



Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
Chirurgische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar
Klinische Forschergruppe „Molekulare Tumorbilogie“

**Immunmodulation der Tumorentstehung:
die Rolle von Toll-like Rezeptoren und ihrem Adaptermolekül
MyD88 bei der kolorektalen Karzinogenese**

Nicolas Hans Dominique Gros

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. K.-P. Janssen
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 11.09.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.04.2014 angenommen.

Für meine Großeltern!
Pour mes grands-parents!

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	3
2	Abkürzungsverzeichnis	7
3	Einleitung	9
3.1	Hereditäres Kolorektalkarzinom.....	9
3.2	Sporadisches Kolorektalkarzinom.....	9
3.2.1	Molekulargenetik der sporadischen kolorektalen Tumorgenese	10
3.2.1.1	Adenom-Karzinom-Modell.....	10
3.2.1.2	Der RAS-Signalweg	11
3.2.1.3	Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg.....	13
3.2.2	Inflamationsbedingte Tumorgenese	14
3.3	Das Mustererkennungssystem als Teil des angeborenen Immunsystems .	17
3.3.1	Charakterisierung Toll-ähnlicher Rezeptoren.....	18
3.3.1.1	Intrazelluläre Signalwege der Toll-like Rezeptoren	20
3.4	Mausmodelle für Kolorektalkarzinome.....	22
3.4.1	Das pVillin-Kras ^{V12G} -Mausmodell	22
3.4.2	Mausmodelle mit mutiertem Apc-Allel	22
3.4.3	Das RasApc-Modell	24
3.4.4	Das Myd88 ^{stp/stp} -Mausmodell.....	25
3.4.5	Untersuchungen zur Rolle von TLRs bei der Tumorentstehung: Befunde aus Mausmodellen.....	25
3.5	Klinische Befunde zur Rolle des Toll-like Rezeptor-Systems bei der kolorektalen Tumorgenese	27
4	Problemstellung.....	29
5	Material	31
5.1	Geräte und technisches Zubehör.....	31
5.2	Chemikalien / Reagenzien	32
5.3	Stammlösungen und Medien	34
5.4	Reagenzienkits	36
5.5	Andere Verbrauchsmaterialien	36
5.6	Oligonukleotide	36
5.6.1	Primer zur Genotypisierung der Mausstämme	37
5.6.2	Primer für qRT-PCR (human).....	37

5.6.3	Primer für qRT-PCR (murin).....	38
5.7	Zelllinien.....	39
5.8	Patientenkollektiv.....	39
5.9	Versuchstiere.....	40
6	Methoden.....	41
6.1	Tierversuche.....	41
6.1.1	Organentnahme.....	41
6.1.2	Gewinnung einer Mausschwanz-Biopsie.....	41
6.2	Zellbiologische Methoden.....	41
6.2.1	Ex-Vivo-Organkultur.....	41
6.2.2	Zellkultur.....	41
6.2.3	Isolation intestinaler epithelialer Zellen (IEC) aus Mausgewebe....	42
6.3	Molekularbiologische Methoden.....	42
6.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsie.....	42
6.3.2	Ethanol-DNA-Fällung.....	43
6.3.3	RNA-Isolation.....	43
6.3.3.1	RNA-Isolation aus Gewebsmengen < 50 mg.....	43
6.3.3.2	RNA-Isolation aus Gewebsmengen > 50 mg.....	44
6.3.4	cDNA-Synthese (reverse Transkription).....	44
6.3.5	Quantifizierung von DNA und RNA.....	44
6.3.6	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	45
6.3.7	Quantitative RT-PCR.....	46
6.3.7.1	Hydrolysis Probe Assay.....	47
6.3.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	48
6.4	Immunologische / Zellbiologische Methoden.....	49
6.4.1	Stimulation von Ex-Vivo-Organkulturen mit TLR-Agonisten.....	49
6.4.2	Stimulation von Zellkulturen mit TLR-Agonisten.....	49
6.4.3	ELISA.....	49
6.5	Immunhistochemische und Immuncytochemische Methoden.....	50
6.5.1	Gefrierschnitte.....	50
6.5.2	Hämatoxylin und Eosin Färbung (HE-Färbung).....	50
6.6	Biometrie und Statistik.....	51
7	Ergebnisse.....	52
7.1	Quantifizierung der TLR-Expression in humanen Tumorzellen.....	52

7.1.1	MYD88	53
7.1.2	TLR2	54
7.1.3	TLR3	55
7.1.4	TLR4	57
7.1.5	TLR9	58
7.1.6	Interleukin-8	59
7.2	Expressionsanalysen humaner Tumorproben	61
7.2.1	Stadienabhängige Analyse der TLR-Genexpressionen in humanen Proben kolorektaler Tumore	63
7.2.1.1	TLR-Expressionen kolorektaler Tumore in allen UICC-Stadiengruppen.....	63
7.2.1.2	TLR-Expression in fortgeschrittenen Kolonkarzinomen (Stadium UICC IV).....	65
7.2.1.3	TLR-Expression in lokal begrenzten Kolonkarzinomen (Stadium UICC II): Test auf Assoziation mit Rezidivierung.....	66
7.2.1.4	Prognostische Bedeutung der intratumoralen Toll-like Rezeptor-Expression.....	68
7.2.2	Stadienabhängige Analyse der MyD88-Genexpression in humanen Kolonkarzinomen	73
7.2.2.1	MyD88-Expressionsunterschiede kolorektaler Tumore in allen UICC-Stadiengruppen	74
7.2.2.2	MyD88-Expression bei fortgeschrittenen Kolonkarzinomen (Stadium UICC IV)	75
7.2.2.3	Keine signifikante Bedeutung der intratumoralen MyD88 Expression für die Prognose	76
7.2.3	Stadienabhängige Analyse der intratumoralen Interleukin-8 Genexpression in humanen Kolonkarzinomen.....	77
7.2.3.1	IL8-Expressionsunterschiede kolorektaler Tumore in allen UICC-Stadiengruppen.....	78
7.2.3.2	Analyse der prognostischen Bedeutung der intratumoralen IL8-Expression bei lokal begrenzten Kolonkarzinomen (Stadium UICC II)	78
7.2.3.3	Analyse der prognostischen Bedeutung der intratumoralen IL8-Expression.....	79

7.2.4	Korrelation der intratumoralen Genexpressionswerte	82
7.3	Analyse von genetisch definierten Mausmodellen für Kolonkarzinome	84
7.3.1	Analyse von Mausgewebe mittels qRT-PCR	84
7.3.1.1	MyD88-Expression transgener Mausmodelle.....	86
7.3.1.2	TLR-Expression in den transgenen Mausmodellen.....	87
7.3.1.3	Expression von COX2 in transgenen Mausmodellen	88
7.3.2	Stimulation von Gewebe-Explantaten mit TLR-Liganden.....	89
7.3.2.1	Bestimmung von sekretiertem Interleukin-6 nach TLR-Stimulation von Gewebeexplantaten (ELISA).....	89
7.3.2.2	TNF α -ELISA.....	92
8	Diskussion	93
8.1	Einfluss des Toll-like Rezeptor (TLR)-Systems auf die inflammationsbedingte kolorektale Tumorgenese.....	93
8.1.1	TLR- und MyD88-Expression etablierter kolorektaler Tumorzelllinien	95
8.1.2	TLR- und MyD88-Expression in resezierten humanen Tumorproben.....	98
8.1.3	TLR- und MyD88-Expression in murinen Gewebeproben	102
8.1.4	Synopsis der Diskussion.....	106
9	Zusammenfassung	108
9.1	Deutsch.....	108
9.2	Summary (English)	110
10	Literaturverzeichnis.....	112
11	Abbildungsverzeichnis	123
12	Tabellenverzeichnis.....	125
13	Anhang	126
13.1	Klinische Klassifikation kolorektaler Tumore.....	126
14	Danksagung	128
15	Lebenslauf.....	129

2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACF	Aberrant Crypt Foci
APC	Adenomatous Polyposis Coli
Apc-Maus	Apc ^{1638N} -Maus
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIN	chromosomale Instabilität
DCC	Deleted in Colon Cancer
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat (N= A, C, G, T)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
FAP	Familiäres Adenomatous Polyposis
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung; Gramm
h	Stunde
HE	Hämatoxylin/Eosin
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer
IHC	Immunhistochemistry
IEC	Intestinal Epithelial cells
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Les	Läsion

LOH	Loss of Heterozygosity
LoxP	Locus of crossing over
μ	mikro
M	Molar
ml	Milliliter
min	Minute(n)
MIN	Multiple Intestinal Neoplasia
mM	Millimolar
mA	Milliampère
Mut	mutiertes Allel
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PRR	Pattern Recognition Receptor
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue deleted on Chromosome 10
VilRas	pVillin-Kras ^{G12V} -Maus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
u.a.	unter anderem
V	Volt
Wt	Wildtyp-Allel

3 Einleitung

Mehr als 50% der Bevölkerung mit einem Alter von 70 Jahren weisen Polypen im Dickdarm auf, wobei der Tumor in 10% der Fälle eine Malignität entwickelt {Kinzler & Vogelstein, 1996}. Mit einer jährlichen Inzidenz von 47.9 und einer Mortalität von 17.6 pro 100.000 Menschen, ist das kolorektale Karzinom die dritt häufigste bösartige Tumorerkrankung der westlichen Welt. Das Kolorektalkarzinom ist in den industrialisierten Ländern die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache bei Mann und Frau {Jemal, 2011}. Es werden ätiologisch hereditäre von sporadischen Kolorektalkarzinomen unterschieden. Histologisch sind 85% bis 90% Adenokarzinome des Kolons.

3.1 Hereditäres Kolorektalkarzinom

Etwa 5-10% aller Kolorektalkarzinome sind hereditär, werden also durch genetische Veränderungen in der Keimbahn ausgelöst {Jasperson, 2010}. Die beiden häufigsten Syndrome sind FAP (familiäre adenomatöse Polyposis) und HNPCC (hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom). FAP resultiert aus der Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *APC* (engl.: *adenomatous polyposis coli*), während HNPCC durch Defekte in den Mutationsreparaturgenen entsteht (z.B. DNA mismatch repair proteins MSH1 und MCH1). Letzteres ist die häufigste erbliche Darmkrebsform mit 5% der Fälle {Gryfe, 2009}. Bei beiden Syndromen kommt es zur synchronen und metachronen Ausbildung zahlreicher tumoröser Läsionen.

3.2 Sporadisches Kolorektalkarzinom

Rund 90% der Kolorektalkarzinome gelten als sporadisch, wobei als wichtigster disponierender Faktor das gutartige Adenom zu nennen ist. Diese gelten als etablierte Vorläuferstadien eines Adenokarzinoms {Fearon, 1990}. Das Malignitätspotential von Adenomen ist direkt abhängig von deren Anzahl und Größe. Liegt das Karzinomrisiko eines Adenoms < 1cm noch bei unter 1%, wird dem Adenom > 4cm bereits ein Risiko von 70% zugeschrieben {Riede, 2004}.

3.2.1 Molekulargenetik der sporadischen kolorektalen Tumorgenese

Der Weg von der Tumorinitiation bis zur Tumorprogression bedarf genetischer und epigenetischer Veränderungen, die im Gegensatz zu den hereditären Syndromen somatisch erfolgen, und nicht bereits in der Keimbahn vorliegen. Man unterscheidet Alterationen in Tumorsuppressorgenen und Protoonkogenen. Tumorsuppressorgene wie APC kodieren meist Proteine, die durch Zellwachstumshemmung eine protektive Wirkung gegen Tumorentstehung aufweisen. Da Alterationen in Tumorsuppressorgenen rezessiv sind, kommt es erst durch Funktionsverlust beider Allele („Verlust der Heterozygotie“ ; *LOH: engl.: loss of heterozygosity*) zu einer phänotypischen Beteiligung an der Tumorentstehung. Proto-Onkogene wie RAS (*Rat sarcoma G-Protein*) wiederum kodieren Proteine, die die Zellproliferation stimulieren. Eine Funktionszunahme (*engl.: gain of function*) dieser Gene kann in ein unkontrolliertes Zellwachstum resultieren. Die Mutation eines Protoonkogens ist dominant, was bedeutet, dass die Mutation eines Allels zur phänotypischen Beteiligung an der Tumorentstehung ausreicht.

3.2.1.1 Adenom-Karzinom-Modell

Das Adenom-Karzinom-Modell beschreibt die Progression von normalem Darmepithel bis hin zum malignen Karzinom, wobei den Zwischenstadien spezifische genetische Veränderungen zugeordnet werden {Fearon & Vogelstein, 1990}. Es wird ferner angenommen, dass eine Darmepithelzelle zur Entartung ca. 5-10 Mutationen akkumulieren muss {Kinzler & Vogelstein, 1996}. Mutationen im *APC-Gen* sind eines der frühesten genetischen Ereignisse der kolorektalen Tumorinitiation {Fodde & Smits, 2001}. APC-Mutationen kommen in über 80% der kolorektalen Tumore vor {Smith et al., 1993} {Kinzler & Vogelstein, 1996}. Bei Mutation des Tumorsuppressors APC, liegt eine konstitutive Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges vor, wobei das Signalmolekül β -Catenin akkumuliert und in den Zellkern transferiert. Dort aktiviert β -Catenin die Expression zahlreicher Wnt-Zielgene. Zudem führen Mutationen in APC zu einer Destabilisierung des zellulären Genoms {Abal et al., 2007}. Im zweiten Schritt der kolorektalen Tumorgenese ist die konstitutive Aktivierung des *KRAS* Onkogens von großer Bedeutung. Das Protoonkogen *Kras* ist bereits bei frühen Tumorstadien und in 50% aller Kolorektalkarzinome mutiert {Bos et al., 1987} {Fearon & Vogelstein, 1990}. Auch der Verlust einer Kopie des Chromosoms 18q findet sich in 73% der kolorektalen Adenome. Tumorsuppressorgene wie *DCC (Deleted in Colon Cancer)*, *SMAD2* und *SMAD4*

sind auf diesem Chromosom lokalisiert und dadurch an der Tumorentstehung beteiligt {Vogelstein et al., 1988} {Nakao et al., 1997}. Die Transformation eines adenomatösen Polypen in ein Karzinom korreliert dann schließlich zu 75% mit der Inaktivierung von *p53* (engl.: *tumor protein 53*) durch Mutationen oder Verlust des Chromosoms 17q {Ohue et al., 1994}. Aktuell geht man von drei parallelen Wegen der kolorektalen Tumorentstehung aus, die sich in der Art und Abfolge der Mutationen unterscheiden {Leggett, 2010}. Neben Tumoren, die durch eine aberrante Aktivierung des Wnt-Signalwegs initiiert werden, gibt es auch die Möglichkeit einer Aktivierung von Onkogenen wie BRAF und KRAS, wie im folgenden ausgeführt wird.

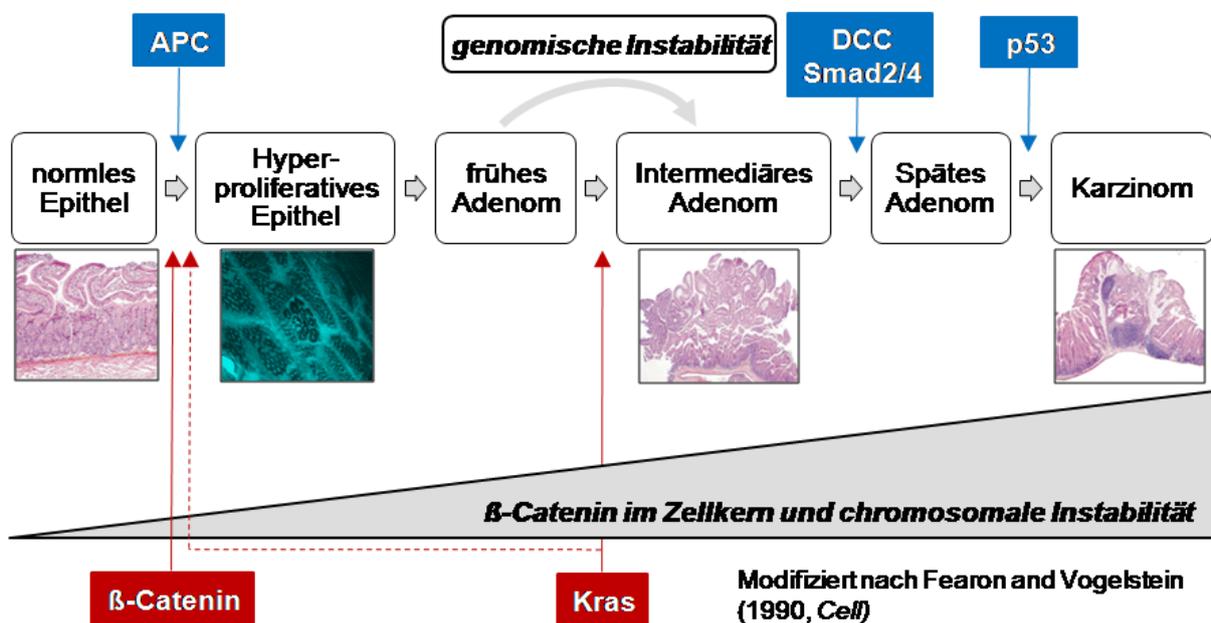


Abbildung 1: Modell der kolorektalen Karzinogenese

(modifizierte Abb. der AG Janssen; nach {Fearon, 1990}) Die Initiation und Progression der Tumorentstehung erfolgen durch viele genetische Veränderungen, wie dem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen (**blau**) und der Aktivierung von Onkogenen (**rot**). Neben der Anreicherung von β -Catenin im Zellkern ist die erhöhte chromosomale Instabilität ein wichtiges Merkmal von Darmkrebs. Abkürzungen: DCC (deleted in colorectal cancer), Kras (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog).

3.2.1.2 Der RAS-Signalweg

Ras gehört zur Superfamilie der kleinen GTPasen. Diese G-Proteine sind molekulare Schalter, die GTP (aktiv)- oder GDP (inaktiv)-gebunden vorkommen {Malumbres &

Barbacid, 2003} {Kindler et al., 2008}. GTP-bindende Ras-Proteine befinden sich intrazellulär als Teil mehrstufiger Signalkaskaden die Zellwachstum, -überleben und -differenzierung regulieren. Die häufigste onkogene Punktmutation beim Menschen, $Kras^{V12G}$, bewirkt, dass GTP nicht mehr hydrolysiert werden kann und Ras in der aktivierten Konformation verbleibt. Hierdurch kommt es zur Aktivierung des nachgeordneten Raf/MEK/ERK-Signalweges {Campbell, Khosravi-Far, Rossman, Clark, & Der, 1998} {Zuber et al., 2000}, wobei der konstitutiven Ras-Aktivierung Zellproliferation und Apoptoseinhibition folgen {Kim & Lance, 1997}. Dysplastisch-hyperproliferierende Foci aberranter Krypten (*ACF, engl. aberrant crypt foci*) aus dem Kolon sind das erste, erkennbare, histopathologische Korrelat für Darmzellentartung und weisen in 60% aller Fälle Mutationen in *KRAS* auf {Takayama et al., 2001}. In einem Tiermodell wurde ausserdem gezeigt, dass solitär, aktiviertes *Kras* in Abwesenheit von Mutationen des *Apc* Gens zur Entstehung von Darmadenomen führen kann {Janssen et al., 2002}.

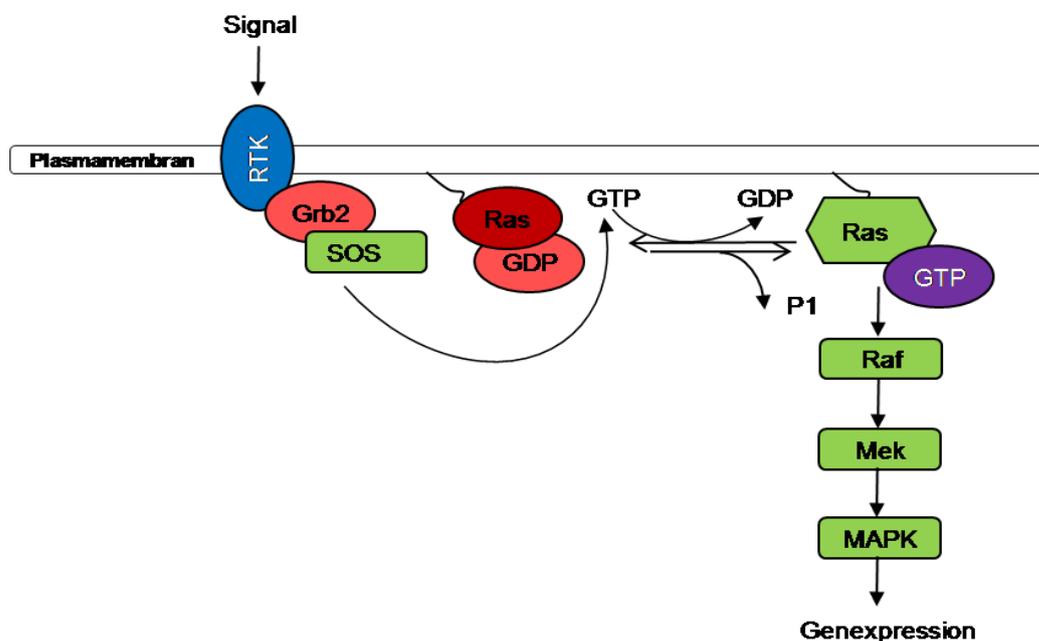


Abbildung 2: vereinfachte, schematische Darstellung des Ras-Signalweges

(Abb. modifiziert nach {Schubbert, 2007}) Nach Bindung eines Liganden durch die Rezeptor-Tyrosin-Kinase führt eine dimersierende Konformationsänderung des Rezeptors zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten an dessen intrazellulärem Teil {Downard, 1998}. Die Tyrosinreste binden nun den Adapter Grb2 (engl.: Growth factor receptor-bound protein 2), welcher wiederum das Protein SOS (engl.: son of sevenless) bindet. SOS bindet dann Ras und bewirkt eine Konformationsänderung, bei der GDP frei wird und GTP gebunden wird. Ras aktiviert nun Downstream-Effektoren wie die Kinase Raf, die weitere nachgeschaltete Kinasen phosphoryliert.

3.2.1.3 Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Bindet der Frizzled-Rezeptor ein lösliches Wnt-Protein, erfolgt nach mehreren Zwischenschritten ein Transfer von β -Catenin in den Zellkern. Dort bindet es an die T-Zellfaktor-Familie (TCF/LEF) und regt die Transkription von Wnt-Zielgenen an, welche an Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose beteiligt sind.

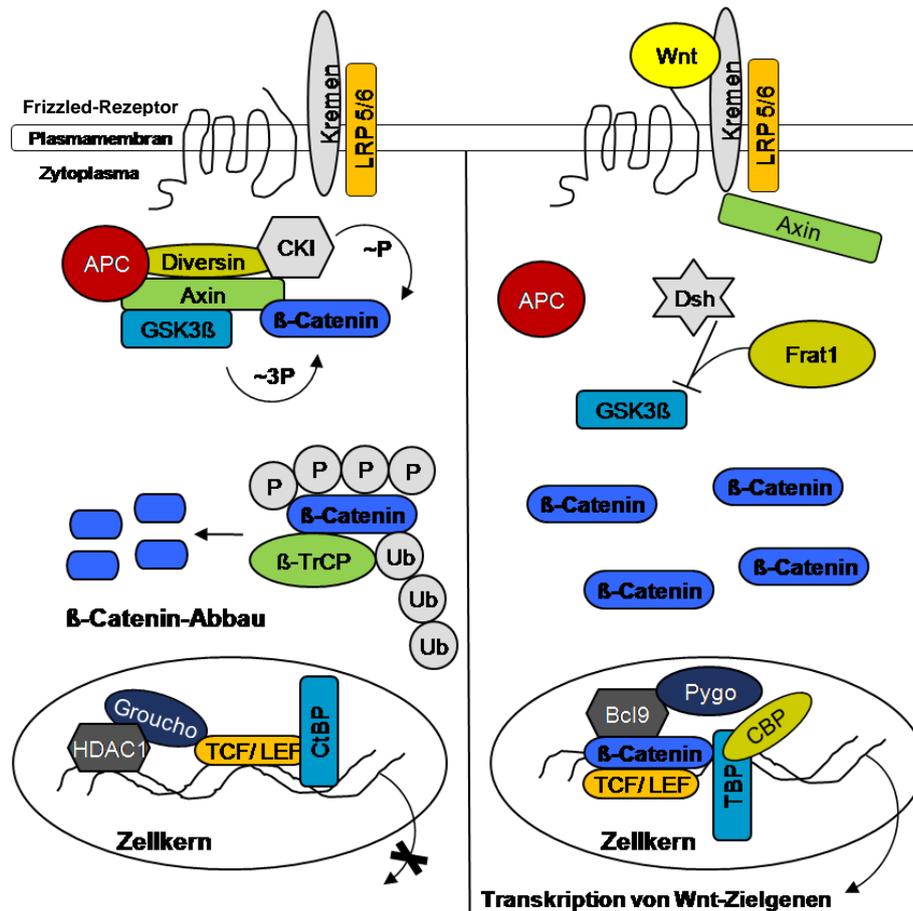


Abbildung 3: vereinfachte, schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs

(Abb. modifiziert nach {Roberts, 2007}) [links] In Abwesenheit von Wnt-Signalen, und somit von nukleärem β -Catenin, blockiert TCF/LEF (engl.: TCF: T-Cell Factor, LEF: Lymphoid Enhancer Factor) mit den Ko-Repressoren CtBP (engl.: Carboxy-terminal Binding Protein), TLE (engl.: Transducin-like Enhancer of split) und dessen Homolog Groucho, die Promotorbereiche der Wnt-Zielgene {Batlle et al., 2002}. [rechts] Mit Wnt-Signal und nukleärem β -Catenin, induziert der Komplex aus β -Catenin, TCF/LEF und verschiedenen Aktivatoren, wie Bcl9 und Pygopus, die Transkription von Wnt-Zielgenen {Kramps et al., 2002}.

Ohne Wnt-Signal liegt β -Catenin entweder an E-Cadherin gebunden oder zytosolisch vor. Der zytosolische Anteil an β -Catenin wird über einen Multiprotein-Komplex mit APC rasch abgebaut {Batlle et al., 2002}: ein „Proteinzerstörungskomplex“ aus APC,

Axin, sowie den Serin/Threonin-Kinasen GSK3 β (Glykogen Synthase Kinase 3 β) und CKI (Casein Kinase 1a oder ϵ), Diversin und F-Box-Protein β -TrCP (β -Transducin Repeat Containing Protein) phosphoryliert und ubiquityliert das zytosolische β -Catenin. Der Tumorsuppressor APC transportiert hierbei zusätzlich nukleäres β -Catenin ins Zytosol und gewährleistet die Bindung an dem Zerstörungskomplex {Neufeld, Zhang, Cullen, & White, 2000}. Der kanonische Wnt-Signalweg kontrolliert Differenzierung und Homoöstase im Darmepithel und ist ausserdem für die Stammzell-Funktion von entscheidender Bedeutung {Clevers, 2012}.

3.2.2 Inflammationsbedingte Tumorgenese

Neben zellautonomen molekulargenetischen Veränderungen in Krebszellen finden sich zunehmend alternative Modelle für die intestinale Tumorentstehung, die verstärkt auf die Rolle des Tumorstromas und des Immunsystems eingehen {Alcock, Stephenson, Royds, & Hammond, 2003}. Insbesondere die entzündungsbedingte Tumorgenese gewinnt stetig an Bedeutung, da die physiologische Inflammation über immunologische Prozesse das Karzinomrisiko nachweislich erhöht {Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008}. Bekannte Beispiele hierfür sind chronische Entzündungen mit dem *Hepatitis-C-Virus* oder dem *Helicobacter pylori* Bakterium, welche das Karzinomrisiko ihrer jeweiligen Zielorgane signifikant anheben {Schiffman, Castle, Jeronimo, Rodriguez, & Wacholder, 2007} {Peek & Blaser, 2002}. Dabei wird postuliert, dass es bei Zellschädigungen und Zellstress in Epithelien, vermittelt über den proinflammatorischen NF- κ B-Signalweg (*engl.: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer'*), zur parakrinen Ausschüttung von Zytokinen wie TNF α (*engl.: tumor necrosis factor alpha*) kommt. Dies führt zur Aktivierung von Immunzellen, die nun wiederum über den NF- κ B-Signalweg, verstärkt Entzündungsmediatoren ausschütten, was Zellüberleben und Tumorentstehung beschleunigen kann {Karin & Greten, 2005}. Zudem kann es über die Produktion von Sauerstoffradikalen (*engl.: ROS, reactive oxygen species*) durch Zellen des angeborenen Immunsystems zu DNA-Schäden und genetischen Veränderungen in Epithelzellen kommen. Entzündungsmediatoren wie Interleukin-6 sind trophisch wirksam und verursachen eine genetische Instabilität, wodurch das Risiko für Neoplasien steigt {Burstein & Fearon, 2008} {Popivanova et al., 2008}. Auf molekularer Ebene regulieren dabei TGF-beta (*engl. Transforming Growth Factor beta*) und konesktiv das IL6 tumorinfiltrierender T-Zellen die Aktivierung des proliferativ-wirksamen Transkriptionsfaktors STAT-3 (*engl. Signal transducer and activator of transcription 3*) in Tumorzellen.

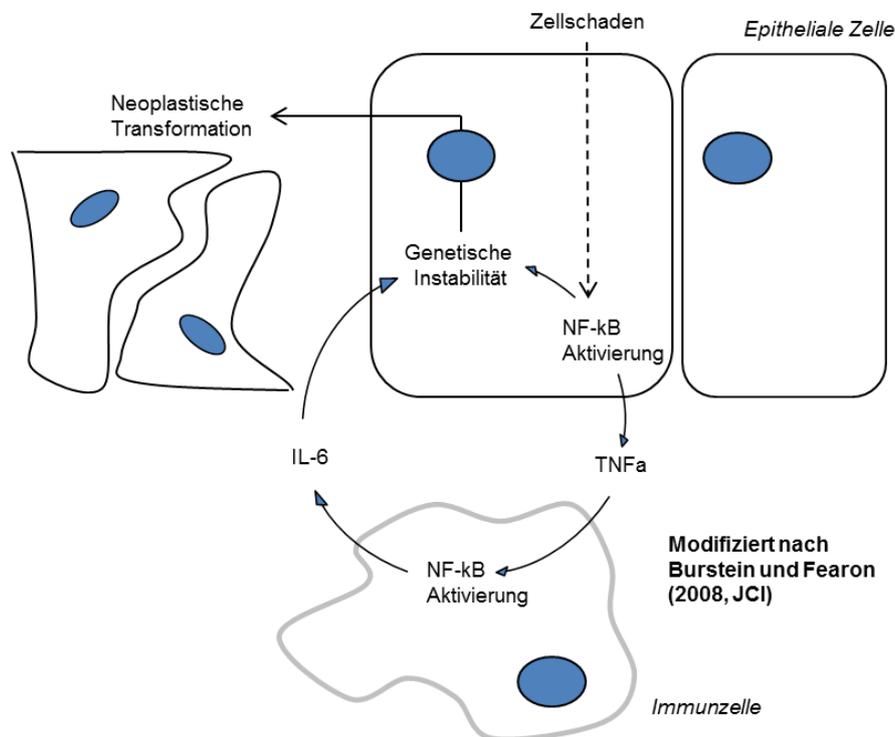


Abbildung 4: Schematische Darstellung der inflammationsbedingten Tumorentstehung

(Abb. der AG Janssen modifiziert nach {Burstein & Fearon, 2008}). Durch Zellschädigung kommt es zur NF- κ B-Aktivierung und einer daraus resultierenden Entzündungsreaktion, welche sich konsekutiv selbsterhält und genetische Instabilität verursacht.

