach Aktivierung durch epitheliale oder mikrobielle  $\beta$ -Glucuronidasen kanzerogen (Neufert et al., 2007). Durch die Applikation von AOM entwickeln 100 % der Mäuse Tumore. Die AOM-Dosis wird dabei so gering gehalten, dass Tumore nicht ohne DSS und somit nicht unabhängig von der Entzündung entwickelt werden (Coudry et al., 2004). Während 100 % der mit AOM und DSS behandelten Mäuse Adenome entwickeln, bilden nur rund 50 % Karzinome aus (De Robertis et al., 2011).

## 2 FRAGESTELLUNG

Die Inzidenz von CED steigt in den Industrieländern kontinuierlich an. Die derzeit verfügbaren Therapien sind unspezifisch und verfolgen lediglich das Ziel einer Remissionsinduktion und -erhaltung. 20 - 25 % der Patienten sprechen zudem auf diese Therapie nicht ausreichend an. CED gehen mit einer Reduzierung der Lebensqualität und einem erhöhten Risiko für CED-assoziierte Krankheiten wie CRC einher. Deshalb ist es wichtig, die Pathophysiologie der Entzündungsvorgänge und der Karzinogenese bei CED vollständig zu verstehen, um zielgerichtete, effiziente Therapieansätze entwickeln zu können.

Bei CED findet eine Reaktion des Immunsystems gegen kommensale Bakterien statt. Bei TLR4 handelt es sich um einen Rezeptor, der LPS gramnegativer Bakterien erkennt. Durchbrechen Bakterien die intestinale Barriere, binden die vom Epithel und den Immunzellen exprimierten TLRs bakterielles LPS und induzieren Entzündungsvorgänge sowie die Regeneration des intestinalen Epithels. Daher ist eine Beteiligung von TLR4 an der Pathogenese von CED und CAC wahrscheinlich.

Ziel dieser Arbeit ist es zu prüfen, inwieweit TLR4-abhängige Signalwege für die Entzündungsaktivität und die Entwicklung von CAC verantwortlich sind. Genauer soll im murinen AOM/DSS-Modell untersucht werden, zu welchen Zeitpunkten der Entstehung von CAC TLR4 exprimiert wird und wann die Rezeptoraktivität funktionell relevant ist. Hierzu werden die TLR4-abhängigen Signalwege während der Entzündungsphase oder während der Tumorprogression mittels eines Inhibitors gehemmt. Neben dem Tumorwachstum soll insbesondere das Immunzellinfiltrat und die Entzündungsaktivität analysiert werden. Dabei wird auch ein möglicher therapeutischer Nutzen einer TLR4-Inhibition überprüft.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Mauslinien

In dieser Arbeit wurden weibliche BALB/c Mäuse genutzt, um die Rolle von TLR4 bei der Entstehung Kolitis-assoziiierter Kolonkarzinome zu untersuchen. Die BALB/c Mäuse wurden von ENVIGO (Rossdorf, Deutschland) erworben und in der tierexperimentellen Einheit des Universitätsklinikums Essen in individuell ventilierten Käfigen (engl. *individually ventilated cages*, IVC2) unter SPF-Bedingungen gehalten. Die Mäuse erhielten Wasser und Futter ad libitum. Das Hell-Dunkel-Verhältnis betrug 12:12 Stunden. Zu Versuchsbeginn waren die Mäuse 8 - 10 Wochen alt. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den ethischen Prinzipien und Richtlinien für wissenschaftliche Experimente durchgeführt und vom örtlichen Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV, Nordrhein-Westfalen, Deutschland) genehmigt.

#### 3.1.2 Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Roth, Karlsruhe
Azoxymethan (AOM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Dextran-Sodium-Sulfat (DSS)	MP Biomedicals, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	BIOTREND, Köln
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Roth, Karlsruhe, Germany
Fetales Kälberserum (engl. <i>Fetal calf serum</i> , FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Austria
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe

Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Ketamin 10 %	Ceva Sante Animale, Düsseldorf
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Promega, Mannheim
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Trisaminomethan (Tris, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Xylazin 2 %	Ceva Sante Animale, Düsseldorf

### 3.1.3 Medien und Puffer

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) mit GlutaMAX™:

Invitrogen, Karlsruhe

IMDM-Komplettmedium (IMDMc):

IMDM mit GlutaMAX™ und 25 mM HEPES

10 %	FCS
50 µg/ml	Penicillin/Streptomycin
25 µM	β-Mercaptoethanol

Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI): Invitrogen, Karlsruhe

PBS-Puffer (engl. phosphate buffered saline, pH = 7,0):

8 g/l NaCl	NaCl
0,2 g/l	KCl
1.44 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,2 g/m	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

FACS-Puffer:

PBS-Puffer	
2 %	FCS
2 mM	EDTA

PBS/EDTA:

PBS-Puffer

3 mM            EDTA

RPMI/FCS:

RPMI mit GlutaMAX™ und 25mM HEPES

20 %            FCS

RPMI/FCS/EGTA/MgCl<sub>2</sub>:

RPMI

1 %            FCS

1 mM           EGTA

1,5mM        MgCl<sub>2</sub>

TBE-Puffer:

10,78 g        Tris

5,5 g           Borsäure in 1 Liter Wasser gelöst

0,74 g        EDTA

TE-Puffer:

10 mM        Tris/HCL (pH 8,0)

1 mM        EDTA (in demineralisiertem Wasser)

M-MLV RT 5x Reaktionspuffer (pH 8,3): Promega, Mannheim

GoTaq Hot Start Polymerase 5x Reaktionspuffer: Promega, Mannheim

**3.1.4 Kits und Enzyme**

dNTP Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Fibrous Tissue Kit	Qiagen, Hilden
FoxP3 <i>Staining Buffer</i> Set	eBioscience, San Diego, USA
<i>Go Taq Hot Start</i> Polymerase	Promega, Mannheim
M-MLV ( <i>Moloney Murine Leukemia</i>	Promega, Mannheim
<i>Virus</i> ) Reverse Transkriptase	

Oligo(dT) Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Procarta <i>Cytokine Assay Kit</i>	Panomics, Fremont, USA
Random Primer	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR™ Green PCR Master Mix	Life Technologies, Darmstadt

### 3.1.5 Primerpaare

**Tabelle 3.1: Verwendete Primerpaare.** In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten Primer aufgelistet sowie die Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer, deren Annealing-Temperatur  $T_a$  und deren eingesetzte Konzentrationen in der quantitativen Real-Time Polymerase Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). Alle verwendeten Primer sind spezifisch für das Mausgenom und stammen von MWG Biotech (Ebersberg).

Gen	Primersequenz (vorwärts/rückwärts)	Annealing-Temperatur ( $T_a$ ) [°C]	Konzentration [nM]
RPS9	5'-CTGGACGAGGGCAAGATGAAGC-3' 5'-TGACGTTGGCGGATGAGCACA-3'	52-60	900/50
TLR2	5'-ACCCGCCCTTTAAGCTGTGTCTCC-3' 5'-GCCGCGTCGTTGTTCTCGTCA-3'	60	300/300
TLR3	5'-TCGCCTGCTAAGATGAAAACAA-3' 5'-TGAGGCACAAAACCAAGACAAC-3'	56	300/300
TLR4	5'-TGCTGGGGCTCATTCACTCAC-3' 5'-ACACTCAGACTCGGCACTTAGCAC-3'	58	300/300
TLR7	5'-GCCTGAAAAATGCCCTGACC-3' 5'-ACCAATCTGAGCCATGACAACACTG-3'	56	300/300
TLR9	5'-CCAGGCCACGGAGCAAAGGTT-3' 5'-GGGGGTGGAGGGGCAGAGAATGAA-3'	60	300/300

### 3.1.6 Antikörper

**Tabelle 3.2: Verwendete Antikörper.** In der folgenden Tabelle sind alle Antikörper aufgelistet, die bei der Durchflusszytometrie verwendet wurden. Angegeben sind das Epitop, an das die Antikörper binden, deren Fluorochrom, deren Klon und der Hersteller. Alle verwendeten Antikörper sind spezifisch für die Maus.

Epitop	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD4	PB	RM4-5	BD Pharmingen, San Jose, USA
CD8	AmCyan	SK1	BD Pharmingen, San Jose, USA
CD11b	PE	M1/70	BD Pharmingen, San Jose, USA

CD11c	APC	HL3	BD Pharmingen, San Jose, USA
FoxP3	FITC	FJK-16s	eBioscience, San Diego, USA
F4/80	PB	BM8	Invitrogen, Karlsruhe
Granzym B	APC	GB11	BD Pharmingen, San Jose, USA
Ki-67	PE/Cy7	SolA15	eBioscience, San Diego, USA
MHCII	BV510	M5/114.15.2	BioLegend, San Diego, USA
TLR4	PE/Cy7	SA 15-21	BioLegend, San Diego, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung aus rektalen Gewebebiopsien wurde das *Qiagen Fibrous Tissue Kit* (Qiagen, Hilden) genutzt. Die RNA Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben, inklusive 15-minütigem DNA-Verdau. Anschließend wurde die Konzentration der RNA im Eluat photometrisch mit Hilfe eines NanoDrops (Thermo Scientific, Bonn) gemessen.

#### 3.2.1.2 cDNA-Synthese

Durch reverse Transkription wurden 0,6 – 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben, wobei je Experiment dieselbe Menge in RNase-freiem H<sub>2</sub>O gelöste RNA eingesetzt wurde. Im Thermocycler (T3 Biometra, Göttingen) erfolgte für 10 Minuten bei 70 °C das Annealing der Primer, jeweils 0,5 µl Random Hexamer Primer und Oligo(dT)-Primer (Invitrogen, Karlsruhe). Ein Mastermix bestehend aus 1 µl M-MLV reverse Transkriptase (H-), 4 µl 5x M-MLV RT Puffer (beide Promega, Mannheim) und 1 µl dNTP Mix (10 mM; Fermentas, St. Leon-Rot) wurden zugegeben und der Reaktionsansatz für 1 h bei 42 °C inkubiert. In einem abschließenden Schritt wurde das Enzym durch eine 5-minütige Inkubation bei 95 °C inaktiviert und die synthetisierten cDNA-Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.1.3 Polymerasekettenreaktion

Zur besseren Einstellung der einzusetzenden cDNA Templatmenge in der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) wurde zunächst eine semi-quantitative PCR mit spezifischen Primern für das Haushaltsgen RPS-9 durchgeführt. Im Folgenden sind der dafür verwendete Reaktionsansatz sowie das PCR-Programm aufgeführt.

Der Reaktionsansatz bestand aus:

1 µl	cDNA	
4 µl	5x Reaktionspuffer	(Promega, Mannheim)
0,5 U	GoTaq Hot Start Polymerase	(Promega, Mannheim)
1,5 mM	Magnesiumchlorid	(Promega, Mannheim)
1 mM	dNTP Mix	(Thermo Fischer Scientific, Braunschweig)
5 µM	RPS-9 Vorwärtsprimer	
5 µM	RPS-9 Rückwärtsprimer	
ad 20 µl	MilliQ H <sub>2</sub> O	

**Tabelle 3.3: PCR-Programm der semiquantitativen PCR.**

Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]	
95	10:00	
95	00:45	<b>30 Zyklen</b>
58	00:45	
72	01:00	
72	10:00	

Zur Visualisierung wurde das PCR-Produkt auf ein 1 %iges Agarose-Gel aus Biozym LE Agarose, TBE-Puffer und Ethidiumbromid aufgetragen.

Zur relativen Quantifizierung der Expressionsstärken verschiedener Gene wurde anschließend auf die Methode der quantitativen Real-Time PCR (RT-qPCR) zurückgegriffen. Auf Basis der semi-quantitativen PCR wurde die einzusetzende cDNA Templatmenge für alle Proben angeglichen. Die Proben wurden in Duplikaten eingesetzt. Für die Quantifizierung der jeweils untersuchten Gene wurden sowohl für das Haushaltsgen RPS-9 als auch für die entsprechenden Zielgene Standardgeraden in die Analyse miteinbezogen. Die qPCR wurde in einem 7500 Fast Real-Time System durchgeführt und mithilfe der „7500 Fast Real-Time System“ Software analysiert (beide Applied Biosystems, Darmstadt). Der RT-qPCR-Reaktionsansatz sowie das Programm sind im Folgenden aufgeführt:

Reaktionsansatz: 5 µl cDNA-Template  
 5 µl Primer-Mix: je 50 - 300 nM Vorwärts- und Rückwärtsprimer  
 10 µl *Fast SYBR Green* MasterMix (Life Technologies,  
 Darmstadt)

Tabelle 3.4: Programm der RT-qPCR.

Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]	
95	10:00	
95	00:15	<b>40 Zyklen</b>
58	00:30	
72	00:30	
95	00:15	<b>Dissoziationskurve</b>
60	01:00	
95	00:15	
60	00:15	

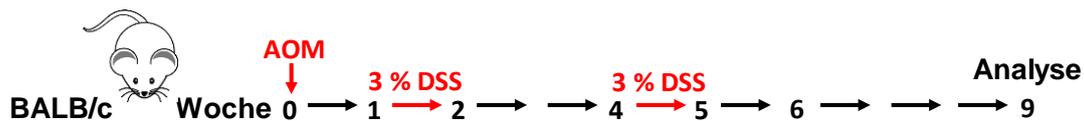
Die relative Expressionsstärke wird aus dem Quotienten aus dem Wert des entsprechenden Zielgens und dem Wert des Haushaltgens RPS9 gebildet.

### 3.2.2 Tierexperimentelle Methoden

#### 3.2.2.1 Das AOM/DSS-Mausmodell

Das AOM/DSS-Mausmodell wurde genutzt, um die Entstehung und Progression von CAC zu untersuchen. Unter den zahlreichen zur Verfügung stehenden CAC-Mausmodellen ist das AOM/DSS-Modell am besten untersucht. Die Tumore ähneln molekulargenetisch sowie histopathologisch den humanen CRC von Patienten mit CED (Snider et al., 2016).

In Woche 0 wurde weiblichen BALB/c Mäusen AOM in einer Dosis von 12,5 mg/kg Körpergewicht (KG) in 200 µl PBS intraperitoneal appliziert. Zur chemischen Induktion einer Kolitis folgte in Woche 1 der erste Zyklus DSS. In einem zweiten Zyklus wurde die DSS-Gabe in Woche 4 wiederholt. DSS wurde 3 %ig für 2-6 Tage ins Trinkwasser gegeben.



**Abbildung 3.1: AOM/DSS-Protokoll.** Nach intraperitonealer Injektion von AOM erhielten die Mäuse zwei Zyklen von mit DSS-supplementiertem Trinkwasser zur Induktion von CAC.

Die als Ktrl bezeichneten Kontrolltiere erhielten weder AOM noch DSS. Sie entwickelten im Gegensatz zu den als CAC gekennzeichneten Tiere keine Kolitis und keine CRC. Es handelt sich bei den Ktrl somit um gesunde Kontrolltiere.

### 3.2.2.2 *Behandlung von Mäusen mit einem TLR4-Inhibitor*

Zur Blockade des TLR4-Signalwegs wurde BALB/c Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten während des AOM/DSS-Protokolls der TLR4-Inhibitor TAK-242 (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) injiziert. TAK-242 bindet an Cys 747 an der intrazellulären Domäne von TLR4 und verhindert so die Bindung der Adaptormoleküle TIRAP und TRAM an TLR4. Die Signaltransduktion ist dadurch unterbrochen (Matsunaga et al., 2011).

TAK-242 wurde in DMSO gelöst und mit PBS verdünnt. Die Applikation fand 3-mal wöchentlich in einer Dosis von 3 mg/kg KG intravenös (i.v.) oder intraperitoneal (i.p.) statt.

### 3.2.2.3 *Disease Activity Index*

Zur klinischen Quantifizierung der Entzündungsaktivität im Darm während der DSS-Gabe wurde der *Disease Activity Index* (DAI) verwendet. Als Kriterien dienen ihm der relative Gewichtsverlust, die Stuhlkonsistenz und die Schwere intestinaler Blutungen. Für jedes Kriterium werden wie in Tabelle 2.5 dargestellt jeweils 0 bis 4 Punkte vergeben und daraus eine Summe gebildet. Der DAI nimmt Werte zwischen 0 und 12 an.

**Tabelle 3.5: Disease Activity Index (DAI):** Der DAI dient der Quantifizierung der DSS-induzierten Kolitis. Es wird die Summe aus den Punktwerten für Gewichtsverlust, Stuhlkonsistenz und rektale Blutungen gebildet.

Punktwert	Gewichtsverlust	Stuhlkonsistenz	Rektale Blutungen
0	< 1 %	normal	kein Blut
1	1-5 %		wenig Blut im Stuhl
2	5-10 %	sehr weich	viel Blut im Stuhl
3	10-20 %		Blut am Anus

4	>20 %	Diarrhoe	Blut perianal
---	-------	----------	---------------

(modifiziert nach Hidalgo-Cantabrana et al., 2016)

### 3.2.2.4 Endoskopie und Tumor-Scoring

Zur Feststellung der Anzahl und der Größe der Tumore wurden in Woche 6 und Woche 9 Koloskopien durchgeführt. Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 100 mg Ketamin pro kg Körpergewicht und 5 mg Xylazin pro kg Körpergewicht verdünnt in 100 µl isotonischer NaCl-Lösung narkotisiert. Für die Endoskopie wurde ein Endoskop von Karl Storz (Tuttlingen) verwendet. Das Endoskop wurde mit Ethanol und Wasser gereinigt und desinfiziert. Die Endoskopie fand unter konstantem Luftstrom bis zur ersten Kolonflexur statt.

Entsprechend der Größe der Tumore wurde jedem Tumor ein Tumorgrad zugeteilt. Die Klassifizierung der Tumorgrade ist in Tabelle 9 dargestellt. Aus der Anzahl der Tumore und den Tumorgraden wurde durch Addition der Tumorgrade ein Tumorscore gebildet.

**Tabelle 3.6: Klassifizierung der Tumore.** Die Einteilung erfolgt entsprechend der Größe eines einzelnen Tumors in 5 Grade.

Tumorgrad	Größe des Tumors
Grad 1	sehr klein, aber makroskopisch detektierbar
Grad 2	maximal ein Achtel des Kolonumfangs
Grad 3	maximal ein Viertel des Kolonumfangs
Grad 4	maximal die Hälfte des Kolonumfangs
Grad 5	über die Hälfte des Kolonumfangs

(modifiziert nach Becker et al., 2005)

### 3.2.2.5 Organentnahme

Die Mäuse wurden durch eine zervikale Dislokation getötet. Die benötigten Organe wurden entnommen und in PBS auf Eis zwischengelagert. Es wurden die Milz, mesenteriale Lymphknoten und das Kolon entnommen.

## 3.2.3 Zellbiologische Methoden

### 3.2.3.1 Gewinnung von Einzelzellsuspensionen

*Lamina Propria Mononukleäre Zellen (LPMZ) und Lamina propria Lymphozyten (LPL)*

Für die Gewinnung von Immunzellen aus der Lamina propria wurde das Kolon mit PBS gespült, longitudinal aufgetrennt, in etwa 1 cm große Stücke zerkleinert. Die Darmstücke

wurden in 30 ml PBS/EDTA zweimal für 10 Minuten bei 37 °C und unter Rühren bei 280 rpm im Brutschrank inkubiert. Die Überstände wurden jeweils dekantiert. In zwei weiteren Rührschritten wurde das Kolon zweimal in RPMI/FCS/EGTA/MgCl<sub>2</sub> aufgenommen und für je 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach dem Vortexen wurde die Suspension mit den Darmstücken durch ein 100 µm Zellsieb (BD Bioscience, Heidelberg) filtriert. Die Darmstücke wurden mechanisch mit einer Schere zerkleinert und durch 100 Unit/ml Collagenase IV aus *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in RPMI/FCS über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37 °C unter Rühren verdaut.

Nach Ende des Collagenase Verdaus wurde die Zellsuspension durch ein 40 µm Zellsieb (BD Biosciences, Heidelberg) filtriert und mit FACS gewaschen. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 1200 rpm. Anschließend wurde das Zellpellet in FACS-Puffer aufgenommen und durch ein 30 µm Zellsieb (BD Biosciences, Heidelberg) filtriert.