Eine Inhibierung der TGF-beta abhängigen IL6-Signalgebung unterdrückte in-vivo die Tumorprogression {Becker, 2004}. Als gemeinsame „Endstrecke“ molekular-genetischer und inflammationsbedingter Tumorgenese kann deshalb die genomische Instabilität verstanden werden. Diese äußert sich in einer Mikrosatelliten-Instabilität (MIN) oder in einer chromosomalen Instabilität (CIN). Die MIN kommt bei 12% der sporadischen Kolorektaltumore vor und ist beim Kolonkarzinom mit einer guten Prognose korreliert {Nitsche, 2012}, wobei DNA-Reparaturgene von dieser genetischen Instabilität betroffen sind {Aaltonen et al., 1998}. Die CIN hingegen kommt bei 80% der sporadischen kolorektalen Tumore vor {Goel et al., 2004}. Tatsächlich nimmt die Entzündungsantwort in allen Stadien (Initiation, Promotion und Progression) der Karzinomentwicklung eine zentrale Rolle ein {Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008}. Klinische Befunden zeigen eine deutliche Erhöhung des kolorektalen Krebsrisikos bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa {Ekbohm, 1990}.

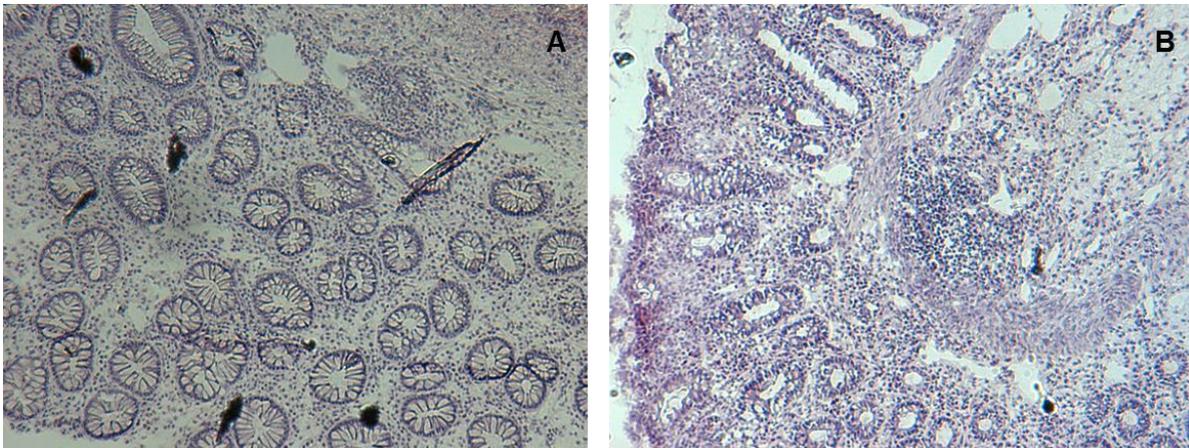


Abbildung 5: Morphologie des chronisch entzündeten humanen Kolons

Hämatoxylin/Eosin-gefärbte Gefrierschnitte von Kolongewebe (7 μ M), Vergrößerung 50-fach.

A. Colitis ulcerosa befallener Dickdarm mit Entzündungsinfiltrat in Mucosa und Submucosa. B. Morbus Crohn befallener Dickdarm mit transmuralen Entzündungsinfiltrat.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass nicht-steroidale Entzündungshemmer (NSAIDs) die Inzidenz von Kolonkarzinomen bei FAP-Patienten, die eine Keimbahnmutation in dem Tumorsuppressor APC tragen, senken {Schreinemachers, 1994}. Bei Integritätsverlust von Epithelien durch exogene oder endogene Noxen, kommt es durch Epithel- und Immunzellen zur Ausschüttung antiapoptotischer, proinflammatorischer, neovaskularisierender und proliferativer Chemokine und Zytokine. Diese Prozesse werden unter physiologischen Bedingungen auch in Organsystemen mit hohem Zellumsatz, wie etwa dem Gastrointestinaltrakt, beobachtet {Girling & Hedger, 2007}. Vergleicht man ferner die Mikroumgebung hochproliferativer Gewebe, chronischer Entzündungen und tumoröser Prozesse findet sich jeweils eine große Anzahl immunologischer Zellen, sowie eine hohe Konzentration wachstumsfördernder und antiapoptotischer Faktoren {Lin & Karin, 2007} {Beachy, Karhadkar, & Berman, 2004}. Bei der Konvergenz von Inflammation, Gewebsreparatur, Regeneration, Proliferation und Tumorgenese wird deutlich, dass der NF- κ B-Signalweg eine Schnittstelle darstellt. Neben chronischen Entzündungsprozessen wie der Colitis Ulcerosa, die zur „entzündungsassoziierten Tumorgenese“ führen, wird in der letzten Zeit auch ein Beitrag der Inflammation bei sporadischen Kolorektalkarzinomen diskutiert. Aktuell wird der Beitrag tumorinfiltrierender Lymphozyten für die Prognose bei soliden Tumoren diskutiert {Gooden, 2011} {Camus, 2009}. Neben dem adaptiven spielt auch das angeborene Immunsystem eine zentrale Rolle bei der Karzinogenese, wie im Folgenden ausgeführt wird.

3.3 Das Mustererkennungssystem als Teil des angeborenen Immunsystems

Das angeborene Immunsystem besteht stark vereinfacht aus zwei funktionellen Komponenten, dem Komplementsystem und dem Mustererkennungssystem. Das Komplementsystem besteht aus inaktiven Plasmaproteasen, sog. Zymogene, welche im Verlauf einer Kaskade durch proteolytische Spaltung aktiviert werden und eine Entzündungsreaktion initiieren {Riede, 2004}. Sie binden dabei an virale und bakterielle Oberflächenstrukturen, wodurch Pathogene opsoniert oder direkt durch einen aus Komplementfaktoren bestehenden Komplex lysiert werden. Das Mustererkennungssystem besteht aus Rezeptoren, die pathogen-assoziierte Strukturen identifizieren, aber im Vergleich zu den Antigenrezeptoren der adaptiven Immunantwort eine sehr eingeschränkte Spezifität aufweisen. Die Rezeptoren erkennen allerdings konservierte molekulare Muster, welche sich auf zahlreichen pathogenen Mikroorganismen wiederfinden und weisen deshalb ein breites Erkennungsspektrum auf. Diese repetitiven Muster werden allgemein als pathogen-assoziierte molekulare Muster (*engl.: pathogen-associated molecular patterns, PAMPS*) bezeichnet. Daneben werden auch endogene Liganden erkannt, die etwa von nekrotischen Zellen freigesetzt werden können, diese bezeichnet man als DAMPS (*engl.: danger-associated molecular patterns*), da sie auf mögliche Gefahren durch Zellstress reagieren. Die zugehörigen Rezeptoren des Abwehrsystems werden als Mustererkennungsrezeptoren (*engl.: pattern recognition receptors, PRR*) bezeichnet. Die Aktivierung eines PRRs erfolgt durch Bindung eines PAMPs und führt, neben erleichterter Phagozytose, zur Aktivierung intrazellulärer Signalproteine, welche die Transkription bestimmter Gene modulieren. Das Mustererkennungssystem umfasst zytosolische und membrangebundene Proteine, darunter das mannosebindende Lektin (= MBL), die Surfactant-Proteine A und D (SP-A und SP-D), den Makrophagen-Mannoserezeptor, den Scavenger-Rezeptor, die zytosolischen Proteine NOD1 und NOD2 (nukleotidbindungs-Oligomerisierungsdomänen 1 und 2) und die Toll-ähnlichen Rezeptoren (= toll-like Rezeptoren, TLR) {Akira, 2004} {Rakoff-Nahoum, 2009}. Letzteren wird, aufgrund der starken Konservierung in vielzelligen Organismen, ihrer Funktion und ihrer Signalwege eine besondere Bedeutung in der angeborenen Immunabwehr zugesprochen {Kaisho & Akira, 2000}. 1985 entdeckten *Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus et al.* die Toll-Gene in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*). 1996/97 wurde die wichtige Funktion der TLRs in der angeborenen Immunabwehr von *Bruce A. Beutler und Dr. Hoffmann* entdeckt, wofür sie 2011 den Nobelpreis für Medizin erhielten.

3.3.1 Charakterisierung Toll-ähnlicher Rezeptoren

Mensch und Maus besitzen gemeinsam 15 verschiedene TLR-Gene, die namentlich mit TLR1 bis TLR15 angegeben sind. Dabei kann der Mensch TLRs besitzen, welche die Maus nicht hat und umgekehrt. Man unterscheidet beim Menschen 10 funktionstüchtige und unterschiedliche TLR-Gene. Bei der Maus wurden 11 verschiedene TLR-Gene erforscht {Tabeta, 2004} {Chuang, 2000} {Du, 2000}. Phylogenetische Analysen zeigen, dass sich die Gruppe der TLRs in drei größere Unterfamilien gliedern lässt. Die Unterteilung beruht auf chemischen Unterschieden der jeweiligen Liganden {Roach et al., 2005}. Die TLRs 1, 2, 6 und 10 erkennen Lipide. Die TLRs 5 und 11 haben Proteine als Liganden, während die TLRs 3, 7, 8 und 9 Nukleinsäuren binden. Die subzelluläre Verteilung der TLRs spiegelt die chemische Natur ihrer Liganden wieder. So finden sich protein-bindende TLRs auf der extrazellulären Seite, während nukleinsäure-bindende TLRs in endozytotischen Kompartimenten zu finden sind {Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008}. Von dieser Einteilung ausgenommen ist der TLR4, welcher verschiedene Liganden, wie Fette, Proteine oder Zucker binden kann. TLRs, ob intra- oder extrazellulär, sind Transmembranproteine, deren wichtigstes Kennzeichen Mehrfachkopien eines leucinhaltigen Sequenzmotivs mit der Bezeichnung TIR (*engl.: Toll-like /IL1-Receptor domain*) sind. Die TIR-Domäne befindet sich auf der intrazellulären Seite des TLRs und ist auch in den Rezeptoren der Zytokine Interleukin-1 und Interleukin-18 zu finden, was die Nutzung ähnlicher Signalwege durch die Rezeptoren vermuten lässt {Akira & Takeda, 2004}. Die Bindung eines PAMP-Liganden durch einen TLR bewirkt eine Konformationsänderung im Rezeptor, die zur Dimerisierung führt. Daraufhin wird an der intrazellulär liegenden TLR-TIR-Domäne eine weitere, adapterprotein-assoziierte TIR-Domäne rekrutiert. Gegenwärtig sind fünf Adaptermoleküle bekannt: TIRAP (*engl.: TIR domain-containing adaptor protein*), TRIF (*engl.: TIR domain-containing adaptor protein including IFN- β*), TRAM (*engl.: TRIF-related adaptor molecule*), SARM/TRIF-1 (*engl.: sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein*) und MyD88 (*engl.: myeloid differentiation factor 88*) {O'Neill & Bowie, 2007}. Die TLR-Aktivierung führt, über die genannten Adapterproteine, zur Induktion von spezifischen Signalproteinen, wie der MAP-Kinasen (*engl.: mitogen-activated protein kinase*), der PI-3-Kinase (*engl.: Phosphatidylinositide 3-kinase*) oder NF- κ B (*engl.: nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*). Die gleichnamigen mehrstufigen Signalwege führen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und modulieren die Transkription diverser Gene, u.a. von Zytokinen und

Adhäsionsmolekülen, wodurch sie sich an der Regulation von Proliferation und Apoptose beteiligen.

TLR	Liganden (PAMPs)	Adaptermolekül	Signalweg
1	Multiple bakterielle Lipopeptide	MyD88/ MAL	ERK1/2, p38, JNK, NF-κB
2	HA, PLM, tGPI-Mutin, PG, LAM, LTA	MyD88/ TIRAP	ERK1/2, p38, JNK, NF-κB
3	dsRNA	TRIF	IFNβ
4	VSV-G, MMTV-G, GXM, LPS, HMGB1, GIPL, Mannan, DAMPS: Fibrinogen, , HSP	TRIF, TRAM, MyD88, TIRAP Ko-Rezeptoren: CD14, MD-2	ERK1/2, p38, JNK, NF-κB, IFNβ
5	Flagellin	MyD88	ERK1/2, p38, JNK, NF-κB
6	Zymosan, DALP, LTA	MyD88/ TIRAP	ERK1/2, p38, JNK, NF-κB
7	ssRNA	MyD88	ERK1/2, p38, JNK, NF-κB
9	Hämозoin, CpG-DNA	MyD88	ERK1/2, p38, JNK, NF-κB
10	unbekannt	MyD88	ERK1/2, p38, JNK, NF-κB

Tabelle 1: Übersicht wichtiger Toll-Like Rezeptoren (TLRs) mit ihren jeweiligen Liganden, Adaptermolekülen und nachgeordneten intrazellulären Signalwegen

Abkürzungen: CpG-DNA (unmethylierte Cytosin-phosphatidyl-Guanin-haltige DNA aus Bakterien); DALP (Diacyl-Lipopeptide), DAMP (engl.: damage associated molecular pattern), dsRNA (doppelsträngige RNA), GIPL (Glucosaminoglykan-Phospholipide), GXM (Glucuronoxylomannan), HA (Hämagglutinin), HMGB1 (high-mobility-group box 1), HSP (Hitzeschockprotein), LAM (Lipoarabino-Mannan), LPS (Lipopolysaccharid), LTA (Lipoteichonsäure), MMTV-G (engl.: mouse mammary tumor virus surface-glycoprotein), PG (Peptidoglycan), PLM (Phospholipo-Mannan), ss-RNA (einzelssträngige RNA), VSV-G (engl.: vesicular stomatitis virus-glycoprotein).

3.3.1.1 Intrazelluläre Signalwege der Toll-like Rezeptoren

Nach Bindung der MyD88-TIR-Domäne an die TLR-TIR-Domäne kommt es über die Todesdomäne des MyD88 zur Rekrutierung von IRAK Kinasen (*engl.: IL-1R associated kinases*). Abhängig vom beteiligten TLR (1, 2, 4 und 6) wird zuvor noch das Adaptermolekül TIRAP rekrutiert. IRAK mobilisiert das Protein TRAF-6 (*engl.: TNF receptor associated factor*), welches die Aktivierung von TAK-1 (*engl.: transforming growth factor β -activated kinase 1*), einer MAPKKK (*engl.: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase*), stimuliert. TAK-1 wiederum stimuliert dann IKK (*engl.: inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex*). Dabei phosphorylieren die I κ B-Kinasen des IKK das I κ Ba-Protein. Infolgedessen wird das I κ Ba-Protein aktiviert, polyubiquityliert und schliesslich in den Proteasomen abgebaut. Hierdurch wird NF- κ B (p50/RelA) aus dem I κ Ba-NF- κ B-Komplex freigesetzt. NF- κ B kann nun in den Kern translozieren und die Transkription von Genen modifizieren, {Chen, 2005}. TAK1 stellt eine „Gabelung“ in der TLR-induzierten Signaltransduktion dar. Es vermag neben NF- κ B den MAP Kinasen-Signalweg zu aktivieren, welcher wiederum zur Aktivierung der Transkriptionsfaktorfamilie AP-1 (*engl.: activating protein-1*) und Ets (*engl.: E twenty-six*) führt {Holtmann et al., 2001}. Die Nukleinsäure-bindenden TLRs 7, 8 und 9 können neben NF- κ B auch IRFs (*engl.: Interferon regulatory factors*) aktivieren. So wurde spezifisch für dendritische Zellen gezeigt, dass ein Proteinkomplex aus MyD88, IRAKs (*engl.: IL-1R associated kinase kinases*), TRAF-6 und IRF-7 (*engl.: Interferon regulatory factor 7*) die Produktion von IFN α induziert {Kawai et al., 2004}. TLR4 benötigt mehr als zwei Adaptermoleküle zur vollständigen Signaltransduktion. Es wird postuliert, dass dies durch seinen Liganden LPS (Lipopolysaccharid) bedingt ist. LPS ist der potenteste TLR-Aktivator und bedarf deshalb zusätzlicher Regulationsmechanismen. Kommt es zur infektionsbedingten Freisetzung von LPS im Körper, so wird es zuerst durch das Akute-Phase-Protein LBP (*engl.: LPS binding protein*) gebunden. Zur Aktivierung von NF- κ B über die Kinase IRAK benötigt TLR4 neben der Rekrutierung von MyD88 zusätzlich TIRAP. Des Weiteren bedarf TLR4 zur vollständigen Aktivierung die Ko-Rezeptoren MD-2 und CD14. Dieser MyD88-abhängige Signalweg führt zur Induktion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF α und IL6. Um mit TRIF (*engl.: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) zu interagieren muss TLR4 das Adaptermolekül TRAM (*engl.: Trif-related adapter molecule*) rekrutieren. Dieser MyD88-unabhängige Weg führt über TBK1 (*engl.: TANK binding kinase1*) und IRF-3 zur Expression IFN(Interferon)-induzierter Gene, welche hauptsächlich für Chemokine kodieren. Über TRIF und RIP1 wird ferner der NF- κ B-Signalweg aktiviert.

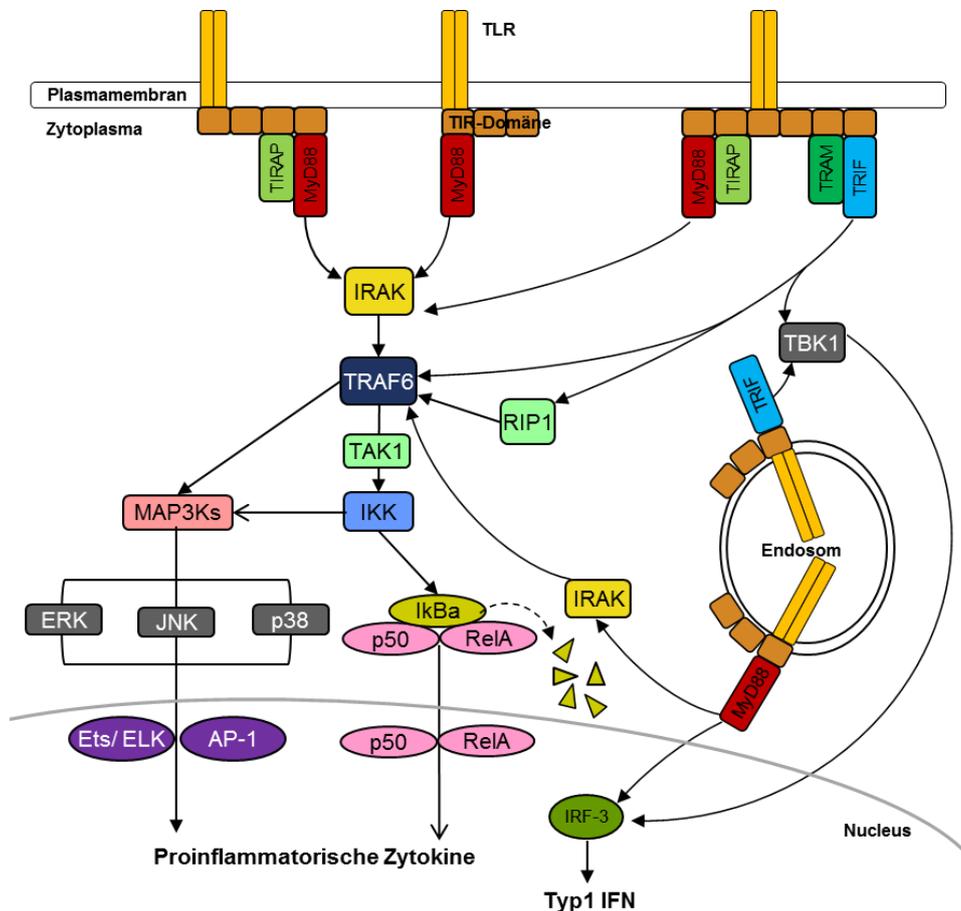


Abbildung 6: schematische Darstellung der TLR-Signalwege

(modifiziert nach {Kawai, 2010}) Details siehe Text. Abkürzungen: AP-1 (engl.: activating protein-1), Ets (engl.: E twenty-six), IKK (engl.: inhibitor of nuclear factor- κ B (κ B)-kinase complex), IRAK Kinasen (engl.: IL-1R associated kinases), IRF-3 (engl.: Interferon regulatory factor 3), TAK-1 (engl.: transforming growth factor β -activated kinase 1), TIRAP (engl.: toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein), TRAF-6 (engl.: TNF receptor associated factor), RIP1 (engl.: receptor-interacting protein 1).

Der MyD88-unabhängige TLR3-Signalweg nutzt das Adaptermolekül TRIF zur Signaltransduktion {Kawai, 2007} {Beutler, 2006}. Über TBK wird der Transkriptionsfaktor IRF-3 aktiviert und dimerisiert, was nach Translokation in den Kern zur Expression von IFN- β (Typ 1 Interferon) führt. IFN- β induziert autokrin über die IFN-Rezeptor-Kopplung die Expression weiterer Entzündungsmediatoren, führt aber auch zur Expression kostimulatorischer Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen.{Yamamoto et al., 2003}. TRIF kann ausserdem neben IRF-3 den NF- κ B-Signalweg über TRAF-6 aktivieren {Meylan et al., 2004}.

3.4 Mausmodelle für Kolorektalkarzinome

Das Mausgenom ist seit 2002 vollständig entschlüsselt {Nature 2002; 420:6915}. Seit 80 Jahren entwickelt die biomedizinische Forschung Mausmodelle mit experimentell induzierbarer Karzinogenese. Das Mausmodell bietet wegen seiner schnellen und reproduzierbaren Tumorinduzierung und der Existenz von genetisch definierten Modellen, die auf der Basis von homologer Rekombination die gezielte Inaktivierung von Genen (knock-out), bzw. einen gezielten Austausch von Allelen (knock-in) erlauben, eine gute Möglichkeit, um zentrale tumorbiologische Prozesse zu verstehen {Rosenberg, Giardina, & Tanaka, 2009}. Daher sollen im Folgenden, neben der in der vorliegenden Arbeit verwendeten transgenen Mausmodelle, etablierte Mausmodelle kolorektaler, tumorbiologischer Forschung vorgestellt und in der Diskussion berücksichtigt werden.

3.4.1 Das pVillin-Kras^{V12G}-Mausmodell

Da Kras, das am häufigsten mutierte Onkogen in humanen Kolonkarzinomen ist, wurde das pVillin-Kras^{V12G}-Mausmodell {Janssen et al., 2002} etabliert. Bei diesem Modell unterliegt die transgene Expression von Kras^{V12G} der Kontrolle einer 9kb großen regulatorischen Region des murinen *Villin* Gens, was zu einer selektiven Expression des humanen onkogenen Kras4B^{V12G} in allen Darmepithelzellen führt. Das pVillin-Kras^{V12G}-Mausmodell zeigt nach ca. 12 Monaten 2-3 Tumore pro Tier, wobei Adenome und invasive Karzinome vorrangig im Dünndarm gefunden werden und sich im Kolon vor allem ACF (*engl.: Aberrant Crypt Foci*) entwickeln. Im Gegensatz dazu zeigt ein transgenes Modell, das onkogenes Kras unter Kontrolle eines anderen Promotors, der keine Expression im Stammzellkompartiment, sondern nur in differenzierten Epithelzellen aufweist, keine Neoplasien im Darmtrakt {Coopersmith, 1997}. In diesen Mausmodellen ist die Inaktivierung von Apc für die Tumorgenese nicht erforderlich {Janssen, 2003} {Janssen,2005}

3.4.2 Mausmodelle mit mutiertem Apc-Allel

Die Apc^{Min}-Maus (MIN: multiple intestinal neoplasia) enthält eine „nonsense“ Mutation im Codon 850 und ist das erste beschriebene Mausmodell mit einer Mutation im Apc-Gen. Phänotypisch entwickeln die normal geborenen heterozygoten Mäuse, nach erfolgtem Verlust der Heterozygotie (LOH: loss of heterozygosity) und abhängig vom transgenen Hintergrund, bis zu 100 Adenome im Dünndarm und haben eine

verminderte Lebensspanne von ca. 150 Tagen {Su et al., 1992}. Das Apc^{Min}-Mausmodell weist allerdings Unterschiede zur Situation beim Patienten auf, da es überwiegend benigne Adenome im Dünndarm entwickelt, welche fast nie zum Karzinom fortschreiten. Im Anschluss entstanden verschiedene Apc-Knock-in Mauslinien, wie die Apc^{580D} {Shibata et al., 1997}, Apc^{Δ716} {Oshima & Taketo, 2002}, Apc^{1683N} {Fodde & Smits, 2001} und Apc^{1638T} {Smits et al., 1999}. Mit Ausnahme von Apc^{1638T}, fehlen den genannten Apc-Knock-in Mauslinien neben den sieben 20-Aminosäure-Wiederholungen und allen SAMP-Motiven (entscheidend für den β-Catenin-Abbau), auch die karboxy-terminale Domäne (entscheidend für die EB1- und Mikrotubulibindung) im Apc-Protein. Homozygotie dieser Apc-Mutationen führt noch während der Embryonalentwicklung zum Tod.

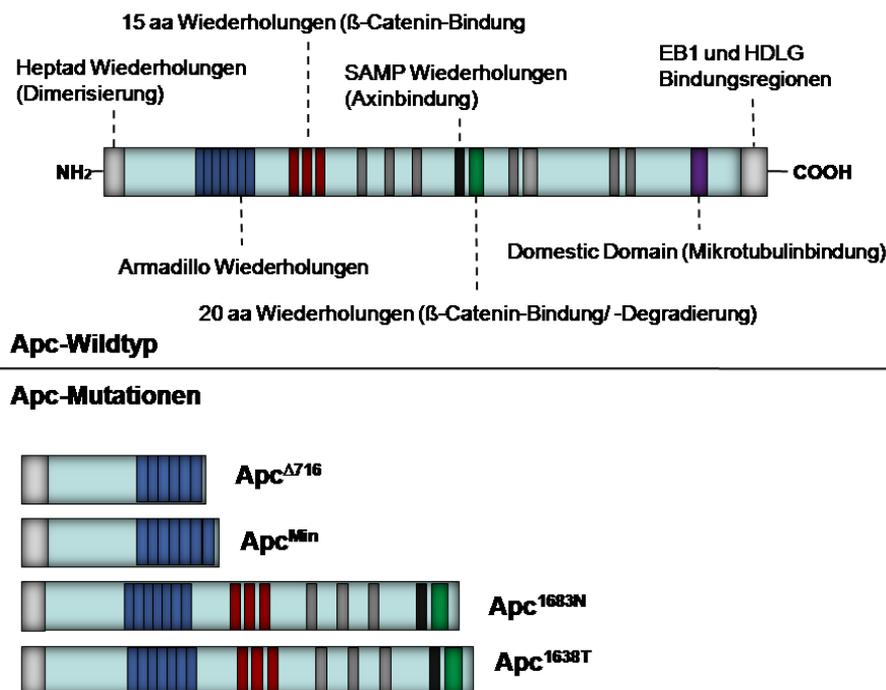


Abbildung 7: schematische Darstellung der Proteinstruktur des physiologischen Apc-Proteins, sowie truncierte Genprodukte, die von verschiedenen genetischen Mausmodellen produziert werden

(Abb., verändert nach Dr. R. Smits und Prof. R. Fodde, Univ. Rotterdam, Niederlande) Details siehe Text. Abkürzungen: SAMP (Serin, Threonin (=A), Methionin und Prolin), EB1 (end binding protein1) und HDLG (human homolog of the Drosophila lethal discs large-1 tumor suppressor).

Die humanen Apc-Mutationen befinden sich meist im letzten und größten Exon, dem Exon 15. Dies wurde in der Apc^{1683N} Maus rekapituliert, die eine, der Leserichtung des Apc-Genlokus entgegengesetzt-orientierte, Neomycinkassette an der Position

1638 des Apc-Gens enthält. Die Gesamtzahl der Läsionen pro Tier ist zwar deutlich geringer als bei der Apc^{Min}-Maus, dafür ist die Progression der Malignität deutlich erhöht. Das humane Adenom-Karzinom-Modell und die Vergleichbarkeit zur klinischen Situation wird mit diesem Modell also stärker berücksichtigt. Heterozygote Apc^{1683N} Mäuse weisen so eine stadienabhängige Tumorgenese und -progression auf. Sie entwickeln schrittweise aberrante Krypten, Polypen, Adenome und schließlich invasive Karzinome im Dünndarm, seltener auch im Kolon. Die phänotypischen Unterschiede aller Apc-Modelle sind auf die unterschiedliche Konzentrationen an transkriptionell aktivem β -Catenin im Nucleus zurückzuführen {Gaspar & Fodde, 2004}

3.4.3 Das RasApc-Modell

1) pVillin-Kras^{V12G} (Janssen et al., 2002)

- transgene Maus
- exprimiert onkogenes Kras im Darmepithel
- entwickelt 2-3 Tumore nach 20 Monaten

→ **Ras ist ausreichend, um die Tumorgenese zu initiieren**

2) Apc^{1638N} (Fodde et al., 1994)

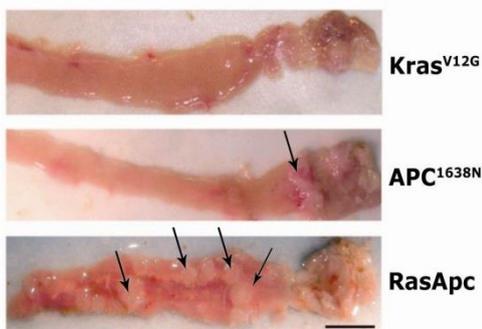
- Knock-in Maus
- exprimiert geringe Mengen von c-terminal deletiertem Apc
- entwickelt 5-6 Tumore nach 10 Monaten

→ **Modell für das FAP-Syndrom**

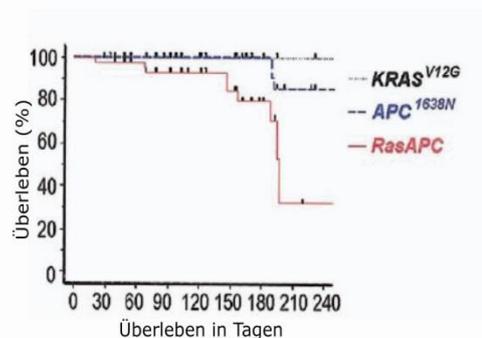
3) RasApc (Janssen et al., 2006)

- kombiniertes Mausmodell aus pVillin-Kras^{V12G} und Apc^{1638N}
- exprimiert onkogenes Kras und mutiertes Apc
- entwickelt 30 Tumore nach 6 Monaten

→ **Drastische Erhöhung der Tumorgenese und Sterblichkeit**



Janssen et al., 2006



Janssen et al., 2006

Abbildung 8: Mausmodelle für die kolorektale Tumorgenese

(Abb. der AG Janssen, Dissertation Rohde; 2007) Überblick verschiedener Mausmodelle, ihrer phänotypischen Eigenschaften und ihres Überlebens.

Die Kombination aus beiden Mausmodellen (Apc^{1638N} und $Kras^{V12G}$) führt im Vergleich zu den einfach-transgenen Modellen zu einer dramatischen Erhöhung der Mortalität, Morbidität, Tumorzahl und –progression. Verschiedene Befunde zeigen, dass diese Effekte durch eine synergistische Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in Zellen mit *KRAS* und *APC* Mutationen hervorgerufen werden {Janssen et al., 2006}.