### *Peritonealzellen*

Zur Isolierung von Peritonealzellen wurde die Bauchdecke einer Maus unter Schonung des Peritoneums eröffnet. 5 ml IMDMc-Medium und 1 ml Luft wurden in die Peritonealhöhle injiziert und die Maus geschüttelt, um die sich in der Peritonealhöhle befindlichen Zellen in Suspension zu nehmen. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig mit einer stumpfen Pipette abgenommen und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in IMDMc-Medium resuspendiert und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Separation der nicht-adhären Zellen wurde nach 60 min der Überstand abgetragen. Von den adhären Peritonealzellen wurden 10<sup>6</sup>/well in Kultur genommen.

### **3.2.3.2 Bestimmung absoluter Zellzahlen**

Die Zellsuspensionen wurden zur Abgrenzung avitaler Zellen 1:10 in Trypanblau verdünnt. In einer Neubauer-Zählkammer erfolgte mikroskopisch die Bestimmung der Zellzahl pro Großquadrat als Durchschnitt von zwei bis vier ausgezählten Großquadraten. Die Berechnung der Gesamtzellzahl erfolgte nach der Formel: Zellzahl pro Großquadrat \* Kammerfaktor 10<sup>4</sup> \* Verdünnungsfaktor \* Volumen der Zellsuspension [ml]. Dabei ergibt sich der Kammerfaktor aus der Fläche (1,0 mm<sup>2</sup>), der Höhe (0,1 mm) sowie dem Volumen (0,1 mm<sup>3</sup> = 10<sup>4</sup> ml) des Großquadrats.

### 3.2.3.3 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie wurden Zellen anhand ihrer biophysikalischen Eigenschaften sowie ihrer Expression von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Molekülen wie Proteinen und Zytokinen charakterisiert. Die Zellen wurden hierzu einzeln an einem Laser vorbeigeführt und das gebrochene Licht von einem Detektor aufgefangen. Die Vorwärtsstreuung (engl. *forward scatter*, FCS) gab Aufschluss über das Zellvolumen, während das Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC) die Zellen im Hinblick auf ihre Granularität, Größe und Struktur des Zellkerns charakterisierte. Für die Analyse der Expressionseigenschaften wurden fluorochromgekoppelte Antikörper verwendet und für die Färbung in verschiedenen Konzentrationen in FACS-Puffer angesetzt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde zusätzlich der lebend/tot-Farbstoff 7AAD (eBioscience, San Diego, USA) im Verhältnis 1:40 in die Antikörperlösung gegeben.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurde ein FACS LSR II zusammen mit der FACS Diva Software (BD Biosciences, Heidelberg) genutzt.

#### *Oberflächenfärbung*

Pro Well wurden  $1-2 \times 10^6$  in Suspension befindliche Zellen in einer 96-Well-Rundbodenplatte für 5 Minuten bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. 100 µl der Färbelösung bestehend aus einem Antikörper in dessen spezifischer Verdünnung in FACS-Puffer wurden für 10 Minuten im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen und nach Zentrifugation in 150 µl FACS-Puffer aufgenommen.

#### *Intrazelluläre Färbung von Foxp3 und Granzym B*

Nach der Oberflächenfärbung wurden die Zellen durch eine 30-minütige Inkubation in Fixation/Permeabilisierungskonzentrat und -diluent (eBioscience, San Diego, USA) im Dunkeln bei 4 °C (Foxp3) bzw. Raumtemperatur (Granzym B) fixiert. Zur Färbung wurden die Antikörper in Permeabilisierungspuffer (eBioscience, San Diego, USA) verdünnt und die Zellen wurden mit der Färbelösung bei 4 °C (Foxp3) bzw. Raumtemperatur (Granzym B) im Dunkeln 30 Minuten inkubiert. Nach einem Waschschriff mit 100 µl Permeabilisierungspuffer wurde das Zellpellet in FACS-Puffer aufgenommen.

#### **3.2.3.4 Bestimmung sezernierter Zytokine**

Kolonbiopsien mit einem Gewicht von etwa 15 mg wurden für 6 Stunden in einer 48-Well Platte in 300 µl IMDMc-Medium gegeben und die sezernierten Zytokine und Chemokine im konditionierten Medium gemessen.

Dies geschah über ein Verfahren, bei welchem die Zielmoleküle, die Zytokine und Chemokine, durch Antikörper auf Mikrosphärenpopulationen (*beads*) spezifisch gebunden wurden. Die *beads* sind intern mit präzisen Anteilen von roten und infraroten Fluorophoren gefärbt. Die unterschiedlichen Anteile der roten und infraroten Fluorophore ergeben Mikrosphären mit einzigartiger spektraler Signatur, welche vom Detektionssystem identifiziert wird. Die Konjugation eines bestimmten Antikörpers mit einem bestimmten *bead* ermöglicht die Detektion und Quantifizierung mehrerer Analyten zeitgleich.

Das Procarta *Cytokine Assay Kit* (Panomics, Fremont, USA) wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die Messungen wurden mit der Luminex IS Software (Luminex Corporation, Austin, USA) durchgeführt.

#### **3.2.4 Statistische Analysen**

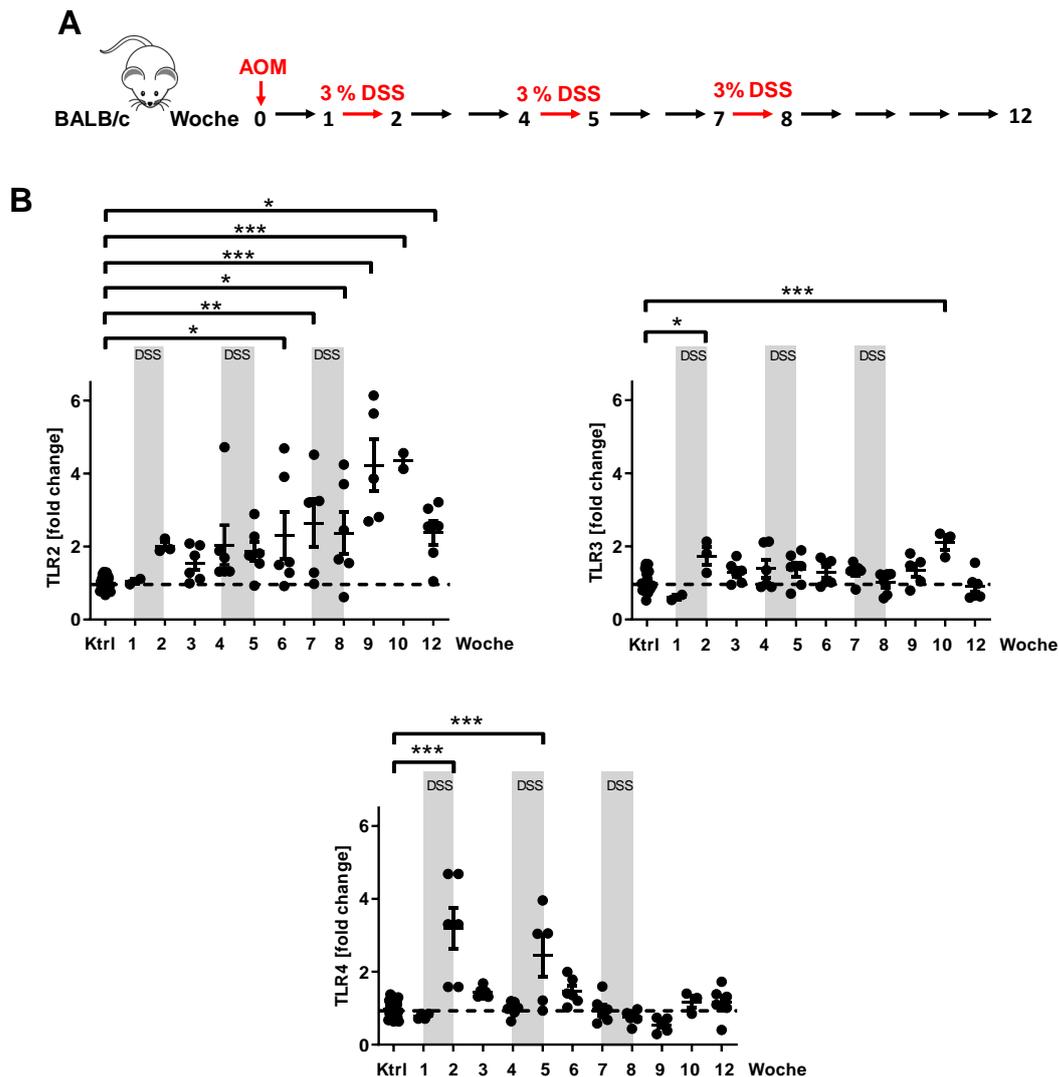
Alle statistischen Analysen wurden mithilfe des Programms Graphpad Prism (Version 8.0, GraphPad Software, San Diego, California) durchgeführt. Für die Überprüfung der Signifikanzen wurde, wenn nicht anders angegeben, der One-Way-Anova Test mit anschließender Tukey-Korrektur durchgeführt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## **4 ERGEBNISSE**

Das Mikrobiom besitzt einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorgenese. Ein direktes Bindeglied zwischen dem intestinalen Epithel bzw. epithelialen Tumorzellen und kommensalen Bakterien stellen Rezeptoren wie TLRs dar. Im Kolon werden unter Homöostase vor allem TLR2, TLR3, TLR4 und TLR5 exprimiert (Furrie et al., 2005; Price et al., 2018). Im Darm von CED Patienten zeigte sich, dass TLRs bei akuter Entzündung differenziell reguliert werden. Dabei wird insbesondere TLR3 bei MC in intestinalen Epithelzellen herunterreguliert und TLR4 bei MC und CU hochreguliert (Cario and Podolsky, 2000). Darüber hinaus wurde für die TLR4 Expression im Darmgewebe von CRC Patienten eine positive Korrelation mit einer Verschlechterung der Prognose nachgewiesen (Wang et al., 2010). Ziel dieser Arbeit ist es zu prüfen, inwieweit TLR4-abhängige Signalwege für die Entzündungsaktivität und die Entwicklung von CAC verantwortlich sind.

### **4.1 Expressionsmuster von TLRs im AOM/DSS-Modell**

Das Expressionsmuster von TLR4 wurde während der durch AOM/DSS-induzierten Inflammation und Tumorgenese im Mausmodell erhoben und mit dem Expressionsmuster anderer im Darm stark exprimierter TLRs verglichen. Hierzu wurden in Woche 1 - 12 des AOM/DSS-Modells Kolonbiopsien entnommen (Abb. 3.1 A). Anschließend wurde die Expression von TLR2, TLR3 und TLR4 mittels RT-qPCR untersucht (Abb. 3.2 B).



**Abbildung 4.1: Expressionsprofil von TLR2, TLR3 und TLR4 im Kolon im Verlauf des AOM/DSS-Modells.** A) BALB/c Mäuse erhielten in Woche 0 AOM i.p. und zur Induktion von CAC drei Zyklen 3%iges DSS über das Trinkwasser in Woche 1, 4 und 7. Die Kontrolltiere (Ktrl) erhielten weder AOM noch DSS. B) RNA wurde aus Kolonbiopsien isoliert und die Expression von TLR2, TLR3 und TLR4 wurde mittels RT-qPCR analysiert. Es ist die zur Expression des *housekeeping* Gens RPS9 relativierte Expression als Abweichung von den Kontrollen in Form eines *fold change* angegeben. Neben den Einzelwerten ist der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (engl. *standard error of the mean*, SEM) abgebildet. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten mit  $n=25$  Kontrolltieren und  $n=2-6$  CAC Tieren pro Woche. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *one-way* ANOVA und Tukey post-hoc Test (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

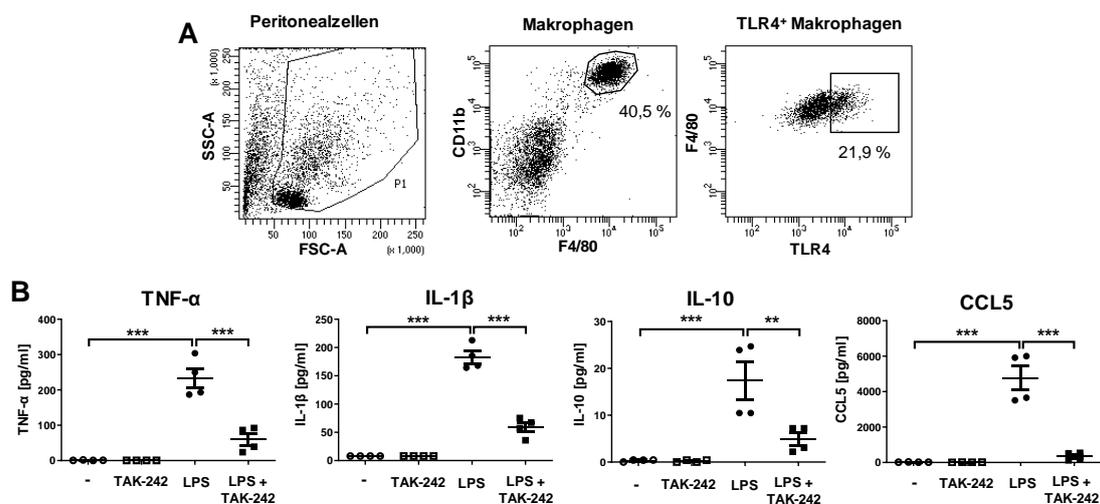
Die Expression von TLR2 war während der DSS-Gabe unverändert und wurde im Rahmen der Tumorprogression ab Woche 6 zunehmend hochreguliert. TLR3 wurde in Woche 2 und Woche 10 auf niedrigem Expressionsniveau hochreguliert. Das Expressionsprofil von TLR3 ließ dabei keinen Zusammenhang zur DSS-Gabe oder zum Tumorwachstum erkennen. Die TLR4-Expression war nach DSS-Gabe in den Wochen 2 und 5 im Vergleich zu den gesunden Kontrollen signifikant erhöht. Die Hochregulierung

ereignete sich somit in den ersten beiden Entzündungsphasen. Die Hochregulierung blieb während des dritten Zyklus DSS sowie im Rahmen der Tumorprogression vollständig aus.

## 4.2 *In vitro* Inhibition von TLR4 auf Peritonealmakrophagen

Die Expressionsanalysen zeigten eine verstärkte Expression von TLR4 im Kolon während der DSS-Gabe bzw. Entzündungsphasen. Daher sollte im Folgenden getestet werden, ob die Inhibierung des TLR4-Signalweges während der Entzündungsphasen einen Ansatzpunkt für die Beeinflussung der Tumorinitiation und Progression darstellen könnte. Hierfür wurde der TLR4-Signalweg durch TAK-242 inhibiert. TAK-242 ist ein kleines Molekül, das selektiv und effizient die Signalkaskade von TLR4 an der intrazellulären Domäne des Rezeptors unterbricht (Matsunaga et al., 2011). Die Wirkung und die Wirksamkeit von TAK-242 wurden zunächst *in vitro* an Peritonealmakrophagen untersucht, da Makrophagen in hohem Maße TLR4 exprimieren (Zarembler and Godowski, 2002) und Peritonealzellen einen hohen Anteil naiver gewebeständiger Makrophagen enthalten (Ray and Dittel, 2010).

Dazu wurden Peritonealzellen aus BALB/c Mäusen isoliert und in Kultur genommen. Mittels der Durchflusszytometrie wurden die Peritonealzellen auf den Anteil an Makrophagen und deren TLR4-Expression untersucht. In der Zellkultur erfolgte die Stimulation von TLR4 durch LPS und eine Inhibition mittels TAK-242.



**Abbildung 4.2: Stimulation und Inhibition von TLR4 auf Peritonealmakrophagen.** Peritonealzellen wurden aus einer naiven BALB/c Maus isoliert und mittels Durchflusszytometrie wurde die Expression von TLR4 auf CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Makrophagen bestimmt. A) Exemplarische Darstellung repräsentativer Dotplots der Gating-Strategie. B)

Peritonealzellen wurden in je 4 Wells pro Bedingung kultiviert. Die adhärenz Zellen wurden mit 1  $\mu$ M TLR4-Inhibitor TAK-242 1 h prä-inkubiert und über Nacht mit 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Die Konzentration der Zytokine wurde mittels Luminex-Technologie in den Zellüberständen bestimmt. Neben den Einzelwerten ist der Mittelwert  $\pm$  SEM eines Experiments dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *one-way* ANOVA und Tukey post-hoc Test (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Durchflusszytometrisch zeigte sich ein Großteil der Peritonealzellen als CD11b und F4/80 positive Makrophagen, von denen etwa 22 % TLR4 exprimierten (Abb. 3.2 A) und sich daher für einen TLR4-Stimulations-/Inhibitionsassay eigneten.

Die Stimulation der Peritonealzellen durch LPS führte zu einer starken Sekretion aller gemessenen Chemokine und Zytokine. Neben den in Abbildung 3.2 B abgebildeten Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 sowie des Chemokins CCL5 wurde auch eine erhöhte Konzentration der Zytokine IL-6 und IL-17A gemessen. Die Sekretion aller Zytokine bzw. Chemokine konnte durch den TLR4-Inhibitor TAK-242 signifikant gesenkt werden (Abb. 3.2 B).

Diese Ergebnisse verdeutlichen die primär proinflammatorische Wirkung TLR4-abhängiger Signalwege. Die TLR4-abhängige Stimulation von IL-10 deutet hingegen auf die immunmodulierende Wirkung des Rezeptors hin. Durch die Senkung der Zytokinkonzentrationen konnte die grundsätzliche Wirksamkeit des Inhibitors, welcher in den folgenden *in vivo* Experimenten eingesetzt wurde, gezeigt werden.

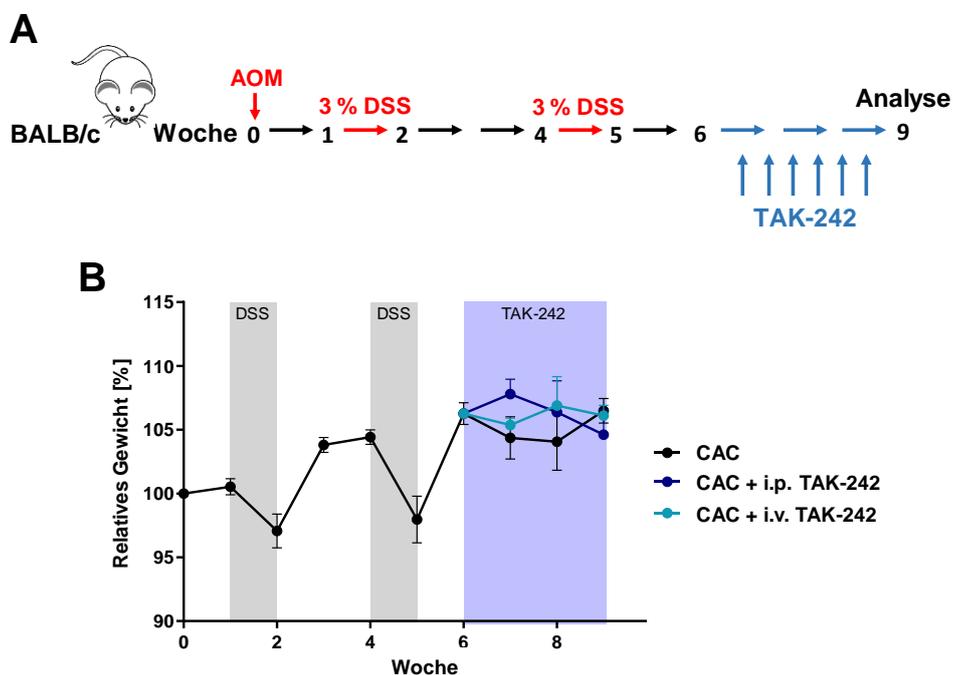
### **4.3 Inhibition des TLR4-Signalweges im murinen AOM/DSS-Modell**

In diesen *in vivo* Experimenten wurde im murinen AOM/DSS-Modell die funktionelle Wirkung von TLR4 durch Experimente mit dem TLR4-Inhibitor TAK-242 untersucht. Die Applikation von TAK-242 zur Inhibition von TLR4 fand dabei zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten des AOM/DSS-Modells statt. In einem Experiment wurde TAK-242 von Woche 6 – 9 appliziert und somit zu dem Zeitpunkt, zu dem sich eine antibiotische Intervention als effektive Maßnahme zur Tumorreduktion erwiesen hatte. In einem zweiten Ansatz erhielten die Mäuse TAK-242 während der DSS-Gabe und somit in den aktiven Entzündungsphasen, in denen die TLR4-Expressionsanalysen eine starke TLR4-Expression gezeigt hatten. Da bisher unklar war, ob eine intraperitoneale (i.p.) oder eine intravenöse (i.v.) Applikation des Inhibitors effektiver ist, wurden beide Injektionsformen angewandt und miteinander verglichen.