3.4.4 Das $Myd88^{stp/stp}$ -Mausmodell

Dieses Mausmodell wurde in der Arbeit verwendet. In unveröffentlichten Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass eine globale *Myd88*-Defizienz einen protektiven Effekt aufweist, und zu stark reduzierter Tumorentstehung in den Modellen *pvillin-KrasV12G*, sowie *Apc1638N* führt {M. Martini und K.P. Janssen}. Um den Beitrag einzelner Zelltypen (Darmepithelzellen, Leukozyten oder andere Stromazellen) zur Tumorgenese untersuchen zu können, ist allerdings die Manipulation spezifischer Zelltypen in einem *in-vivo*-System erforderlich. Bei der konditionalen Mutagenese kann mit dem *Cre/loxP*-Rekombinationssystem, das auf einem Enzym aus dem Bakteriophagen P1 beruht, die Expression eines Gens zelltypspezifisch deletiert bzw. induziert werden. Dazu werden zuerst *loxP*-Erkennungssequenzen, die ein Gen oder eine definierte inserierte Sequenz (z.B. eine sog. „Stopp-Kassette“) flankieren, durch homologe Rekombination in das Genom eingeführt. Anschließend kann durch Kreuzung mit Mäusen, welche die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors exprimieren, die Zielsequenz zwischen den beiden *loxP*-Erkennungssequenzen deletiert werden. Auf diese Weise kommt es je nach Strategie zur Deletion oder Reexpression des Gens. Durch homologe Rekombination pluripotenter embryonaler Stammzellen wurden Mausstämme generiert, die eine Stopp-Kassette mit flankierenden *loxP*-Erkennungssequenzen im *MyD88*-Genlokus enthalten und selektiv in intestinalen Epithelzellen ($MyD88^{IEC}$) oder myeloiden Zellen ($MyD88^{myel}$) *MyD88* reexprimieren (Dissertation Gais; 2007) {Gais, 2012}.

3.4.5 Untersuchungen zur Rolle von TLRs bei der Tumorentstehung: Befunde aus Mausmodellen

Aufgrund der Evidenz, dass Immunantworten in allen Stadien der Tumorentwicklung beteiligt sind, rückt das angeborene Immunsystem auch zunehmend in den Fokus tumorbiologischer Forschung, was sich etwa in der neuen Fassung der „Hallmarks of

Cancer“ widerspiegelt {Hanahan, 2011} {Kinzler & Vogelstein, 1996}. Das TLR-System aktiviert über MAP-Kinase-Signalwege und vor allem über den NF-κB-Signalweg die Transkription inflammations-regulierender Gene. Das Adapterprotein MyD88 bezieht bei der Signaltransduktion der Rezeptoren eine zentrale Position. Neue Befunde, die vornehmlich an vorklinischen Maus-Modellen erhoben wurden, belegen eine tumorfördernde Rolle von MyD88 bei der Entstehung verschiedener Tumorentitäten. MyD88-Defizienz führte zu einer Reduktion von Fibrosarkomen und Hauttumoren, sowie zu einer reduzierten Tumorbildung bei chemisch ausgelöstem Leberkrebs {Swann, 2008} {Naugler, 2007}.

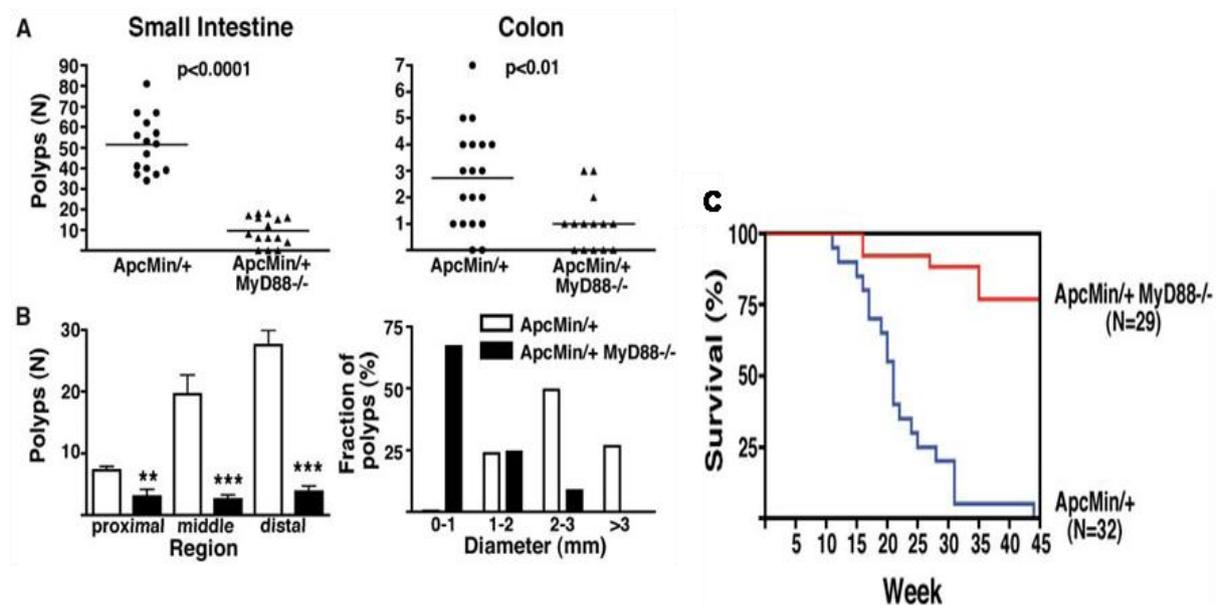


Abbildung 9: Einfluss eines Myd88-Knockouts auf die spontane intestinale Tumorgenese von $Apc^{Min/+}$ Mäusen

(Abbildung aus {Rakoff-Nahoum, 2007}) **A)** Gesamtanzahl von Polypen in Dünndarm und Dickdarm. **B)** Lage und Durchmesser der Polypen. **C)** Überlebenskurven der Mäuse

Um die Interaktionen des Wnt/β-Catenin-Signalweges und des TLR/Myd88-Signalweges bei spontaner intestinaler Tumorgenese besser zu verstehen, wurde ein transgenes $Apc^{Min/+}MyD88^{-/-}$ - Mausmodell entwickelt. Im Vergleich zu den parental $Apc^{Min/+}$ Mäusen, wiesen die $Apc^{Min/+}MyD88^{-/-}$ Mäuse mit globaler MyD88-Defizienz dramatische Unterschiede im Phänotyp und Überleben auf. Tumoranzahl und -durchmesser waren in $Apc^{Min/+}$ Mäusen in Dünndarm und Dickdarm deutlich erhöht, während das Überleben deutlich verkürzt war {Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2007}. Die gleiche Studie konnten einen ähnlichen pro-

tumorigenen Effekt von MyD88 auch bei chemischer Karzinogenese im Darmtrakt nachweisen. Eine Vielzahl von pro-inflammatorischen und tumorfördernden Zytokinen war in den MyD88-defizienten $Apc^{Min/+}$ Tieren stark verringert exprimiert. Eine Arbeit aus der Gruppe von Eyal Raz konnte unlängst anhand von Mausmodellen zeigen, dass die TLR/MyD88-abhängigen Signalwege die Tumorentstehung im Darmtrakt fördern. Dies wurde auf eine Aktivierung der MAPK-Kaskade in Tumorzellen zurückgeführt, die eine Stabilisierung des Proto-Onkogens cMYC bedingt {Lee, 2010}. Unklar ist hierbei, wie die TLRs im Apc^{Min} -Mausmodell stimuliert werden. In keimfrei gehaltenen Mäusen ist die Tumorzinzidenz von Apc^{Min} -Mäusen deutlich reduziert, was auf eine tumorfördernde Reaktion der TLRs auf kommensale Bakterien hindeutet {Dove, 1997}.

3.5 Klinische Befunde zur Rolle des Toll-like Rezeptor-Systems bei der kolorektalen Tumorgenese

Es gibt mittlerweile zahlreiche klinische Belege für einen Zusammenhang der Karzinogenese mit Entzündungsprozessen, die von TLRs vermittelt werden. Polymorphismen in TLR2 korrelieren mit dem Auftreten von Magen- und Prostatakarzinomen {Tahara, 2007} {Stevens, 2008}. Polymorphismen in TLR4 weisen einen signifikanten Zusammenhang mit dem klinischen Ansprechen nach Radio-, bzw. Chemotherapie bei Mammakarzinomen auf {Apetoh, 2007}. Mechanistisch spielt hier vermutlich das Protein HMGB1 (*engl.: high-mobility-group box 1*) eine zentrale Rolle, das von nekrotischen Tumorzellen nach der Chemotherapie freigesetzt wird. Als endogener „DAMP“-Ligand wird es durch den Rezeptor TLR4 auf dendritischen Zellen erkannt, was zur Stimulation MyD88-abhängiger Signalwege führt, welche die Prozessierung und Kreuzpräsentation von Tumorantigenen fördern, und so für eine effiziente anti-tumorale Immunreaktion erforderlich sind {Apetoh, 2007}. Im Vorfeld konnte bereits eine TLR4-Überexpression in Patienten mit kolorektalen Tumoren und CED nachgewiesen werden {Fukata et al., 2007}. Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) haben ferner eine erhöhte Inzidenz kolorektaler Karzinogenese {Burstein & Fearon, 2008}. Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen TLR1 und TLR2 Polymorphismen und der Entwicklung einer Pancolitis bei Patienten mit Colitis ulcerosa gezeigt werden {De Jager, 2007} {Pierik, 2006}. Die Krankheitsprozesse der Colitis ulcerosa beruhen vermutlich auf Störungen der epithelialen Barrierefunktion, so dass mikrobielle Produkte die Epithelschicht

durchdringen können, bzw. auf einer Fehlregulation des Immunsystems in der Kolonmukosa {Cho, 2008}. Die Mustererkennungsrezeptoren der TLR-Familie sind also wichtig, um die Toleranz des mukosalen Immunsystems gegen kommensale Mikroorganismen, sowie die Integrität der Mukosa-Barriere zu gewährleisten. Ferner wurde erschlossen, dass eine TLR4-Stimulation mit LPS die Expression des Chemokins CXCR7 erhöht und in humanen Tumorzelllinien somit Proliferation, Migration und Apoptose beeinflusst. Dabei wurde auch gezeigt, dass das Expressionsniveau von CXCR7 und TLR4 mit der Tumorgroße und Lymphknotenmetastasierung positiv korreliert {Xu et al., 2011}. Für den TLR3 konnte bei Jugendlichen gezeigt werden, dass in Gewebeproben des hamartomatösen Polyposis-Syndroms die Expression, im Vergleich zu juvenilen Polypen, reduziert ist. Bei Erwachsenen hatten zudem Adenome eine höhere TLR3-Expression als entsprechende Adenokarzinome. Diese Beobachtungen lassen eine Deregulation der TLR3-Expression, im Sinne einer Reduktion mit steigender Malignität, vermuten {Xiang, 2012}. Für die TLRs 2, 3 und 4 konnte dargestellt werden, dass Einzelnukleotid-Polymorphismen im Zusammenhang mit Lebensgewohnheiten, wie Ernährung mit gesättigten Fettsäuren und Kohlenhydraten oder auch Zigarettenkonsum das Risiko von Kolorektalkarzinomen negativ beeinflusst, wohingegen die Einnahme von NSAIDs (nicht-steroidale Antirheumatika, *engl. Non-steroidal anti-inflammatory drugs*) protektiv wirkte. Postuliert wird hierbei, dass eine TLR-vermittelte Entzündungsantwort Einfluss auf die Entwicklung kolorektaler Karzinome hat {Slattery, 2012}. Weiter konnte eine Korrelation von TLR4, MyD88 und der Prognose des kolorektalen Karzinoms (CRC) dargestellt werden. Dabei zeigte sich mit steigender Malignität und Mortalität von CRC, eine Expressionszunahme von TLR4 und MyD88. Entsprechend wurde eine Expressionszunahme von TLR4 und MyD88 in Metastasen und soliden Karzinomen im Vergleich zu Adenomen und Normalgewebe nachgewiesen {Wang et al., 2010}. Eine weitere Studie zeigt, dass bei Patienten mit Kolorektalkarzinomen ein "loss of function" Allel von TLR4 zwar nicht häufiger vorkommt als in gesunden Probanden, allerdings innerhalb der Gruppe der Tumorpatienten mit reduziertem Überleben korreliert ist {Tesniere, 2010}. Die Frage, ob und welche Aktivierung des TLR-Systems eine hemmende oder fördernde Wirkung auf Tumoren hat, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar. Die Antwort scheint einerseits vom Zellkontext, sowie andererseits von der Art des TLR abzuhängen. Eine TLR-Aktivierung, alleine oder in Kombination mit Radio- oder Chemotherapie, scheint die tumorlimitierende Kapazität des Immunsystems zu fördern und wird als neuartige Tumorthherapie diskutiert {Apetoh, 2007}.

4 Problemstellung

Toll-like Rezeptoren, deren Adapterproteine und Signalwege beziehen eine zentrale Position in der angeborenen Immunantwort. Aufgrund der Assoziation von chronischer Entzündung und Tumorgenese ist in den letzten Jahren klar geworden, dass TLR- und MyD88-abhängige Signalwege nicht nur bei der antimikrobiellen Immunabwehr eine Rolle spielen, sondern auch bei der Tumorentstehung als zentrale Akteure zu betrachten sind. Dies wird einer TLR-vermittelten Aktivierung entzündungs-modulierender Transkriptionsfaktoren zugesprochen, wie etwa AP-1, IRF-3 und vor allem NF- κ B. Aktuelle Befunde aus der Literatur, sowie laboreigene Vorarbeiten zeigen, dass das Adapterprotein MyD88 eine kritische tumorfördernde Rolle in der intestinalen Tumorgenese spielt. So konnte in MyD88-defizienten Mäusen, sowohl die Anzahl und der Durchmesser von Darmtumoren, als auch die Sterblichkeit der Mäuse signifikant gesenkt werden. Untersuchungen von humanen Kolonkarzinomen zeigen eine positive Korrelation der TLR4- und MyD88-Ausprägung mit Tumorgöße und Lymphknotenmetastasierung. Ausserdem war eine erhöhte Expression von TLR4 und MyD88 mit einer schlechteren Prognose korreliert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Metastasen und Karzinome höhere Expressionsniveaus von TLR4 und MyD88 aufweisen als benigne Adenome und Normalgewebe {Wang et al., 2010}. Die Ausprägung weiterer TLRs in humanen Kolonkarzinomen, sowie ihre prognostische Bedeutung sind allerdings noch weitgehend unklar.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Ausprägung verschiedener Toll-like Rezeptoren, sowie ihres Adapterproteins Myd88 in humanen Tumorproben aus der Chirurgischen Klinik der TUM zu quantifizieren und stadienabhängig (UICC I-IV) zu vergleichen, um mit Hilfe statistischer Verfahren prognostische Aussagen in Abhängigkeit der Expressionsniveaus treffen zu können.

Hierzu sollte zunächst die Quantifizierung anhand von etablierten Zellreihen aus humanen Kolorektalkarzinomen durchgeführt werden. Zudem sollten dabei die TLRs (2, 3, 4, 9) selektiv mit ihren jeweiligen Liganden in vitro stimuliert werden. Dieser Teil der Arbeit sollte einen Einblick über die TLR-Expressionsprofile isolierter Tumorzellen liefern, und den Einfluss der einzelnen TLR-Stimulationen auf die funktionelle Aktivierung der Kolonkarzinom-Zellen beleuchten.

Die Arbeiten an humanen Zelllinien und Patientenproben wurden um Untersuchungen an einem neuartigen vorklinischen Mausmodell, das eine gewebespezifische Ausprägung von Myd88 in Tumorzellen oder Makrophagen erlaubt, ergänzt. Die TLR und MyD88-Quantifizierung sollte mit Gewebeproben verschiedener transgener Mausmodelle (MyD88^{IEC}, MyD88^{myel}, MyD88^{stp/stp}) durchgeführt werden, um so den Einfluss des Adapterproteins MyD88 auf die TLR-Expression zelltypspezifisch vergleichen zu können. Zudem wurde die biologische Funktionalität des Adapterproteins anhand von ex vivo Stimulationsversuchen mit Gewebeexplantaten transgener Mäuse überprüft.

Ziel der Arbeit war es, Aussagen über das Expressionsprofil, Expressionsniveau und die Funktionalität der TLRs (2, 3, 4, 9) und des Adapterproteins MyD88 im Zusammenhang mit der kolorektalen Tumorgenese treffen zu können.

5 Material

5.1 Geräte und technisches Zubehör

7300 Real Time PCR System	<i>ABI, Foster City, USA</i>
Brutschränke	<i>Heraeus, Hanau</i>
ELISA Waschgerät	<i>STL, Crailsheim</i>
MRX Microplate Reader	<i>Dynatech Lab, El Paso, Texas</i>
Gel Doc XR System	<i>Bio Rad, München</i>
Elektrophoresekammer (Agarosegele)	<i>Fischer Scientific, Ulm</i>
Innova 4230 incubator shaker	<i>New Brunswick. Edison, USA</i>
Kryostat	<i>Leica, Wetzlar</i>
Lightcycler 480	<i>Roche, Mannheim</i>
Mikroskope (Axiolab)	<i>Zeiss, Jena</i>
Rotationsrad, Mixing Rotor	<i>Renner, Darmstadt</i>
NanoDrop [®] ND-1000	<i>Nanodrop Techn., Montchanin, USA</i>
Power Pack P25	<i>Biometra, Göttingen</i>
pH-Meter	<i>Inolab pH Level 1, WTW, Weilheim</i>
Pipetten (Research)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Reinstwasseranlage	<i>Millipore, Eschborn</i>
Schüttler	<i>Memmert, Schwabach</i>
Sterilbank	<i>Kendro Laboratory, München</i>
T3 Thermocycler	<i>Biometra, Göttingen</i>
TissueLyser II	<i>Qiagen, Hilden</i>
Vortexer	<i>Scientific Industries, New York, USA</i>
Waagen	<i>Sartorius, Göttingen</i>
Wasserbäder	<i>Memmert, Schwabach</i>
Zentrifugen	<i>Heraeus, Hanau</i>

5.2 Chemikalien / Reagenzien

Agarose	<i>Invitrogen</i> , Leek, NL
β -Mercaptoethanol	<i>Merck</i> , Darmstadt
CpG-Dinukleotid 2216	<i>TIB</i> , Berlin
Chloroform	<i>Merck</i> , Darmstadt
Diethylether	<i>Merck</i> , Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	<i>Sigma-Aldrich</i> , Stammheim
Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
Desoxynukleotide (dNTPs)	<i>Fermentas</i> , St. Leon-Rot
Eosin Y	<i>Sigma-Aldrich</i> , Stammheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Ethanol	<i>Merck</i> , Darmstadt
Ethidiumbromid	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Eukitt	<i>Kindler</i> , Freiburg
Fötale Kälberserum (FKS)	<i>Biochrom</i> , Berlin
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	<i>Fermentas</i> , St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	<i>Fermentas</i> , St. Leon-Rot
Gentamycin	<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe
Glycin	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Hämatoxylin	<i>Sigma-Aldrich</i> , Stammheim
Hepes	<i>Biochrom</i> , Berlin
Insulin	<i>Novo Nordisk</i> , Dänemark
Isofluran	<i>Abbott</i> , Wiesbaden
Isopropanol	<i>Klinikumsapotheke</i> , München
Kaliumchlorid	<i>Roth</i> , Karlsruhe
L-Glutamin	<i>Biochrom</i> , Berlin
Lipopolysaccharid (LPS) (<i>Salmonella minnesota</i>)	<i>List Biolog. Laboratories</i> , USA
Magnesiumchlorid	<i>Sigma-Aldrich</i> , Stammheim

Natriumacetat	<i>Sigma-Aldrich, Stammheim</i>
Natriumazid	<i>Sigma-Aldrich, Stammheim</i>
Natriumchlorid	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Natriumdodecylsulfat (SDS)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Natronlauge	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Oligo-dT Primer	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
Orange G	<i>Sigma-Aldrich, Stammheim</i>
Pyridin-2-Aldoxin-Methiodid-3-Cystein (Pam3Cys)	<i>EMC, Tübingen</i>
Polyinosinic:Polycytidylic Säure (Poly I:C)	<i>Sigma-Aldrich, Stammheim</i>
Penicillin/Streptomycin	<i>Biochrom, Berlin</i>
Proteinase K	<i>Sigma-Aldrich, Stammheim</i>
Random Primer	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
Reverse Transkriptase	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
RNase Inhibitor (Riboblock)	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
HCl (Salzsäure)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Schwefelsäure	<i>Roth, Karlsruhe</i>
SybrGreen PCR Master Mix	<i>Eurogentec, Belgien</i>
Taq-Polymerase	<i>Fermentas, St. Leon-Rot</i>
Trireagenz	<i>Sigma-Aldrich, Stammheim</i>
Tris	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Trypsin/EDTA	<i>PAA, Pasching, A</i>
Tween 20	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Xylol	<i>Hedinger, Stuttgart</i>

5.3 Stammlösungen und Medien

In Klammern sind Konzentrationen der einzusetzenden Stocklösungen angegeben:

DNA-Auftragspuffer (6x)

- 1 ml 10x TAE
- 1 ml Orange G (10 mg/ml)
- 5 ml Glycerin
- 3 ml H₂O_{dd}

IEC-Lysepuffer (IEC: Intestinale Epithelzellen)

- 1,3 ml NaCl (5M)
- 5 ml EDTA (100mM)
- 1 ml HEPES (0,5M)
- 5 ml FCS
- 50 µl DTT (1M)
- 37,7 ml H₂O_{dd}

IEC-Waschpuffer

- 1,5 ml NaCl (5M)
- 50 µl DTT (1M)
- 48,5 ml H₂O_{dd}

Main-Culture-Medium

- 40 ml DMEM
- 10 ml FKS
- 500 µl Penicillin/Streptomycin
- 500 µl Glutamin
- 500 µl Gentamycin

- 500 µl Antibiotic/Antimycotic
- 125 µl Insulin
- 10 µl EGF (50 µg/ml)

Mouse-Tail-Lysis Puffer

- 0,1 M NaCl
- 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 0,5% SDS
- 5 mM EDTA
- mit H₂O_{dd} ansetzen

PBS (phosphatgepufferte NaCl-Lösung)

- 137 mM Natriumchlorid
- 2,7 mM Kaliumchlorid
- 9 mM Dinatriumdihydrogenphosphat
- 2,3 mM Kaliumdihydrogenphosphat
- mit H₂O_{dd} ansetzen
- 7,4 pH-Wert mit HCL einstellen

50x TAE

- 2 M Tris, pH 8
- 0,5 M Eisessig
- 50 mM EDTA

TE-Puffer (TNE-Puffer)

- 10 mM Tris, pH 7.5
- 1 mM EDTA, pH 8.0
- (100 mM NaCl)

5.4 Reagenzienkits

Quantikine mIL6 Immunoassay	<i>R&D, Minneapolis, USA</i>
Quantikine m TNF α Immunoassay	<i>R&D, Minneapolis, USA</i>
Quantikine h TNF α Immunoassay	<i>R&D, Minneapolis, USA</i>
Quantikine hIL6 Immunoassay	<i>R&D, Minneapolis, USA</i>
QIAquick PCR Purification Kit	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
SYBR [®] Gene Polymerase Kit	<i>ABI, Foster City, USA</i>
RNeasy Mini Kit	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>
RNase free DNase Set	<i>Qiagen GmbH, Hilden</i>

5.5 Andere Verbrauchsmaterialien

Kanülen	<i>B. Braun, Melsungen</i>
MicroSpin S-200HR columns	<i>GE Healthcare, München</i>
Plastikwaren	<i>FALCON, Heidelberg</i>
Spritzen	<i>BD, PharMingen, SanDiego, USA</i>
Sterilfilter	<i>Satorius, Göttingen</i>
Superfrost Objektträger	<i>Menzel, Braunschweig</i>

5.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (München) hergestellt. Sie sind in 5'=> 3' Richtung angegeben. Die Größe des PCR-Produkts ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

5.6.1 Primer zur Genotypisierung der Mausstämme

Oligoname	Sequenz (5' => 3')	Größe (in bp)
MyD-Ex1-sense	ctagccttggcatattaatcttg	824 (wt-Allel)
MyD-Intron1-antis.	gaagggtgtagaggctcctc	
MyD-Ex1-sense	ctagccttggcatattaatcttg	900 (1 loxP-Allel)
MyD-Stop-antis.	ctgaagaggagtttacgtccag	
Villin-Cre 198 as	cgcgaaacatcttcaggttct	200
Villin-Cre 2kb seq	caagcctggctcgacggcc	

Tabelle 2: Liste der für PCR verwendeten Oligonukleotide (für murine DNA)

5.6.2 Primer für qRT-PCR (human)

Oligoname	Sequenz (5' => 3')	Größe (in bp)
HPRT-sense	cgagcaagacgttcagtcct	69
HPRT-anti.	tgaccttgattatcttgcataacc	
MyD88-sense	ctgctcgagctgcttacca	81
MyD88-anti.	cttttgcaatcctcctcaa	
TLR2-sense	cgttctctcaggtgactgctc	63
TLR2-antis.	cctttggatcctgcttgc	
TLR3-sense	agagttgtcatcgaatcaaattaaag	63
TLR3-antis.	aatctccaattgcgtgaaaa	
TLR4-sense	ctctcctgcgtgagaccag	74
TLR4-antis.	tccatgcattgataagtaattagga	
TLR9-sense	tgtgaagcatcctccctgta	113
TLR9-antis.	gagagacagcgggtgcag	
IL8-sense	agacagcagagcacacaagc	119
IL8-antis.	cacagtgagatggttcctcc	

Tabelle 3: Liste der für RT-PCR verwendeten Oligonukleotide (humaner mRNA)

5.6.3 Primer für qRT-PCR (murin)

Oligoname	Sequenz (5' => 3')	Größe (in bp)
TF2D-sense	cggtcgcgctcattttctc	78
TF2D-anti.	gggttatcttcacacacccatga	
MyD88-sense	tggccttgtagaccgtga	98
MyD88-anti.	aagtatttctggcagtcctcctc	
TLR2-sense	ggggcttcacttctctgctt	111
TLR2-anti.	agcatcctctgagattgacg	
TLR3-sense	gatacagggattgcacccata	77
TLR3-anti.	tccccaaaggagtacattaga	
TLR4-sense	ggactctgatcatggcactg	101
TLR4-anti.	ctgatccatgcattggtaggt	
TLR9-sense	gaatcctccatctccaacat	92
TLR9-antis.	ccagagtctcagccagcact	
KC-sense	agactccagccacactccaa	107
KC-anti.	tgacagcgcagctcattg	
COX-2-sense	gatgctcttccgagctgtg	96
COX-2-anti.	ggattggaacagcaaggattt	

Tabelle 4: Liste der für qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide. Die aufgeführten Oligonukleotide dienen der Bindung muriner mRNA

5.7 Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Organsystem	Morphologie
SW480	Homo sapiens	Kolon	epithelial
SW620	Homo sapiens	Kolon-Lymphknoten	epithelial
DLD1	Homo sapiens	Kolon	epithelial
HT29	Homo sapiens	Kolon	epithelial

Tabelle 5: Liste der in der Arbeit verwendeten humanen Zelllinien

Alle Zellen sind epithelialen Ursprungs und entstammen Adenokarzinomen des Kolons

5.8 Patientenkollektiv

Gesamtes Kollektiv	n=55	[100%]
Geschlecht (n[%])	Männlich (33[60])	Weiblich (22[40])
Alter (MW)	67,03 Jahre	59,31 Jahre
(Spanne)	23-88 Jahre	34-87
UICC Stadium	[n]	Prozent
Stadium I	10	18,2
Stadium II	26	47,3
Stadium III	10	18,2
Stadium IV	9	16,4

Tabelle 6: Übersicht des Patientenkollektivs mit Anzahl und Stadiumverteilung UICC-klassifizierter Tumorproben

Untersucht wurden 55 verschiedene Tumorproben. Nicht aufgeführt sind jeweils 9 Proben Normal- und Lebermetastasengewebe, welche von den 9 Patienten im UICC-Stadium IV stammen. Details zur UICC-Klassifikation sind dem Anhang (Kapitel 12.1) zu entnehmen.

Das gesamte Kollektiv umfasste 55 Patienten. Alle Patienten wurden an der Chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU München zwischen 1987 und 2011 operiert. Durchschnittlich waren sie 63,17 Jahre alt und ihre

Krankengeschichte wurde bis 205,2 Monate nach der Operation verfolgt. Die Spannweite betrug hierbei 3,4 bis 205,2 Monate. Keiner der 55 Patienten litt an einem Zweitkarzinom oder einem multizentrischen Auftreten des Karzinoms. Der Resektionsstatus war, mit einer Ausnahme, bei allen Patienten R0. Weiterhin hatte keiner der Patienten eine neoadjuvante Vorbehandlung erhalten. Während der Patientennachsorge wurden sowohl der TNM Status, als auch der R-Status, die Lymph- und Blutgefäßinvasion sowie die Gesamtzahl aller entnommenen und aller positiven Lymphknoten erfasst.

5.9 Versuchstiere

Die Mäuse wurden alle in der SPF-Einheit (spezifiziert pathogenfrei) des Zentrums für präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar (ZPF/MRI) der Technischen Universität München gezüchtet und gehalten.

Mausstamm	Eigenschaft	Herkunft
C57BL/6N	Wildtyp	Charles River, Wilmington, USA
MyD88 ^{-/-}	Knock-out im <i>myeloid differentiation primary response gene 88</i> (MyD88)	Shizuo Akira, Osaka, Japan
MyD88 ^{stp/stp}	Stopp-Kassette mit flankierenden loxP-Sequenzen im MyD88 Genlokus	TUM, München, Deutschland Gais et al. J. Immu. 2012
MyD88 ^{IEC}	Stopp-Kassette im MyD88 Genlokus mit Reexpression in Enterozyten, durch Einkreuzen von pvillin-Cre	TUM, München, Deutschland Gais et al. J. Immu. 2012
MyD88 ^{Myel}	Stopp-Kassette im MyD88 Genlokus mit Reexpression in myeloiden Zellen, durch Einkreuzen von LysM-Cre	TUM, München, Deutschland Gais et al. J. Immu. 2012

Tabelle 7: Liste der in der Arbeit verwendeten Mausstämme

Die Mausstämme besitzen alle den genetischen Hintergrund C57BL/6N

6 Methoden

6.1 Tierversuche

6.1.1 Organentnahme

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet, nachdem sie mit Diethylether bzw. Isofluran betäubt wurden. Die jeweiligen Organe wurden nach Desinfektion des Operationsgebietes mit 70% EtOH entnommen und anschliessend mit PBS gewaschen. Die hierfür verwendeten Instrumente wurden ebenfalls mit 70% EtOH desinfiziert.

6.1.2 Gewinnung einer Mausschwanz-Biopsie

Die Biopsiegewinnung erfolgte in den ersten zwei Wochen post partum. Hierzu wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert. Die Biopsientnahme erfolgte durch Abschneiden eines 0,5 cm langen Stücks der Mausschwanzspitze.

6.2 Zellbiologische Methoden

6.2.1 Ex-Vivo-Organkultur

Um Organkulturen anzulegen, wurde Normalgewebe der Maus entnommen und in 37°C warmen PBS-Puffer gewaschen, wobei Hohlorgane wie Dick- und Dünndarm zuvor aufgeschnitten wurden. Die gewünschten Organe wurden anschliessend jeweils in 2 ml 37°C warmen Main-Culture-Medium (2.6.) aufgenommen. Die Organkulturen wurden über 24 h bei 37°C, 7% CO₂ und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre im Brutschrank kultiviert.