Da in dem verwendeten Mausmodell die Tumorentstehung bereits in Woche 6 stattfindet, wurde auf den dritten DSS-Zyklus verzichtet und die Analysen erfolgten in Woche 9.

#### 4.3.1 Späte TLR4-Inhibition

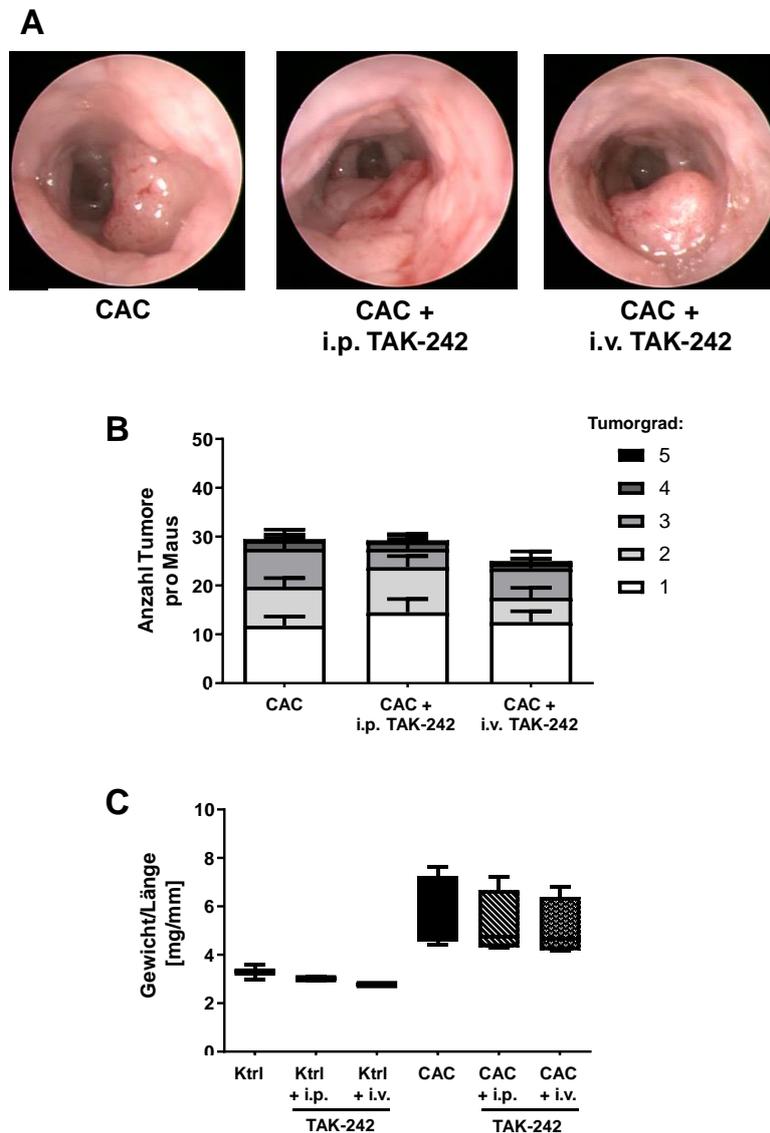
Für die späte Inhibition der TLR4-Signalkaskade erhielten BALB/c Mäuse AOM und DSS. In Woche 6 wurde eine Koloskopie zur Parallelisierung der Versuchsgruppen durchgeführt. Die Behandlung mit TAK-242 erfolgte dreimal wöchentlich i.p. oder i.v. ab Woche 6 (Abb. 3.3 A). Der Gewichtsverlauf und der Gesundheitszustand der Tiere wurden wöchentlich beobachtet und protokolliert.



**Abbildung 4.3: Gewichtsverlauf im AOM/DSS-Modell mit später TLR4-Inhibition.** A) BALB/c Mäuse erhielten in Woche 0 AOM und in Woche 1 und 4 jeweils einen Zyklus 3%iges DSS (CAC). In den Wochen 6 – 9 wurde den Mäusen i.p. bzw. i.v. TAK-242 dreimal pro Woche in einer Dosis von 3 mg/kg KG injiziert. B) Relatives Gewicht der Mäuse im AOM/DSS-Modell im Vergleich zum Ausgangsgewicht in Woche 0. Abgebildet ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Ergebnisse stammen aus einem Experiment mit  $n=4$  CAC Tieren.

Im AOM/DSS-Modell verloren Mäuse während der DSS-Gabe deutlich an Gewicht. Nach Beendigung der DSS-Gabe erholten sich die Tiere und nahmen wieder an Gewicht zu. Die TAK-242 Behandlung in den Wochen 6 – 9 hatte keinen wesentlichen Einfluss auf den Gewichtsverlauf (Abb. 3.3 B).

In Woche 9 erfolgte eine Koloskopie und die Tumore wurden anhand ihrer Größe und Anzahl analysiert. Zudem wurde das Kolon entnommen und das Gewicht zur Länge ins Verhältnis gesetzt.



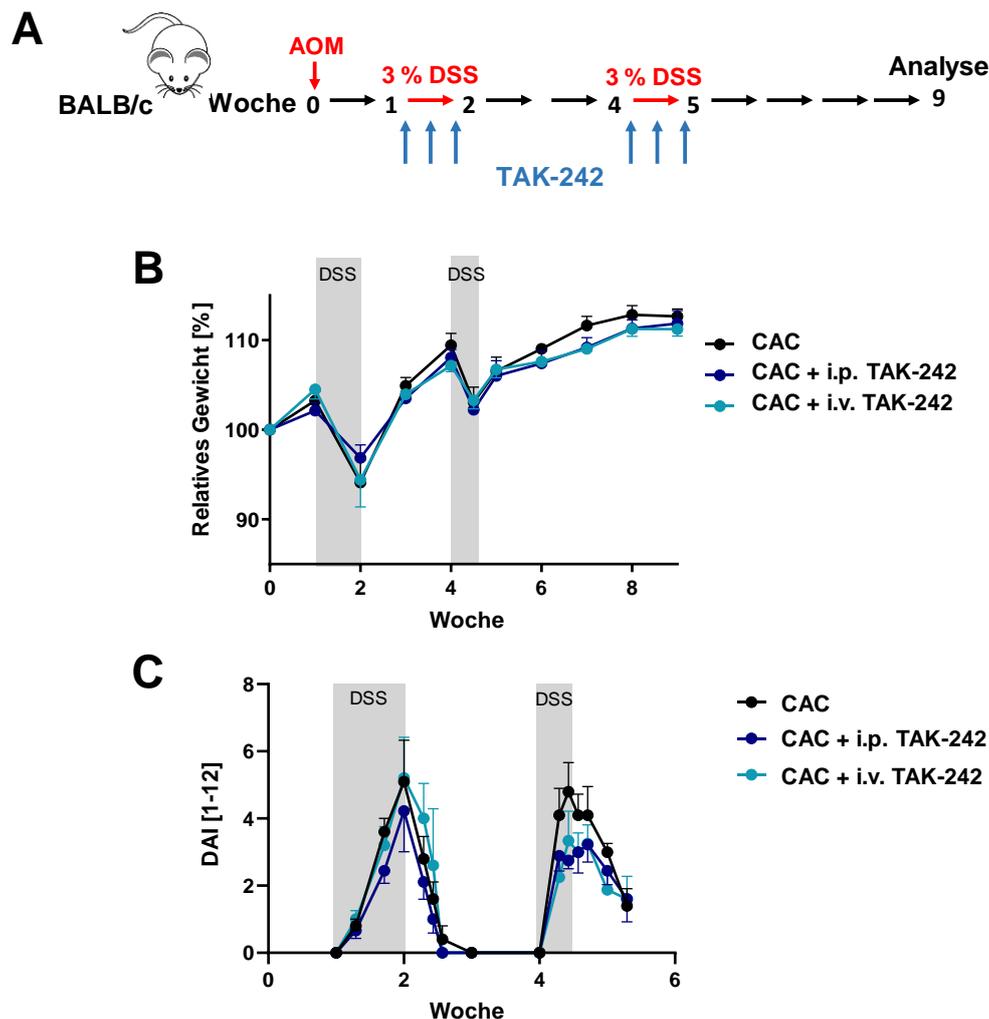
**Abbildung 4.4: Einfluss einer Inhibition von TLR4 in Woche 6 – 9 des AOM/DSS-Modells auf das Tumorwachstum.** BALB/c Mäuse wurden mit AOM/DSS behandelt, um Darmkrebs zu induzieren (CAC). In den Wochen 6 – 9 erfolgte eine i.p./i.v. Behandlung mit dem TLR4-Inhibitor TAK-242. BALB/c Mäuse ohne AOM/DSS-Behandlung dienten als Kontrollen (Ktrl). Nach 9 Wochen wurden die Mäuse koloskopiert und der Versuch beendet. A) Repräsentative Aufnahmen der Tumorentstehung im Kolon jeder Versuchsgruppe. B) Durchschnittliche Anzahl an Tumoren pro Tumorgrad und Maus als Mittelwert + SEM in Woche 9. C) Quotient aus Gewicht und Länge des Kolons vom Anus bis zum Beginn des Zäkums. Dargestellt ist ein Box-Whisker-Plot. Die Ergebnisse stammen aus einem Experiment mit n=1-2 Kontrolltieren und n=4 CAC Tieren.

Die Inhibition von TLR4 in den Wochen 6 - 9 zeigte weder auf endoskopischer Ebene noch bei der Anzahl und Größe der Tumore Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten CAC Tieren. Der Quotient aus Gewicht und Länge des Kolons ist ein Maß für pathologische, entzündliche Vorgänge und wird durch die Tumorentstehung erhöht. Die Ratio aus Gewicht und Länge des Kolons zeigte bei der späten TLR4-Inhibition keine

Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Auch die verschiedenen Applikationsformen von TAK-242 scheinen sich nicht zu unterscheiden (Abb. 3.4 A-C). Eine Veränderung des Tumorwachstums durch eine späte Inhibition von TLR4 in der Phase der Tumorprogression konnte nicht beobachtet werden. Zudem ergaben die durchflusszytometrischen Analysen der Zellzusammensetzung sowie die Bestimmung der Zytokine im Kolon keine signifikanten Unterschiede durch die Gabe des TLR4-Inhibitors bei Tieren mit CAC (Daten nicht gezeigt).

### **4.3.2 Frühe TLR4-Inhibition**

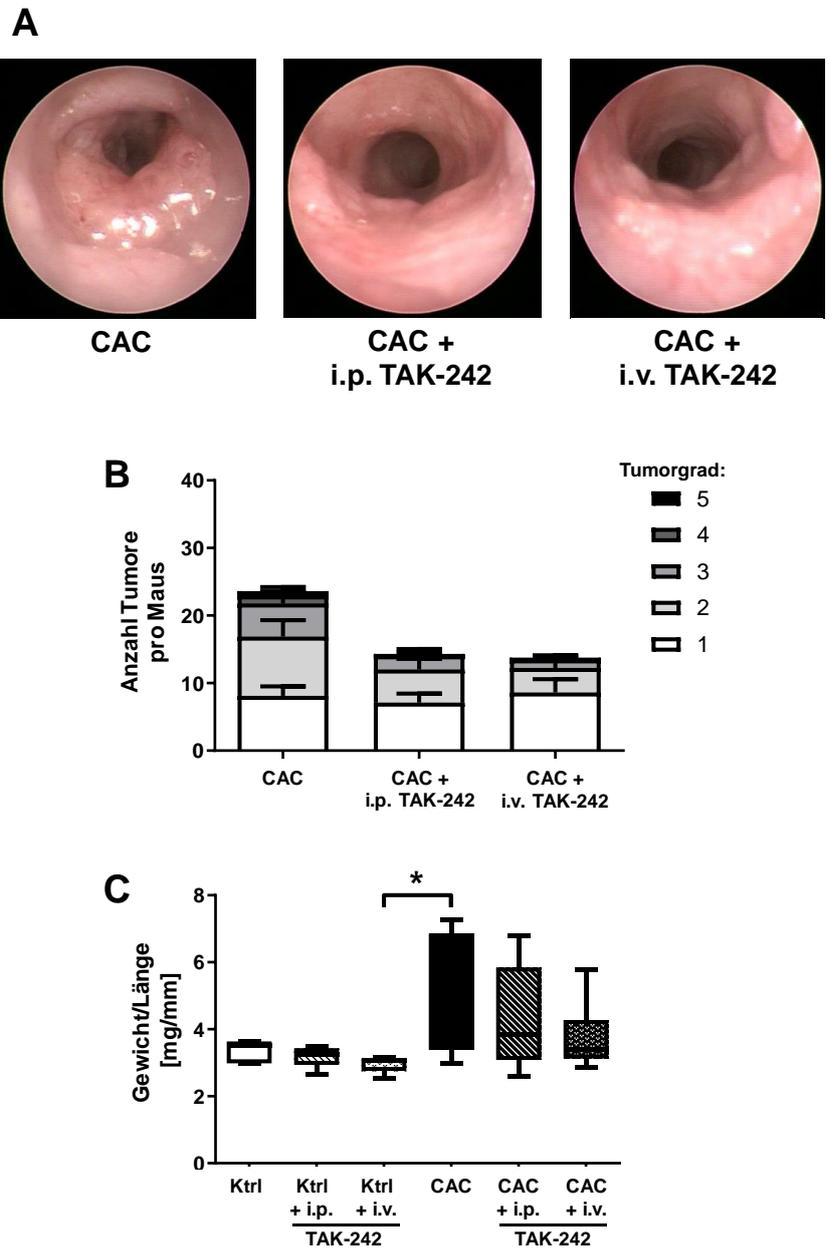
Das Expressionsmuster von TLR4 zeigte eine Hochregulierung des Rezeptors während der Entzündungsphase. Daher erfolgte die Inhibierung des TLR-Signalweges in einem zweiten Ansatz während der DSS-Gabe. Die Behandlung mit TAK-242 erfolgte während der DSS-Gabe i.p. oder i.v. (Abb. 3.5 A). Im Laufe des AOM/DSS-Modells wurde wöchentlich das Körpergewicht erhoben und der Gesamthabitus der Tiere beobachtet. Während der DSS-Zyklen wurde zusätzlich die Entzündungsaktivität mit Hilfe des DAI ermittelt.



**Abbildung 4.5: Einfluss der TAK-242 Behandlung auf die klinische Symptomatik im AOM/DSS-Modell.** A) BALB/c Mäuse erhielten in Woche 0 AOM und in Woche 1 und 4 jeweils einen Zyklus 3 %iges DSS (CAC). Von Tag 0 bis Tag 10 nach Beginn der DSS-Gabe wurde den Mäusen i.p. bzw. i.v. der TLR4-Inhibitor TAK-242 dreimal pro Woche in einer Dosis von 3 mg/kg KG injiziert. B) Das relative Gewicht der Mäuse im Vergleich zum Ausgangsgewicht in Woche 0 ist dargestellt. Abgebildet ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. C) Der Schweregrad der Entzündung wurde mittels DAI quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit  $n=8-10$  CAC Tieren.

Die Mäuse, die AOM und DSS erhielten, verloren während der DSS-Gabe deutlich an Gewicht. Nach Beendigung der DSS-Gabe erholten sich die Tiere zügig davon. Die zusätzliche TAK-242 Behandlung hatte keinen wesentlichen Einfluss auf den Gewichtsverlauf (Abb. 3.5 B). Während und nach der DSS-Gabe zeigten alle Mäuse Symptome einer Kolitis in Form einer blutigen Diarrhoe und Gewichtsverlust. Diese wurden durch den DAI quantifiziert. Tendenziell wiesen die mit TAK-242 behandelten Tiere insbesondere während des zweiten DSS-Zyklus einen geringeren DAI auf. Die Reduktion des DAI bei Mäusen mit TAK-242 Behandlung ergibt sich vor allem durch weniger Diarrhoe und rektale Blutungen (Abb. 3.5 C).

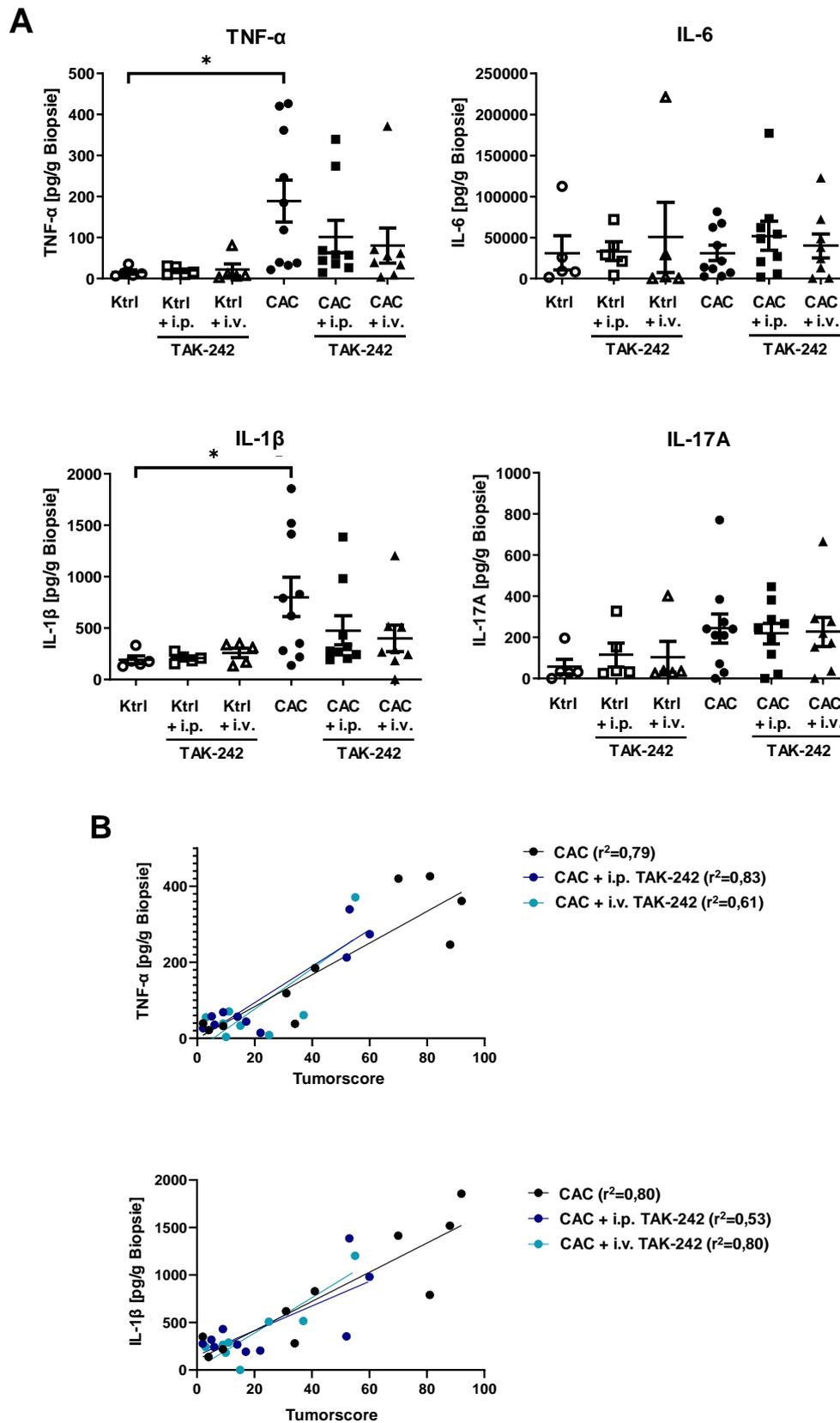
Zur Bestimmung des Tumorwachstums erfolgte in Woche 9 eine Koloskopie und die Tumore wurden anhand ihrer Größe und Anzahl analysiert. Zudem wurde das Kolon entnommen und das Gewicht zur Länge ins Verhältnis gesetzt.