6.2.2 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 7% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und

spätestens bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Das Umsetzen der Zellen erfolgte durch Ablösen mittels Trypsin/EDTA. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in der gewünschten Dichte im Medium aufgenommen und ausgesät. Das Auftauen, Einfrieren und Passagieren der Zellen erfolgte nach Standardprotokollen.

6.2.3 Isolation intestinaler epithelialer Zellen (IEC) aus Mausgewebe

Um spezifischere Aussagen über Enterozyten treffen zu können, wurden diese aus ihrem Epithelverband gelöst und isoliert. Hierzu wurde der entnommene Maudarm zuerst in Dick- und Dünndarm getrennt, aufgeschnitten und jeweils in 37°C warmen PBS gereinigt. Es folgte ein zweiter Waschschrift in 50 ml 37°C warmen IEC-Waschpuffer (siehe 2.6). Dick- und Dünndarm wurden dann jeweils in 25 ml 37°C warmen IEC-Lysepuffer (siehe 2.6) für 45 min bei 37°C in einem neuen Reaktionsgefäß konstant geschüttelt. Durch das enthaltene EDTA wurden Calcium-Kationen gebunden und damit die Funktion von Adhäsionsmolekülen (E-Cadherin) gehemmt, was eine Ablösung durch rotations-bedingte Scherkräfte erleichterte. Im Anschluss wurde der verbliebene Darm verworfen und das Reaktionsgefäß bei RT mit 1500 RpM für 4 min zentrifugiert. Zuletzt wurde der entstandene Überstand ebenfalls verworfen und das gewonnene Zellpellet in entsprechenden Puffern für anschließende biochemische oder molekularbiologische Experimente resuspendiert und bei -80°C oder -20°C gelagert. *(Belastbare Ergebnisse konnten mit dieser Methode leider nicht realisiert werden)*

6.3 Molekularbiologische Methoden

6.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz-Biopsie

Die Mausschwanzproben wurden über Nacht in 250 µl Mouse-Tail-Lysis-Puffer und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 56°C im Rotationsrad verdaut. Daraufhin erfolgte ein Zentrifugationsschrift für 10 Sekunden bei 15.000 RpM. Anschließend wurde die DNA-haltige wässrige Phase des Ansatzes abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein Volumen Isopropanol hinzugefügt. Es folgte ein weiterer 25 minütiger Zentrifugationsschrift bei 10.000 RpM bei 4°C. Der Überstand wurde abgesaugt und das weiße Pellet mit 70%-igem Ethanol gereinigt. Nachdem das Pellet durch Evaporation getrocknet war, wurde es in 500 ml TE-Puffer resuspendiert.

6.3.2 Ethanol-DNA-Fällung

Um DNA umzupuffern oder zu konzentrieren wurde die Ethanolfällung standardmäßig verwendet. Dafür wurde einem Ansatz 2,5 Volumina 100%-iges Ethanol und 0,1 Volumina 3 M Natriumacetat zugegeben. Der Ansatz inkubierte dann für 2 h bei -20°C . Durch 25 minütige Zentrifugation bei 4°C und 14.000 RpM entstand aus der gefällten DNA ein Pellet, so dass der Überstand abgenommen werden konnte. Das DNA-Pellet wurde mit 600 μl -20°C -kaltem und 70%-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14.000 RpM wurde der Überstand verworfen. Bevor das Pellet im gewünschten Puffer oder Volumen resuspendiert werden konnte, wurde es durch Evaporation kurz angetrocknet.

6.3.3 RNA-Isolation

Bei der Bearbeitung von RNA wurden RNase-freie Lösungen, Pippettenspitzen, Reaktionsgefäße und Geräte verwendet. Zur Denaturierung von eventuell vorhandenen RNAsen wurden Geräte vor ihrem Gebrauch entweder mit einer 3%igen H_2O_2 -Lösung, oder mit einer 1M NaOH vorbehandelt.

Die RNA wurde aus Geweben oder Zelllysaten gewonnen, welche zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden. Das Gewebe wurde anschließend im gefrorenen Zustand abgewogen.

6.3.3.1 RNA-Isolation aus Gewebsmengen < 50 mg

Zur RNA-Isolation aus Gewebsmengen <50 mg, wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Die Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgte unter Berücksichtigung der mitgelieferten Anleitung des Herstellers. Das Gewicht des Gewebes wurde bestimmt und mit entsprechender Menge RLT-Puffer im TissueLyser von Qiagen (Hilden) mechanisch aufgeschlossen und homogenisiert. Die Durchführung umfasste dann weitere Arbeitsschritte gemäss dem standardisierten Protokoll des Kits, wobei im letzten Schritt die gewonnene RNA in 50 μl RNase-freiem H_2O eluiert wurde. Die RNA wurde dann bei -80°C gelagert.

6.3.3.2 RNA-Isolation aus Gewebsmengen > 50 mg

Zur Gewinnung von RNA aus Gewebsmengen größer 50 mg wurde die gefrorene Gewebprobe abgewogen und mit Trireagenz versetzt (1 ml pro 100 mg Probe). Im nächsten Schritt erfolgte die Disruption und Homogenisierung des Ansatzes mit dem TissueLyser von Qiagen (Hilden). Anschließend inkubierte der Ansatz für 5 min bei RT. Es folgte die Zugabe von Chloroform (200 µl pro 100 mg Probe) und eine erneute Homogenisierung. In einem darauf folgenden 15 minütigen Zentrifugationsschritt unter 14.000 RpM bei 4°C entstanden zwei Phasen im Reaktionsgefäß. Die obere Phase wurde abgenommen und die RNA mit Isopropanol (500 µl pro 100 mg Probe) gefällt. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurde der obere Zentrifugationsschritt identisch wiederholt. Der Überstand wurde dann verworfen, das RNA-haltige Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen, nach der Ethanolevaporation in RNase freiem H₂O eluiert und bei -80°C gelagert.

6.3.4 cDNA-Synthese (reverse Transkription)

Die cDNA-Synthese wurde mit Reagenzien der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) durchgeführt. 2 µg RNA wurden bei einem Ansatz von 40 µl verwendet. Synthetische Oligonukleotide, welche sich an den Poly-A-Schwanz der mRNA anlagern dienten als Primer. Zur Auflösung der RNA-Sekundärstruktur wurden jeweils 1 µl 1 µM Oligo-dT- und Randomprimer mit der mRNA für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis runtergekühlt. Es folgte die Zugabe von 2 µl dNTP-mix, 8 µl 5x Transkriptionspuffer, 1 µl Ribonuklease Inhibitor und 1 µl reverse Transkriptase (RevertAid H-minus M-Mulv). Der Ansatz wurde für 1 h bei 42°C inkubiert, wobei die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Ansatz für 5 min auf 95°C erhitzt, so dass das Enzym denaturierte. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert oder direkt als Template für die RT-PCR eingesetzt.

6.3.5 Quantifizierung von DNA und RNA

Die Messung erfolgte am NanoDrop[®] ND-1000 mittels Messung optischer Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und erfordert 1.25 µl der DNA- oder RNA-Probe. Um Aussagen über mögliche Proteinkontaminationen treffen zu können erfolgte zudem eine Messung bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der Quotient aus beiden OD-Werten (OD₂₆₀ / OD₂₈₀) gab Auskunft über den Reinheitsgrad.

6.3.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ist eine enzymatische Amplifikation des DNA-Abschnittes zwischen zwei gebundenen Oligonukleotid-Primern, welche sich gegenläufig an komplementären DNA-Strängen anlagern {Saiki, 1988}. Die eingesetzte DNA wird zuerst bei 94°C denaturiert und dadurch in DNA-Einzelstränge aufgespalten. Es folgt der Hybridisierungsschritt (Annealing) in dem sich zugegebene Oligonukleotid-Primer bei einer primer-spezifischen Temperatur (Annealing-Temperatur) an die DNA-Einzelstränge anlagern. Diese kurzen doppelsträngigen Abschnitte werden dann, bei einer Temperatur von 72°C in 3'-5'-Richtung durch die hitzestabile Taq-Polymerase (gewonnen aus *Thermus aquaticus*), verlängert. Hierbei werden aus einem Doppelstrang zwei neue Doppelstränge synthetisiert. Dieser letzte Schritt wird als Elongationsphase bezeichnet und ist zeitlich an die Fragmentlänge angepasst. Durch zyklische Wiederholung von Denaturierung, Hybridisierung und Elongation kann der primer-spezifische DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt werden. Alle verwendeten Reagenzien wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) hergestellt. In einem 50 µl-Ansatz wurden 3 µl DNA, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1,0 µl dNTPs (5 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), jeweils 25 µM Primer „forward“ und „reverse“ und 2,0 µl Taq-Polymerase (1:4 verdünnt) gemischt und mit H₂O_{dd} auf 50 µl aufgefüllt. Standardmäßig wurde ein „Hotstart“ angewendet, sprich die Taq-Polymerase wurde erst nach der anfänglichen Denaturierung (5 min bei 94°C) zum PCR-Ansatz gegeben. Im Anschluss des letzten Zyklus blieb das Reaktionsgemisch für 10 Minuten auf 72°C zur vollständigen Elongation des PCR-Produktes. Das Reaktionsgemisch wurde dann auf 4°C heruntergekühlt, um das entstandene Produkt bis zur Weiterverarbeitung adäquat zu lagern. Die Dauer und Temperatur der Reaktionszyklen sind aufgrund der primer-spezifischen Annealing-Temperaturen unterschiedlich und im Folgenden für alle Genotypisierungs-PCRs aufgeführt.

PCR	Denaturierung	Annealing	Extension	Anzahl Zyklen
MyD88 ^{stp/stp}	94°C, 60 s	57°C, 60 s	72°C, 60 s	35
Cre	94°C, 45 s	55°C, 45 s	72°C, 45 s	30

Tabelle 8: Liste der verwendeten PCR-Programme zur Mausgenotypisierung

6.3.7 Quantitative RT-PCR

Die qRT-PCR stellt eine Abwandlung der herkömmlichen PCR dar, da sie die Möglichkeit der Quantifizierung von mRNA Transkripten aus komplementärer DNA (cDNA) bietet. Durch Verwendung eines in die DNA interkalierenden und fluoreszierenden Reporterfarbstoffes (SYBR-Green), können doppelsträngige PCR-Reaktionsprodukte markiert werden. Mit fortschreitenden Reaktionszyklen kommt es, durch vermehrte Einlagerungen des Reporterfarbstoffs in entstandenen Amplifikaten, zu einem Fluoreszenzanstieg, der direkt proportional zur Zahl vorhandener Doppelstrang-Moleküle ist. Über ein optisches Detektionsmodul kann dieser Fluoreszenzanstieg in Echtzeit gemessen werden. Die PCR-Quantifizierung basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, den sogenannten C_T -Wert (Threshold Cycle). Der C_T -Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Das Reportersignal ist direkt proportional zur Menge an gebildeter DNA und steigt, wie die DNA-Menge auch, exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Der logarithmische Anstieg wird dann mit dem entsprechenden Zyklus korreliert. Diese Korrelation wird ins Verhältnis zu einem ubiquitär exprimierten Kontroll-Transkript gesetzt. Hierdurch erhält man eine quantitative Aussage. Es wurden 250 ng Template-cDNA eingesetzt und das Reaktionsprodukt jeweils ins Verhältnis zu den „Housekeeping“-Genen TFIID (murine Proben) oder HPRT (humane Proben) gesetzt.

- Ein PCR-Ansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

- 15 μ l SYBR® Green Master Mix
- 5 μ l DNA [0,1 μ g/ μ l] (0,05 μ g/ μ l bei 250ng Template)
- 1 μ l Primer A (forward) [20 pmol]
- 1 μ l Primer B (reverse) [20 pmol]
- 8 μ l H₂O

- Die Bedingungen der Einzelschritte waren:

- 50°C 2 min
- 95°C 10 min
- 40 Zyklen 
 - 95°C 15 sec
 - 60°C 1 min (Annealing)

Durch eine zusätzliche Schmelzpunktanalyse nach der PCR-Reaktion wurde geprüft, ob Fehlhybridisierungen (Primer-Dimere) stattgefunden haben. Über diese Dissoziationsreaktion wird die Spezifität der Fluoreszenz geprüft.

- Bedingungen der Dissoziationsreaktion waren:

- 95°C 15 s,
- 60°C 20 s (Annealing)
- 95°C 15 s.

Die Reaktionen wurden mit dem ABI Prism™ 7300 Sequence Detector (Applied Biosystem, USA) durchgeführt und mit Hilfe des Programms Sequence Detection Software v.1.4 (Applied Biosystem, USA) ausgewertet.

Primer	Annealing-Temperatur (°C)
murine RT-PCRs	60°C
humane RT-PCRs	60°C

Tabelle 9: Annealing-Temperaturen der verwendeten Oligonukleotide für qRT-PCR

6.3.7.1 Hydrolysis Probe Assay

Von der qRT-PCR mittels SYBR-Green (Abschnitt: 5.3.7) ist die qRT-PCR mittels UPL-Sonden-Assay zu unterscheiden. Um die cDNA nachzuweisen wird hierbei ein sogenannter "Hydrolysis Probe Assay" verwendet. In diesem System werden, neben vorwärts- und rückwärts- Oligonukleotid-Primern, Fluoreszenzreportersonden zugegeben. Diese Methode ist spezifischer, da nur diejenige DNA amplifiziert wird, welche die jeweilige SONDENSEQUENZ enthält. Die Sequenz-spezifischen Sonden aus der „Universal Probe Library“ (UPL) von Roche sind am 5'-Ende mit Fluoreszin (Reporter) und am 3'-Ende an ein „Quencher“-Fluorophor gekoppelt. Die Sonden sind acht bis neun Basen lang und enthalten sogenannte „Locked Nucleic Acids“ (LNA), DNA- Nukleotid- Analoga, welche einen modifizierten Ribose-Rest mit einer zusätzlichen 2'-O, 4'-C-methylen Brücke besitzen. Daher weisen sie eine erhöhte Schmelztemperatur und verbesserte Hybridisierungsaffinität zur komplementären DNA auf. Nach der Anlagerung der sequenzspezifischen Sonde an den DNA-Strang sind Reporter und „Quencher“ in räumlicher Nähe zueinander, wodurch der „Quencher“ die Fluoreszenzdetektion (des Fluoreszins) mittels fluorescence energy transfer (FRET) verhindern kann. Die Sonde wird durch die 5' zu 3' Exonuklease-

Aktivität der Taq-Polymerase zerstört, so dass die Fluoreszenz des Reporters nun detektiert werden kann {Heid et al., 1996}. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer, sowie die sequenzspezifische Sonde wurden über einen Internet-basierten Algorithmus entworfen (<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/ezh.html>). Die Expressionsanalysen humaner Tumorproben und etablierter Zelllinien wurden mit dem Hydrolysis-Probe-Assay realisiert.

6.3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Das Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von PCR-Produkten in einem elektrischen Feld. Die Agarose dient hierbei als Matrix, in welcher die DNA-Moleküle durch ihre negativ geladenen Phosphatgruppen (im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat) im konstanten elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von unterschiedlichen Faktoren wie Molekülgröße, Konformation der DNA, Matrixdichte und die angelegte Spannung. Die Laufgeschwindigkeit linearer doppelsträngiger DNA ist proportional zu ihrem Molekulargewicht. Die Agarosekonzentration wird abhängig von dem Molekulargewichtsbereich des aufzutrennenden DNA-Moleküls festgelegt. Allgemein wurden nur 1%-ige (w/v) Agarosegele verwendet. Agarose wurde unter Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und direkt im flüssigen Zustand mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml) ergänzt. Danach wurde das Gel in die Gelkammer mit Schlitten gegossen und die Geltaschen mit der Applikation von Platzhaltern sichergestellt. Nach Erstarren des Gels wurde dieses mit TAE-Puffer befüllt. Die DNA-Proben wurden mit entsprechenden Volumen von 5x Probenpuffer (Orange G) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zudem wurde eine Geltasche mit einem Referenzmarker befüllt, um nach Abschluss des Gel-Laufes die Länge und Menge der aufgetragenen DNA-Fragmente bestimmen zu können. Dieser Molekulargewichtsmarker diente als Größenstandard und wurde von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen. Die Elektrophorese wurde mit einer Feldstärke von 5 V pro cm Elektrodenabstand (100V) durchgeführt. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkalierte in die Doppelhelix der DNA und konnte aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaft unter UV-Licht (254 nm) mit einem Transilluminator erkennbar gemacht und mittels eines digitalen Videosystems dokumentiert werden (Gel Doc XR System, Bio Rad, München).

6.4 Immunologische / Zellbiologische Methoden

6.4.1 Stimulation von Ex-Vivo-Organkulturen mit TLR-Agonisten

Für die Stimulation der Organkulturen mit verschiedenen TLR-Agonisten wurden gewonnene Organstücke mit PBS gewaschen, nass gewogen und anschließend in Mikrotiterplatten mit 6 Vertiefungen gelegt. Die einzelnen Vertiefungen waren davor mit 2 ml 37°C warmem „Main Culture Medium“ befüllt worden. Anschließend wurden Pam₃Cys (10 µg/ ml) und CpG 2216 (5 µM) jeweils standardmäßig hinzugefügt. Die Organkulturen wurden über Nacht bei 37°C, 7% CO₂ und einer wasserdampf-gesättigten Atmosphäre im Brutschrank stimuliert. Nach erfolgter 24-stündiger Stimulation wurden die Organstücke verworfen und der verbliebene konditionierte Überstand zur Zytokin- und Chemokindetektion für den ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) bei -80°C weggefroren oder direkt eingesetzt.

6.4.2 Stimulation von Zellkulturen mit TLR-Agonisten

Für die Stimulation von Zellkulturen mit verschiedenen TLR-Agonisten wurden die Zellen zuerst mittels Trypsin/EDTA abgelöst und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Im nächsten Schritt wurde die für 10⁶ Zellen entsprechende Zellsuspension in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte eingesetzt. Die Vertiefungen wurden dann auf 3 ml Medium aufgefüllt und anschließend jeweils mit LPS (1 µg/ ml), Pam₃Cys (10 µg/ ml), Poly I:C (50µg/ ml) und CpG 2216 (5 µM) versetzt. Die weiteren Schritte entsprechen denen der Ex-Vivo-Organkultur.

6.4.3 ELISA

Um Zytokine und Chemokine in Organ- und Zellkulturüberständen nachzuweisen, wurden ELISAs (*engl.: Enzyme linked immunosorbent assays*) angewendet. Die hierfür verwendeten ELISA-Kits wurden von der Firma R&D bezogen und basieren auf der Technik des Sandwich-ELISA. Bei diesem Assay wird ein aufgereinigter, polyklonaler und gegen das zu untersuchende Antigen gerichteter Antikörper auf eine Mikrotiterplatte gebunden. Die Probe wird dann in die so vorpräparierten Vertiefungen pipettiert und inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene und lösliche Antigen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Platte gewaschen, wodurch ungebundene Bestandteile entfernt werden. Anschließend wird ein Detektionsantikörper mit

angekoppelter Meerrettichperoxidase, der ebenfalls gegen das zu untersuchende Antigen gerichtet ist, zugegeben. Nach Inkubation und weiteren Waschschritten wird das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben, welches durch die Peroxidase in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Die Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt wobei ein niedriger pH-Wert den Farbumschlag von blau nach gelb (450 nm) erlaubt. Dieser wird dann durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Anhand eines mitgeführten Standards können quantitative Aussagen über den Gehalt des zu untersuchenden Antigens (z.B. Zytokin oder Chemokin) in der Probe gemacht werden.

6.5 Immunhistochemische und Immunzytochemische Methoden

6.5.1 Gefrierschnitte

Das von der Maus entnommene Gewebe wurde in TissueTek (Sakura; Niederlande) eingebettet und bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde dann mit einem Kryotom (Leica, Wetzlar) 6-8 μm dick geschnitten und auf Superfrost Objektträger (Menzel, Braunschweig) übertragen. Die Kryoschnitte wurden für einige Stunden luftgetrocknet und entweder direkt für Färbungen verwendet oder bei -80°C gelagert.

6.5.2 Hämatoxylin und Eosin Färbung (HE-Färbung)

Für die histologische Beurteilung von Gewebe wurden Schnitte mit Hämatoxylin (Zellkernfärbung) und Eosin (Zytoplasmafärbung) gefärbt. Hierfür wurden Objektträger zuerst 1 min in 4%igem Formalin fixiert und anschließend in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurden die Schnitte für 5 min mit Hämatoxylin gefärbt und dann 5 min unter fließendem Wasser gespült. Daraufhin folgte die 1-minütige Eosin-Gegenfärbung. Nach kurzem Waschen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol) dehydriert. Zur Alkoholverdrängung wurden die Objektträger dann in Xylol inkubiert und anschließend in Eukitt (Kindler, Freiburg) gedeckelt. Die Paraffinschnitte mussten vor der HE-Färbung entparaffiniert werden. Dafür wurden genannte Schritte invertiert. Nach Xylolinkubation folgte die absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol)

6.6 Biometrie und Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Die Auswertung der Signifikanz erfolgte durch den „Student's t“-Test. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aufgeführt. Unterschiede werden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$ ist, d. h. wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Aussage unter 5% liegt. Mit SPSS wurde die Verteilung nominal oder ordinal skalierten Variablen mittels Chi-Quadrat-Test verglichen. Kardinale Variablen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet.

7 Ergebnisse

Pathophysiologisch hat die inflammationsbedingte Tumorgenese im Zusammenhang der sporadischen, kolorektalen Karzinogenese in den vergangenen Jahren an Bedeutung zugenommen, was sich auch an der steigenden Zahl entsprechender Publikationen erkennen lässt. Das Toll-like-Rezeptorsystem und dessen Signalwege nehmen in diesen inflammatorischen Prozessen eine zentrale Position ein, wobei MyD88 als eines der wichtigsten Adapterproteine für die Signaltransduktion zu nennen ist. Um den Einfluss von Toll-like Rezeptoren auf die kolorektale Karzinogenese näher zu beleuchten, wurden TLR-Expressionsanalysen zunächst in etablierten humanen Tumorzelllinien durchgeführt.

7.1 Quantifizierung der TLR-Expression in humanen Tumorzellen

Zur Etablierung der qRT-PCR Analysemethode für humane Toll-like Rezeptoren und Myd88 wurden zunächst Tumorzelllinien eingesetzt. Da in OP-Resektaten neben Tumorgewebe auch interstitielles Gewebe (Tumorstroma) abgetragen wird, erlaubt eine Expressionanalyse an reseziertem Humangewebe keine Aussage über zelltypspezifische Ausprägungsmuster. Daher sollte im Vorfeld der Tumorprobenanalyse ein TLR-Expressionsprofil von isolierten Tumorzelllinien erstellt werden. Hierbei galt es zu klären, ob Tumorzellen selbst TLRs ausprägen. Zur Überprüfung der TLR-Funktionalität wurden die Zellen, wie in 6.4.1 und 6.4.2 beschrieben, mit spezifischen TLR-Liganden stimuliert und jeweils 48h und 72h in Kultur gehalten. Dabei wurden die Liganden so ausgewählt, dass sie selektiv den zu untersuchenden TLR stimulieren: Pam3Cys (Pyridin-2-Aldoxin-Methiodid-3-Cystein) stimuliert spezifisch TLR2, Poly I:C (Polyinosinic:Polycytidylic Säure) TLR3, LPS (Lipopolysaccharid) TLR4 und schliesslich CpG (CpG-Dinukleotid 2216) TLR9. Als Vergleichswert diente eine unstimulierte Kontrolle („non“). Wie in 5.7 beschrieben, sind die untersuchten humanen Zelllinien (SW480, SW620, DLD1, HT29) epithelialen Ursprungs und entstammen Adenokarzinomen des Kolons. Die Zelllinien SW480 und SW620 entstammen dabei dem selben Patienten, wobei Letztere aus einer intestinalen Lymphknotenmetastase isoliert wurde. Der 48h- und 72h-Versuch wurden jeweils dreimal wiederholt. Die abgebildeten Ergebnisse sind nach Zelllinie und Zieltranskript sortiert, wobei die 48h- und 72h-Werte jeweils auf einem Graphen aufgeführt sind. Die Signifikanzen wurden mittels 2-seitigen-t-Test berechnet.

7.1.1 MYD88

MyD88 wird, bei Betrachtung der unstimulierten Kontrolle, von allen untersuchten Tumorzelllinien in vergleichbarer Menge exprimiert. Die selektiven TLR-Stimulationen verursachen bei den Zelllinien SW620 und DLD1 keine signifikanten Änderungen in der MyD88-Expression.

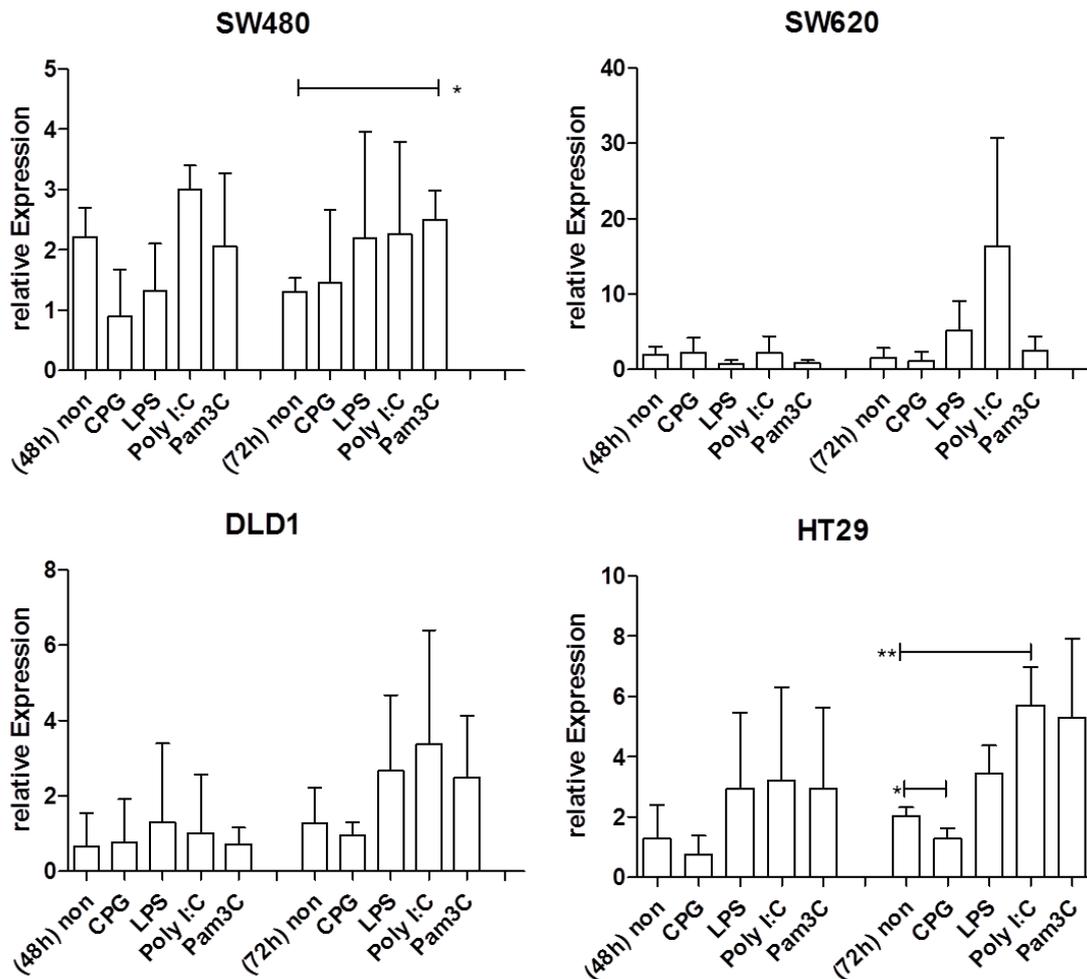


Abbildung 10: relative MyD88-Expression in Tumorzelllinien mit und ohne selektive TLR-Stimulation

Mittelwert \pm Standardabweichung für drei unabhängige Versuche (qRT-PCR). Die unterschiedlichen Skalierungen sind zu beachten. Stimulation erfolgte für die angegebenen Zeitpunkte mit CpG (5 μ M), LPS (1 μ g/ml), Poly (I:C) (50 μ g/ml), sowie Pam3Cys (10 μ g/ml). Im 72h-Versuch wurde im Vergleich von unstimulierten Zellen und den Pam3C-stimulierten Zellen eine signifikante Erhöhung (p -Wert: 0,0175) beobachtet. Die HT29-Zelllinie zeigt im 72h-Versuch signifikante Unterschiede im Vergleich von: non vs. CpG reduzierte Expression (p -Wert: 0,0475), non vs. Poly I:C erhöhte Expression (p -Wert: 0,0077),

Signifikante Veränderungen sind bei den Zelllinien SW480 und HT29 zu verzeichnen, allerdings nur 72h nach der Stimulation. Dabei reduziert die TLR9-Stimulation durch CpG die MyD88-Expression in beiden Zelllinien, während die MyD88-Expression durch die TLR3-Stimulation mit Poly I:C erhöht wird. Die Ergebnisse belegen, dass alle untersuchten Adenokarzinomzellen MyD88 exprimieren und dass eine TLR3-Stimulation die MyD88-Expression in einigen Zelllinien verstärkt, während sie durch TLR9 Stimulation reduziert wird.