**Abbildung 4.6: Einfluss der TAK-242 Behandlung auf das Tumorwachstum.** BALB/c Mäuse wurden mit AOM/DSS behandelt, um Darmkrebs zu induzieren (CAC). Während der Entzündungsphase in Woche 1 und 4 erfolgte eine i.p. bzw. i.v. Behandlung mit dem TLR4-Inhibitor TAK-242. BALB/c Mäuse ohne AOM/DSS-Behandlung dienten als Kontrollen (Ktrl). Nach 9 Wochen wurden die Mäuse koloskopiert und der Versuch beendet. A) Repräsentative Aufnahmen der Tumorentstehung im Kolon jeder Versuchsgruppe. B) Durchschnittliche Anzahl an Tumoren pro Tumorgrad und Maus als Mittelwert + SEM in Woche 9. C) Quotient aus Gewicht und Länge des Kolons vom Anus bis zum Beginn des Zäkums. Dargestellt ist ein Box-Whisker-Plot. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=5 Kontrolltieren und n=8-10 CAC Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *one-way* ANOVA und dem Tukey post-hoc Test (\* p < 0,05).

Die Inhibition des TLR4-Signalweges während der DSS-Gabe führte tendenziell zu weniger und kleineren Tumoren. Dies zeigte sich in den koloskopischen Aufnahmen und der daraus ermittelten Zahl und dem Grad von Tumoren. Die absolute Anzahl an Tumoren nahm durch die frühe TLR4-Inhibition ab und es gab im Gegensatz zu unbehandelten CAC Mäusen nur noch sehr wenige Tumore mit Tumorgrad 4 und gar keine Tumore des Tumorgrades 5. Die Ratio aus Gewicht und Länge des Kolons deutete ebenfalls eine Reduktion des Tumolvolumens durch die frühe TLR4-Inhibition an (Abb. 3.6 A-C). Zwischen der intraperitonealen und der intravenösen Applikationsform zeigten sich keine deutlichen Unterschiede. Beide Applikationsformen von TAK-242 waren in der Phase der Entzündung gleichermaßen potent, die Tumorgenese zu hemmen.

Es wurde nachfolgend untersucht, ob die *in vivo* Inhibition des TLR4-Signalweges während der DSS-Gabe nachhaltig die Zytokinspiegel beeinflusst. Hierzu wurde in Woche 9 die Konzentration von Zytokinen im Überstand kultivierter Kolonbiopsien mittels Luminex-Technologie bestimmt.

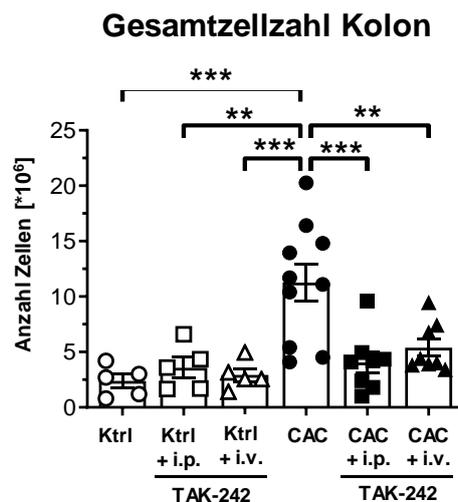


**Abbildung 4.7:** Einfluss der TAK-242 Behandlung auf die Zytokinsekretion im AOM/DSS-Modell. BALB/c Mäuse wurden mit AOM/DSS behandelt, um Darmkrebs zu induzieren (CAC). Während der Entzündungsphase in Woche 1 und 4 erfolgte eine i.p. bzw. i.v. Behandlung mit dem TLR4-Inhibitor TAK-242. BALB/c Mäuse ohne

AOM/DSS-Behandlung dienten als Kontrollen (Ktrl). In Woche 9 wurden Kolonbiopsien entnommen und für 6 h in IMDMc-Medium inkubiert. Die Zytokinkonzentrationen wurden mittels Luminex-Technologie in den Überständen gemessen. A) Masse an Zytokinen pro g Biopsie. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Zusätzlich ist der Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=5 Kontrolltieren und n=8-10 CAC Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way* ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test (\*  $p < 0,05$ ). B) Korrelation zwischen dem Tumorscore und TNF- $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  im Kolonbiopsieüberstand. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=5 Kontrolltieren und n=8-10 CAC Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfacher linearer Regression unter Angabe des Determinationskoeffizient  $r^2$ .

Die Konzentration der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  waren in den Überständen von Kolonbiopsien der Mäuse mit CAC signifikant erhöht gegenüber den Überständen von Biopsien aus gesunden Kontrolltieren. Die IL-17A-Sekretion wurde tendenziell durch die Tumorgenese erhöht. Die TLR4-Inhibition senkte tendenziell die Konzentration von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  im Überstand der Kolonbiopsien von Mäusen mit CAC. Bei der Sekretion von IL-6 zeigten sich weder durch die Tumorentstehung noch durch die TLR4-Inhibition Unterschiede in den Überständen von Kolonbiopsien (Abb. 3.7 A). Die großen Varianzen innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen spiegelten das variable Tumorstadium wider. Die Zytokinkonzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  korrelierten statistisch signifikant positiv mit dem Tumorstadium. Je höher die Tumorscores waren, desto höher waren in allen CAC-Gruppen mit und ohne TAK-242 Behandlung die Zytokinkonzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in den Überständen der Kolonbiopsien (Abb. 3.7 B).

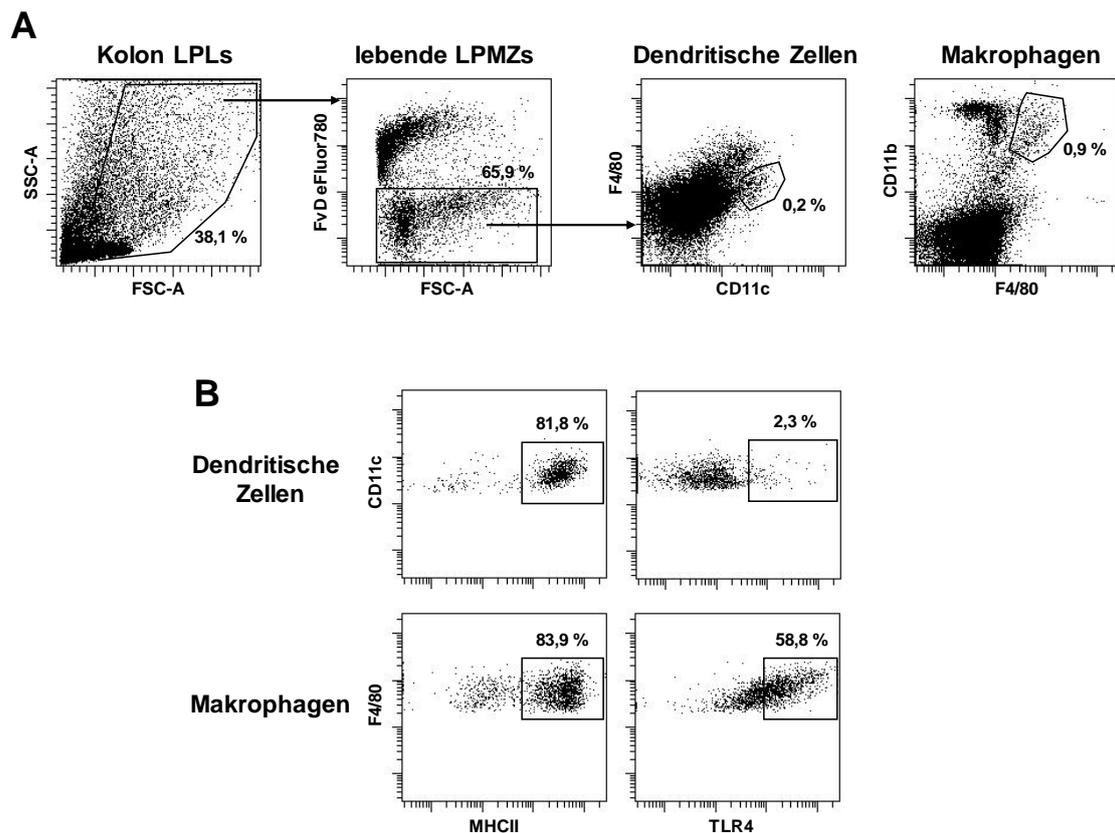
Für TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ist beschrieben, dass sie an der Initiation und dem Wachstum von Kolonkarzinomen beteiligt sind (Landskron et al., 2014; Mager et al., 2016). Zytokine werden überwiegend von Immunzellen sezerniert und stellen den wichtigsten Kommunikationsweg von Immunzellen im Hinblick auf Differenzierung, Aktivierung und Chemotaxis dar (Zhang and An, 2007). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, wie die zelluläre Zusammensetzung im Kolon sich unter CAC und durch die TLR4-Inhibition verändert. Hierzu wurden LPMZs aus Kolonbiopsien isoliert und die absolute Zellzahl bestimmt.



**Abbildung 4.8: Einfluss der Tumorentstehung und TAK-242 Behandlung auf die absolute Zellzahl im Kolon.** BALB/c Mäuse wurden mit AOM/DSS behandelt, um Darmkrebs zu induzieren (CAC). Während der Entzündungsphase in Woche 1 und 4 erfolgte eine i.p. bzw. i.v. Behandlung mit dem TLR4-Inhibitor TAK-242. BALB/c Mäuse ohne AOM/DSS-Behandlung dienten als Kontrollen (Ktrl). Nach 9 Wochen wurden die LPMZ aus dem Kolon isoliert und die absolute Zellzahl mikroskopisch bestimmt. Dargestellt ist neben den Einzelwerten einer individuellen Maus der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit  $n=5$  Kontrolltieren und  $n=8-10$  CAC Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *one-way* ANOVA mit Tukey post-hoc Test (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

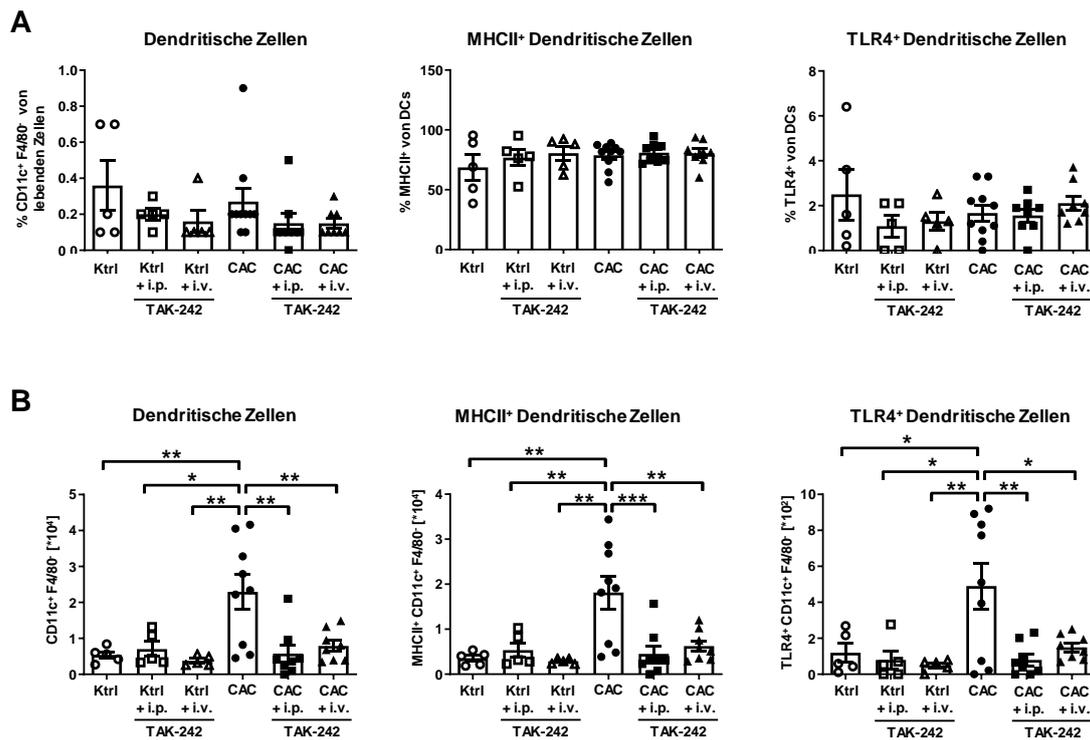
In der Gruppe der Mäuse mit CAC war die absolute Zahl an LPMZs gegenüber gesunden Kontrolltieren signifikant erhöht. Die Kolitis-assoziierte Tumorgenese führte zu einer starken Infiltration der Lamina propria durch Immunzellen. Die Inhibition von TLR4 in CAC Mäusen führte zu einer signifikanten Reduktion der absoluten Zahl an LPMZs im Kolon (Abb. 3.8).

Zur näheren Charakterisierung der Zellen, die an der Erhöhung der Zellzahl beteiligt waren, wurden die LPMZs durchflusszytometrisch analysiert. Die *Gating*-Strategie für DCs und Makrophagen zeigt Abbildung 3.9.



**Abbildung 4.9: Gating-Strategie für DCs und Makrophagen.** LPMZs wurden aus dem Darm von CAC Mäusen isoliert und mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt. Die Färbung erfolgte mit *fixable viability Dye* (FvD)-eFluor780 und Antikörpern gegen CD11c, CD11b, F4/80, MHCII und TLR4. A) Über FSC-A und SSC-A wurden die LPMZs ausgewählt, welche im Hinblick auf Größe und Granularität mononukleären Zellen entsprechen. Tote Zellen wurden mit Hilfe des lebend/tot-Farbstoffs FvD-eFluor780 identifiziert. Dendritische Zellen gelten als F4/80<sup>-</sup> und CD11c<sup>+</sup>. Makrophagen präsentieren sich als F4/80<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup>. B) Eine Charakterisierung von DCs und Makrophagen erfolgte im Hinblick auf die Expression von MHCII und TLR4. Dargestellt sind repräsentative Dotplots der Zellen aus dem Kolon einer mit AOM/DSS behandelten Maus.

Beim *Gating* der Zellen des angeborenen Immunsystems wurden im ersten Schritt über FSC-A und SSC-A LPMZs anhand ihrer Zellgröße und Granularität identifiziert. Mittels FvD wurden nekrotische und apoptotische Zellen ausgeschlossen. Unter den lebenden LPMZs wurden über F4/80, CD11b und CD11c DCs von Makrophagen unterschieden (Abb. 3.9 A). Mittels eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpers gegen MHCII und TLR4 wurde die Expression dieser beiden Rezeptoren durch DCs und Makrophagen analysiert (Abb. 3.9 B). Diese *Gating*-Strategie wurde für die Analyse aller LPMZs angewandt.

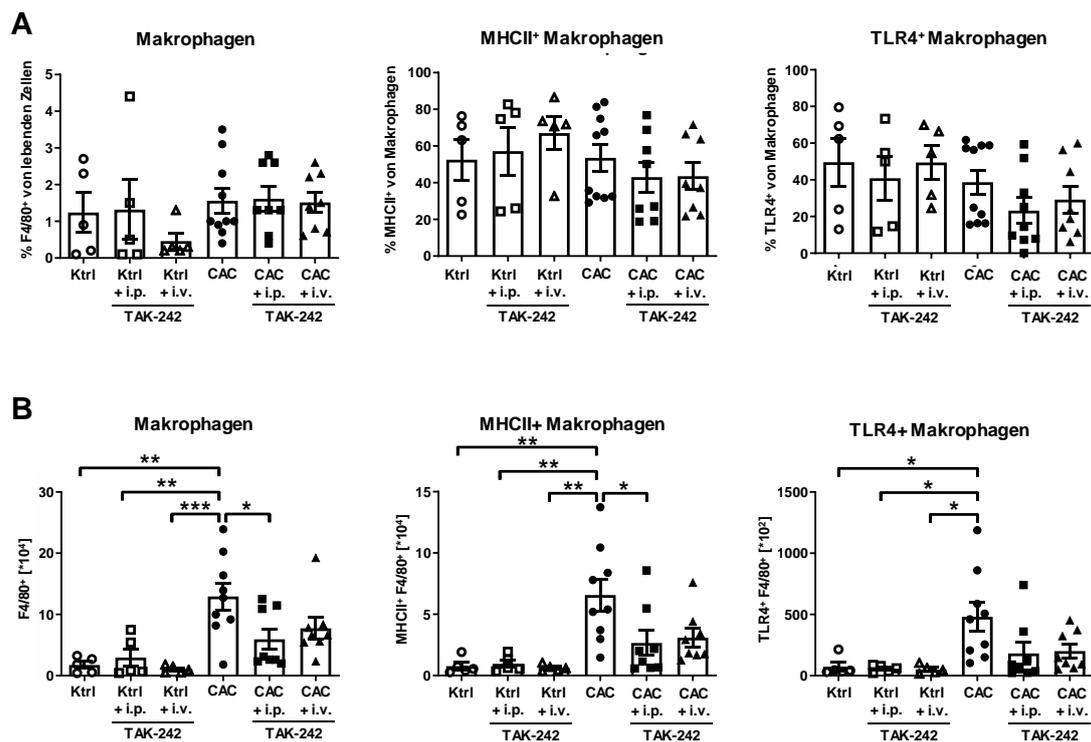


**Abbildung 4.10: Prozentualer und absoluter Anteil von DCs im Kolon von CAC Mäusen nach TLR4-Inhibition.** BALB/c Mäuse wurden mit AOM/DSS behandelt, um Darmkrebs zu induzieren (CAC). Während der Entzündungsphase in Woche 1 und 4 erfolgte eine i.p. bzw. i.v. Behandlung mit dem TLR4-Inhibitor TAK-242. BALB/c Mäuse ohne AOM/DSS-Behandlung dienten als Kontrollen (Ktrl). Nach 9 Wochen wurden LPMZs aus dem Kolon isoliert, gezählt und durchflusszytometrisch analysiert. A) Anteil der CD11c<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> DCs an allen lebenden Zellen sowie der Anteil der MHCII<sup>+</sup> bzw. TLR4<sup>+</sup> DCs. B) Absolute Anzahl DCs sowie absolute Zahl MHCII<sup>+</sup> bzw. TLR4<sup>+</sup> DCs. Neben den Einzelwerten einer individuellen Maus ist der Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=5 Kontrolltieren und n=8-10 CAC Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *one-way* ANOVA mit Tukey post-hoc Test (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

Der prozentuale Anteil an DCs im Kolon änderte sich weder durch die Tumorgenese noch durch die TLR4-Inhibition. Die Expression von MHCII und TLR4 blieb ebenso konstant (Abb. 3.10 A). Die absolute Zahl an DCs zeigte sich bei Mäusen mit CAC deutlich erhöht. Zudem gab es einen absoluten Anstieg MHCII<sup>+</sup> sowie TLR4<sup>+</sup> DCs. Nach TAK-242 Behandlung von CAC Mäusen zeigte sich eine signifikante Reduktion in der absoluten Zahl an DCs. Auch die absolute Zahl MHCII<sup>+</sup> sowie TLR4<sup>+</sup> DCs war nach der Gabe von TAK-242 signifikant verringert (Abb. 3.10 B).

Dies indiziert eine Infiltration der Lamina propria im Rahmen der Tumorgenese mit Immunzellen, darunter MHCII<sup>+</sup> TLR4<sup>+</sup> DCs.

Als weitere Zellen des angeborenen Immunsystems wurden Makrophagen durchflusszytometrisch analysiert.

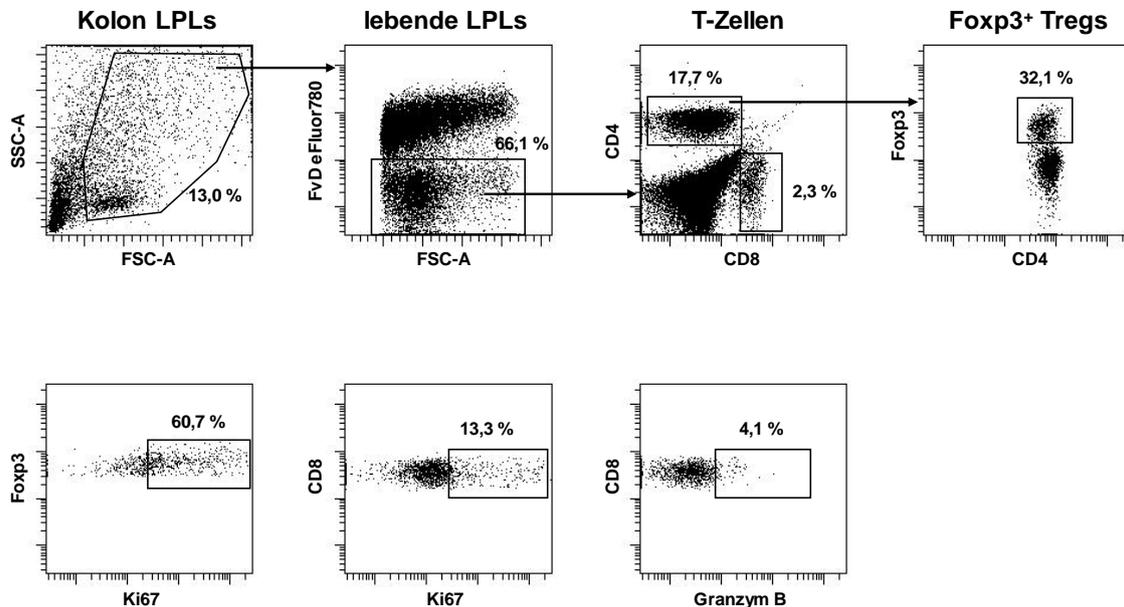


**Abbildung 4.11: Prozentualer und absoluter Anteil an Makrophagen im Kolon von CAC Mäusen nach TLR4-Inhibition.** BALB/c Mäuse wurden mit AOM/DSS behandelt, um Darmkrebs zu induzieren (CAC). Während der Entzündungsphase in Woche 1 und 4 erfolgte eine i.p. bzw. i.v. Behandlung mit dem TLR4-Inhibitor TAK-242. BALB/c Mäuse ohne AOM/DSS-Behandlung dienten als Kontrollen (Ktrl). Nach 9 Wochen wurden LPMZs aus dem Kolon isoliert, gezählt und durchflusszytometrisch analysiert A) Anteil von F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Makrophagen an allen lebenden Zellen. Der Prozentsatz MHCII<sup>+</sup> bzw. TLR4<sup>+</sup> Makrophagen wurde bestimmt. B) Absolute Anzahl Makrophagen sowie absolute Zahl MHCII<sup>+</sup> bzw. TLR4<sup>+</sup> Makrophagen. Abgebildet sind die Einzelwerte einer individuellen Maus sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=5 Kontrolltieren und n=8-10 CAC Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *one-way* ANOVA mit anschließendem Tukey post-hoc Test (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

Der prozentuale Anteil an Makrophagen an allen lebenden Zellen änderte sich weder durch CAC noch durch die Gabe von TAK-242. Der prozentuale Anteil MHCII und TLR4 exprimierender Makrophagen an allen Makrophagen blieb ebenfalls unverändert (Abb. 3.11 A). Im Vergleich zu gesunden Kontrollmäusen war die absolute Anzahl an Makrophagen in Mäusen mit CAC signifikant erhöht. Nach TLR4-Inhibition in der frühen Phase des AOM/DSS-Modells war die absolute Anzahl an Makrophagen signifikant reduziert. Folglich zeigte sich auch eine verringerte Zahl MHCII<sup>+</sup> und TLR4<sup>+</sup> Makrophagen (Abb. 3.11 B).

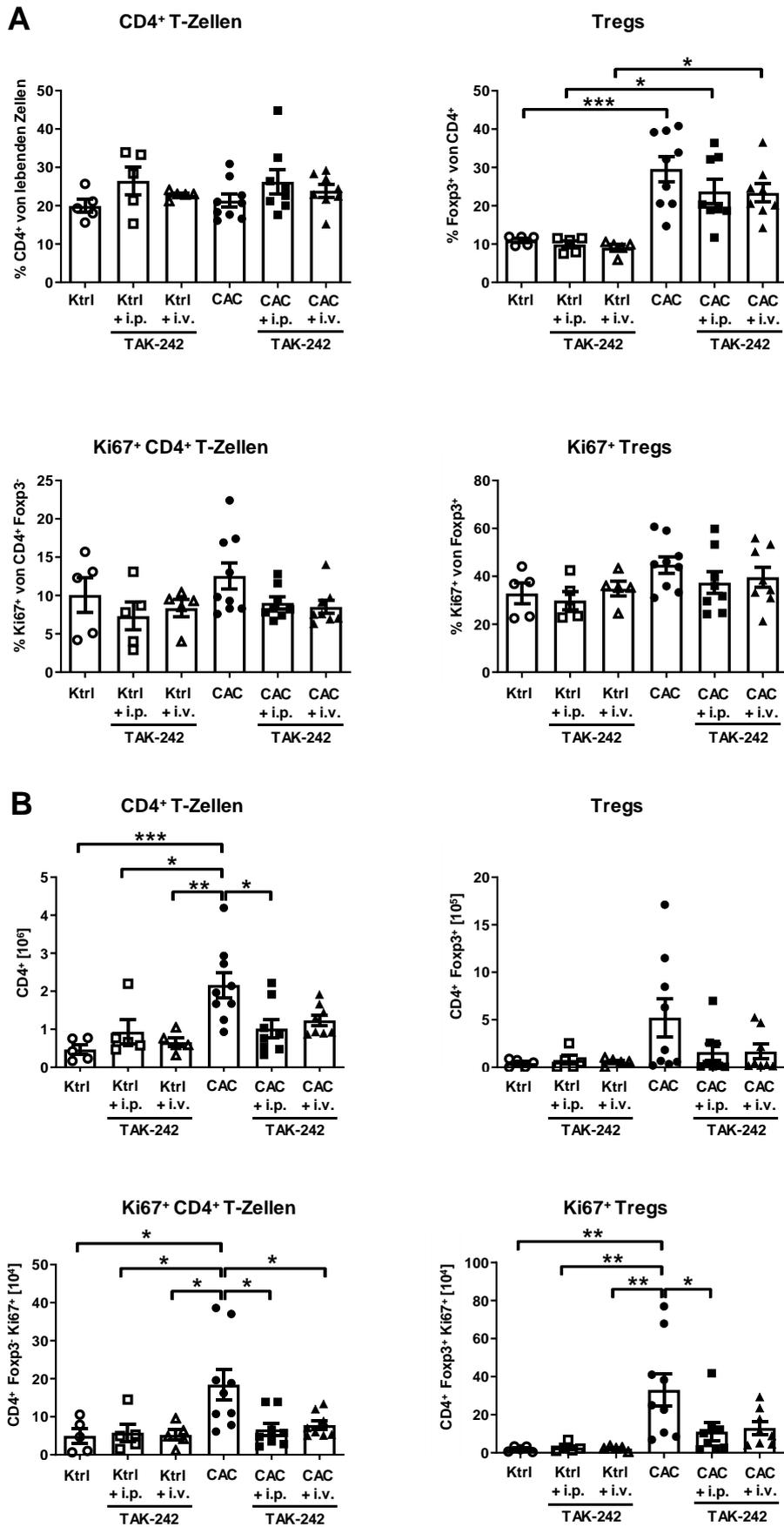
Dies deutet auf eine Infiltration der Lamina propria durch MHCII<sup>+</sup> TLR4<sup>+</sup> Makrophagen im Rahmen der Tumorgenese hin. Die Behandlung der Versuchstiere mit TAK-242 inhibierte diese Infiltration signifikant.

Mittels Durchflusszytometrie sollten LPMZs im Hinblick auf Zellen des erworbenen Immunsystems untersucht werden. Die *Gating*-Strategie für  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen (LPLs) ist in Abbildung 3.12 dargestellt.



**Abbildung 4.12: Gating-Strategie für  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen.** LPLs wurden aus dem Darm von CAC Mäusen isoliert und mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt. Die Färbung erfolgte mit FvD-eFluo780 und Antikörpern gegen CD4, CD8, Foxp3, Ki67 und Granzym B. A) Über FSC-A und SSC-A wurden die LPLs ausgewählt, welche im Hinblick auf Größe und Granularität Leukozyten entsprachen. Tote Zellen wurden mit Hilfe des lebend/tot-Farbstoffs FvD-eFluo780 identifiziert. T-Lymphozyten wurden über CD4 und CD8 differenziert. Zusätzlich wurden Foxp3, Ki67 und Granzym B (GzmB) durchflusszytometrisch gemessen. Repräsentative Dotplots aus dem Kolon einer CAC Maus sind dargestellt.

Zunächst wurden über die Zellgröße und Granularität durch SSC-A und FSC-A LPLs ausgewählt. Tote Zellen wurden mittels FvD abgegrenzt. Eine Unterscheidung der T-Lymphozyten erfolgte über die Expression von CD4 bzw. CD8. Die Stärke der Expression von Foxp3, Ki67 und GzmB wurde mittels Fluoreszenz-markierten Antikörpern ermittelt und deren jeweiliger Anteil an den T-Lymphozyten bestimmt (Abb. 3.12). Die abgebildete *Gating*-Strategie wurde für alle LPLs verwendet.

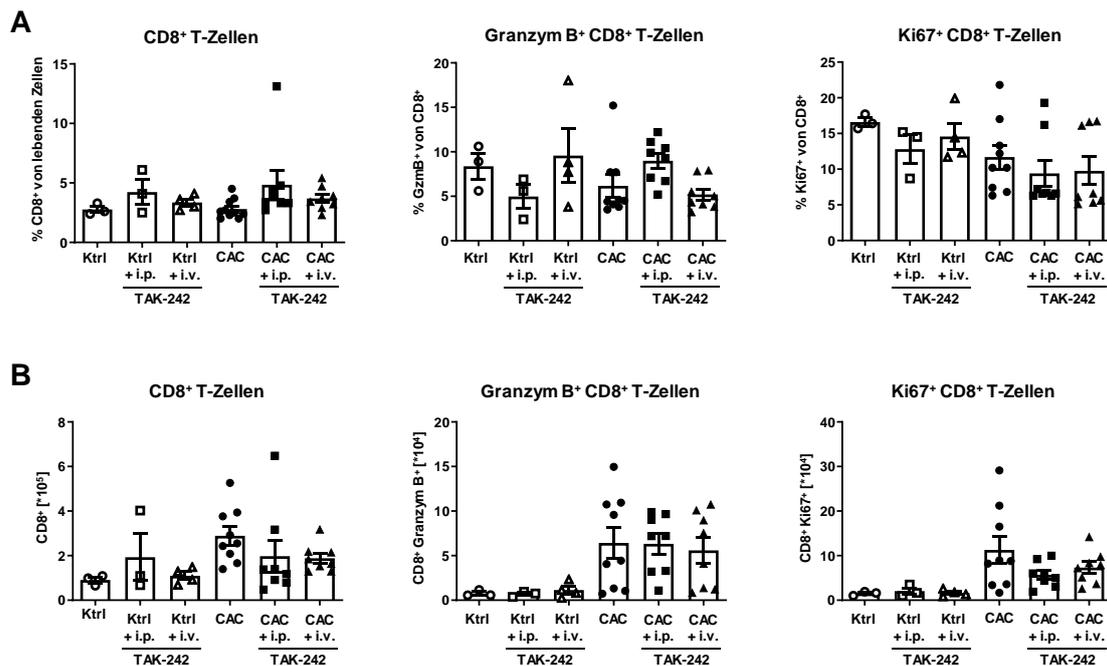


**Abbildung 4.13: Prozentualer und absoluter Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Kolon von CAC Mäusen nach TLR4-Inhibition.** BALB/c Mäuse wurden mit AOM/DSS behandelt, um Darmkrebs zu induzieren (CAC). Während der Entzündungsphase in Woche 1 und 4 erfolgte eine i.p. bzw. i.v. Behandlung mit dem TLR4-Inhibitor TAK-242. BALB/c Mäuse ohne AOM/DSS-Behandlung dienten als Kontrollen (Ktrl). Nach 9 Wochen wurden LPLs aus dem Kolon isoliert, gezählt und durchflusszytometrisch analysiert. A) Prozentualer Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen an allen lebenden Zellen und Anteil Foxp3<sup>+</sup> Zellen an den CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 wurde für Foxp3<sup>-</sup> und Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen bestimmt. B) Absolute Zellzahlen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Foxp3<sup>+</sup> Tregs sowie deren Ki67-Expression. Dargestellt sind die Einzelwerte einer individuellen Maus sowie der Mittelwert ± SEM. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=5 Kontrolltieren und n=8-10 CAC Tieren. Die statistische Analyse erfolgte mit dem *one-way* ANOVA mit anschließendem Tukey post-hoc Test (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001).

Der prozentuale Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen an allen lebenden LPLs änderte sich im Rahmen der Tumorgenese und Behandlung mit TAK-242 nicht. Die Proliferationsrate gemessen an der Ki67-Expression blieb in allen Versuchsgruppen konstant. Einzig der Anteil von Foxp3<sup>+</sup> Tregs an den CD4<sup>+</sup> T-Zellen war in Mäusen mit CAC signifikant erhöht. Die prozentuale Zunahme an Tregs in CAC Mäusen war nach TAK-242 Gabe tendenziell geringer (Abb. 3.13 A). Bei Betrachtung der absoluten Zellzahlen war ein signifikanter Anstieg der CD4<sup>+</sup> sowie der Ki67<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Tumorgenese erkennbar. Nach TLR4-Inhibition war der absolute Anstieg an CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant geringer. Tendenzuell trafen diese Veränderungen auch auf Tregs zu (Abb. 3.13 B).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen am Immunzellinfiltrat in die Lamina propria beteiligt sind. Der prozentuale Anteil an Tregs war im Vergleich zu gesunden Tieren erhöht. Die TLR4-Inhibition während der DSS-Gabe hemmte die Infiltration durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Anschließend wurden die relativen und absoluten Zahlen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Kolon betrachtet.



**Abbildung 4.14: Prozentualer und absoluter Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Kolon von CAC Mäusen nach TLR4-Inhibition.** BALB/c Mäuse wurden mit AOM/DSS behandelt, um Darmkrebs zu induzieren (CAC). Während der Entzündungsphase in Woche 1 und 4 erfolgte eine i.p. bzw. i.v. Behandlung mit dem TLR4-Inhibitor TAK-242. BALB/c Mäuse ohne AOM/DSS-Behandlung dienten als Kontrollen (Ktrl). Nach 9 Wochen wurden LPLs aus dem Kolon isoliert, gezählt und durchflusszytometrisch analysiert. A) Prozentsatz CD8<sup>+</sup> T-Zellen an allen lebenden Zellen sowie Prozentsatz von GzmB bzw. Ki67 exprimierender Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. B) Absolute Zahl CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie absolute Zahl GzmB<sup>+</sup> und Ki-67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Neben den Einzelwerten einer individuellen Maus ist der Mittelwert  $\pm$  SEM abgebildet. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=3-4 Kontrolltieren und n=8-10 CAC Tieren.

Der prozentuale Anteil CD8<sup>+</sup> T-Zellen blieb während der Tumorgense und TAK-242-Gabe konstant. Ebenso veränderte sich der prozentuale Anteil GzmB<sup>+</sup> und Ki67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht. Die absoluten Zellzahlen zeigten tendenziell einen Anstieg CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie GzmB<sup>+</sup> und Ki67<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Kolon der AOM/DSS behandelten Mäuse. Die TLR4-Inhibition verursachte keine Veränderungen in der Anzahl CD8<sup>+</sup> T-Zellen und deren Expression von GzmB und Ki67 in gesunden Kontrolltieren oder CAC Tieren (Abb. 3.14 A-B). CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten sich somit weitestgehend unbeeinflusst durch das Tumorstadium und die TLR4-Inhibition.

Zusammenfassend zeigten die durchflusszytometrischen Analysen eine Zunahme der absoluten Zellzahlen an DCs, Makrophagen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Rahmen der Tumorgense. Die prozentualen Anteile der Zellen des angeborenen sowie erworbenen Immunsystems blieben trotz Tumorstadium weitestgehend konstant. Eine Veränderung der prozentualen Anteile einzelner Zelltypen am Zellinfiltrat in der Lamina propria war somit nicht erkennbar und es ist von einer gleichmäßigen Infiltration durch DCs,

Makrophagen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen auszugehen. Eine Ausnahme bildet eine Zunahme des Anteils an Tregs. Die relativen Zahlen zeigten keine Veränderungen in den Expressionseigenschaften von MHCII und TLR4 bei DCs und Makrophagen sowie Ki67 bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Rahmen des Tumorwachstums.

Nach Behandlung mit TAK-242 zeigte sich in CAC-Mäusen eine signifikante Verringerung der absoluten Zellzahlen an DCs, Makrophagen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die prozentuale Zusammensetzung des Zellinfiltrats blieb nach TAK-242 Gabe konstant. Die Expression von MHCII, TLR4 und Ki67 blieb nach TLR4-Inhibition unverändert.

Zusammenfassend lässt sich beobachten, dass die Inhibition von TLR4 durch TAK-242 während der DSS-Gabe im AOM/DSS-Mausmodell die Entzündungsaktivität im Kolon reduziert. Die nach CAC Induktion im Kolon stark exprimierten Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie die Zunahme der Gesamtzellzahl der LPMZs wurde durch die frühe TAK-242 Behandlung deutlich verringert. Insbesondere die Zahl der DCs, Makrophagen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Kolon zeigte sich nach der TLR4-Inhibition reduziert. Das Tumorwachstum war nach TLR4-Inhibition ebenso tendenziell verringert.

## 5 DISKUSSION

Der Darm ist fortwährend einer Vielzahl an Antigenen von Nahrungsmitteln und kommensalen sowie pathogenen Mikroorganismen ausgesetzt. Die Fähigkeit von intestinalen Epithelzellen, bakterielle Komponenten zu erkennen, erfordert die Expression von PRRs, darunter TLRs (Furrie et al., 2005). TLRs reagieren unterschiedlich auf pathogene und kommensale Bakterien. Sie verhindern eine Infektion als auch Inflammation und sind an Proliferations- und Reparationsvorgängen der IEZ beteiligt. TLRs sind somit entscheidend für die intestinale Homöostase (Yesudhas et al., 2014). TLR-Polymorphismen sind mit einer erhöhten Inzidenz von CED assoziiert (Price et al., 2018). Die Rolle des TLR/Myd88-Signalwegs bei der Entstehung und dem Wachstum von CAC ist teils konträr. Einerseits führt der TLR/Myd88-Signalweg zu Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen und eine TLR-Inhibition verhindert Tumorwachstum. Andererseits haben TLRs eine anti-tumorale Wirkung. Entscheidend sind dabei vor allem der TLR-Typ und die Tumorart (Zhu et al., 2018). In dieser Arbeit stellte sich die TLR4-Aktivierung als ein Mechanismus dar, der die intestinale Inflammation und dadurch die Entwicklung von CAC fördert.

Die verstärkte Expression von TLR4 während der Entzündungsphasen des AOM/DSS-Modells (Abb. 3.1 B) indiziert eine Beteiligung von TLR4 an der Kolitis-Induktion. In Übereinstimmung hiermit zeigten Studien in CED Patienten eine Hochregulierung von TLR4 besonders bei aktiver Erkrankung im Vergleich zu gesunden Kolonbiopsien. Eine Hochregulierung wurde in der Lamina propria, die Immunzellen enthält, aber auch in IEZ registriert (Cario and Podolsky, 2000). Die Expression von TLR4 wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels qRT-PCR in Kolonbiopsien gemessen. Offen blieb daher, welche Zellen im Kolon während der Entzündungsphase vermehrt TLR4 exprimiert haben. Eine Unterscheidung der TLR4 Expression zwischen CD45<sup>+</sup> Immunzellen und Epithelzellen könnte mittels Immunfluoreszenzfärbung oder Durchflusszytometrie erfolgen. Weitergehende Analysen der AG Westendorf hierzu zeigten, dass die TLR4-Expression von Immunzellen im Kolon unter Homöostase nahezu auf Makrophagen begrenzt war, welche etwa zu 60% TLR4<sup>+</sup> waren. Durchflusszytometrisch gemessen waren nach DSS-Gabe signifikant mehr CD45<sup>+</sup> LPMCs und darunter insbesondere Makrophagen TLR4<sup>+</sup>. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (engl. *mean fluorescent intensity*, MFI) war

zudem bei IEZs erhöht (Pastille et al., 2021). Epithelial wird TLR4 sowohl apikal als auch basal auf IEZs im proximalen Kolon exprimiert. Price et al. schlussfolgerten, dass IEZs auf Liganden nach deren Translokation reagieren können. Dieser Aspekt wird insbesondere bei Defekten der epithelialen Barriere im Rahmen der Inflammation bedeutsam. Bei DSS-Kolitis fanden Price et al. keine Veränderungen in der epithelialen TLR4-Expression (Price et al., 2018) und stützen somit die Annahme, dass primär Immunzellen TLR4 während der Entzündungsphasen hochregulieren.