7.1.2 TLR2

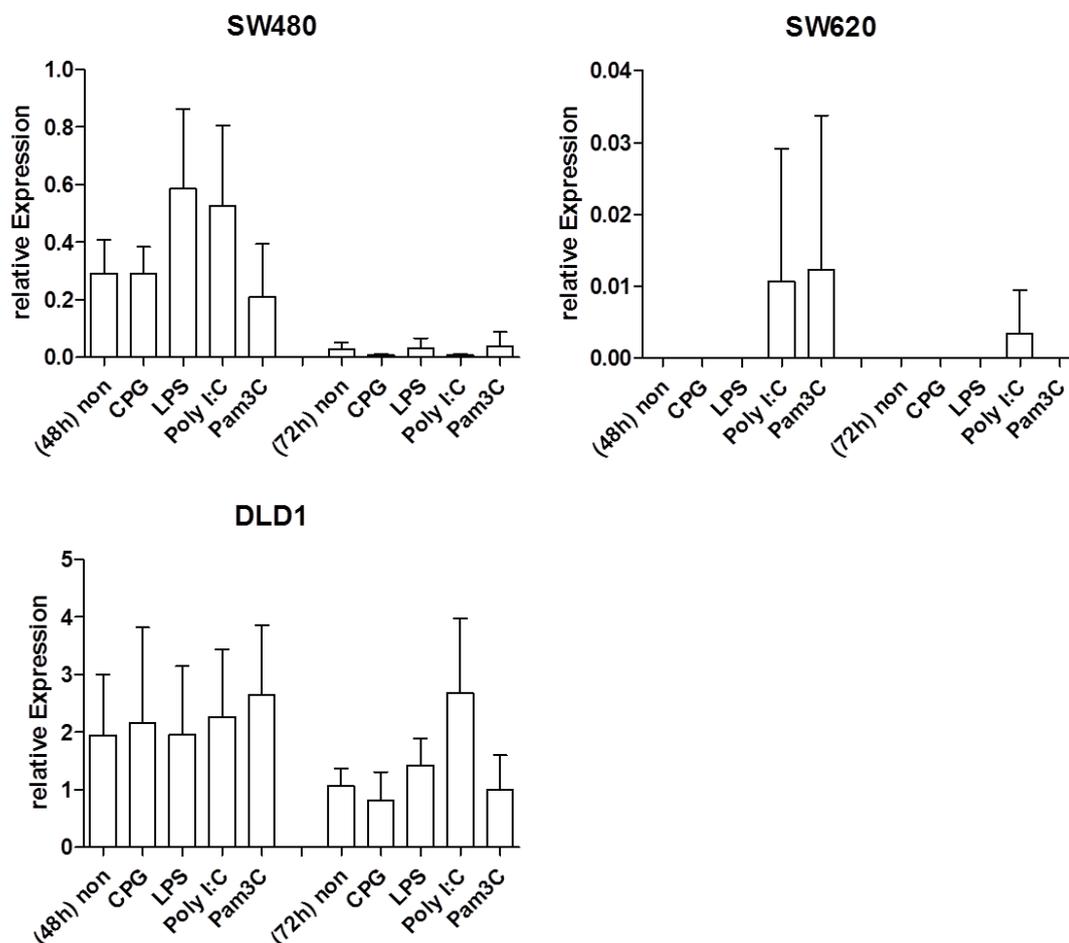


Abbildung 11: relative TLR2-Expression in Tumorzelllinien mit und ohne selektive TLR-Stimulation

Mittelwert \pm Standardabweichung für drei unabhängige Versuche (qRT-PCR). Stimulation erfolgte wie bei Abb. 8 aufgeführt. Die unterschiedlichen Skalierungen sind zu beachten. Die TLR2-Expression der Tumorzelllinien zeigt nach 48h und 72h Stimulation keine signifikanten Unterschiede. Skalierung

Die TLR2 Expression unterliegt, im Vergleich zur MyD88-Expression, unter unstimulierten Kontrollbedingungen größeren Schwankungen. So exprimiert die DLD1-Zelllinie die 10fache Menge im Vergleich zu den SW480-Zellen. Eine TLR2-Expression ist in der unstimulierten Kontrolle der SW620-Zelllinie nicht nachweisbar. Erst eine Stimulation der TLRs 2 und 3 bewirkt in den SW620-Zellen eine, allerdings sehr geringe, Expression von TLR2. Grundsätzlich lag die TLR2-Expression der SW620 Zelllinie, auch nach Stimulation, an der Nachweisbarkeitsgrenze. In der HT-29-Zelllinie konnte die TLR2-Expression nicht nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen waren dagegen für keine der Zelllinien nachzuweisen, auch nicht für den TLR2-spezifischen Liganden Pam3Cys.

7.1.3 TLR3

Eine TLR3-Expression konnte in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Während für SW620 und DLD1 Zellen keine signifikanten Unterschiede beobachtet wurden, zeigten die Linien SW480 und HT29 signifikante Expressionsunterschiede für die verschiedenen TLR-Stimulanzen. So liess sich bei SW480-Zellen, eine signifikante Expressionssteigerung nach Behandlung mit dem TLR3-Liganden Poly(I:C)- messen. Die SW480 und die SW620-Zelllinien zeigten nach 72h-Stimulation generell geringere Expressionswerte als nach 48h, was durch reduziertes Zellüberleben nach längerer Kulturdauer erklärbar wäre. Im Vergleich zu den SW480-/ SW620- Zelllinien exprimieren DLD1 und HT29 die 10-fache Menge an TLR3. DLD1-Zellen zeigen bei konstant-hoher Expression keine signifikante Reaktion auf die Stimulanzen. HT29 Zellen zeigen nach 48h eine signifikante Reduktion der TLR3-Ausprägung bei Stimulation der TLRs 2 und 9.

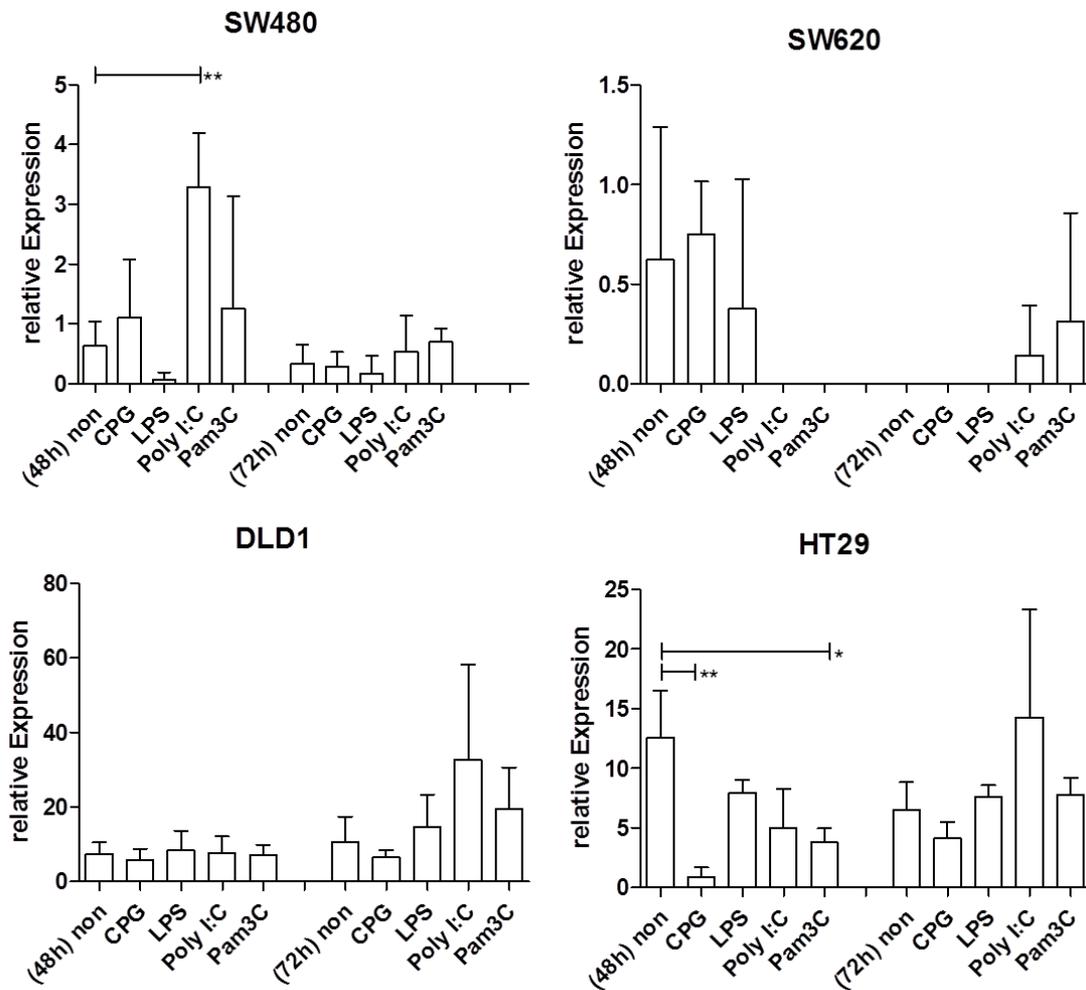


Abbildung 12: relative TLR3-Expression in Tumorzelllinien mit und ohne selektive TLR-Stimulation

Mittelwert \pm Standardabweichung für drei unabhängige Versuche (qRT-PCR). Stimulation erfolgte wie bei Abb. 8 aufgeführt. Die unterschiedlichen Skalierungen sind zu beachten. In der SW480-Zelllinie zeigt die TLR3-Expression signifikante Unterschiede bei dem Vergleich von Poly(I:C) mit der unstimulierten Kontrolle (p -Wert: 0,0096). Die HT29-Zellen zeigen nach 48h-Stimulation signifikante Unterschiede im Vergleich von unstimulierter Kontrolle mit CPG (p -Wert: 0,0074) und Pam3C (p -Wert: 0,0210).

7.1.4 TLR4

TLR4 wird in unterschiedlichen Mengen von den Adenokarzinomzellen exprimiert. SW620 produzieren TLR4 an der Nachweisbarkeitsgrenze, während es bei DLD1-Zellen nicht mehr detektierbar ist. SW480 zeigen im 48h-Versuch eine niedrige und stimulations-unabhängige Expression, während sie in der 72h-Stimulation auf den spezifischen TLR4-Liganden LPS mit einer verstärkten TLR4-Expression reagieren, allerdings erreicht der Unterschied nicht das Signifikanzniveau.

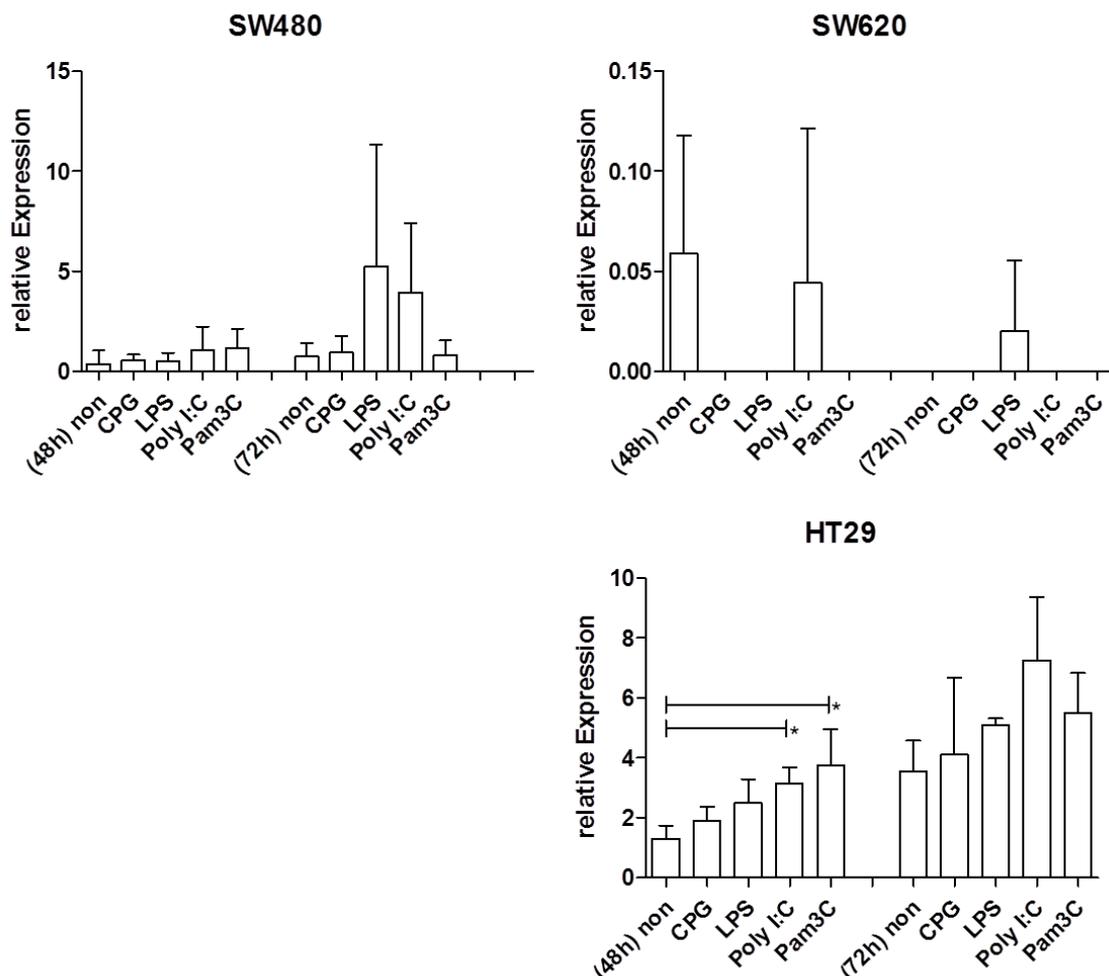


Abbildung 13: relative TLR4-Expression in Tumorzelllinien mit und ohne selektive TLR-Stimulation

Mittelwert \pm Standardabweichung für drei unabhängige Versuche (qRT-PCR). Stimulation erfolgte wie bei Abb. 8 aufgeführt. Die unterschiedlichen Skalierungen sind zu beachten. Signifikante Unterschiede der TLR4-Expression nach 48h-Stimulation zeigen HT29-Zellen, im Vergleich von unstimulierter Kontrolle mit Poly I:C (p -Wert: 0,0103) und Pam3C (p -Wert: 0,0293).

Die HT29-Zelllinie weist die höchsten TLR4-Expressionswerte auf, wobei keine Ligandenspezifität zu erkennen ist. So exprimieren zwar alle stimulierten Ansätze mehr TLR4 als die Kontrolle, jedoch werden die höchsten TLR4-Expressionswerte nicht durch dessen selektiven Liganden LPS erreicht, sondern durch die Liganden der TLR2 und -3. Ein ähnlicher Verlauf war für HT29 Zellen nach 72h zu beobachten, allerdings ohne Signifikanz.

7.1.5 TLR9

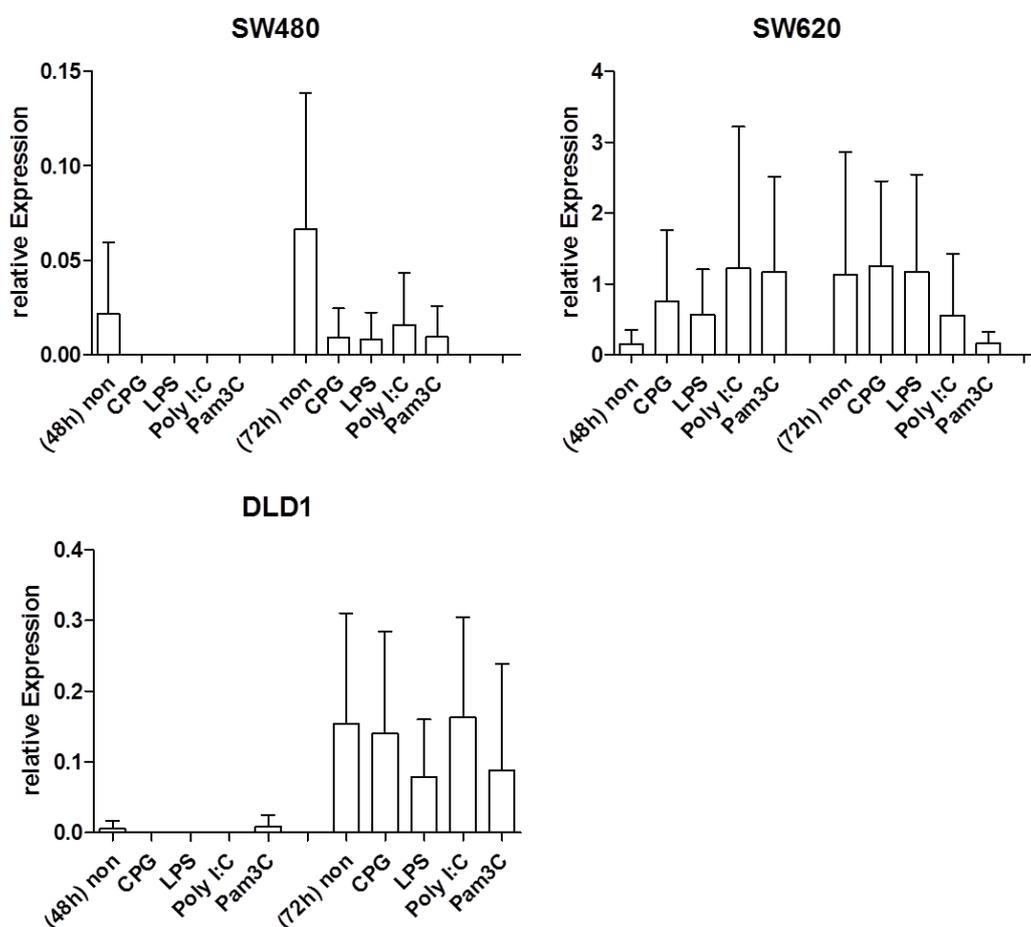


Abbildung 14: relative TLR9-Expression in Tumorzelllinien mit und ohne selektive TLR-Stimulation

Mittelwert \pm Standardabweichung für drei unabhängige Versuche (qRT-PCR). Stimulation erfolgte wie bei Abb. 8 aufgeführt. Die unterschiedlichen Skalierungen sind zu beachten. Die TLR9-Expression der Tumorzelllinien zeigt nach 48h und 72h Stimulation keine signifikanten Unterschiede.

SW480, DLD1 und HT29 Zellen produzieren TLR9-Transkripte an der unteren Nachweisbarkeitsgrenze, wobei im 72h-Versuch durchschnittlich etwas höhere Werte erreicht werden. Die TLR9-Expression in SW620-Zellen ist im Gesamtvergleich um ein Vielfaches höher. Die Expressionshöhe des TLR9 ist unabhängig von seinem selektiven Liganden CpG und auch die Stimulationsdauer hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Expressionsniveau.

7.1.6 Interleukin-8

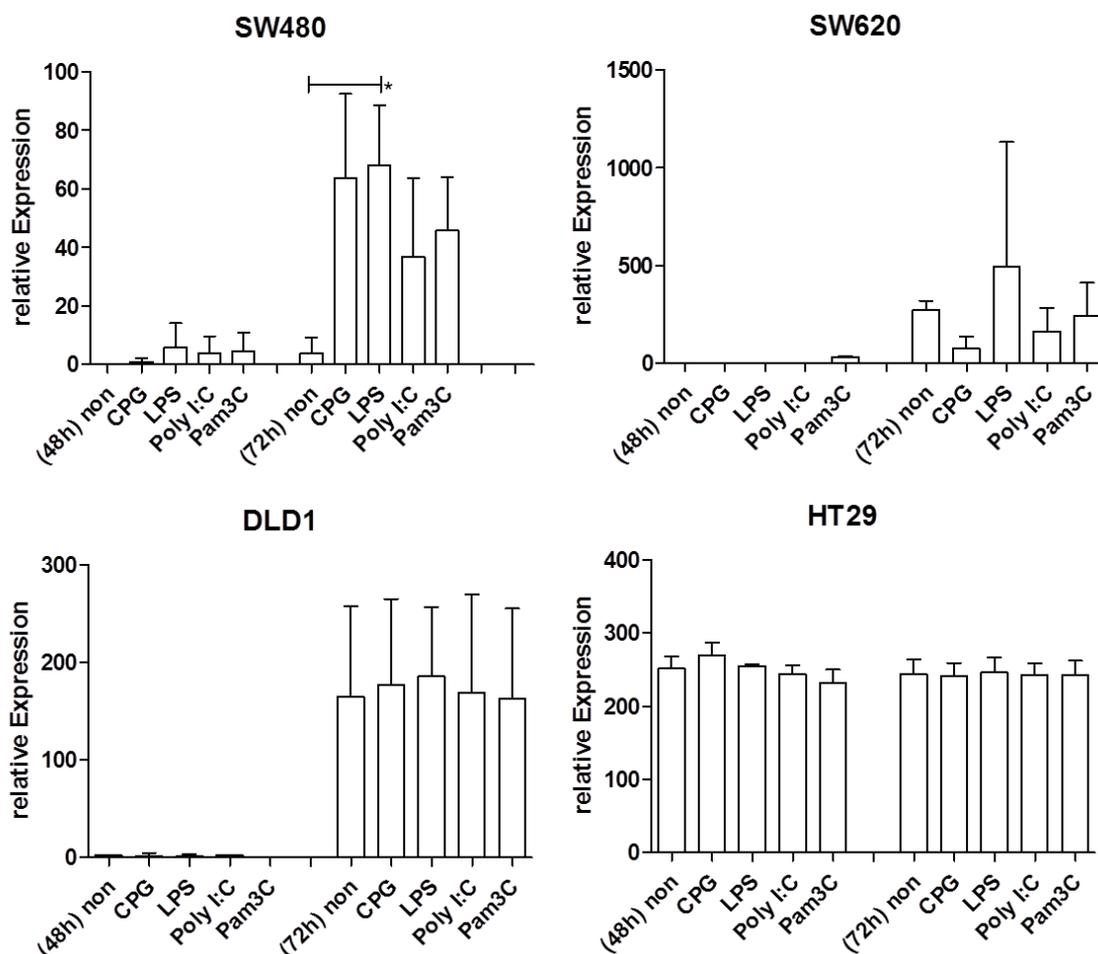


Abbildung 15: relative IL8-Expression in Tumorzelllinien mit und ohne selektive TLR-Stimulation

Mittelwert \pm Standardabweichung für zwei unabhängige Versuche (qRT-PCR). Stimulation erfolgte wie bei Abb. 8 aufgeführt. Die unterschiedlichen Skalierungen sind zu beachten. SW480-Zellen exprimieren nach 72h-Stimulation mit LPS signifikant mehr IL8, als die unstimulierte Kontrolle (p -Wert: 0,0497).

Interleukin-8 (syn. CXCL8) ist ein pro-inflammatorisches CXC -Chemokin, das nach TLR-Aktivierung, und daraus resultierender intrazellulärer NF- κ B-Stimulation, vermehrt exprimiert wird {Cronin, Turner, Goetze, Bryant, & Sheldon, 2012}. Hier sollte untersucht werden, welcher Stimulus, und damit welcher TLR-abhängige Signalweg, den größten Einfluss auf die IL8 Expression hat. Zusätzlich sollte auch der Einfluss der Stimulationsdauer auf das IL8-Expressionsniveau untersucht werden.

Vergleicht man die Expressionsmuster der verschiedenen Zelllinien fällt auf, dass bei der HT29-Zelllinie ein sehr homogenes Bild vorliegt. Die HT29-Zellen prägen konstant, also unabhängig von Stimulus und Zeit, das Interleukin-8 aus. Zu beachten ist ferner, dass auch die Standardabweichung bei allen Messungen gering und vergleichbar ist. DLD1-Zellen zeigen, dass die Stimulationszeit den größten Einfluss auf das Expressionsniveau hat. Im 72h-Versuch liegen die Expressionswerte ca. 100-fach höher. Eine Expressionsvarianz zwischen den verschiedenen Stimuli liegt bei der DLD1-Zelllinie nicht vor. Während die DLD1- und HT29-Zellen somit keine Reaktion auf die Stimulation mit TLR-Liganden zeigen, sind bei den SW480 und SW620-Zelllinien heterogene Stimulationsmuster zu erkennen. Die SW480-Zellen exprimieren, abhängig von Stimulus und Stimulationsdauer, unterschiedliche Mengen an IL8. Grundsätzlich erscheint die Expression im 72h-Versuch um das 3- bis 4-fache erhöht. Ein signifikanter Anstieg der IL8-Expression konnte nur für die Zelllinie SW480 nach Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS beobachtet werden. SW-620-Zellen exprimieren wie SW480 und DLD1 grundsätzlich bei längerer Stimulation mehr IL8, allerdings erreichten die Unterschiede zur unstimulierten Kontrolle nicht das Signifikanzniveau. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien erzielte die Zelllinie SW620 die höchste IL8-Expression. Das Expressionsprofil der untersuchten Zelllinien ist in der *Tabelle 10* vereinfacht zusammengefasst.

Zelltyp	TLR2	TLR3	TLR4	TLR9	MyD88	IL8
SW480	+	+	+	+	+	+
SW620				++	+	+++
DLD1	++	++		+	+	+++
HT29		++	++		+	+++

Tabelle 10: vereinfachte Zusammenfassung relativer Zielgen-Expressionen in isolierten Darmtumorzellen des Menschen

Nachdem die TLR-Expression in isolierten Tumorzellen nachgewiesen werden konnte, und die Funktionalität durch selektive TLR-Stimulation mit spezifischen Liganden überprüft wurde, sollten die untersuchten Zielgene in humanen Tumorproben mittels qRT-PCR quantifiziert, und mit klinischen und histopathologischen Daten korreliert werden.

7.2 Expressionsanalysen humaner Tumorproben

In diesem Experiment wurden Expressionsanalysen humaner, kolorektaler Tumorproben mittels qRT-PCR (4.3.7) durchgeführt. Als Zielgene wurden die Toll-like-Rezeptoren 2,3,4 und 9, das Adaptermolekül MyD88 und das Interleukin-8 definiert. Die Patientenproben stammen aus der Tumorbank der Chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU München, und lagen dort als postoperative Gewebeproben in flüssigem Stickstoff (bzw. bei -80°C). Aufgrund präoperativer Diagnostik, sowie intra- und postoperativer histopathologisch abgesicherter Befunde, konnten die jeweiligen Tumore des Patientenkollektivs in die UICC-Klassifikation (Anhang, s.S 121) eingeteilt werden. Die UICC-Klassifikation ist das gebräuchlichste Klassifikationssystem für Kolorektaltumore. Es unterteilt sich in 4 Stadiengruppierungen und unterstützt, durch dessen klinische und prognostische Wichtung, die Entscheidung über therapeutische Indikationen.

Gesamtes Kollektiv	n=55	[100%]
Geschlecht (n[%])	Männlich (33[60])	Weiblich (22[40])
Alter (MW)	67,03 Jahre	59,31 Jahre
(Spanne)	23-88 Jahre	34-82 Jahre
Tumorlokalisation	[n]	Prozent
rechts	23	42
links	32	58
Tumorstadium	[n]	Prozent
T1	9	16,3
T2	27	49,1
T3	10	18,2
T4	9	16,4

Grading	[n]	Prozent
G1 + G2	28	50,1
G3 + G4	27	49,9
UICC Stadium	[n]	Prozent
Stadium I	10	18,2
Stadium II	26	47,3
Stadium III	10	18,2
Stadium IV	9	16,4
Überleben	[n]	Prozent
Ja	17	31
Nein	38	69
Tumorbedingter Tod	16	29,1
Fehlende Daten	18	32,7
Resektionsstatus	[n]	Prozent
Komplette Resektion (R0)	53	96,4
Resektion (R1,R2,Rx)	2	3,6
Rückfall	[n]	Prozent
Kein Rückfall	23	41,8
Rückfall (gesamt)	32	48,2
Metastasen	[n]	Prozent
Nur lokale Rückfälle	1	47,3
Fernmetastasen	29	52,7

Tabelle 11: Patientenkollektiv mit klinischen und histopathologischen Daten

Abkürzungen: T charakterisiert den Primärtumor bei der TNM-Klassifikation: T1 (Infiltration der Tela submucosa), T2 (Infiltration der Tunica muscularis), T3 (Infiltration der Subserosa) und T4 (Infiltration von Nachbarorganen oder des Peritoneum viscerale). G beschreibt das Grading (histologischer Differenzierungsgrad) des Tumors: G1 (gut differenziert), G2 (mäßig differenziert), G3 (schlecht differenziert) und G4 (entdifferenziert/ undifferenziert). R beschreibt, ob Tumorgewebe nach einer Therapie verblieben ist: R0 = Kein Tumor im Organismus nachweisbar, R1 = Mikroskopischer Residualtumor an den Schnitträndern, R2 = Makroskopisch Tumor oder Metastasen belassen. Je höher T und G sind, desto schlechter ist die Prognose.

7.2.1 Stadienabhängige Analyse der TLR-Genexpressionen in humanen Proben kolorektaler Tumore

Die Genexpressionsanalyse humaner Kolorektalkarzinome wurde für das in 7.2 beschriebene Patientenkollektiv (n=55) durchgeführt. Als Kalibrator für die Expression wurde die humane Kolonkarzinom-Zelllinie SW480 (siehe 5.7) ausgewählt, da diese Zelllinie für alle untersuchten Transkripte positiv war (siehe 7.1). Die relativen Expressionswerte, die im folgenden aufgeführt sind, beziehen sich also auf die Expression in SW480-Zellen (=Expressionsniveau 1,0), und wurden in Bezug gesetzt auf die Ausprägung des Housekeeping-Gens HPRT. Die Ergebnisse wurden mit Kastengrafiken (*engl. Box-Whisker-Plot*) zur Darstellung gebracht und mit dem 2-seitigen t-Test (*engl. Two-sample t-Test*) untereinander verglichen. Ferner wurden signifikante Zusammenhänge der Zielgenexpressionen durch die Spearman-Rho-Korrelation ermittelt. Um eine prognostische Bedeutung der TLR-Expressionshöhe zu überprüfen, wurden, durch Korrelation der Expressionswerte mit klinischen und histopathologischen Patientendaten, Kaplan-Meier-Analysen realisiert. Im Folgenden ist zunächst die Quantifizierung der TLR-Expressionen (TLR 2, 3, 4 und 9), dann der MyD88-Expression und zuletzt der Interleukin-8-Expression dargestellt.

7.2.1.1 TLR-Expressionen kolorektaler Tumore in allen UICC-Stadiengruppen

Die relative TLR-Expression im untersuchten Patientenkollektiv unterlag sowohl innerhalb der einzelnen UICC-Stadien, als auch zwischen individuellen Patientenproben großen Schwankungen. Darüber hinaus variierte auch die Expression der verschiedenen Toll-like Rezeptoren untereinander. Dies bestätigt Literaturbefunde, wonach in Kolon-Epithelzellen beim Menschen TLR3 und TLR5 relativ stark, TLR2 und TLR4 dagegen vergleichsweise schwach ausgeprägt sind {Abreu, 2010}. So wurde bei Betrachtung der TLR-Expression im Normalgewebe deutlich, dass TLR3 mit 8-fach höherer Expression als TLR4 am stärksten exprimiert wird. TLR2 und TLR9 sind, in absteigender Reihenfolge, ca. 4-fach schwächer ausgeprägt als TLR4. Die TLR9-Expression ist dabei konstant niedrig und zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen UICC-Stadien. TLR2 dagegen wird generell in allen UICC-Stadien stärker exprimiert. Eine signifikant niedrigere Expression findet sich im Vergleich zum Normalgewebe nur im UICC Stadium I. Die höheren UICC-Stadien, wie auch Lebermetastasen kolorektaler Karzinome zeigten eine zum Normalgewebe vergleichbare TLR2-Expression. TLR4

konnte ebenfalls in allen UICC-Stadien nachgewiesen werden, und weist signifikante Unterschiede zwischen Normalgewebe und den Tumorgewebegruppen der Stadien II, III und IV auf. Die TLR4-Expression ist in allen UICC-Stadien, wie auch in der Lebermetastasengruppe, geringer als die des Normalgewebes.