Nach dem 3. DSS-Zyklus und im Rahmen der Tumorgenese fand sich in dieser Arbeit keine verstärkte TLR4-Expression (Abb. 3.1 B). Fukata et al. registrierten im AOM/DSS-Modell wie auch in dieser Arbeit eine Hochregulierung der TLR4-Expression bei DSS-Gabe. Zusätzlich beschrieben sie eine Erhöhung der TLR4-Expression am Ende des AOM/DSS-Modells in Tumoren im Vergleich zum Tumor-umgebenden Gewebe. Humane Kolonbiopsien aus CAC weisen im Vergleich zum umgebenden Gewebe ebenfalls eine vermehrte TLR4-Expression auf (Fukata et al., 2007). Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz der TLR4-Expression am Ende des AOM/DSS-Modells ist, dass in dieser Arbeit die Expression im gesamten Kolon und nicht explizit aus den Tumoren bestimmt wurde, so dass eine Hochregulierung in Tumorzellen möglicherweise nicht erkannt wurde. Zudem analysierten Fukata et al. die Expression nicht nur auf Ebene der mRNA mittels qRT-PCR, sondern auch auf Proteinebene durch Western Blot und Immunhistochemie (Fukata et al., 2007). Die fehlende Hochregulierung von TLR4 im dritten DSS-Zyklus bleibt unklar. Denkbar wären Veränderungen des Mikromilieus oder der Mikrobiota im Rahmen des Wechsels von Inflammation zu Tumorgenese.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben TLR4 die Expression von TLR2 im AOM/DSS-Modell analysiert. Hierbei konnten wir zeigen, dass TLR2, im Gegensatz zu TLR4, im Rahmen des Tumorwachstums hochreguliert wurde (Abb. 3.1 B). Es ist bereits bekannt, dass unter homöostatischen Bedingungen TLR2 auf niedrigem Niveau im Darm, insbesondere im Kolon, exprimiert wird. Die epitheliale Expression ist überwiegend auf die Krypten begrenzt. In der Lamina propria ist TLR2 auf Immunzellen nachweisbar (Cario and Podolsky, 2000; Furrie et al., 2005). Studien in CED Patienten zeigten eine Hochregulierung der TLR2-Expression in der Lamina propria bei konstanter epithelialer Expression (Cario and Podolsky, 2000). Auch in CRC Patienten findet sich eine Hochregulierung von TLR2 in Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Epithelzellen (Zhu

et al., 2018). Diese Daten entsprechen unseren Beobachtungen zur Expression von TLR2 im Kolon während CAC und lassen eine Rolle von TLR2 bei der Tumorentstehung vermuten. Jedoch sind gegensätzliche Wirkungen von TLR2 bei der Entstehung von CAC beschrieben. Studien in TLR2-defizienten Mäusen zeigten, dass die Zahl und Größe der Tumore im AOM/DSS-Modell signifikant erhöht war gegenüber Wildtyp-Tieren. Lowe et al. sehen die Ursache in einer Verstärkung der Inflammation durch die TLR2-Defizienz, denn nach DSS-Gabe wiesen TLR2-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine stärkere klinische Symptomatik mit Erhöhung der Zytokinspiegel, des Immunzellinfiltrats und der epithelialen Proliferationsrate auf (Lowe et al., 2010). Salcedo et al. fanden hingegen im AOM/DSS-Modell keine erhöhte Suszeptibilität für eine Kolitis oder CAC in TLR2-defizienten Mäusen (Salcedo et al., 2010). Meng et al. beschrieben eine schwerere Kolitis und weniger Kolitis-assoziierte Tumore bei TLR2-Defizienz (Meng et al., 2020). Die Wirkung von TLR2 bleibt auf Grundlage dieser Studien somit unklar. Die Expressionsanalysen mit der Erhöhung der TLR2-Expression mit fortgeschrittenem Tumorwachstum machen eine Beteiligung von TLR2 an der Pathogenese von CAC jedoch wahrscheinlich, weshalb die Analyse von TLR2 Inhalt zukünftiger Forschung sein sollte. Sämtliche Ergebnisse bauen auf Versuchen an TLR2-defizienten Mäusen auf. Aufschlussreich wären Versuche mit einem TLR2-Inhibitor, denn dadurch wäre eine differenzierte Betrachtung der verschiedenen Phasen der Tumorentstehung möglich, insbesondere eine gezielte Inhibition zum Zeitpunkt der hochregulierten TLR2-Expression wäre interessant.

Im Laufe des AOM/DSS-Modells zeigten sich in dieser Arbeit keine spezifischen Veränderungen in der TLR3-Expression im Rahmen der Entzündung oder Tumorgenese (Abb. 3.1 B). Im AOM/DSS-Modell ging eine TLR3-Defizienz mit einer erhöhten Tumoralast bei unveränderter Kolitis einher. TLR3 scheint somit bei der Entstehung von CAC eine protektive Wirkung zu besitzen ohne das Ausmaß der Kolitis zu beeinflussen (Jun et al., 2020). Die Expressionsanalysen und die virale Abstammung des Liganden von TLR3 lassen insgesamt eine untergeordnete Rolle von TLR3 in der Pathogenese von CED und CAC vermuten.

Die Expression von TLR7 und TLR9 war mittels semiquantitativer PCR weder im Dünndarm noch im Kolon von unbehandelten Kontrolltieren nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Für das Kolon wurde beschrieben, dass neben TLR2, TLR3 und TLR4

zusätzlich TLR5 bedeutsam exprimiert wird (Furrie et al., 2005; Price et al., 2018). TLR5 wurde in dieser Arbeit nicht analysiert.

TLR4 war während der Entzündungsphasen signifikant hochreguliert. Nach aktuellem Literaturstand trägt TLR4 unter den TLRs den größten Beitrag zu Entstehung von CRC bei (Yesudhas et al., 2014). In dieser Arbeit wurde daher die Rolle von TLR4 durch die Verwendung eines TLR4-Inhibitors näher analysiert. Zur TLR4-Inhibition wurde TAK-242 verwendet. TAK-242 ist ein kleines Molekül, das selektiv die TLR4-Signalkaskade unterbricht (Matsunaga et al., 2011). Es gibt bereits zahlreiche Erfahrungen mit dem Einsatz von TAK-242 in murinen inflammatorischen Modellen u.a. für rheumatoide Arthritis und Neuroinflammation (Fellner et al., 2017; Samarpita et al., 2020) sowie klinische Studien an Sepsis-Patienten (Rice et al., 2010). Die Wirkung von TAK-242 auf die Entstehung von CAC im AOM/DSS-Modell wurde bisher nicht untersucht.

Unterschiede in der Wirksamkeit von TAK-242 in Abhängigkeit von der i.p. oder i.v. *in vivo* Applikationsform waren in dieser Arbeit nicht erkennbar (Abb. 3.4-3.8, 3.10, 3.11, 3.13, 3.14).

Die Inhibition durch TAK-242 während der DSS-induzierten Entzündungsphasen reduzierte tendenziell die Anzahl und Größe der Tumore (Abb. 3.6). Auch Fukata et al. registrierten im AOM/DSS-Modell in TLR4-defizienten Mäusen signifikant weniger Tumore als in Wildtyp-Mäusen (Fukata et al., 2007). Umgekehrt führt eine konstitutive Aktivität von TLR4 im murinen AOM/DSS-Modell zu mehr Kolitis-assoziierten Tumoren (Fukata et al., 2011). Die Ursache hierfür sahen Fukata et al. in der durch die TLR4-Defizienz ausbleibenden Expression der Cyclooxygenase 2 (COX-2) und konsekutiv dem Fehlen von Prostaglandin E2 (PGE2) und Amphiregulin. Es resultierte eine verminderte Aktivierung des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und folglich weniger epitheliale Proliferation (Fukata et al., 2007). Die epitheliale TLR4-Aktivität führt dabei über die Expression von Chemokinen zu einer verstärkten Infiltration durch COX-2 exprimierende Makrophagen und Neutrophile und schafft ein tumorförderndes Mikromilieu (Fukata et al., 2009). In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine verminderte Infiltration durch Makrophagen, DCs und CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach TLR4-Inhibition beobachtet. Ausgehend von der signifikanten Reduktion an Zytokinen nach TLR4-Inhibition ist zudem eine Abnahme der inflammatorischen Aktivität anzunehmen. In der Reduktion der inflammatorischen Aktivität während der DSS-Gaben sehen wir eine

Erklärung für die Wirkweise der TLR4-Inhibition bei der Reduzierung des Tumorwachstums. Den überwiegend TLR4<sup>+</sup> Makrophagen sprechen wir hierbei eine Schlüsselfunktion zu. Wir gehen davon aus, dass durch die Inhibition der TLR4-Aktivität auf Makrophagen weniger Zytokine sezerniert werden und konsekutiv weniger Inflammation entsteht. Zwischen dem Ausmaß der Inflammation und dem Risiko für CRC besteht wiederum ein direkter Zusammenhang. Das Risiko für CAC steigt mit dem Schweregrad und der Dauer der CED (Grivennikov, 2013). In einer retrospektiven Studie wiesen Kolonbiopsien von CU Patienten, die CAC entwickelten, eine höhere entzündliche Aktivität auf als Biopsien von CU Patienten, die keine CAC ausbildeten (Fukata et al., 2009).

Die Reduktion der inflammatorischen Aktivität zeigt sich auch in der Reduktion der Zytokinkonzentration im Überstand von Peritonealmakrophagen sowie von Kolonbiopsien (Abb. 3.7 A). Zudem zeigte sich ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration an TNF- $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$  mit dem Tumorscore (Abb. 3.7 B). Von TNF- $\alpha$  ist bekannt, dass es im Rahmen chronischer Entzündungen an der Initiation von Tumoren beteiligt ist, oxidativen Stress erzeugt, Proliferation induziert, Apoptose hemmt und die Invasivität von Tumoren steigert (Landskron et al., 2014; West et al., 2015). Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper werden therapeutisch bei CED eingesetzt. Onizawa et al. zeigten im AOM/DSS-Modell, dass sich nach TNF- $\alpha$ -Inhibition signifikant weniger und kleinere Tumore entwickeln (Onizawa et al., 2009). Eine Reduktion der Konzentration von TNF- $\alpha$  ist somit ein Ansatzpunkt für die tumorhemmende Wirkung der TLR4-Inhibition. Auch für IL-1 $\beta$ , dessen Konzentration ebenfalls nach TAK-242 Gabe tendenziell reduziert war, ist eine tumorfördernde Wirkung im AOM/DSS-Modell beschrieben (Wang et al., 2014).

Der Einfluss der Inflammation auf die klinische Entzündungssymptomatik wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des DAI erfasst. Die TLR4-Inhibition konnte die im DAI erfasste klinische Symptomatik nicht signifikant verändern, insbesondere im zweiten DSS-Zyklus war der DAI jedoch tendenziell erniedrigt im Vergleich zu unbehandelten DSS-Versuchstieren (Abb. 3.4 C). Ungaro et al. beschreiben bei akuter DSS-induzierter Kolitis eine signifikante Reduktion proinflammatorischer Zytokine durch die TLR4-Inhibition mittels antagonistischem Antikörper (Ungaro et al., 2009). Zudem wird das akute Entzündungsinfiltrat, vorrangig Granulozyten, in TLR4-defizienten Mäusen reduziert.

Daraus resultiert jedoch auch eine erhöhte Translokation von Bakterien über die Darmwand (Fukata et al., 2005). Fukata et al. erkannten, dass die Defizienz im TLR4-Gen zu einer Reduktion der epithelialen Proliferation und folglich zu einer stärkeren klinischen Symptomatik mit stärkeren rektalen Blutungen und mehr Gewichtsverlust führt. Die Ursache dafür sahen sie in der Inaktivität der TLR4-PGE<sub>2</sub>-Amphiregulin-EGFR-Achse, die in IEZs die Proliferation initiiert (Fukata et al., 2007). Auch Shi et al. erkennen die protektive antiphlogistische Wirkung der TLR4-Inhibition bei DSS-Gabe, aber auch die Notwendigkeit der TLR4-Signalkaskade für die Proliferation und Wundheilung (Shi et al., 2019). Diese duale Rolle von TLR4 birgt ein hohes Risiko für einen therapeutischen Einsatz von TLR4-Inhibitoren bei Patienten mit CED und stellt einen Erklärungsansatz für Widersprüche in der Ausprägung der klinischen Symptomatik nach TLR4-Inhibition bzw. bei TLR4-Defizienz dar. Zudem variiert die Suszeptibilität gegenüber DSS deutlich je nach Mausstamm und wird von der intestinalen Mikrobiota stark beeinflusst (Perše and Cerar, 2012). Die Art der Unterbindung der TLR4-Signalkaskade, in dieser Arbeit die TLR4-Inhibition durch TAK-242, bei Ungaro et al. ein antagonistischer Antikörper gegen TLR4 (Ungaro et al., 2009) und bei Fukata et al. sowie Shi et al. eine Defizienz im TLR4-Gen (Fukata et al., 2007; Fukata et al., 2005; Shi et al., 2019), könnte den Verlauf der Kolitis ebenfalls beeinflusst haben. TAK-242 wirkt gegenüber einer TLR4-Defizienz vorteilhaft auf die klinische Symptomatik. Mögliche Erklärungen liegen in der kurzfristigen Applikation gegenüber einer dauerhaften Defizienz und möglichen bisher unbekanntem Nebeneffekten von TAK-242. Wang et al., die als einzige auch TAK-242 zur TLR4-Inhibition verwendet haben, kommen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass TAK-242 die DSS-induzierte Kolitis dosisabhängig mildert. Als ursächlich hierfür wurde eine Hemmung des JAK2/STAT3-Signalwegs und Veränderungen im Mikrobiom beschrieben (Wang et al., 2020).

Insgesamt ist die TLR4-Inhibition während der Entzündungsphase als vielversprechend zur Hemmung der Tumorgenese anzusehen. Signifikante Ergebnisse sind bei einer Vergrößerung der Fallzahl wahrscheinlich. Wang et al. beschreiben bei DSS-induzierter Kolitis eine dosisabhängige Wirkung von TAK-242 und verabreichten teilweise eine 6-fach höhere Dosis als in dieser Arbeit (Wang et al., 2020). Vor diesem Hintergrund wäre eine Dosissteigerung von TAK-242 im AOM/DSS-Modell aussichtsreich. Beachtet werden muss jedoch die duale Rolle von TLR4 bei Kolitis, die ein therapeutisches

Eingreifen bei Patienten mit CED erschwert und Risiken birgt. Deshalb sind weitere Experimente nötig, um die Wirkung einer TLR4-Inhibition auf die Kolitis besser verstehen zu können. Um Veränderungen im Grad der Inflammation durch TLR4-Inhibition zu erkennen, wären histopathologische Analysen und eine durchflusszytometrische Charakterisierung des Immunzellinfiltrates während der DSS-Kolitis zielführend.

Die in dieser Arbeit erfolgte Analyse des Immunzellinfiltrates der aus dem Kolon isolierten LPMZs am Ende des AOM/DSS-Modells wiesen auf eine verstärkte Infiltration der Lamina propria durch DCs, Makrophagen und CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Rahmen der Tumorgenese hin, diese Infiltration blieb nach TAK-242 Gabe aus (Abb. 3.10, 3.11, 3.13 und 3.14). Bei der Interpretation des Immunzellinfiltrates muss in die verschiedenen Phasen der Tumorinitiation und -progression unterschieden werden, da die Rolle der Immunzellen von dieser Phase abhängig ist. In der Entzündungsphase gelten beispielsweise Tregs als vorteilhaft, da sie einen immunsuppressiven Charakter besitzen und die Entstehung einer Kolitis verhindern können (Hooper and Macpherson, 2010). Bei der Tumorprogression tragen Tregs zum Tumor-*Immunescape* bei und gehen mit einer schlechteren Prognose einher (Facciabene et al., 2012; Pastille et al., 2014). Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Analyse des Immunzellinfiltrats zum Zeitpunkt der DSS-Gabe und TLR4-Inhibition.

DCs steuern die Differenzierung der T-Lymphozyten und können eine effektive Immunantwort und eine Eliminierung von Tumorzellen initiieren, aber auch zum Tumor-*Immunescape* beitragen (Mancino et al., 2008). Die Beurteilung der Bedeutung von DCs erfordert deshalb zunächst eine nähere Charakterisierung der DCs.

Im Rahmen der Kolitis-assoziierten Tumorgenese infiltrieren sowohl M1- als auch M2-Makrophagen Tumore. Beide Polarisierungen weisen konträre Effekte auf (Wu et al., 2016). Eine Differenzierung beider Polarisierungen anhand typischer Marker wäre zielführend für die Beurteilung des Einflusses der TAK-242 Gabe auf die Makrophagen. Während der Tumorentstehung wird häufig eine Anhäufung von TAMs beobachtet. Im Allgemeinen werden TAMs mit einer schlechten Prognose bei soliden Tumoren in Verbindung gebracht, da sie einen immunsuppressiven, pro-angiogenen und pro-metastatischen Phänotyp annehmen (Lin et al., 2006; Zhong et al., 2018). Auch die physiologisch im Darm vorkommenden Makrophagen weisen einen tolerogenen

Charakter auf. Die Reifung zu tolerogenen Makrophagen ist bei Kolitis jedoch gestört. Die unreifen Makrophagen aggravieren Entzündungsvorgänge durch die Sezernierung inflammatorischer Zytokine und verschlimmern Gewebeschäden (Na et al., 2019). Die Expression von TLR4 durch DCs und Makrophagen blieb unverändert. Durch die verstärkte Infiltration im Rahmen der Tumorgenese fanden sich jedoch mehr TLR4<sup>+</sup> DCs und vor allem mehr TLR4<sup>+</sup> Makrophagen in der Lamina propria (Abb. 3.10 und 3.11). Da unter den Immunzellen primär Makrophagen TLR4 exprimieren (Abb. 3.11) und deren Rekrutierung durch TAK-242 wirksam unterbunden wurde, sollten Makrophagen im Zusammenhang mit einer TLR4-Inhibition mehr Aufmerksamkeit erhalten. Zumal bereits aus der Blockade von CCR2 bekannt ist, dass eine fehlende Rekrutierung von Makrophagen effektiv die Tumorentwicklung verhindert (Popivanova et al., 2009). Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen bleiben nach TLR4-Inhibition konstant (Abb. 3.14). Beim Erhalt der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist von einem positiven Effekt auszugehen, da sie maßgeblich an der Tumor-Immunüberwachung und der Eliminierung entarteter Zellen beteiligt sind (Farhood et al., 2019).

In dieser Arbeit fand erstmalig eine Analyse des Immunzellinfiltrates im AOM/DSS-Modell nach Inhibition von TLR4 statt. Die Ergebnisse sind vielversprechend, so dass eine genauere Charakterisierung der Immunzellen als aussichtsreich erachtet werden kann. Zudem wäre ein Vergleich mit dem Immunzellinfiltrat zum Zeitpunkt der DSS-Gabe interessant. Ein Schwerpunkt sollte dabei auf Makrophagen gelegt werden, da unter den Immunzellen hauptsächlich Makrophagen TLR4 exprimieren und anzunehmen ist, dass die TLR4-abhängige Sekretion proinflammatorischer Zytokine überwiegend durch Makrophagen erfolgt.

Die Inhibition von TLR4 in Woche 6 – 9 des AOM/DSS-Modells hatte kaum Einfluss auf das Tumorwachstum (Abb. 3.4 A-C). Diese Ergebnisse sind überraschend, da TLR4 das Bindeglied zwischen dem intestinalen Epithel bzw. Tumorzellen und dem Mikrobiom bildet und gezeigt worden war, dass Veränderungen des Mikrobioms zu Veränderungen im Tumorwachstum führen. So reduzierte eine zweiwöchige orale Antibiose zum gleichen Zeitpunkt des AOM/DSS-Modells die Anzahl sowie die Größe von Tumoren und veränderte die Zusammensetzung des Mikrobioms. Es traten allerdings erhebliche Nebenwirkungen auf (Pastille et al., 2021). Auch Zackular et al. behandelten Mäuse

während des gesamten AOM/DSS-Modells antibiotisch und stellten reduzierte Tumorscores und Veränderungen im Mikrobiom fest (Zackular et al., 2013).

Eine TLR4-Inhibition in Woche 6 – 9 des AOM/DSS-Modells hatte im Gegensatz zu einer Antibiose keinen Einfluss auf das Tumorwachstum gezeigt. Beide Therapieansätze unterscheiden sich in großem Maße. TAK-242 vermittelt Veränderungen der Mikrobiota mit erhöhten Butyratspiegeln (Wang et al., 2020), aus der antibiotischen Therapie resultiert im Gegensatz dazu eine Depletion der Mikrobiota. Ein weiterer Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Therapieeffekten wäre, dass die TLR4-Signalkaskade nicht für die Reduktion des Tumorwachstums durch eine antibiotische Behandlung verantwortlich ist, zumal es zum genannten Zeitpunkt des AOM/DSS-Modells keine Veränderungen in der TLR4-Expression gibt. Es bleibt offen, wie das durch eine Antibiose in seiner Zahl reduzierte und in seiner Zusammensetzung veränderte Mikrobiom die Tumorentwicklung beeinflusst. Denkbar wäre über andere PRRs beispielsweise andere TLRs oder durch einen direkten Einfluss der Bakterien auf das Epithel und Tumorzellen. Denn Bakterien sind in der Lage, Immunantworten, die Regulation von Stammzellen und Stoffwechseleigenschaften zu beeinflussen (Zou et al., 2018). Ein Beispiel für den direkten Einfluss bakterieller Produkte auf die Tumorgenese des intestinalen Epithels ist das Cyclomodulin CNF (engl. *cytotoxic necrotizing factor*). Es wird von *E. coli* gebildet, greift in die Regulation des Zellzyklus ein und verhindert über die Expression des *B-cell lymphoma*-Proteins (bcl-2) die Apoptose. In CRC Patienten kommen Calmodulin-produzierende *E. coli* Stämme vermehrt vor (Khan et al., 2017).

Zusammenfassend unterstreichen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von TLR4-abhängigen Signalwegen bei der Entstehung von CAC. Die TLR4-Expression wird im Rahmen der Kolitis-assoziierten Tumorgenese hochreguliert. Eine Inhibition von TLR4 durch TAK-242 in der Phase der Entzündung ist insbesondere bei höherer Dosierung vielversprechend zur Reduktion des Tumorwachstums. Die in dieser Arbeit erfolgten durchflusszytometrischen Analysen des Immunzellinfiltrates nach TLR4 Inhibition durch TAK-242 sind bisher einmalig und weisen auf die Bedeutung TLR4<sup>+</sup> Makrophagen beim Kolitis-assoziierten Tumorwachstum hin. Eine genauere Analyse der Rolle von Immunzellen, insbesondere TLR4<sup>+</sup> Makrophagen, in der Phase der Entzündung

sollte zukünftig erfolgen, um einen therapeutischen Nutzen einer TLR4-Inhibition bei Patienten mit CED abschließend beurteilen zu können.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa haben ein etwa dreifach erhöhtes Risiko für die Entstehung kolorektaler Karzinome. Welcher Mechanismus genau der Entzündungs-assoziierten Tumorgenese zugrunde liegt, bleibt unklar. Es wird diskutiert, dass sowohl kommensale als auch pathogene Bakterien an der Inflammation und Entstehung von Kolitis-assoziierten Karzinomen (CAC) beteiligt sind. In dieser Arbeit wurde die Rolle von Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), einem Rezeptor, der Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen Bakterien erkennt, bei den intestinalen Entzündungsvorgängen und der Tumorgenese in einem murinen Modell für CAC untersucht.

Während der Entzündungsphasen der CAC-Entstehung wurde die TLR4-Expression im Kolon deutlich hochreguliert. Die Blockade des TLR4-Signalwegs während der durch Natriumdextransulfat (DSS) induzierten Entzündungsphasen der Kolitis-assoziierten Tumorgenese durch einen spezifischen Inhibitor reduzierte die Entstehung und Progression der Kolontumore, was einher ging mit niedrigeren Spiegeln an proinflammatorischen Zytokinen und einer verminderten Infiltration von Immunzellen in die Lamina propria. Innerhalb der intestinalen Immunzellen exprimierten insbesondere Makrophagen TLR4. Die Blockade des TLR4-Signalwegs zu einem späteren Zeitpunkt der CAC-Entstehung hatte keinen Einfluss auf das Kolitis-assoziierte Tumorwachstum.

Unsere Ergebnisse indizieren, dass die bakterielle Aktivierung von TLR4 auf Makrophagen im Kolon Entzündungsprozesse auslöst und dadurch das Tumorwachstum fördert. Deshalb stellt die Inhibition der TLR4-Signalkaskade während der intestinalen Entzündung einen vielversprechenden neuen Ansatz dar, die Entstehung von CAC zu verhindern.

## 7 SUMMARY

Patients with inflammatory bowel disease (IBD) such as Crohn's disease and ulcerative colitis have an approximately threefold increased risk of developing colorectal cancer. The exact underlying mechanisms of inflammation-associated tumorigenesis remain unclear. It is discussed that both commensal and pathogenic bacteria are involved in the inflammation and development of colitis-associated cancer (CAC). In this work, the impact of Toll-like receptor 4 (TLR4), a receptor that recognizes lipopolysaccharides (LPS) from Gram-negative bacteria, on intestinal inflammation and tumorigenesis was investigated in a murine model of CAC.

During the inflammatory phases of CAC development, TLR4 expression was markedly upregulated in the colon. Blockade of TLR4 signaling during the dextran sulfate sodium (DSS)-induced inflammatory phases of colitis-associated tumorigenesis by a specific inhibitor reduced the development and progression of colon tumors, which was accompanied by lower levels of pro-inflammatory cytokines and reduced infiltration of immune cells in the lamina propria. Among immune cells, macrophages in particular expressed TLR4. Blocking of TLR4 signaling at a later stage of CAC development did not affect colitis-associated tumor growth.

Our results indicate that bacterial activation of TLR4 on macrophages in the colon triggers inflammation and promotes tumor growth. Therefore, inhibition of the TLR4 signaling cascade during intestinal inflammatory processes is a promising new approach to inhibit the development of CAC.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aldinucci, D., and Colombatti, A. (2014). The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression. *Mediators Inflamm* 2014, 292376.
2. Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2017). Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* 66, 683-691.
3. Bain, C.C., Scott, C.L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., Williams, M., Malissen, B., Agace, W.W., and Mowat, A.M. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal immunology* 6, 498-510.
4. Becker, C., Fantini, M.C., Wirtz, S., Nikolaev, A., Kiesslich, R., Lehr, H.A., Galle, P.R., and Neurath, M.F. (2005). In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut* 54, 950-954.
5. Blaser, M.J., and Falkow, S. (2009). What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nature reviews Microbiology* 7, 887-894.
6. Bremnes, R.M., Busund, L.T., Kilvaer, T.L., Andersen, S., Richardsen, E., Paulsen, E.E., Hald, S., Khanehkenari, M.R., Cooper, W.A., Kao, S.C., and Donnem, T. (2016). The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11, 789-800.
7. Brenner, H., Schrotz-King, P., Holleccek, B., Katalinic, A., and Hoffmeister, M. (2016). Rückgang der Inzidenz und Mortalität von Darmkrebs in Deutschland. *Dtsch Arztebl* 7, 101-116.
8. Bunt, S.K., Sinha, P., Clements, V.K., Leips, J., and Ostrand-Rosenberg, S. (2006). Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 176, 284-290.
9. Cario, E., and Podolsky, D.K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68, 7010-7017.
10. Cheng, P., Corzo, C.A., Luetke, N., Yu, B., Nagaraj, S., Bui, M.M., Ortiz, M., Nacken, W., Sorg, C., Vogl, T., Roth, J., and Gabrilovich, D. (2008). Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *The Journal of experimental medicine* 205, 2235-2249.
11. Clapper, M.L., Cooper, H.S., and Chang, W.C. (2007). Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. *Acta pharmacologica Sinica* 28, 1450-1459.

12. Corvaisier, M., Moreau-Aubry, A., Diez, E., Bennouna, J., Mosnier, J.F., Scotet, E., Bonneville, M., and Jotereau, F. (2005). V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *175*, 5481-5488.
13. Coudry, R.A., Cooper, H.S., Gary, M., Lubet, R.A., Chang, W.-C.L., and Clapper, M.L. (2004). Correlation of inhibition of colitis-associated dysplasia by celecoxib with degree of inflammation in the mouse model of DSS-induced colitis. *Cancer Research* *64*, 548-548.
14. Cresswell, P., Ackerman, A.L., Giodini, A., Peaper, D.R., and Wearsch, P.A. (2005). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunological reviews* *207*, 145-157.
15. Dasu, M.R., and Isseroff, R.R. (2012). Toll-like receptors in wound healing: location, accessibility, and timing. *The Journal of investigative dermatology* *132*, 1955-1958.
16. De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M.L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., and Fazio, V.M. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of carcinogenesis* *10*, 9.
17. Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R., and Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature immunology* *8*, 1086-1094.
18. Dignass, A., Preiß, J.C., Aust, D.E., Autschbach, F., Ballauff, A., Barretton, G., Bokemeyer, B., Fichtner-Feigl, S., Hagel, S., Herrlinger, K.R., Jantschek, G., Kroesen, A., Kruis, W., Kucharzik, T., Langhorst, T., Reinshagen, M., Rogler, G., Schleiermacher, D., Schmidt, C., Schreiber, S., Schulze, H., Stange, E., Zeitz, M., Hoffmann, J.C., and Stallmach, A. (2011). Aktualisierte Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa 2011 – Ergebnisse einer Evidenzbasierten Konsensuskonferenz. *Z Gastroenterol* *49*, 1276-1341.
19. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* *3*, 991-998.
20. Dupre-Crochet, S., Erard, M., and Nubetae, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of leukocyte biology* *94*, 657-670.
21. Facciabene, A., Motz, G.T., and Coukos, G. (2012). T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res* *72*, 2162-2171.
22. Farache, J., Koren, I., Milo, I., Gurevich, I., Kim, K.W., Zigmond, E., Furtado, G.C., Lira, S.A., and Shakhar, G. (2013). Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity* *38*, 581-595.

23. Farhood, B., Najafi, M., and Mortezaee, K. (2019). CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of cellular physiology* 234, 8509-8521.
24. Fellner, A., Barhum, Y., Angel, A., Perets, N., Steiner, I., Offen, D., and Lev, N. (2017). Toll-Like Receptor-4 Inhibitor TAK-242 Attenuates Motor Dysfunction and Spinal Cord Pathology in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *Int J Mol Sci* 18.
25. Fukata, M., Chen, A., Vamadevan, A.S., Cohen, J., Breglio, K., Krishnareddy, S., Hsu, D., Xu, R., Harpaz, N., Dannenberg, A.J., Subbaramaiah, K., Cooper, H.S., Steven, H.I., and Abreu, M.T. (2007). Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology* 133, 1869-1881.
26. Fukata, M., Hernandez, Y., Conduah, D., Cohen, J., Chen, A., Breglio, K., Goo, T., Hsu, D., Xu, R., and Abreu, M.T. (2009). Innate immune signaling by Toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflammatory bowel diseases* 15, 997-1006.
27. Fukata, M., Michelsen, K.S., Eri, R., Thomas, L.S., Hu, B., Lukasek, K., Nast, C.C., Lechago, J., Xu, R., Naiki, Y., Soliman, A., Arditi, M., and Abreu, M.T. (2005). Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 288, G1055-1065.
28. Fukata, M., Shang, L., Santaolalla, R., Sotolongo, J., Pastorini, C., España, C., Ungaro, R., Harpaz, N., Cooper, H.S., Elson, G., Kosco-Vilbois, M., Zaias, J., Perez, M.T., Mayer, L., Vamadevan, A.S., Lira, S.A., and Abreu, M.T. (2011). Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. *Inflammatory bowel diseases* 17, 1464-1473.
29. Furrie, E., Macfarlane, S., Thomson, G., and Macfarlane, G.T. (2005). Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* 115, 565-574.
30. Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12, 253-268.
31. Gagniere, J., Raisch, J., Veziat, J., Barnich, N., Bonnet, R., Buc, E., Bringer, M.A., Pezet, D., and Bonnet, M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World journal of gastroenterology* 22, 501-518.
32. Geuking, M.B., Cahenzli, J., Lawson, M.A., Ng, D.C., Slack, E., Hapfelmeier, S., McCoy, K.D., and Macpherson, A.J. (2011). Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* 34, 794-806.

33. Graves, D.T., and Jiang, Y. (1995). Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 6, 109-118.
34. Grivennikov, S.I. (2013). Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Seminars in immunopathology* 35, 229-244.
35. Harty, J.T., Tvinnereim, A.R., and White, D.W. (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual review of immunology* 18, 275-308.
36. Hidalgo-Cantabrana, C., Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Vezza, T., Martínez-Cambor, P., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P., and Gálvez, J. (2016). Effect of a Ropy Exopolysaccharide-Producing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Strain Orally Administered on DSS-Induced Colitis Mice Model. *Front Microbiol* 7, 868.
37. Hoffman, W., Lakkis, F.G., and Chalasani, G. (2016). B Cells, Antibodies, and More. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 11, 137-154.
38. Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 10, 159-169.
39. Huang, Y., and Chen, Z. (2016). Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity. *American journal of translational research* 8, 2490-2497.
40. Hyun, Y.S., Han, D.S., Lee, A.R., Eun, C.S., Youn, J., and Kim, H.Y. (2012). Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis* 33, 931-936.
41. Jun, Y.K., Koh, S.J., Gang, H.W., Chung, K.Y., Han, J.M., Kim, J.W., Kim, B.G., Lee, K.L., Im, J.P., and Kim, J.S. (2020). P088 TLR3 ameliorates colitis-associated colon tumourigenesis in mice. *Journal of Crohn's and Colitis* 14, S179-S179.
42. Jung, C., Hugot, J.P., and Barreau, F. (2010). Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *International journal of inflammation* 2010, 823710.
43. Kasper, L.H., and Reder, A.T. (2014). Immunomodulatory activity of interferon-beta. *Annals of clinical and translational neurology* 1, 622-631.
44. Kawai, T., and Akira, S. (2007a). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine* 13, 460-469.
45. Kawai, T., and Akira, S. (2007b). TLR signaling. *Seminars in immunology* 19, 24-32.
46. Khan, A.A., Khan, Z., Malik, A., Kalam, M.A., Cash, P., Ashraf, M.T., and Alshamsan, A. (2017). Colorectal cancer-inflammatory bowel disease nexus and felony of *Escherichia coli*. *Life sciences* 180, 60-67.

47. Kidd, P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 8, 223-246.
48. Kluwe, J., Mencin, A., and Schwabe, R.F. (2009). Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 87, 125-138.
49. Korneev, K.V., Atretkhany, K.N., Drutskaya, M.S., Grivennikov, S.I., Kuprash, D.V., and Nedospasov, S.A. (2017). TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis. *Cytokine* 89, 127-135.
50. Lakshmi Narendra, B., Eshvendar Reddy, K., Shantikumar, S., and Ramakrishna, S. (2013). Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 62, 823-834.
51. Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C., and Hermoso, M.A. (2014). Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of immunology research* 2014, 149185.
52. Lin, E.Y., Li, J.F., Gnatovskiy, L., Deng, Y., Zhu, L., Grzesik, D.A., Qian, H., Xue, X.N., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 66, 11238-11246.
53. Loh, D.Y., Sha, W.C., Nelson, C.A., Newberry, R.D., Kranz, D.M., and Russell, J.H. (1989). Positive and negative selection of T lymphocytes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 54 Pt 1, 147-151.
54. Lowe, E.L., Crother, T.R., Rabizadeh, S., Hu, B., Wang, H., Chen, S., Shimada, K., Wong, M.H., Michelsen, K.S., and Arditi, M. (2010). Toll-like receptor 2 signaling protects mice from tumor development in a mouse model of colitis-induced cancer. *PLoS one* 5, e13027.
55. Luddy, K.A., Robertson-Tessi, M., Tafreshi, N.K., Soliman, H., and Morse, D.L. (2014). The role of toll-like receptors in colorectal cancer progression: evidence for epithelial to leucocytic transition. *Frontiers in immunology* 5, 429.
56. Mager, L.F., Wasmer, M.H., Rau, T.T., and Krebs, P. (2016). Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol* 6, 96.
57. Magro, F., Langner, C., Driessen, A., Ensari, A., Geboes, K., Mantzaris, G.J., Villanacci, V., Becheanu, G., Borralho Nunes, P., Cathomas, G., Fries, W., Jouret-Mourin, A., Mescoli, C., de Petris, G., Rubio, C.A., Shepherd, N.A., Vieth, M., and Eliakim, R.. (2013). European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis* 7, 827-851.
58. Mahe, E., Pugh, T., and Kamel-Reid, S. (2018). T cell clonality assessment: past, present and future. *Journal of clinical pathology* 71, 195-200.

59. Mancino, A., Schioppa, T., Larghi, P., Pasqualini, F., Nebuloni, M., Chen, I.H., Sozzani, S., Austyn, J.M., Mantovani, A., and Sica, A. (2008). Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. *Blood* 112, 3723-3734.
60. Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T., and Ii, M. (2011). TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Molecular pharmacology* 79, 34-41.
61. Matsuoka, K., and Kanai, T. (2015). The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in immunopathology* 37, 47-55.
62. Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489, 231-241.
63. Meng, S., Li, Y., Zang, X., Jiang, Z., Ning, H., and Li, J. (2020). Effect of TLR2 on the proliferation of inflammation-related colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. *Cancer Cell Int* 20, 95.
64. Mills, K.H. (2004). Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4, 841-855.
65. Montresor, A., Toffali, L., Constantin, G., and Laudanna, C. (2012). Chemokines and the signaling modules regulating integrin affinity. *Frontiers in immunology* 3, 127.
66. Moum, B., Hovde, O., and Hoivik, M.L. (2014). What have we learnt about the role of the environment and natural course of IBD in the new millennium? 20-year follow-up of the IBSEN cohort. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* 32 *Suppl 1*, 2-9.
67. Na, Y.R., Stakenborg, M., Seok, S.H., and Matteoli, G. (2019). Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 16, 531-543.
68. Nemazee, D. (2017). Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol* 17, 281-294.
69. Neufert, C., Becker, C., and Neurath, M.F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nature protocols* 2, 1998-2004.
70. Nikolaus, S., and Schreiber, S. (2007). Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 133, 1670-1689.
71. Nitzan, O., Elias, M., Peretz, A., and Saliba, W. (2016). Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* 22, 1078-1087.

72. Onizawa, M., Nagaishi, T., Kanai, T., Nagano, K., Oshima, S., Nemoto, Y., Yoshioka, A., Totsuka, T., Okamoto, R., Nakamura, T., Sakamoto, N., Tsuchiya, K., Aoki, K., Ohya, K., Yagita, H., and Watanabe, M. (2009). Signaling pathway via TNF-alpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 296, G850-859.
73. Opitz, C.A., Litztenburger, U.M., Lutz, C., Lanz, T.V., Tritschler, I., Koppel, A., Tolosa, E., Hoberg, M., Anderl, J., Aicher, W.K., Weller, M., Wick, W., and Platten, M. (2009). Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27, 909-919.
74. Pastille, E., Bardini, K., Fleissner, D., Adamczyk, A., Frede, A., Wadwa, M., von Smolinski, D., Kasper, S., Sparwasser, T., Gruber, A.D., Schuler, M., Sakaguchi, S., Roers, A., Müller, W., Hansen, W., Buer, J., and Westendorf, A.M. (2014). Transient ablation of regulatory T cells improves antitumor immunity in colitis-associated colon cancer. *Cancer Res* 74, 4258-4269.
75. Pastille, E., Faßnacht, T., Adamczyk, A., Ngo Thi Phuong, N., Buer, J., and Westendorf, A.M. (2021). Inhibition of TLR4 Signaling Impedes Tumor Growth in Colitis-Associated Colon Cancer. *Frontiers in immunology* 12, 669747.
76. Pernot, S., Terme, M., Voron, T., Colussi, O., Marcheteau, E., Tartour, E., and Taieb, J. (2014). Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World journal of gastroenterology* 20, 3738-3750.
77. Perše, M., and Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012, 718617.
78. Popivanova, B.K., Kostadinova, F.I., Furuichi, K., Shamekh, M.M., Kondo, T., Wada, T., Egashira, K., and Mukaida, N. (2009). Blockade of a chemokine, CCL2, reduces chronic colitis-associated carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 69, 7884-7892.
79. Preiß, J.C., Bokemeyer, B., Buhr, H.J., Dignaß, A., Häuser, W., Hartmann, F., Herrlinger, K.R., Kaltz, B., Kienle, P., Kruis, W., Kucharzik, T., Langhorst, J., Schreiber, S., Siegmund, B., Stallmach, A., Stange, E.F., Stein, J., and Hoffmann, J.C. (2014). Aktualisierte S3-Leitlinie – „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ 2014. *Z Gastroenterol* 52, 1431-1484.
80. Price, A.E., Shamardani, K., Lugo, K.A., Deguine, J., Roberts, A.W., Lee, B.L., and Barton, G.M. (2018). A Map of Toll-like Receptor Expression in the Intestinal Epithelium Reveals Distinct Spatial, Cell Type-Specific, and Temporal Patterns. *Immunity* 49, 560-575.e566.
81. Pull, S.L., Doherty, J.M., Mills, J.C., Gordon, J.I., and Stappenbeck, T.S. (2005). Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche

necessary for regenerative responses to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 99-104.