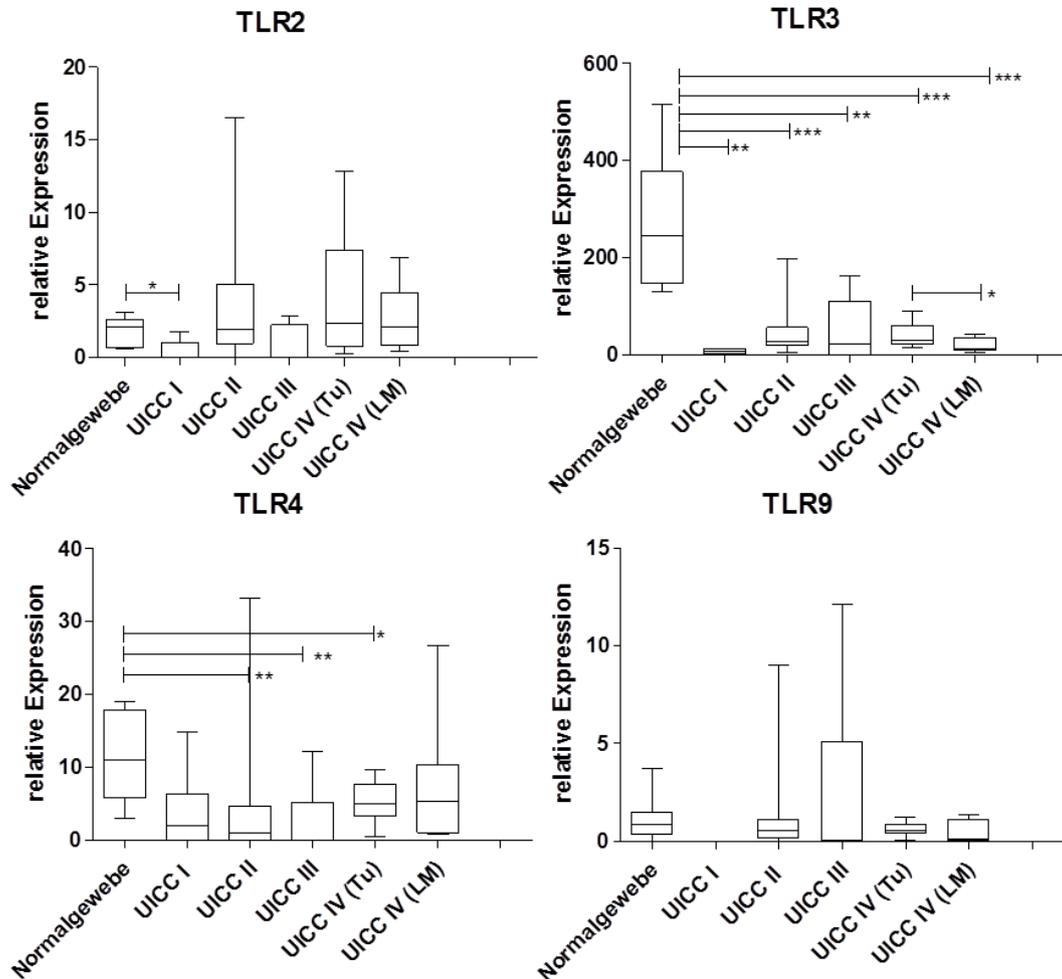


Abbildung 16: relative TLR-Expressionen in humanen Kolorektaltumoren

Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR. Box-Plot Darstellung mit Angabe des Medians, der Maximal- und Minimalwerte, sowie des 50%-Perzentils. Die unterschiedlichen Skalierungen sind zu beachten. Die TLR2-Expression in UICC I Tumoren ist signifikant niedriger (p -Wert: 0,0165) als die des Normalgewebes (NG). Die TLR3-Expression ist stadienspezifisch dereguliert. Dabei wird TLR3 im NG signifikant höher exprimiert als in Tumoren der Stadien UICC I (p -Wert: 0,0039), -II (p -Wert: <0,0001), III (p -Wert: 0,0020) und IV (p -Wert: 0,0002), sowie mehr als in Lebermetastasen (LM) (p -Wert: 0,0007). Ferner ist die TLR3-Expression in UICC IV Tumoren signifikant höher als in LM (p -Wert: 0,0454). Die TLR4-Expression ist auch im NG signifikant höher als die der UICC II (p -Wert: 0,0041), III (p -Wert: 0,0090) und IV Tumore (p -Wert: 0,0152). Für TLR9 sind keine signifikanten Veränderungen festzustellen.

Die TLR3-Expression zeigt die dramatischste Veränderung der Expression von allen untersuchten TLRs. Hier liegen hochsignifikante Unterschiede zwischen Normalgewebe und den Tumoren unterschiedlicher Stadien, bzw. der Metastasen vor. Zudem gibt es eine signifikante Reduktion der TLR3 Ausprägung in der Lebermetastasengruppe gegenüber der Gruppe der primären Kolonkarzinome des Stadiums UICC IV. Vergleicht man die UICC-Stadien untereinander ergeben sich keine weiteren signifikanten Expressionsunterschiede. Diese Befunde sind in guter Übereinstimmung mit Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, die durch Transkriptom-Analysen erzielt wurden {Rimkus, 2006}.

7.2.1.2 TLR-Expression in fortgeschrittenen Kolonkarzinomen (Stadium UICC IV)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein kleines Kollektiv von Patienten mit metastasierten, fortgeschrittenen Kolonkarzinomen des Stadiums UICC IV gesondert untersucht werden. Das ausgewählte Kollektiv ist von besonderem Interesse, da die hier verwendeten Proben, also Normalgewebe aus der Kolonmukosa (NG), Primärtumor (Tu) und Lebermetastase (LM), jeweils von dem selben Patienten (n=9) stammen. Aufgrund dieser Gegebenheit (sog. „matched samples“) können die ermittelten Werte hier graphisch als zusammenhängende Expressionslinien dargestellt werden und die Signifikanzen mit dem gepaarten 2-seitigen-t-Test berechnet werden. Da für einzelne Proben in den Expressionanalysen keine belastbaren Werte über der Nachweisgrenze erzielt werden konnten, liegen in der graphischen Darstellung einzelne Punkte vor (z.B. für TLR2 zu sehen). Durch die Darstellung in Form von Expressionslinien lassen sich Expressionstrends zwischen den verglichenen Geweben besser erkennen. Bei TLR2 ist erkennbar, dass bei vier Patienten die Expression im Tumorgewebe steigt, um dann in Lebermetastasen wieder auf das Niveau des Normalgewebes zu fallen, was sich allerdings für das Gesamtkollektiv nicht in signifikanten Änderungen widerspiegelt. TLR3 hingegen zeigt einen homogenen Abfall der Expressionslinien, belegt durch Signifikanz im gepaarten 2-seitigen-t-Test. Dabei nehmen die Expressionswerte von Normalgewebe zu Lebermetastase kontinuierlich ab, wobei die Abnahme von Normalgewebe zu Tumorgewebe im Durchschnitt ca. 5-fach größer ist, als die von Primärtumor zu Lebermetastase. Eine Expressionsabnahme des TLR4 zwischen Normalgewebe und Tumorprobe wird durch Signifikanz im gepaarten 2-seitigen-t-Test belegt.

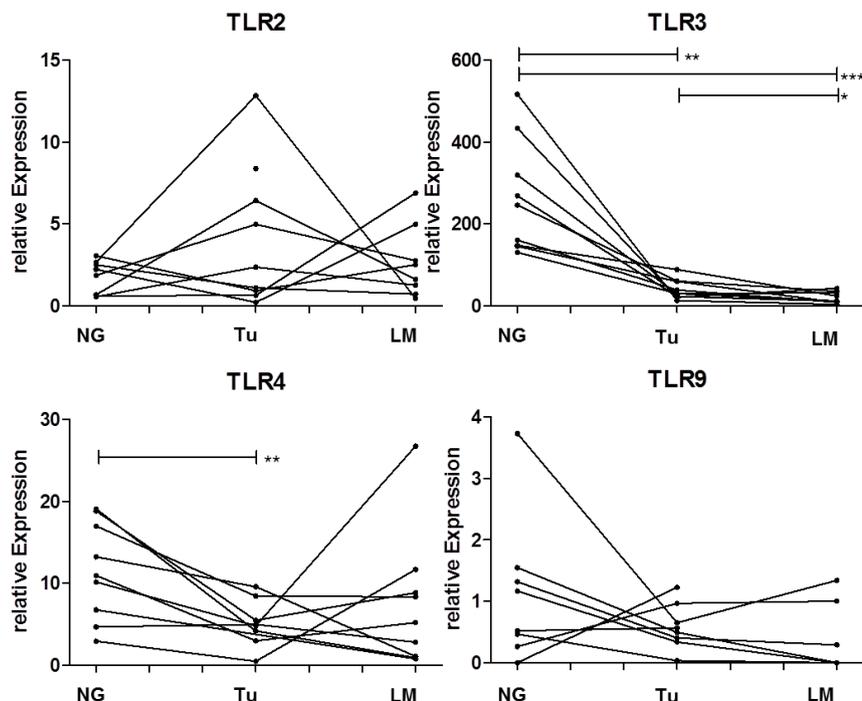


Abbildung 17: TLR-Expressionsanalyse patientenspezifischer Gewebeproben („Matched samples“)

Die unterschiedlichen Skalierungen sind zu beachten. In der UICC IV Patientengruppe zeigte sich eine signifikant reduzierte TLR3-Expression von Normalgewebe (NG) zu Tumoren (Tu) (p -Wert: 0,0026) und Lebermetastasen (LM) (p -Wert: 0,0007). Ausserdem ist die Expression in Lebermetastasen signifikant geringer als die in Tumoren (p -Wert: 0,0485). Die TLR4-Expression ist in Tumoren ebenfalls signifikant geringer als im Normalgewebe (p -Wert: 0,0071).

In den Expressionslinien des TLR9 ist die, bei TLR3 beobachtete, kontinuierliche Expressionsabnahme angedeutet. Aufgrund der grundsätzlich niedrigeren TLR9-Expressionswerte und der größeren Varianz zwischen den einzelnen Patienten lassen sich hier jedoch keine Signifikanzen nachweisen.

7.2.1.3 TLR-Expression in lokal begrenzten Kolonkarzinomen (Stadium UICC II): Test auf Assoziation mit Rezidivierung

Die Gruppe der Patienten mit lokal begrenzten, metastasenfreien Kolonkarzinomen (UICC II) war mit 26 Patienten von insgesamt 55 (47,5%) die größte des untersuchten Patientenkollektivs. Aufgrund der vorliegenden klinischen und

histopathologischen Nachsorgedaten lässt sich diese Kohorte retrospektiv in zwei Untergruppen unterteilen: die Gruppe mit post-operativ aufgetretenen Krankheitsrezidiven in Form von Fernmetastasen (rez.), sowie die Gruppe ohne Rezidiv (non-rez.). Diese Untergruppen wurden gesondert, mittels ungepaarten 2-seitigen-t-Test, auf signifikante Expressionsunterschiede untersucht. Die Expression des TLR2 zeigte dabei eine signifikant-reduzierte Expression in der Rezidivgruppe. Signifikante Unterschiede wurden für die anderen untersuchten TLRs nicht beobachtet.

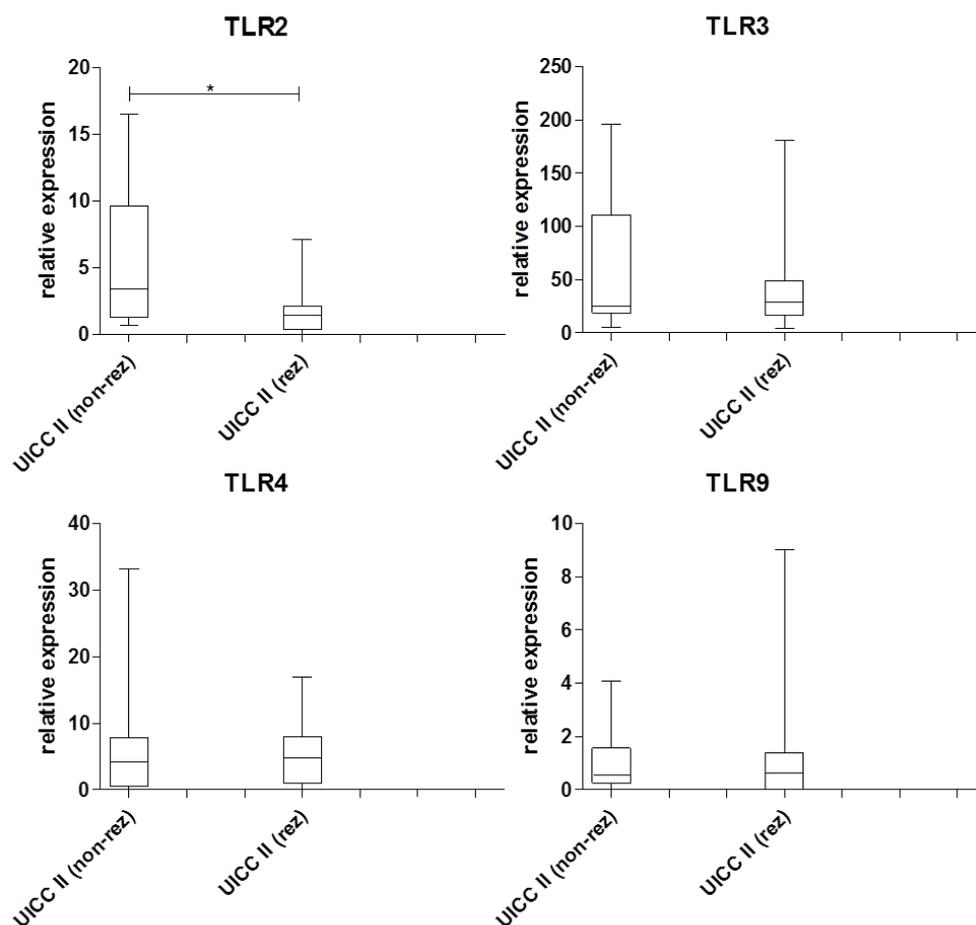


Abbildung 18: relative TLR-Expressionen rezidivierender und nicht-rezidivierender humaner Kolorektaltumore des UICC II Stadiums

Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR. Box-Plot Darstellung mit Angabe des Medians, der Maximal- und Minimalwerte, sowie des 50%-Perzentils. Die unterschiedlichen Skalierungen sind zu beachten. In post-operativ rezidivierenden Tumoren (UICC II rez)(Auftreten von histologisch abgesicherten Fernmetastasen) konnte eine signifikante Reduktion der TLR2-Expression im Vergleich zur Gruppe nicht-rezidivierender Tumore (UICC II non-rez) festgestellt werden (p -Wert: 0,0280).

7.2.1.4 Prognostische Bedeutung der intratumoralen Toll-like Rezeptor-Expression

Die mittels qRT-PCR gemessenen Expressionswerte des Patientenkollektivs wurden mit klinischen und histopathologischen Daten korreliert, wobei diese prä-, intra- und postoperativ in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der TU München durch Fachpersonal erhoben und dokumentiert wurden. Eine Liste der erhobenen Daten ist tabellarisch aufgeführt.

Klinische Daten	Histopathologische Daten
Tumorlokalisation, -breite, -länge, -dicke	Histopathologisches Grading
Gesamtzahl resezierter Lymphknoten (LK)	Gesamtzahl tumor-positiver LK
Adjuvante/ neoadjuvante Therapie	Gefäßinfiltration
Todeszeitpunkt, -ursache	Lymphangiosis
Rezidivstaging	MRR-, BRAF- und Ras-Status
Resektionsstatus	CDK1SA-, CDK2SA-Status
	KI67-Index

Tabelle 12: Liste der für die Kaplan-Meier-Analysen verwendeten klinischen und histopathologischen Daten des Patientenkollektivs

Abkürzungen: Lk (Lymphknoten), CEA (Carcinoembryonales Antigen, Tumormarker), MRR (Mismatch-Repair-Gene), BRAF (Rapidly-Accelerated-Fibrosarcoma-gene), Ras (Rat-Sarcoma-Gene), CDK1/2 SA (specific activity (SA) of cyclin-dependent kinases (CDKs) 1 und 2) {Zeestraten, 2012} {Nitsche, 2012}.

Um die Expressionsdaten mit den klinischen und histopathologischen Daten korrelieren zu können, musste im Vorfeld, aufgrund der unregelmäßigen Verteilung der Werte, eine Logarithmierung (\log_{10}) durchgeführt werden. Hierdurch konnte näherungsweise eine Normalverteilung erreicht werden.

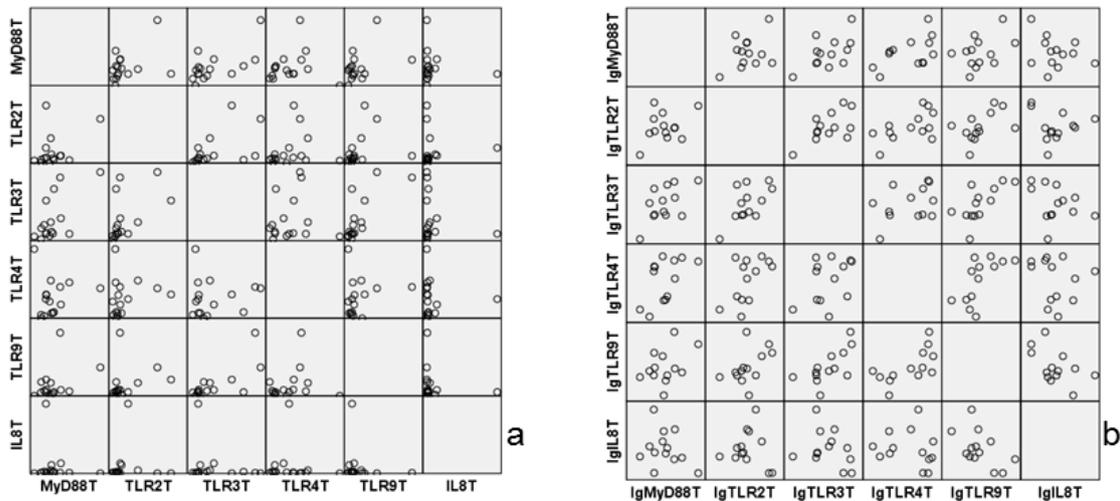


Abbildung 19: Verteilung der Expressionswerte in graphischer Darstellung

a) Unregelmäßige Verteilung der Expressionswerte vor Logarithmierung. b) Die gemessenen Expressionswerte sind logarithmiert (\log_{10}) näherungsweise normalverteilt.

Um zu ermitteln, ob die TLR-Expressionswerte im Zusammenhang mit guter oder schlechter postoperativer Prognose stehen, wurden zuerst die „cut-off“-Werte (Schwellenwerte) mittels Statistikprogramm „R“ berechnet. Damit sollte eine möglichst gute Aufteilung in Hoch- und Niedrigexprimierer erreicht werden („Maximally selected LogRank statistics using condMC“). Die berechneten cut-off-Werte gelten dabei für die logarithmierten Expressionswerte.

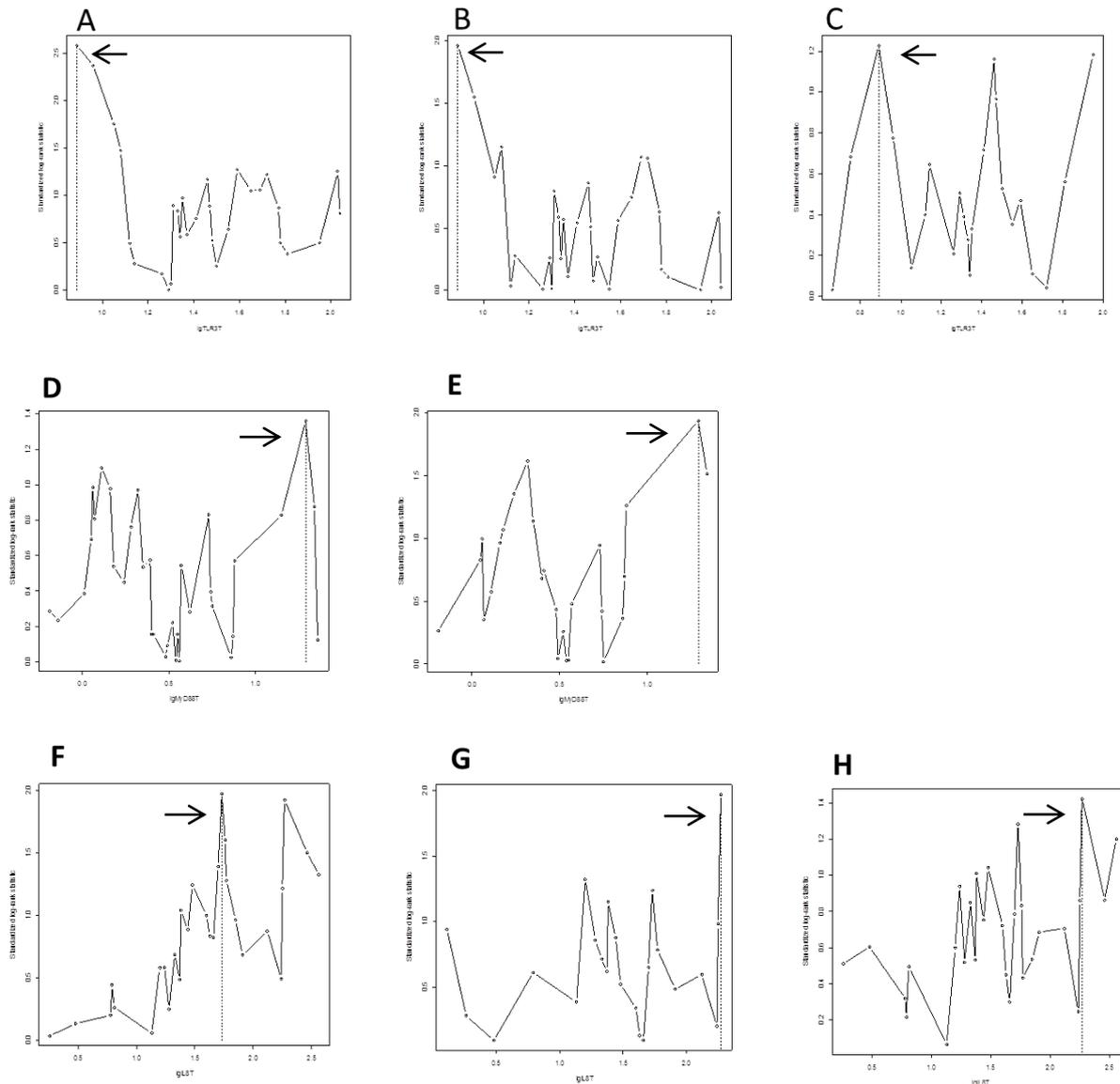


Abbildung 20: Berechnung eines Schwellenwertes („cut-off / cutpoint“) mittels Statistikprogramm „R“

Der „cutpoint“ wird jeweils als senkrechte Linie (**grau**) dargestellt und ist hier mit einem Pfeil gekennzeichnet. **A:** Gesamtüberleben in Abhängigkeit der TLR3-Expression (p-Wert: 0.07107; „cutpoint“: 0.89). **B:** Tumorspezifisches Überleben in Abhängigkeit der TLR3-Expression (p-Wert: 0.3504; „cutpoint“: 0.89). **C:** Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit der TLR4-Expression (p-Wert: 0.2042; „cutpoint“: 0.47). **D:** Gesamtüberleben in Abhängigkeit der MyD88-Expression (p-Wert: 0.7858; „cutpoint“: 1.29). **E:** Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit der MyD88-Expression (p-Wert: 0.3574; „cutpoint“: 1.29). **F:** Gesamtüberleben in Abhängigkeit der IL8-Expression (p-Wert: 0.3504; „cutpoint“: 1.73). **G:** Rezidivfreies Überleben in Abhängigkeit der IL8-Expression (p-Wert: 0.3253; „cutpoint“: 2.27). **H:** Tumorspezifisches Überleben in Abhängigkeit der IL8-Expression (p-Wert: 0.7548; „cutpoint“: 2.27).

Im nächsten Schritt wurden die Expressionswerte und „cut-off“-Werte von Gesamtüberleben, DFS (disease free survival; rezidivfreies Überleben) und TSS (tumor specific survival; tumorspezifisches Überleben), mittels SPSS als Kaplan Meier Überlebenskurven zur Darstellung gebracht. Die Patientengruppe mit Expression unter dem „cut-off“-Wert ist in der Graphik als „0“/blau, und die Gruppe mit Expressionswerten über dem „cut-off“-Wert als „1“/grün gekennzeichnet.

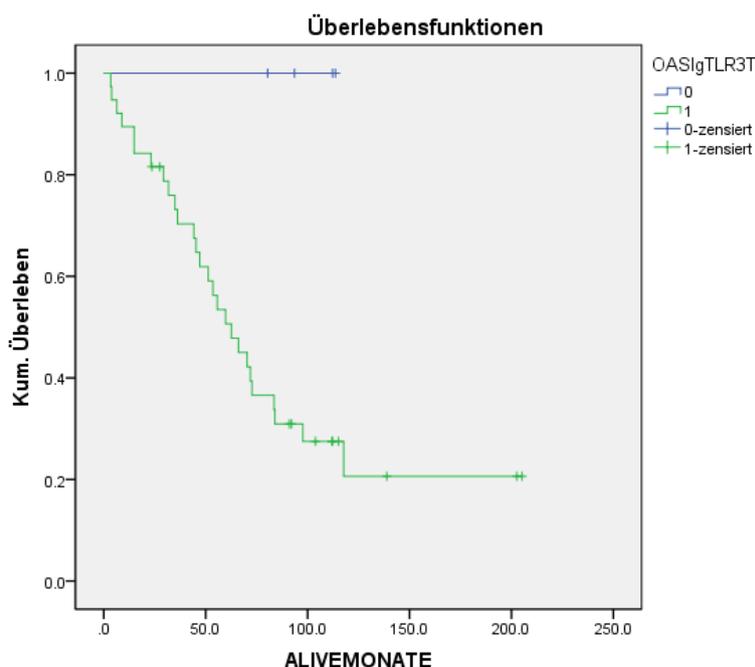


Abbildung 21: Kaplan-Meier-Analyse für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit der TLR3-Expression

Die Kurve zeigt ein signifikant reduziertes Gesamtüberleben (p -Wert: 0,031) bei einer TLR3-Expression über dem Schwellenwert („cutpoint“: 0,89). Bei der Gruppe mit Expression über dem Schwellenwert (**grüne Kurve**) wurden 11 Fälle von 56 und bei der Gruppe mit Expression unter dem Schwellenwert (**blaue Kurve**) 4 Fälle von 5 zensiert.

Die Korrelation der TLR3-Expressionswerte mit klinischen und histopathologischen Daten der Patienten ergab eine Signifikanz bezüglich des Gesamtüberlebens ($p=0,031$). In dem untersuchten Patientenkollektiv ($n=55$) geht eine TLR3-Expression über einem Schwellenwert (cutpoint: 0,89) mit verkürztem Gesamtüberleben einher.

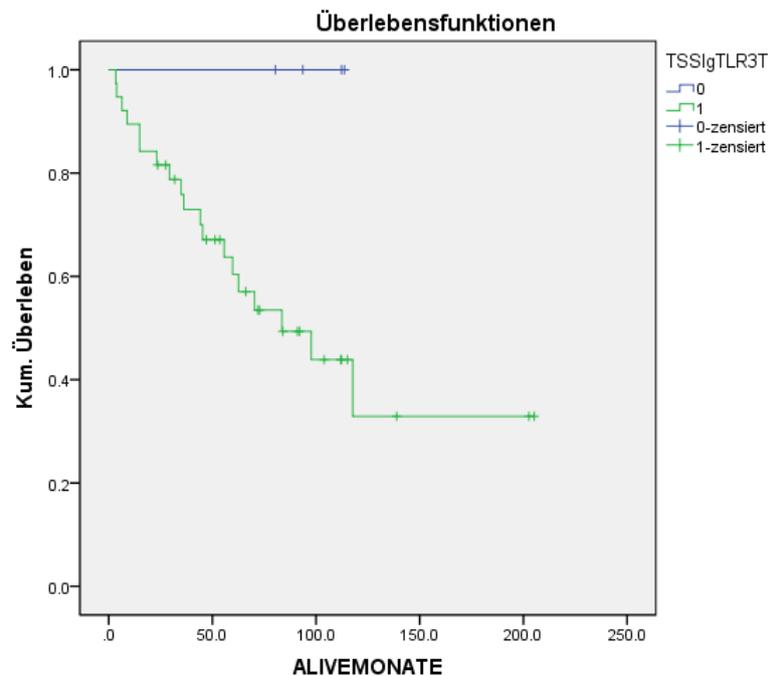


Abbildung 22: Kaplan-Meier-Analyse für das tumorspezifische Überleben in Abhängigkeit der TLR3-Expression

Die Analyse zeigt ein signifikant reduziertes tumorspezifisches Überleben (p -Wert: 0,088) bei einer TLR3-Expression über dem Schwellenwert (cutpoint: 0,89). 17 Fälle von 56 wurden bei der Gruppe mit Expression über dem Schwellenwert (**grüne Kurve**), und 4 Fälle von 5 bei der Gruppe mit niedriger Expression (**blaue Kurve**) zensiert.

Zusätzlich zum Gesamtüberleben, liess sich für TLR3 ein nicht-signifikanter Trend (p -Wert=0,088) bezüglich des tumorspezifischen Überlebens abzeichnen. Auch hier stellt sich eine TLR3-Expression über dem Schwellenwert (cutpoint: 0,89) mit einem reduzierten tumorspezifischen Überleben dar.

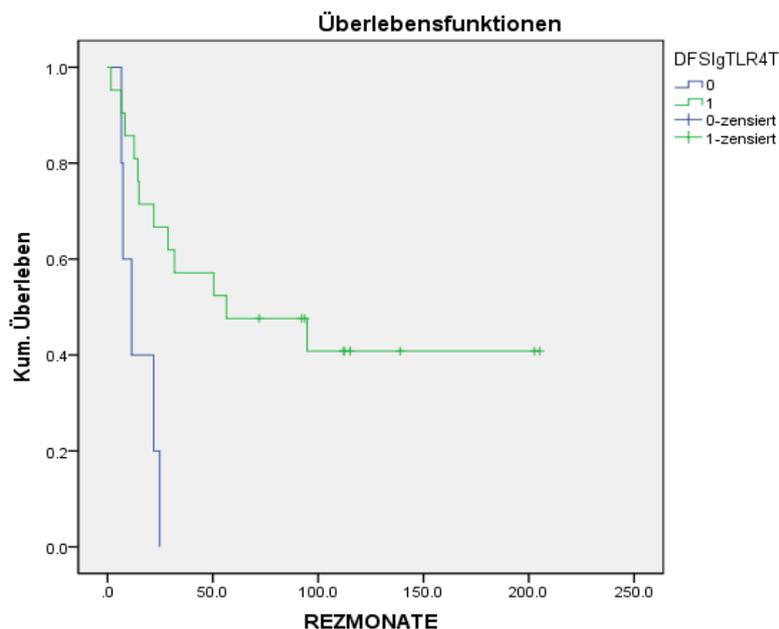


Abbildung 23: Kaplan-Meier- Analyse für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit von der TLR4-Expression

Die Kurven zeigen ein signifikant reduziertes rezidivfreies Überleben (p -Wert: 0,004) bei einer TLR4-Expression unter dem Schwellenwert (cutpoint: 0,47). 8 Fälle von 28 wurden bei den Patienten mit Expression über dem Schwellenwert (**grüne Kurve**) zensiert, während kein Fall von 9 bei der Gruppe mit Expression unter dem Schwellenwert (**blaue Kurve**) zensiert wurde.

Bei der Korrelation der TLR4-Expressionswerte mit den vorliegenden klinischen und histopathologischen Daten konnte eine den für TLR3 erhobenen Befunden entgegengesetzte Beobachtung gemacht werden. Dabei ist nach Auswertung der Kaplan-Meier-Analyse eine TLR4-Expression unter dem Schwellenwert (cutpoint 0,47) mit einem reduzierten rezidivfreien Überleben korreliert ($p = 0,004$).

7.2.2 Stadienabhängige Analyse der MyD88-Genexpression in humanen Kolonkarzinomen

Die MyD88-Expressionsanalyse humaner Kolorektalkarzinome wurde, wie oben für die Toll-like Rezeptoren aufgeführt, für das in 5.8 beschriebene Patientenkollektiv ($n=55$) durchgeführt.

7.2.2.1 MyD88-Expressionsunterschiede kolorektaler Tumore in allen UICC-Stadiengruppen

Die MyD88-Expression unterliegt, mit Ausnahme der UICC III Gruppe, nur relativ geringen Streuungen. Ein signifikanter Unterschied der MyD88-Expression findet sich zwischen Normalgewebe und den Tumoren der UICC IV Gruppe ($p= 0,0013$). Hierbei ist die MyD88-Expression in den Tumoren (1.17 ± 0.15) im Vergleich zum Normalgewebe (2.646 ± 0.3447) um ca. 50% reduziert. Ebenso findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen der UICC II und UICC IV Tumorgruppe. Der p-Wert wird mittels ungepaarten zweiseitigen-t-Test mit 0,0407 berechnet. Die Tumoren der UICC II Gruppe (8.415 ± 1.979) exprimieren damit signifikant mehr MyD88 als die der UICC IV Gruppe (1.175 ± 0.1530). Die MyD88-Expression der Tumore des Stadiums UICC I (1.645 ± 0.4703) und der Lebermetastasen (1.470 ± 0.4768) liegt auf vergleichbarem Niveau und zeigt keine signifikanten Unterschiede zum Normalgewebe.

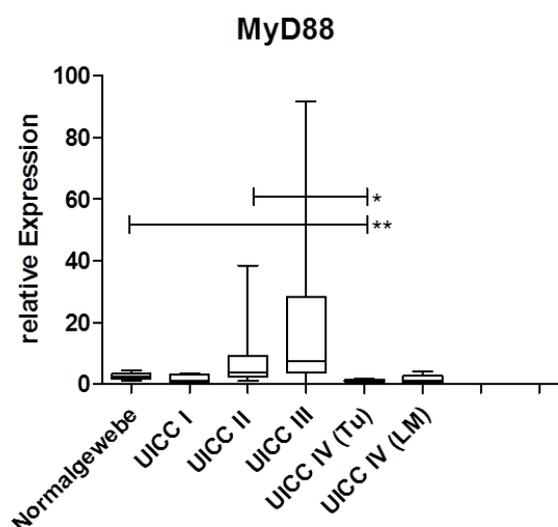


Abbildung 24: relative MyD88-Expression in humanen Kolorektaltumoren

Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR. Box-Plot Darstellung mit Angabe des Medians, der Maximal- und Minimalwerte, sowie des 50%-Perzentils. Die Tumore der UICC IV Gruppe exprimieren signifikant weniger MyD88 als das Normalgewebe (p -Wert: 0,0013) oder die Tumore UICC II Gruppe (p -Wert: 0,0407).

7.2.2.2 MyD88-Expression bei fortgeschrittenen Kolonkarzinomen (Stadium UICC IV)

Bei gesonderter Betrachtung der UICC IV Gruppe zeigt sich im gepaarten 2-seitigen-t-Test ein signifikanter Unterschied der MyD88-Expression zwischen Primärtumoren und Normalgewebe (p -Wert=0,0051). Weitere Signifikanzen liessen sich in der UICC IV Gruppe nicht ermitteln..

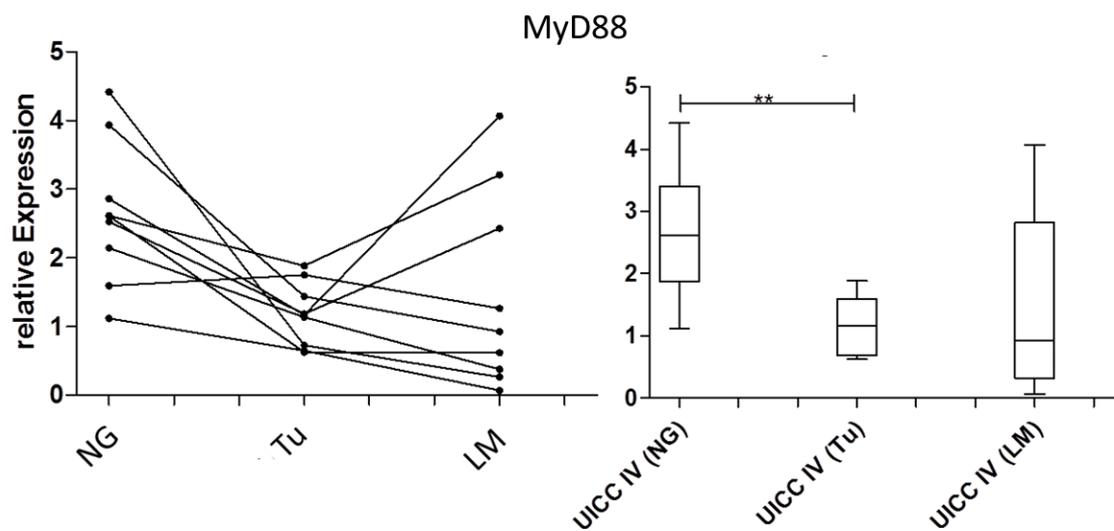


Abbildung 25: MyD88-Expression fortgeschrittener Kolorektalkarzinome

(links) MyD88-Expressionslinien patientenspezifischer Gewebeproben des UICC IV Stadiums.
(rechts) Relative MyD88-Expression von Patienten im UICC IV Stadium. Die Tumore (Tu) der UICC IV Gruppe exprimieren signifikant weniger MyD88 als das Normalgewebe (NG) der entsprechenden Patienten (p -Wert: 0,0051). Die MyD88-Expression der Lebermetastasen (LM) zeigt keine Signifikanz im Vergleich

Wie in 7.2.1.2 beschrieben, können aufgrund der Zusammengehörigkeit der verglichenen Gewebe zu jeweils einem Patienten, Expressionslinien dargestellt werden. Dabei ist zu erkennen, dass in 8 von 9 Fällen die Expression zwischen Normalgewebe und Tumor (Tu) abnimmt. Im Weiteren lassen sich bei Vergleich der Tumor- und Metastasengruppe (LM) gegenläufige Trends beobachten.

7.2.2.3 Keine signifikante Bedeutung der intratumoralen MyD88 Expression für die Prognose

Durch Korrelation der MyD88-Expressionswerte mit histopathologischen und klinischen Daten, konnten mit der SPSS-Software Kaplan-Meier-Analysen für das post-operative Überleben durchgeführt werden. Die hierfür verwendeten Parameter, wie auch die rechnerische Annäherung, sind in Kapitel 7.2.1.4 detailliert aufgeführt.

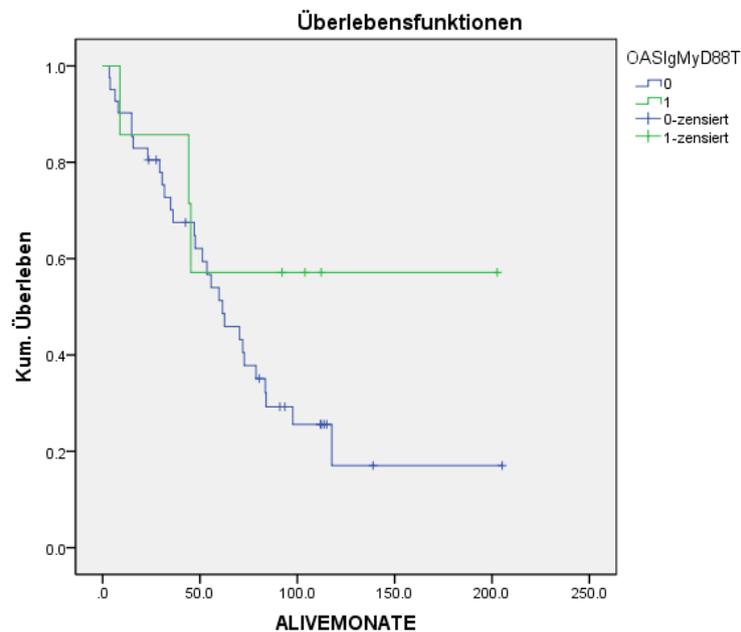


Abbildung 26: Kaplan-Meier-Analyse für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der MyD88-Expression

Details siehe Text. Die Kurven zeigen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Gesamtüberleben und der MyD88-Expression (p -Wert: 0.212). Bei der Patientengruppe mit Expression unter dem Schwellenwert (**blaue Kurve**) wurden 10 Fälle und bei der Patientengruppe mit Expression über dem Schwellenwert (**grüne Kurve**) 4 Fälle zensiert.

Ein Trend, wonach eine MyD88-Expression über dem Schwellenwert (cutpoint=1.29) mit einer besseren Prognose im Gesamtüberleben korreliert, lässt sich allerdings nicht auf dem Signifikanzniveau bestätigen (p -Wert von 0.212).

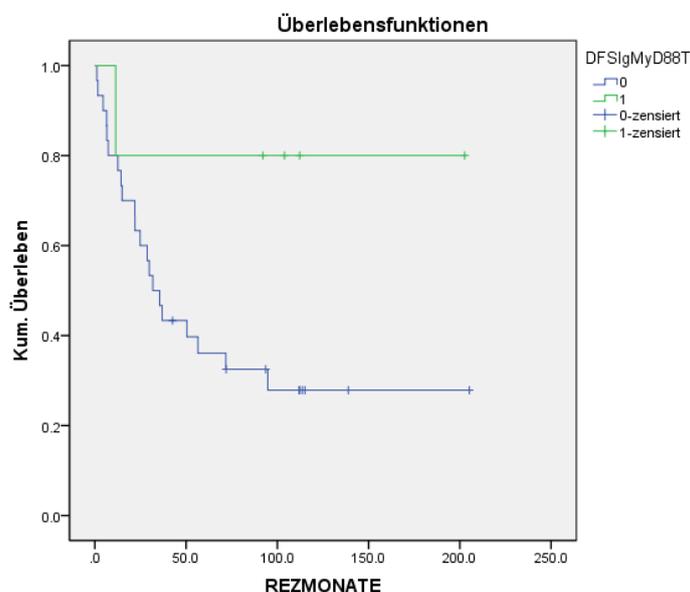


Abbildung 27: Kaplan-Meier-Analyse für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit von der MyD88-Expression

Details siehe Text. Die Kurven zeigen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem rezidivfreien Überleben und der MyD88-Expression (p -Wert: 0.084). Bei der Patientengruppe mit Expression über dem Schwellenwert (**grüne Kurve**) wurden 4 Fälle zensiert. Bei der Patientengruppe mit Expression unter dem Schwellenwert (**blaue Kurve**) wurden 7 Fälle zensiert.

In Bezug auf das rezidivfreie Überleben, ergab sich ebenfalls der Trend ($p=0.084$) einer verbesserten Prognose bei Patienten mit einer MyD88-Expression über den definierten Schwellenwert (cutpoint=1.29).

7.2.3 Stadienabhängige Analyse der intratumoralen Interleukin-8 Genexpression in humanen Kolonkarzinomen

Neben den Toll-like Rezeptoren, und ihrem zentralen Signaladapter MyD88 sollte im Rahmen dieser Arbeit ein wichtiges Zielgen der TLR-Signalwege untersucht werden, das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-8 (CXCL8). Laboreigene Vorbefunde hatten bereits eine signifikante Deregulierung dieses Zytokins in humanen Kolonkarzinomen nachgewiesen {Doll et al., 2010}. Die IL8 Expression humaner Kolorektalkarzinome wurde für $n=44$ Patienten gemessen. Dabei unterscheidet sich das untersuchte Kollektiv von den vorherigen Expressionsanalysen darin, dass weder die Normalgewebe-, noch die UICC IV Gruppen implementiert sind.

7.2.3.1 IL8-Expressionsunterschiede kolorektaler Tumore in allen UICC-Stadiengruppen

Die IL8-Expression zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Tumorgruppen. Der Trend einer ansteigenden Expression konnte mittels 2-seitigen t-Test (*engl. Two-sample t-Test*) und resultierenden p-Werten $> 0,1$ nicht belegt werden.

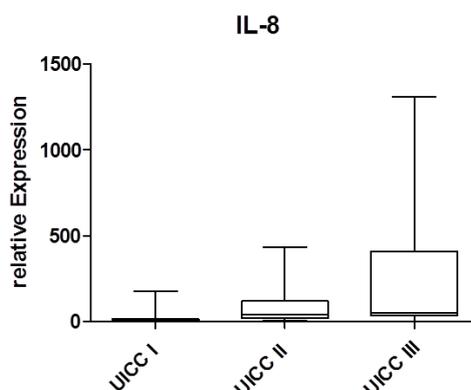


Abbildung 28: relative IL8-Expression humaner Kolorektaltumore

Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR. Box-Plot Darstellung mit Angabe des Medians, der Maximal- und Minimalwerte, sowie des 50%-Perzentils. Es gibt keine signifikanten Unterschiede der IL8-Expression zwischen den Tumorgruppen.

7.2.3.2 Analyse der prognostischen Bedeutung der intratumoralen IL8-Expression bei lokal begrenzten Kolonkarzinomen (Stadium UICC II)

Bei gesonderter Betrachtung der UICC II Gruppe können die Werte von Patienten mit (rez) und ohne Rezidiv (non-rez) miteinander verglichen werden. Die Gruppe von Patienten ohne Rezidiv ($n=10$) zeigt dabei eine größere Streuung der Werte, wobei der Mittelwert der relativen Expression bei $105,4 \pm 41,10$ liegt. Der Mittelwert der Rezidivgruppe liegt bei $87,15 \pm 39,91$ und damit geringfügig unter dem der rezidivfreien Patienten. Es liegen bei Vergleich der Gruppen mittels zweiseitigen-t-Test keine signifikanten Unterschiede vor.

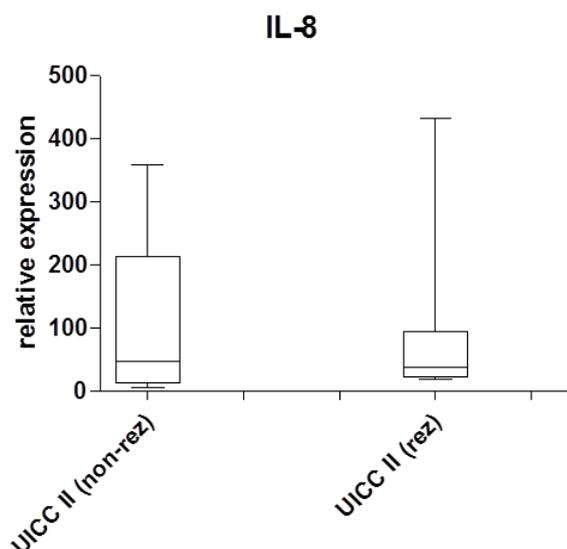


Abbildung 29: relative IL8-Expression rezidivierender und nicht-rezidivierender humaner Kolorektaltumore des Stadiums UICC II

Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR. Box-Plot Darstellung mit Angabe des Medians, der Maximal- und Minimalwerte, sowie des 50%-Perzentils. Es gibt keine signifikanten Unterschiede der IL8-Expression bei dem Vergleich von rezidivierenden und nicht-rezidivierenden Tumoren des UICC II Stadiums.

7.2.3.3 Analyse der prognostischen Bedeutung der intratumoralen IL8-Expression

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war eine prognostische Bedeutung der intratumoralen IL8-Expression nachgewiesen worden {Doll et al., 2010}. Wie in 7.2.1.4 beschrieben, wurden im Rahmen dieser Arbeit klinische und histopathologische Patientendaten, in Abhängigkeit der IL8-Expressionshöhe in den untersuchten Tumoren, mit Hilfe von Kaplan-Meier-Überlebensanalysen dargestellt. Die Schwellenwerte (cutpoints) von OAS (overall survival; Gesamtüberleben), DFS (disease free survival; rezidivfreies Überleben) und TSS (tumor specific survival; tumorspezifisches Überleben) wurden hierzu berechnet. Für das tumorspezifische Überleben ließ sich mit einem p-Wert von 0.075 ein nicht-signifikanter Trend ermitteln, bei dem die Expression über einen Schwellenwert (cutpoint=2.27) die Prognose verschlechtert.

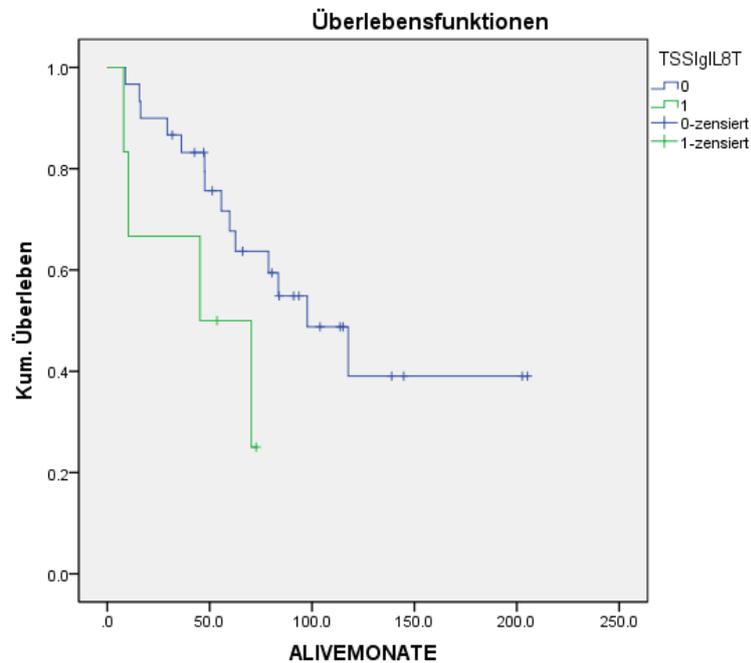


Abbildung 30: Kaplan-Meier-Kurve für das tumorspezifische Überleben in Korrelation mit der IL8-Expression

Details siehe Text. Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen tumorspezifischem Überleben und der IL8-Expression untersuchter Tumore (p -Wert: 0.075). 16 Patientenfälle der Gruppe mit Expressionen unter (**blaue Kurve**) und 2 Fälle der Gruppe mit Expressionen über dem Schwellenwert (**grüne Kurve**) wurden zensiert.

Für das rezidivfreie Überleben konnte mit einem p -Wert $<0,001$ eine signifikante Verschlechterung der Prognose bei hoher IL8-Expression errechnet werden. Dabei treten bei Patienten mit einer IL8-Expression über dem Schwellenwert (cutpoint=2.27) vermehrt Rezidive auf.

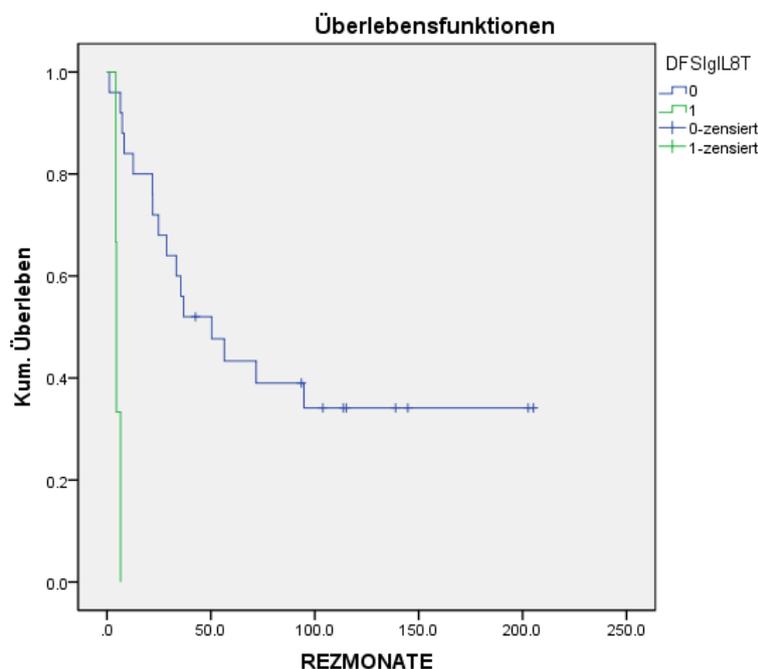


Abbildung 31: Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben in Korrelation mit der IL8-Expression

Bei IL8-Expression über (**grüne Kurve**) einen Schwellenwert (cutpoint: 2,27) kommt es zu einer prognostisch hoch signifikanten Verschlechterung des rezidivfreien Überlebens (p -Wert $< 0,001$). 9 Fälle von 30 wurden bei der Gruppe mit einer Expression unter dem Schwellenwert (**blaue Kurve**) zensiert.

Für das Gesamtüberleben der untersuchten 44 Patienten zeigt sich mit einem p -Wert von 0,036 ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit Expression über und unter dem Schwellenwert. Dabei stellt sich eine IL8-Expression über den berechneten Schwellenwert (cutpoint=1,73) als prognostisch ungünstig dar. Eine hohe IL8-Expression, die auf die Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege schliessen lässt, korreliert so auch mit einem reduzierten Überleben.

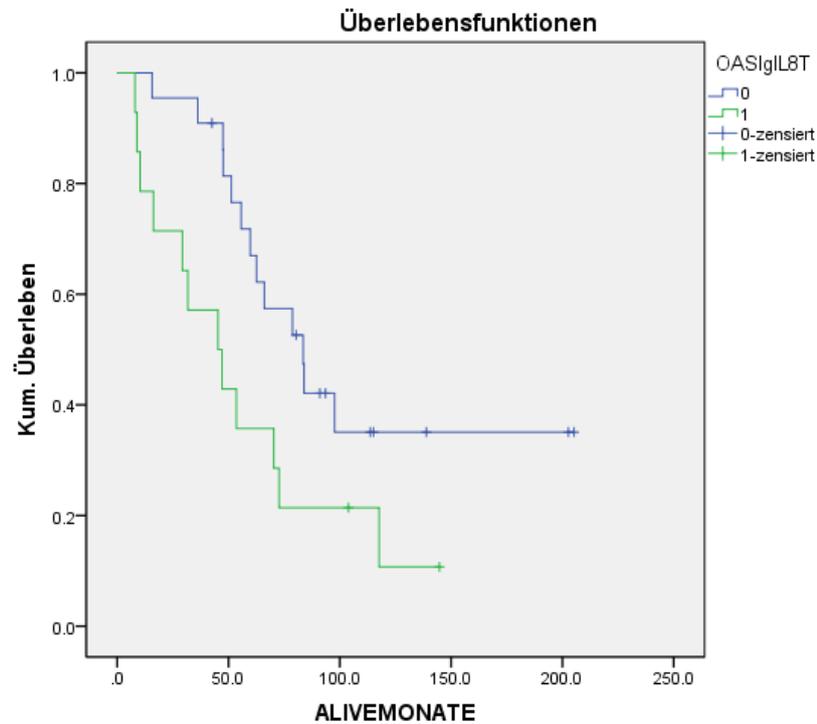


Abbildung 32: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben in Korrelation mit der IL8-Expression

Die Korrelation der IL8-Expression mit dem Gesamtüberleben ergab einen signifikanten (p -Wert: 0,036) Unterschied, wobei sich bei IL8-Expression über einen Schwellenwert (1,73) das Gesamtüberleben verschlechtert. Bei der Gruppe mit einer Expression über dem Schwellenwert gab es 2 Zensuren in 13 Fällen (**grüne Kurve**), während die Gruppe mit niedriger Expression 9 Zensuren in 23 Fällen aufwies (**blaue Kurve**).

Die Interleukin-8-Expression, welche unter Kontrolle TLR-gekoppelter Signalwege wie NF- κ B steht, scheint also prognostische Relevanz zu haben. Konnte im tumorspezifischen Überleben nur ein Trend beobachtet werden, so ließ sich sowohl für das rezidivfreie, als auch für das gesamte Überleben eine signifikante Verschlechterung der Prognose belegen.

7.2.4 Korrelation der intratumoralen Genexpressionswerte

In diesem Kapitel wurden die Tumorproben des Patientenkollektivs ($n=45$), nicht aber die Normalgewebe, auf signifikante Zusammenhänge untersucht. Die Signifikanz wurde mit dem *2-seitigen-t-Test* überprüft. Die Korrelation ist durch den *Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman* dargestellt. Die untersuchten Zielgene waren die TLRs 2, 3, 4, und 9, das Adapterprotein MyD88, sowie das Interleukin-8.

Spearman-Rho Korrelation (log10, nur in Tumoren)					
		TLR3	TLR4	TLR9	IL8
MyD88	Korrelationskoeffizient		.372*		.396*
	Sig. (2-seitig)		.028		.025
	N		35		32
TLR2	Korrelationskoeffizient	.432*			
	Sig. (2-seitig)	.015			
	N	31			
TLR4	Korrelationskoeffizient			.571**	
	Sig. (2-seitig)			.003	
	N			25	
TLR9	Korrelationskoeffizient				.512*
	Sig. (2-seitig)				.043
	N				16

Tabelle 13: Signifikante Korrelationen logarithmierter Expressionswerte von kolorektalen Tumoren

Angegeben sind lediglich die als signifikant errechneten Korrelationen. *) signifikant, **) hoch signifikant. Abkürzungen: Sig. [2-seitig] (Signifikanz im 2-seitigen-t-Test), N (Anzahl untersuchter Tumore).

Es wurden insgesamt fünf signifikante Zusammenhänge von Expressionswerten im untersuchten Kollektiv belegt. Eine Koexpression von MyD88 und TLR4 konnte bei 35 verglichenen Werten mit einem Korrelationskoeffizienten (KK) von 0,372 und einem p-Wert von 0,028 belegt werden. Ebenso ergab die Untersuchung von 32 validen Werten eine signifikante Koexpression von MyD88 und IL8, wobei der Korrelationskoeffizient 0,396 und der p-Wert 0,025 ergaben. TLR2 und TLR3 werden mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,432 und einem p-Wert von 0,015 signifikant koexprimiert. Die deutlichste Koexpression (KK=0,571) findet mit einem p-Wert von 0,003 zwischen TLR4 und TLR9 statt. Bei 16 verglichenen Werten konnte ausserdem eine Korrelation (KK=0,512) von TLR9 und Interleukin-8 belegt werden (p=0,043).

7.3 Analyse von genetisch definierten Mausmodellen für Kolonkarzinome

Die TLR- und MyD88-Quantifizierung, die in der vorliegenden Arbeit an humanen Zelllinien und Patientenproben durchgeführt wurde, sollte durch Untersuchungen an präklinischen Mausmodellen ergänzt werden. Da die Analyse von Patientenmaterial nur korrelative Aussagen ermöglicht, sollte hier auf Mausmodelle zurückgegriffen werden, die eine kausale Aussage über die Auswirkungen der MyD88-Expression in Darmtumoren ermöglichen. Die genetische Inaktivierung des murinen Myd88-Gens erlaubt es, *in vivo* die Effekte auf die Tumorentstehung im Darmtrakt, und spezifisch den Einfluss auf die TLR-Signaltransduktion und –expression, zu untersuchen. Die in der Arbeit verwendeten transgenen Mausmodelle (siehe 5.9) sind durch eine gewebsspezifische MyD88-Expression charakterisiert und ermöglichen, bei globaler MyD88-Defizienz, eine zelltypspezifische Re-Expression von MyD88. Somit können Aussagen über den Einfluss des Adapterproteins auf die TLR-Expression, und vor allem die Funktionalität der TLR-Signalwege im Hinblick auf Entzündung und Tumorgenese getroffen werden. Die zeitaufwendige Einkreuzung von Tumorallelen, und die Analyse der daraus entstandenen komplexen Mausmodelle konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen werden. Darüber hinaus wurde die biologische Funktionalität des Adapterproteins MyD88 und der TLR-Signalwege, durch *ex-vivo* Stimulation von Gewebeexplantaten transgener Mäuse mit TLR-Liganden überprüft. Während die MyD88^{stp/stp}-Maus eine globale MyD88-Defizienz aufweist {Gais et al., 2012}, reexprimiert die MyD88^{IEC}-Maus in intestinalen Epithelzellen und die MyD88^{myel}-Maus in Makrophagen das Adapterprotein MyD88 (siehe 4.1). Diese zelltypspezifische Expression wird durch das DNA-Rekombinase-System Cre/LoxP ermöglicht, die MyD88^{IEC}-Maus entsteht durch Verpaarung mit der pvillin-Cre Linie {el Marjou et al., 2004}, die MyD88^{myel}-Maus durch Verpaarung der MyD88^{stp/stp} Maus mit der LysM-Cre Linie {Malvin et al., 2012}.

7.3.1 Analyse von Mausgewebe mittels qRT-PCR

Um den Einfluss von MyD88 auf die TLR-Expression beurteilen zu können, wurden für die MyD88^{stp/stp}- und MyD88^{IEC}-Mäuse, qRT-PCR Analysen durchgeführt. Hierzu musste zunächst der korrekte Genotyp der Tiere durch PCR-Reaktionen an genomischer DNA überprüft werden.

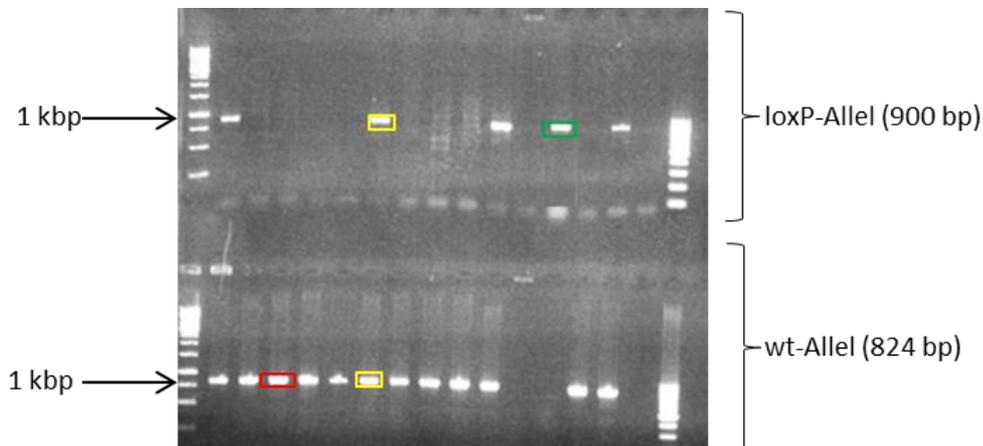


Abbildung 33: PCR-Nachweis des loxP-Allels zur $MyD88^{stp/stp}$ -Genotypisierung

Zur Genotypisierung der $MyD88^{stp/stp}$ -Maus wurden zwei getrennte PCRs durchgeführt. In einem ersten Schritt (**unten**) wurden, zum Nachweis des $MyD88$ -Wildtyp-Allels über ein PCR-Produkt von 824 Basenpaaren (wt,) die Primer MyD-Ex1-sense und MyD-Intron1-antisense eingesetzt. Im nächsten Schritt (**oben**) wurde zum Nachweis der, an der „Stopp-Kassette“ flankierten, loxP-Erkennungssequenz, statt des MyD-Intron1-antisense, der MyD-Stop-antisense Primer eingesetzt (Basensequenz: s. Abschnitt 4.6.1). War kein loxP-Allel in der Maus detektierbar, so handelt es sich um eine Wildtypmaus (**rote Box**). Wurden sowohl das wt-, als auch das loxP-Allel detektiert, so handelt es sich um eine heterozygote Maus (**gelbe Box**). Bei einer $MyD88$ -loxP-homozygoten Maus wurde lediglich das loxP-Allel über ein spezifisches PCR-Produkt von 900 Basenpaaren detektiert (**grüne Box**).