82. Ray, A., and Dittel, B.N. (2010). Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*.

83. Rice, T.W., Wheeler, A.P., Bernard, G.R., Vincent, J.L., Angus, D.C., Aikawa, N., Demeyer, I., Sainati, S., Amlot, N., Cao, C., Li, M., Matsuda, H., Mouri, K., and Cohen, J. (2010). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis. *Crit Care Med* 38, 1685-1694.

84. Romagnani, S. (1999). Th1/Th2 cells. *Inflammatory bowel diseases* 5, 285-294.

85. Rothemich, A., and Arthur, J.C. (2019). The Azoxymethane/Il10 (-/-) Model of Colitis-Associated Cancer (CAC). *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 1960, 215-225.

86. Round, J.L., and Mazmanian, S.K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 313-323.

87. Rudd, C.E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews* 229, 12-26.

88. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133, 775-787.

89. Salcedo, R., Worschech, A., Cardone, M., Jones, Y., Gyulai, Z., Dai, R.M., Wang, E., Ma, W., Haines, D., O'HUigin, C., Marincola, F.M., and Trinchieri, G. (2010). MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *The Journal of experimental medicine* 207, 1625-1636.

90. Samarasinghe, R., Tailor, P., Tamura, T., Kaisho, T., Akira, S., and Ozato, K. (2006). Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 26, 893-900.

91. Samarpita, S., Kim, J.Y., Rasool, M.K., and Kim, K.S. (2020). Investigation of toll-like receptor (TLR) 4 inhibitor TAK-242 as a new potential anti-rheumatoid arthritis drug. *Arthritis Res Ther* 22, 16.

92. Sanin, D.E., Prendergast, C.T., and Mountford, A.P. (2015). IL-10 Production in Macrophages Is Regulated by a TLR-Driven CREB-Mediated Mechanism That Is Linked to Genes Involved in Cell Metabolism. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 195, 1218-1232.

93. Sarvaiya, P.J., Guo, D., Ulasov, I., Gabikian, P., and Lesniak, M.S. (2013). Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget* 4, 2171-2185.

94. Schmiegel, W., and Pox, C. (2017). S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 1.1, 2017, AWMF-Registernummer: 021/007OL. Leitlinienprogramm Onkologie 7.
95. Schmiegel, W., Pox, C., Arnold, D., Porschen, R., Rodel, C., and Reinacher-Schick, A. (2009). Colorectal carcinoma: the management of polyps, (neo)adjuvant therapy, and the treatment of metastases. *Deutsches Arzteblatt international* 106, 843-848.
96. Sellon, R.K., Tonkonogy, S., Schultz, M., Dieleman, L.A., Grenther, W., Balish, E., Rennick, D.M., and Sartor, R.B. (1998). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 66, 5224-5231.
97. Seth, S., Oberdorfer, L., Hyde, R., Hoff, K., Thies, V., Worbs, T., Schmitz, S., and Forster, R. (2011). CCR7 essentially contributes to the homing of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state as well as inflammatory conditions. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 186, 3364-3372.
98. Shi, Y.J., Gong, H.F., Zhao, Q.Q., Liu, X.S., Liu, C., and Wang, H. (2019). Critical role of toll-like receptor 4 (TLR4) in dextran sulfate sodium (DSS)-Induced intestinal injury and repair. *Toxicol Lett* 315, 23-30.
99. Shi, Z., Cai, Z., Sanchez, A., Zhang, T., Wen, S., Wang, J., Yang, J., Fu, S., and Zhang, D. (2011). A novel Toll-like receptor that recognizes vesicular stomatitis virus. *The Journal of biological chemistry* 286, 4517-4524.
100. Sipos, F., Furi, I., Constantinovits, M., Tulassay, Z., and Muzes, G. (2014). Contribution of TLR signaling to the pathogenesis of colitis-associated cancer in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* 20, 12713-12721.
101. Smythies, L.E., Sellers, M., Clements, R.H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W.H., Orenstein, J.M., and Smith, P.D. (2005). Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *The Journal of clinical investigation* 115, 66-75.
102. Snider, A.J., Bialkowska, A.B., Ghaleb, A.M., Yang, V.W., Obeid, L.M., and Hannun, Y.A. (2016). Murine Model for Colitis-Associated Cancer of the Colon. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 1438, 245-254.
103. Spencer, J., and Sollid, L.M. (2016). The human intestinal B-cell response. *Mucosal immunology* 9, 1113-1124.
104. Stallmach, A., Häuser, W., L'hoest, H., and Marschall, U. (2012). Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa: Herausforderungen an die Versorgung. *Barmer GEK Gesundheitswesen aktuell*, 286-309.
105. Steimle, A., and Frick, J.S. (2016). Molecular Mechanisms of Induction of Tolerant and Tolerogenic Intestinal Dendritic Cells in Mice. *Journal of immunology research* 2016, 1958650.

106. Tachibana, T., Onodera, H., Tsuruyama, T., Mori, A., Nagayama, S., Hiai, H., and Imamura, M. (2005). Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *11*, 7322-7327.
107. Thaker, A.I., Shaker, A., Rao, M.S., and Ciorba, M.A. (2012). Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). *Journal of visualized experiments : JoVE*.
108. Tong, Z., Yang, X.O., Yan, H., Liu, W., Niu, X., Shi, Y., Fang, W., Xiong, B., Wan, Y., and Dong, C. (2012). A protective role by interleukin-17F in colon tumorigenesis. *PloS one* *7*, e34959.
109. Ungaro, R., Fukata, M., Hsu, D., Hernandez, Y., Breglio, K., Chen, A., Xu, R., Sotolongo, J., Espana, C., Zaias, J., Elson, G., Mayer, L., Kosco-Vilbois, M., and Abreu, M.T. (2009). A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* *296*, G1167-1179.
110. Uronis, J.M., Muhlbauer, M., Herfarth, H.H., Rubinas, T.C., Jones, G.S., and Jobin, C. (2009). Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PloS one* *4*, e6026.
111. Waldner, M.J., Foersch, S., and Neurath, M.F. (2012). Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. *Int J Biol Sci* *8*, 1248-1253.
112. Waldner, M.J., and Neurath, M.F. (2015). Mechanisms of Immune Signaling in Colitis-Associated Cancer. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* *1*, 6-16.
113. Wang, E.L., Qian, Z.R., Nakasono, M., Tanahashi, T., Yoshimoto, K., Bando, Y., Kudo, E., Shimada, M., and Sano, T. (2010). High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* *102*, 908-915.
114. Wang, J., Zhu, G., Sun, C., Xiong, K., Yao, T., Su, Y., and Fang, H. (2020). TAK-242 ameliorates DSS-induced colitis by regulating the gut microbiota and the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Microb Cell Fact* *19*, 158.
115. Wang, Y., Wang, K., Han, G.C., Wang, R.X., Xiao, H., Hou, C.M., Guo, R.F., Dou, Y., Shen, B.F., Li, Y., and Chen, G.J. (2014). Neutrophil infiltration favors colitis-associated tumorigenesis by activating the interleukin-1 (IL-1)/IL-6 axis. *Mucosal immunology* *7*, 1106-1115.
116. Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M., and Murphy, K.M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* *24*, 677-688.

117. West, A.P., Brodsky, I.E., Rahner, C., Woo, D.K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Walsh, M.C., Choi, Y., Shadel, G.S., and Ghosh, S. (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472, 476-480.
118. West, N.R., McCuaig, S., Franchini, F., and Powrie, F. (2015). Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nat Rev Immunol* 15, 615-629.
119. Wu, T., Dai, Y., Wang, W., Teng, G., Jiao, H., Shuai, X., Zhang, R., Zhao, P., and Qiao, L. (2016). Macrophage targeting contributes to the inhibitory effects of embelin on colitis-associated cancer. *Oncotarget* 7, 19548-19558.
120. Yamada, A., Arakaki, R., Saito, M., Tsunematsu, T., Kudo, Y., and Ishimaru, N. (2016). Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* 22, 2195-2205.
121. Yatim, K.M., and Lakkis, F.G. (2015). A brief journey through the immune system. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 10, 1274-1281.
122. Ye, Y., Pang, Z., Chen, W., Ju, S., and Zhou, C. (2015). The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *International journal of clinical and experimental medicine* 8, 22529-22542.
123. Yesudhas, D., Gosu, V., Anwar, M.A., and Choi, S. (2014). Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Frontiers in immunology* 5, 334.
124. Zackular, J.P., Baxter, N.T., Iverson, K.D., Sadler, W.D., Petrosino, J.F., Chen, G.Y., and Schloss, P.D. (2013). The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *mBio* 4, e00692-00613.
125. Zarembek, K.A., and Godowski, P.J. (2002). Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 168, 554-561.
126. Zhan, Y., Chen, P.J., Sadler, W.D., Wang, F., Poe, S., Nunez, G., Eaton, K.A., and Chen, G.Y. (2013). Gut microbiota protects against gastrointestinal tumorigenesis caused by epithelial injury. *Cancer Res* 73, 7199-7210.
127. Zhang, J.M., and An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 45, 27-37.
128. Zhang, Y.Z., and Li, Y.Y. (2014). Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World journal of gastroenterology* 20, 91-99.
129. Zhong, X., Chen, B., and Yang, Z. (2018). The Role of Tumor-Associated Macrophages in Colorectal Carcinoma Progression. *Cellular physiology and*

biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 45, 356-365.

130. Zhu, M., Yu, K., Wang, L., and Yu, S. (2018). Contribution of drugs acting on the TLRs/MyD88 signaling pathway on colitis-associated cancer. Pharmazie 73, 363-368.

131. Zou, S., Fang, L., and Lee, M.H. (2018). Dysbiosis of gut microbiota in promoting the development of colorectal cancer. Gastroenterology report 6, 1-12.

## 9 ANHANG

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

5-ASA	5-Aminosalicylsäure
AMP	Antimikrobielle Peptide
AOM	Azoxymethan
AP-1	activator protein 1
APC	engl. <i>antigen-presenting cells</i> , Antigenpräsentierende Zellen
Bcl-2	engl. <i>B-cell lymphoma-proteins 2</i> , B-Zell-Lymphom-Protein 2
CAC	engl. <i>Colitis-associated cancer</i> , Kolitis-assoziiertes Karzinom
CAF	engl. <i>cancer-associated fibroblast</i> , Karzinom-assoziierte Fibroblasten
CCL	C-C Motiv Chemokin Liganden
CCR7	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 7
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppe
cDNA	engl. complementary DNA, komplementäre DNS
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CNF	engl. <i>cytotoxic necrotizing factor</i> , zytotoxischer Nekrosefaktor
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRC	engl. <i>colorectal cancer</i> , kolorektales Karzinom
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4	engl. <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i> , zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein
CU	Colitis Ulcerosa
CX3CR1	C-X3-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 1
CXCL	C-X-C Motiv Chemokin Liganden
DAI	engl. <i>Disease Activity Index</i> , Krankheitsaktivitätsindex
DAMP	engl. <i>Damage-associated molecular patterns</i> , Schaden-assoziiertes molekulares Muster
DC	engl. <i>dendritic cells</i> , dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	engl. <i>double-stranded RNA</i> , doppelsträngige RNA
DSS	engl. <i>Dextran sulfate sodium</i> , Natriumdextransulfat
EGFR	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
ELT	Epithelial-leukozytische Transition
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EZM	Extrazellulärmatrix
FAE	Follikel-assoziierten Epithel
FCS	engl. <i>forward scatter</i> , Vorwärtsstreuung
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
Foxp3	<i>Forkhead-Box-Protein P3<sup>+</sup></i>
GALT	engl. <i>gut associated lymphoid tissue</i> , darmassoziierte lymphatische Gewebe
GF	engl. <i>germ-free</i> , frei von Bakterien
GITR	engl. <i>glucocorticoid-induced TNF receptor</i>
GM-CSF	engl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
Gr-1	Granulozytenmarker 1
GzmB	Granzym B

ICOS	engl. <i>inducible costimulator</i> , induzierbarer Kostimulator
IEZ	intestinale Epithelzellen
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
ILF	Isolierte Lymphfollikel
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium mit GlutaMAX™
IMDMc	IMDM-Komplettmedium
IRAK	IL-1 receptor-associated kinase
iTreg	induzierbare regulatorische T-Zellen
IVC2	engl. <i>individually ventilated cages</i> , individuell ventilierte Käfige
JAK	Januskinase
KG	Körpergewicht
ko	knockout
ktrl	Kontrolle
LPL	Lamina propria Lymphozyten
LPMZ	Lamina propria mononukleäre Zellen
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	engl. <i>leucin-rich repeats</i> , Leucin-reiche Wiederholungen
MC	Morbus Crohn
MDSC	engl. <i>myeloid-derived suppressor cells</i> , vom Knochenmark-stammende Suppressorzellen
MFI	engl. mean fluorescent intensity, durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MHC	engl. <i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
mLN	engl. <i>mesenterial lymph node</i> , mesenteriale Lymphknoten
MMP	Metalloproteinase
MPLA	Monophosphoryl Lipid A
MyD88	engl. <i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
M-Zellen	Mikrofaltenzellen
<i>NF-<math>\kappa</math>B</i>	nuclear factor kappa B
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	NOD-like Rezeptoren
NOD	engl. <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
nTreg	natürliche regulatorische T-Zellen
P	Phosphorylierung
PAMP	engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i> Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS-Puffer	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PD-1	engl. <i>programmed death 1</i> , programmierter Tod 1
PD-L1	<i>programmed cell death-ligand 1</i>
PGE2	Prostaglandin E2
Poly IC	<i>Polyinosin/Polycytidyl-Säure</i>
PP	Peyer-Plaques
PRR	engl. <i>pattern recognition receptors</i>
RA	engl. <i>retinoic acid</i> , Retinsäure
RNS	Ribonukleinsäure

---

RNS	engl. <i>reactive nitrogen species</i> , reaktive Stickstoffspezies
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	engl. <i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RT-qPCR	quantitative Real-Time PCR
SD	engl. <i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
SPF	spezifisch pathogenfrei
SSC	engl. <i>side scatter</i> , Seitwärtsstreuung
ssRNA	engl. <i>single-stranded RNA</i> , einzelsträngige RNA
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T <sub>a</sub>	Annealing-Temperatur
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TCR	engl. <i>T cell receptor</i> , T-Zellrezeptor
TE	Tris/EDTA
Teff	T-Effektorzelle
TGF- $\beta$	engl. <i>Transforming growth factor beta</i>
Th17-Zelle	Typ17-T-Helferzelle
Th1-Zelle	Typ1-T-Helferzelle
Th2-Zelle	Typ2-T-Helferzelle
Th-Zellen	T-Helferzelle
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
Tis	<i>Carcinoma in situ</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptoren
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Tr1-Zellen	Typ 1 regulatorische T-Zellen
Tr2-Zellen	Typ 2 regulatorische T-Zellen
TRAF6	<i>tumor necrosis factor receptor-associated factor 6</i>
Treg	regulatorische T-Zellen
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
Tris	Trisaminomethan
Ub	Ubiquitinierung
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Das mukosale Immunsystem.....	7
Abb. 1.2	Differenzierung CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten.....	12
Abb. 1.3	Die drei Phasen des Krebs- <i>Immunediting</i> -Konzepts.....	14
Abb. 1.4	Die TLR-Signalkaskade.....	19
Abb. 1.5	Zytokine in der Pathogenese kolorektaler Karzinome.....	29
Abb. 3.1	AOM/DSS-Protokoll.....	40
Abb. 4.1	Expressionsprofil von TLR2, TLR3 und TLR4 im Kolon im Verlauf des AOM/DSS-Modells.....	46
Abb. 4.2	Stimulation und Inhibition von TLR4 auf Peritonealmakrophagen.....	47
Abb. 4.3	Gewichtsverlauf im AOM/DSS-Modell mit später TLR4-Inhibition.....	49
Abb. 4.4	Einfluss einer Inhibition von TLR4 in Woche 6 – 9 des AOM/DSS-Modells auf das Tumorwachstum.....	50
Abb. 4.5	Einfluss der TAK-242 Behandlung auf die klinische Symptomatik im AOM/DSS-Modell.....	52
Abb. 4.6	Einfluss der TAK-242 Behandlung auf das Tumorwachstum.....	53
Abb. 4.7	Einfluss der TAK-242 Behandlung auf die Zytokinsekretion im AOM/DSS-Modell.....	55
Abb. 4.8	Einfluss der Tumorentstehung und TAK-242 Behandlung auf die absolute Zellzahl im Kolon.....	57
Abb. 4.9	Gating-Strategie für DCs und Makrophagen.....	58
Abb. 4.10	Prozentualer und absoluter Anteil von DCs im Kolon von CAC Mäusen nach TLR4-Inhibition.....	59
Abb. 4.11	Prozentualer und absoluter Anteil an Makrophagen im Kolon von CAC Mäusen nach TLR4-Inhibition.....	60
Abb. 4.12	Gating-Strategie für CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	61
Abb. 4.13	Prozentualer und absoluter Anteil an CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Kolon von CAC Mäusen nach TLR4-Inhibition.....	62
Abb. 4.14	Prozentualer und absoluter Anteil an CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Kolon von CAC Mäusen nach TLR4-Inhibition.....	64

### 9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	TLR-Liganden.....	17
Tabelle 3.1	Verwendete Primerpaare.....	36
Tabelle 3.2	Verwendete Antikörper.....	36
Tabelle 3.3	PCR-Programm der semiquantitativen PCR.....	38
Tabelle 3.4	Programm der RT-qPCR.....	39
Tabelle 3.5	Disease Activity Index (DAI).....	40
Tabelle 3.6	Klassifizierung der Tumore.....	41

## 10 DANKSAGUNG

Am Ende dieser Arbeit möchte ich Danke sagen für all die Unterstützung, die Mithilfe und das Begleiten über den langen Zeitraum vom Beginn des experimentellen Arbeitens im Labor bis zum Ende des Schreibprozesses hinweg.

Zuvorderst möchte ich meinen Betreuern danken: Frau Prof. Dr. rer. nat. Astrid Westendorf danke ich, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat, tiefreichende Einblicke in die experimentelle Wissenschaft und die Immunologie zu erlangen, indem ich Teil ihrer Arbeitsgruppe und Teil des GRK 1949 werden durfte. Darüber hinaus danke ich ihr für die konstruktive Kritik und die stetige gute Betreuung. Dr. rer. nat. Eva Pastille danke ich insbesondere für die Begleitung während des Schreibprozesses, für die Geduld, die konstruktive Kritik und die große Ausdauer. Dr. rer. nat. Alexandra Adamczyk danke ich für die Einarbeitung in das experimentelle Arbeiten und die Methodik im Labor.

Mein Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle sowie ideelle Förderung.

Christian Fehring und Christina Liebig danke ich für die Hilfe an den langen Versuchstagen und das stundenlange Zellenzählen. Dr. rer. nat. Jana Meiners danke ich für die Gespräche, die Mithilfe sowie die vielen guten Ratschläge.

Ein herzlicher Dank geht an das gesamte Team der Arbeitsgruppe Westendorf und der Zusammenarbeit mit dem Team der Arbeitsgruppe Hansen. Ich danke für die Gespräche, für die Aufmunterung und für die Hilfsbereitschaft bei meinen unzähligen Fragen.

Danken möchte ich auch meinen Freundinnen, die mir jeder Zeit für Austausch, Wissensbündelung und zum Korrekturlesen zur Seite standen.

Zuletzt danke ich meinem Freund Sven sowie meiner Familie für das Lösen technischer Probleme, für die Geduld und für die Ermutigung.

## **11 LEBENS LAUF**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