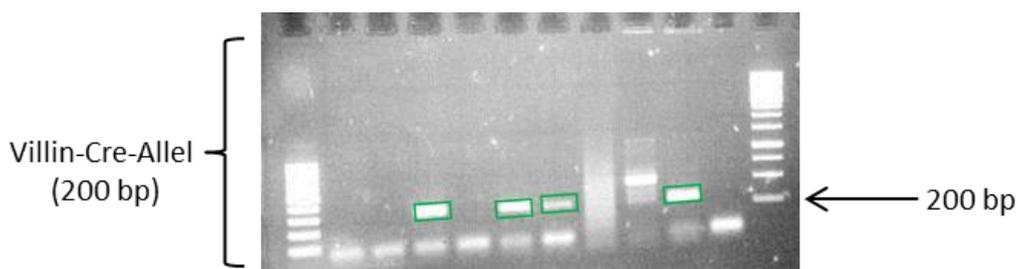


Abbildung 34: PCR-Nachweis des Villin-Cre-Allels in einer $MyD88^{stp/stp}$ -Maus zur $MyD88^{IEC}$ -Genotypisierung

Um eine $MyD88^{IEC}$ -Maus mit selektiver intestinaler $MyD88$ -Reexpression zu generieren, muss eine loxP-homozygote Maus zugleich die Cre-Rekombinase transgen unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors exprimieren. (**grüne Box**) Hierzu wurde das Villin-Cre-Allel (200 bp) mit den Primern Villin-Cre 198 as und Villin-Cre 2kb seq in einer loxP-homozygoten Maus detektiert (Basensequenz: s. Abschnitt 4.6.1).

Zum Vergleich wurde eine C57BL/6-Wildtypmaus mituntersucht. Dabei wurden die Expression der TLRs 2,3,4 und 9, sowie des Adaptermoleküls MyD88 überprüft. Da das Zytokin Interleukin-8 (CXCL8) bei Mäusen nicht vorkommt, wurde alternativ das NF- κ B-Zielgen COX2 (Cyclooxygenase 2) untersucht. Gemessen wurde jeweils die Expression im normalen Kolongewebe. Da die Analysen nur an Gewebeproben aus jeweils einem Tier durchgeführt wurden, besitzen die im Folgenden vorgestellten Untersuchungen nur vorläufigen Charakter, zeigen aber gute Übereinstimmung mit unabhängigen laboreigenen Untersuchungen (nicht gezeigt).

7.3.1.1 MyD88-Expression transgener Mausmodelle

Durch den Vergleich der intestinalen MyD88-Expression wurden insbesondere die transgenen Hintergründe, die durch eine Genotypisierungs-Reaktion an genomischer DNA der Mäuse zuvor ermittelt worden waren, nochmals unabhängig verifiziert. Da die mRNA aus Kolongewebe isoliert wurde, war weder in der MyD88^{stp/stp}-Maus mit globaler MyD88-Defizienz, noch in der MyD88^{myel}-Maus mit monozytärer Reexpression eine MyD88-Expression zu erwarten. Demgegenüber wurden vergleichbare MyD88-Expressionswerte in der Wildtyp- und MyD88^{IEC}-Maus vermutet, da Letztere durch eine spezifische MyD88-Reexpression in intestinalen Epithelzellen charakterisiert ist. Dem transgenem Hintergrund entsprechend, konnte keine Expression des Adaptermoleküls in den MyD88^{stp/stp}- und MyD88^{myel}-Mäusen detektiert werden. Im Kolongewebe der Wildtyp- und MyD88^{IEC}-Mäuse hingegen konnte eine annähernd vergleichbare, wenn auch etwas geringere MyD88-Re-Expression als in der Wildtyp-Kontrolle nachgewiesen werden.

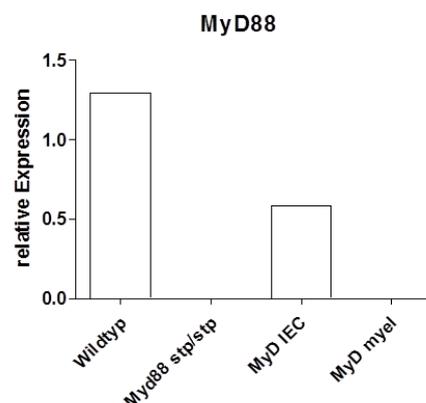


Abbildung 35: relative MyD88-Expression muriner Kolonproben

Die qRT-PCR wurde an je einer Gewebeprobe durchgeführt. Als Kalibrator wurde ein cDNA-Gemisch von Milzgeweben dreier unterschiedlicher C57BL/6-Wildtypmäuse eingesetzt.

7.3.1.2 TLR-Expression in den transgenen Mausmodellen

In dem hier untersuchten Kontrolltier (C57BL/6 Wildtypmaus) konnten alle untersuchten TLRs im Kolon nachgewiesen werden, wobei der TLR4 mit einer relativen Expression von 3.963 die höchsten Werte erzielte. In absteigender Reihenfolge werden TLR 2, 3 und 9 exprimiert, wobei sich letzterer an der Nachweisbarkeitgrenze befindet. Die MyD88^{stp/stp}-Maus mit globaler MyD88-Defizienz exprimiert die TLRs 2 und 4 in vergleichbarer Menge wie die Wildtypmaus, und zeigte eine erhöhte Expression von TLR3. Eine TLR9-Expression war nicht nachweisbar, was auf die geringe Gesamtexpression von TLR9 rückführbar sein könnte.

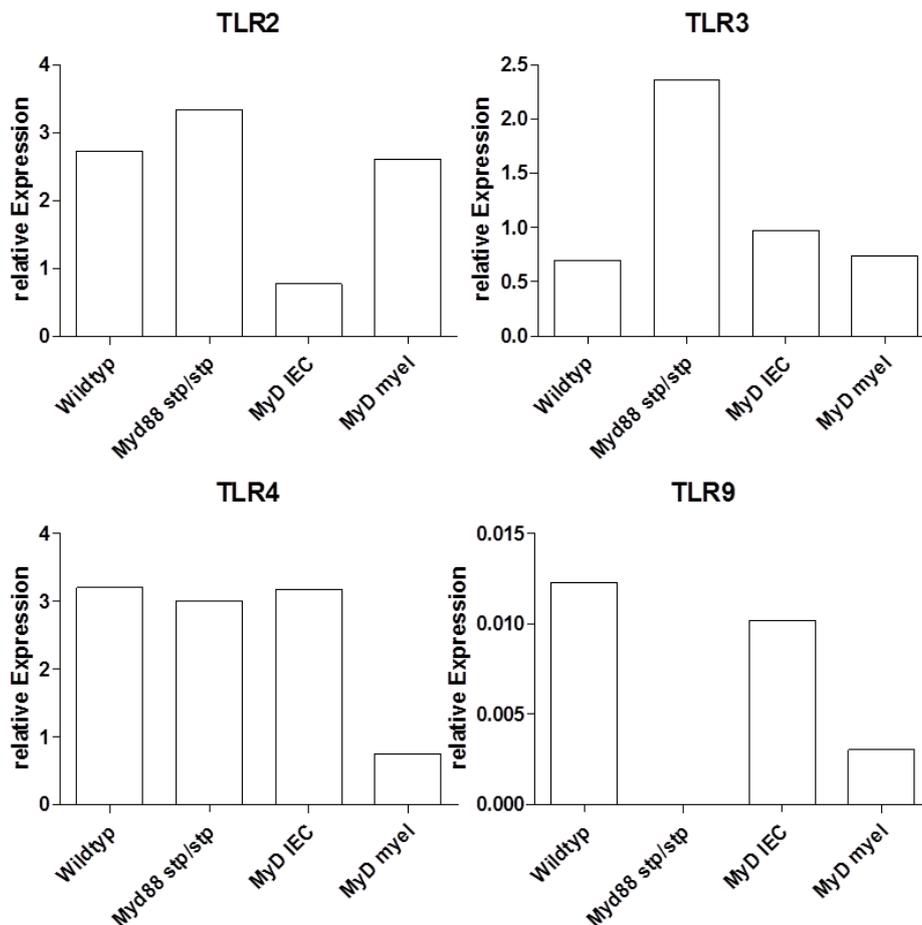


Abbildung 36: relative TLRs-Expression muriner Kolonproben

Die qRT-PCR wurde an jeweils einer Probe durchgeführt. Als Kalibrator wurde ein cDNA-Gemisch von Milzgeweben dreier unterschiedlicher C57BL/6-Wildtypmäuse eingesetzt.

Die MyD88^{IEC}-Maus mit selektiver MyD88-Reexpression in intestinalen Epithelzellen exprimiert alle untersuchten TLRs, wobei insbesondere die TLR2-Expression im Vergleich zu den anderen Gruppen reduziert ist. Bei der MyD88^{myel}-Maus mit selektiver MyD88-Reexpression in Monozyten wurden ebenfalls alle untersuchten TLRs nachgewiesen. Während die TLRs 2 und 3 der Wildtypmaus in vergleichbarer Menge exprimiert werden, zeigt sich bei TLR4 und vor allem TLR9 eine reduzierte Expression.

7.3.1.3 Expression von COX2 in transgenen Mausmodellen

COX-2 (Cyclooxygenase 2) ist ein Prostaglandin-Synthese-Enzym, welches bei inflammatorischen Prozessen produziert wird und als Zielgen des NF- κ B-Signalweges etabliert ist. Die COX2-Expression wurde aus diesem Hintergrund in den transgenen Mausmodellen quantifiziert und verglichen. Mit einer relativen Expression von ca. 0.1 wurden die höchsten Werte in der Wildtypmaus gemessen. Wie vermutet, stellt sich die Expression in den transgenen Mausmodellen als reduziert dar. Während bei der MyD88^{stp/stp}-Maus keine Expression nachzuweisen ist, befindet sich das MyD88-Expressionsniveau bei den MyD88^{IEC}- und MyD88^{myel}-Mäusen knapp über der Nachweisbarkeitsgrenze. Somit kann vermutet werden, dass die COX2-Expression im Darmgewebe von der TLR/MyD88-Expression abhängig ist.

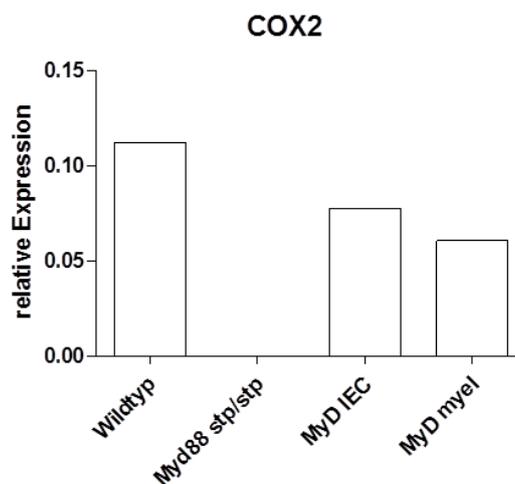


Abbildung 37: relative COX2-Expression (Cyclooxygenase 2) muriner Kolonproben

qRT-PCR an jeweils einer Probe durchgeführt. Als Kalibrator wurde ein cDNA-Gemisch von Milzgeweben dreier unterschiedlicher C57BL/6-Wildtypmäuse eingesetzt.

7.3.2 Stimulation von Gewebe-Explantaten mit TLR-Liganden

Bei diesem Versuch wurden C57Bl/6-Wildtyp-, MyD88^{stp/stp}- und MyD88^{IEC}-Mäuse verglichen. Den Mäusen wurden, nach Betäubung mit Isofluran und Tötung durch zervikale Dislokation, Kolon, Jejunum und Milz entnommen (siehe 6.1.1). Anschliessend wurden die Proben jeweils in 2 ml Gewebekultur-Medium (siehe 2.6, main culture medium) aufgenommen, in einem Inkubator in Kultur gehalten und mit TLR-Liganden stimuliert (siehe 6.2.2). Hierbei wurde nach 24h Inkubation von TLR2 und TLR9 durch die Liganden Pam3Cys und CpG, der konditionierte Überstand zur Zytokin- und Chemokindetektion mittels ELISA (*engl.: Enzyme linked immunosorbent assays*) eingesetzt (siehe 6.4.1). Untersucht wurden Interleukin-6 und TNF α als Zielgene des NF- κ B-Signalweges. Die Versuche wurden zweimal unter identischen Bedingungen wiederholt.

7.3.2.1 Bestimmung von sekretiertem Interleukin-6 nach TLR-Stimulation von Gewebeexplantaten (ELISA)

Bei der Detektion von sekretiertem Interleukin-6 in konditionierten Überständen murinen Kolongewebes zeigt die Wildtypmaus (WT) nach 24h Stimulation die höchsten Konzentrationen. Liegt die Konzentration der unstimulierten Kontrolle im Mittel bei 31.1 (+/- 11.9) pg/ml pro Gramm Gewebe (pg/ml//gG), so steigt die IL6-Konzentration nach TLR2-Stimulation auf 61.1 (+/- 21,6) pg/ml//gG. Die höchsten Werte werden nach TLR9-Stimulation mit 115,6 (+/- 76,2) pg/ml//gG erreicht. Die Kolon-Gewebeprobe der MyD88^{-/-}-Maus zeigt neben niedrigeren IL6-Konzentrationen, auch einen Verlust der Stimulierbarkeit durch TLR-Liganden. Die IL6-Konzentrationen der unstimulierten Kontrolle (10,5 +/- 9,7pg/ml//gG), sowie der Pam3Cys (15,1 +/- 18,1pg/ml//gG) und CPG (10,9 +/- 1,2pg/ml//gG) stimulierten Ansätze sind bei den untersuchten Mäusen mit globalem MyD88-Defizit vergleichbar niedrig. Die Mäuse mit selektiver intestinaler MyD88-Reexpression (MyD88^{pviCre x MyD88^{-/-}}), zeigen ein zur MyD88^{-/-}-Maus vergleichbar niedriges Expressionsprofil mit fehlender TLR-Stimulierbarkeit.

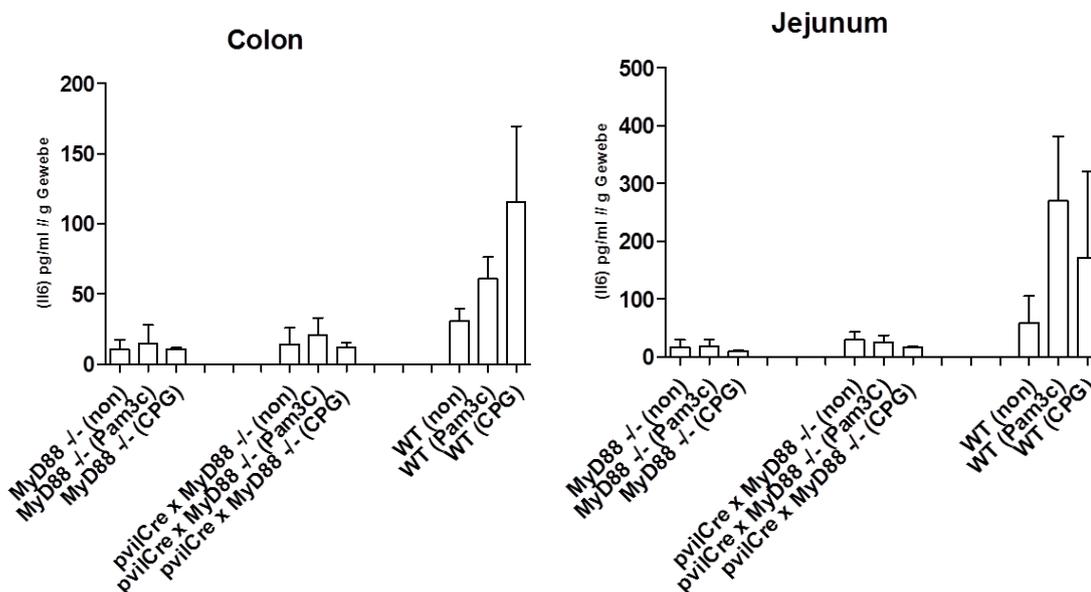


Abbildung 38: IL6-Zytokindetektion nach 24h-Ex-Vivo-Stimulation des Kolons (links) und des Jejunums (rechts)

Zu erkennen sind der Mittelwert +/- Standardabweichung. Mittels ELISA wurde lösliches IL6 (pg/ml) im konditionierten Medium von Gewebeexplantaten bei jeweils 2 Mäusen des gleichen Genotyps gemessen. Die Werte wurden nach 24h Inkubation mit den TLR-Liganden (**in Klammern**) erfasst.

Die IL6-Detektion in konditionierten Überständen murinen Dünndarmgewebes zeigt ein zum Kolon vergleichbares Profil. So sind auch hier die IL6-Konzentrationen der Wildtypmaus höher als die der transgenen Mausmodelle. Bei den MyD88^{-/-} und MyD88^{IEC}-Mäusen sind keine deutlichen Unterschiede nach TLR-Stimulation zu erkennen. Bei globaler MyD88-Defizienz liegen die Konzentrationen nach Pam3c- und CPG- Stimulation im Bereich der unstimulierten Kontrolle.

Wie bei den konditionierten Überständen von Kolon und Jejunum zeigt sich bei dem murinen Milzgewebe die höchste IL6-Konzentration in der Wildtyp-Gruppe. Bei den MyD88^{-/-}-Mäusen konnte bei Betrachtung der unstimulierten Kontrolle, ebenfalls eine erhöhte IL6-Konzentration nach Pam3c- und CPG-Stimulation gemessen werden. Bei der MyD88^{IEC}-Gruppe mit selektiver, intestinaler MyD88-Reexpression, die in der Milz aufgrund der zelltyp-spezifischen Expression keine Auswirkung haben sollte, wurden nach Stimulation mit Pam3c und CPG etwas höhere IL6-Konzentrationen gemessen als in der Kontrolle ohne Stimulation

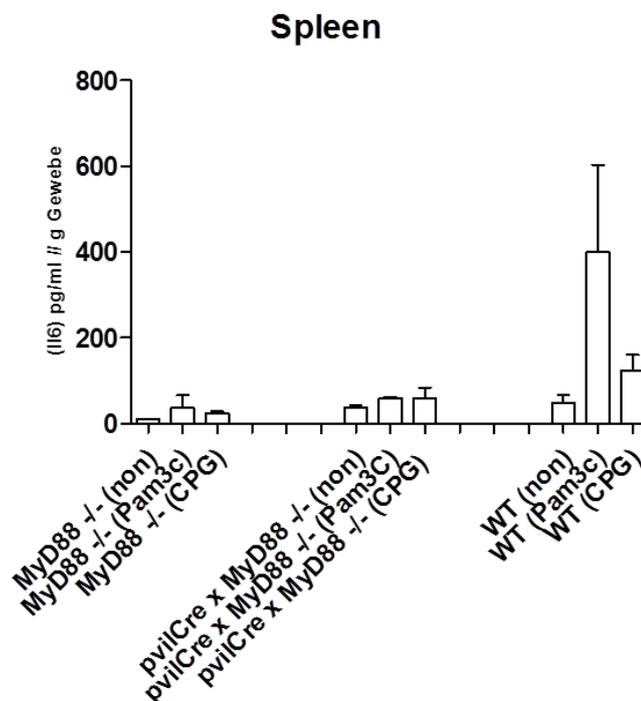


Abbildung 39: IL6-Zytokindetektion nach 24h-Ex-Vivo-Stimulation der Milz (engl.: spleen)

Zu erkennen sind der Mittelwert +/- Standardabweichung. Mittels ELISA wurde lösliches IL6 (pg/ml) im konditionierten Medium von Gewebeexplantaten bei jeweils 2 Mäusen des gleichen Genotyps gemessen. Die Werte wurden nach 24h Inkubation mit den TLR-Liganden (*in Klammern*) erfasst.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Kurzzeit-Kultur von Gewebe-Explantaten eine gute Möglichkeit darstellt, um die in vivo Aktivierbarkeit der TLR/MyD88-abhängigen Signalwege zu überprüfen. Es konnte gezeigt werden, dass Gewebe aus Tieren mit globaler MyD88-Defizienz deutlich verringerte Mengen an IL6 sekretierte, und keine Stimulierbarkeit mit Liganden für MyD88-abhängige TLRs mehr aufwies. In einer Mauslinie mit spezifischer Re-Expression von MyD88 im Darmepithel konnte keine Rekonstitution der IL6-Expression nach TLR-Stimulation nachgewiesen werden. Dies erlaubt den Schluss, dass die in Wildtyp-Mäusen beobachtete IL6-Sekretion nicht auf Darmepithelzellen, sondern auf Immunzellen oder andere Zelltypen im Darmgewebe zurückzuführen ist. Hier könnte ein Versuch mit Makrophagen-spezifischer Re-Expression von MyD88 Aufschluss geben, der im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnte.

7.3.2.2 TNF α -ELISA

Neben dem Zytokin IL6 wurde TNF α im ELISA gemessen, allerdings konnten hier aufgrund der generell geringen Ausprägung von TNF α keine belastbaren Ergebnisse erzielt werden. Bei der TNF α -Zytokindetektion in konditionierten Überständen muriner Kolonproben ist die höchste TNF α -Konzentration bei den transgenen Mausmodellen zu finden. Die MyD88^{-/-}-Gruppe zeigt nach TLR2- (1,779 +/- 1,444pg/ml//gG) und TLR9-(0,8200 +/- 0,6223pg/ml//gG) Stimulation höhere Konzentrationen als in der unstimulierten Kontrollgruppe (0,0675 +/- 0,01061pg/ml//gG). Ebenso reagierte die MyD88^{IEC}-Gruppe auf die TLR2-(1,360 +/- 1,754pg/ml//gG) und TLR9-(0,1150 +/- 0,1626pg/ml//gG) Stimulation mit höheren TNF α -Konzentrationen als die nicht-stimulierte Kontrolle (0,0 +/- 0,0pg/ml//gG). In der Wildtyp-Gruppe nimmt die TNF α -Konzentration nach Stimulation mit Pam3c (0,0500 +/- 0,07071pg/ml//gG) und CPG (0,0170 +/- 0,02404pg/ml//gG) im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,2000 +/- 0,2828pg/ml//gG) ab. Die Zytokindetektion ex-vivo-stimulierter Jejunumproben lässt, trotz grundsätzlich niedriger TNF α -Konzentrationen, die Vermutung zu, dass das Adapterprotein MyD88 eine wichtige Rolle in proinflammatorischen Prozessen einnimmt. Während in der WT-Gruppe die unstimulierte Kontrolle (0,0 +/- 0,0pg/ml//gG) kein TNF α produziert, zeigen die TLR2-(0,4000 +/- 0,1980pg/ml//gG) und TLR9- (0,5450 +/- 0,3041pg/ml//gG) stimulierten Ansätze erhöhte TNF α -Konzentrationen. Mit vergleichbarem TNF α -Konzentrationsprofil wurde auch in der MyD88^{IEC}-Gruppe mit selektiver, intestinaler MyD88-Reexpression, kein TNF α in der unstimulierten Kontrolle (0,0 +/- 0,0pg/ml//gG) detektiert und wiederum erhöhte Konzentrationen in den Pam3c-(0,4000 +/- 0,1980pg/ml//gG) und CPG- (0,5450 +/- 0,3041pg/ml//gG) stimulierten Ansätzen gemessen. Von den in der MyD88^{IEC}- und Wildtypgruppe gemessenen Konzentrationen abweichend, sind die detektierten TNF α -Konzentrationen der MyD88^{-/-}-Gruppe. Zwar sind die Messwerte der TLR2- (0,2005 +/- 0,09122pg/ml//gG) und TLR9- (0,0400 +/- 0,05657pg/ml//gG) stimulierten Proben auch hier höher als die der unstimulierten Kontrolle (0,0 +/- 0,0pg/ml//gG), jedoch liegt das TNF α -Niveau unter dem der MyD88-exprimierenden Gruppen.

8 Diskussion

8.1 Einfluss des Toll-like Rezeptor (TLR)-Systems auf die inflammationsbedingte kolorektale Tumorgenese

Neben Detektion und Abwehr mikrobieller Infektionen beteiligt sich das Toll-like-Rezeptorsystem an der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase {Michelsen & Arditi, 2007}. Über den TLR-NF- κ B-Signalweg wird, bei Gewebeschädigung und konsekutiver TLR-Bindung endogener und exogener Liganden, die Produktion von anti-apoptotischen und proinflammatorischen Faktoren wie Cox-2 oder TNF α angeregt, was die Entstehung eines Entzündungsmilieus nach sich zieht {Fukata, 2006} {Burstein, 2008}. Wechselwirkungen des Entzündungsinfiltrats mit dem umliegenden Gewebe sichern, durch Anregung von Neovaskularisation, Reinvrierung und Gewebeproliferation, den Wiederaufbau der Zellpopulation, Barrierenintegrität und Gewebearchitektur {Rakoff-Nahoum, 2009}. Solche regenerativen Prozesse finden sich auch unter physiologischen Bedingungen in Organsystemen mit hohem Zellumsatz, großer Oberfläche und regelmäßigem Antigenkontakt, wie dem Reproduktions-, Respirations- oder Verdauungstrakt {Jiang, 2005} {Girling, 2007}. Betrachtet man ferner die Mikroumgebung von Tumoren, so zeigen sich häufig, mit einer grossen Anzahl von Entzündungszellen, sowie hohen Konzentrationen an Chemokinen und Zytokinen, alle Charakteristika chronischer Entzündungen und regenerativer Prozesse {Chen, 2008}. Der Zusammenhang von chronischer Entzündung und Tumorgenese ließ sich so bereits für verschiedenste Tumorentitäten belegen: chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und Kolorektalkarzinom, HP-Infektion (*Helicobacter pylori*) und Magenkarzinom, HCV- und HBV-Infektion (Hepatitis-C- und Hepatitis-B-Virus) und Leberzellkarzinom, Schistosomiasis und Blasenkarzinom, chronische Bronchitis und Lungenkarzinom, chronische Pankreatitis und Pankreaskarzinom {Balkwill, 2004} {Burstein, 2008} {Ernst, 2001} {Li, 2005}. Diesen Beobachtungen entsprechend, wird das tumorigene Potential chronischer Entzündungen heutzutage weitestgehend akzeptiert, wobei die genauen molekularen, sowie intra- und interzellulären Mechanismen weiterhin unbekannt bleiben. Aufgrund der steigenden Evidenz, dass das TLR-System bei chronischen Entzündungen und der damit verknüpften inflammationsbedingten Tumorgenese einen wichtigen Beitrag liefert, {Rakoff-Nahoum, 2008} {Chen, 2008} {Akira, 2004} {Huang, 2008} {Kawai, 2010} wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen TLR-Expressionsprofile muriner und humaner Intestinalgewebe

etabliert. Bei Mäusen wurden hierbei, in Dünn- und Dickdarmgewebe, die RNA-Expressionen aller in dieser Arbeit untersuchten TLRs (2, 3, 4 und 9) bestätigt und ebenso konnten, mit Ausnahme des TLR3, die Proteine der untersuchten TLRs im gesamten Intestinum detektiert werden. Interessanterweise waren im murinen Kolon keine weiteren TLR-Expressionen detektierbar {Abreu, 2010}. Bei der Untersuchung menschlichen Intestinalgewebes wurden die Proteine und RNAs der TLRs 2, 3, 4 und 9 ebenfalls detektiert. Ferner konnten im Kolon die Expression der TLRs 1, 5 und 6 festgestellt werden {Abreu, 2010}. Um eine mögliche TLR-vermittelte Interaktion von Karzinomzellen mit der tumoralen Mikroumgebung beurteilen zu können wurden für 12 isolierte Tumorzelllinien humaner, kolorektaler Karzinome TLR-Expressionsprofile erstellt, wonach die SW480- und HT29-Zellen alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten TLRs (2, 3, 4 und 9) exprimieren, während die DLD1-Zelllinie lediglich die TLRs 2 und 9 exprimiert. Auffällig ist die große Heterogenität der TLR-Expressionen in den untersuchten Tumorzelllinien, so dass keiner der bekannten und untersuchten humanen TLRs (1-10) in allen 12 Zelllinien vertreten ist {Abreu, 2010}. Der TLR4 wird in 10 von 12 Zelllinien exprimiert und ist damit am häufigsten vertreten (TLR2: 9/12; TLR3: 7/12; TLR4: 10/12; TLR9: 7/12). Desweiteren konnten in humanen Gewebeproben die TLRs 2, 3, 4 und 9, mittels Immunhistochemie, an der apikalen und basolateralen Seite epithelialer Intestinalzellen nachgewiesen werden {Abreu, 2010}. Diese Beobachtungen belegen, dass Tumorzellen Toll-like Rezeptoren heterogen exprimieren und das Potential haben mit ihrer Mikroumgebung TLR-vermittelt zu interagieren. Eine Veränderung der TLR-Quantität und/oder –Qualität (postranslationelle Modifizierung, TLR-Spektrum oder -Lokalisierung), sowie der Liganden-Qualität und/oder Quantität könnten demnach das sensible Gleichgewicht der Gewebemöostase stören und dadurch möglicherweise Tumorgenese und –progression begünstigen.

Um den Einfluss einzelner Toll-like-Rezeptoren auf die inflammationsbedingte Tumorgenese weiter abschätzen zu können, wurden in dieser Arbeit die Expressionshöhe ausgewählter TLRs (2, 3, 4 und 9), sowie ihres zentralen Signaladapters Myd88, und des TLR-Zielgens Interleukin-8 an etablierten Zelllinien kolorektaler Karzinome, sowie in operativ resezierten Tumorproben des Menschen bestimmt und verglichen. Des Weiteren wurde der Einfluss des Adapterproteins MyD88 auf die TLR-Expression und die Aktivität der TLR-abhängigen Signalwege mit Hilfe transgener Mausmodelle untersucht.

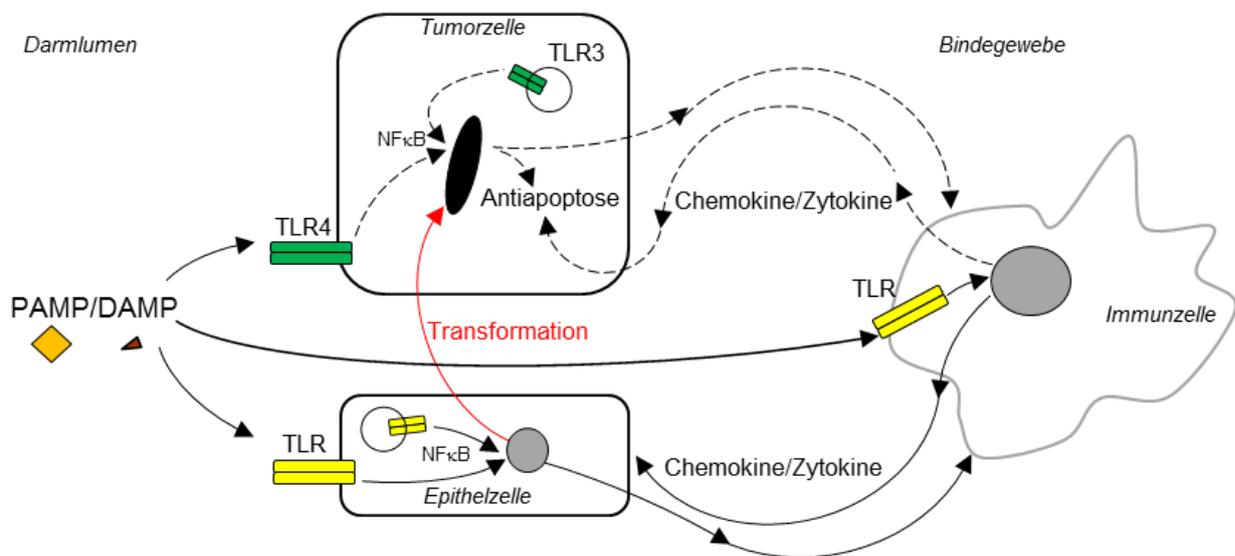


Abbildung 40: Vereinfachte Darstellung potentieller Wechselwirkungen von intestinalen Epithel- und Tumorzellen mit der Mikroumgebung

(unterer Bildabschnitt; durchgezogene schwarze Pfeile) Die TLR-NF- κ B-Signalwegaktivierung durch Liganden (DAMP: damage associated molecular pattern / PAMP: pathogen associated molecular pattern) bedingt in Epithel- und Immunzellen eine verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, welche in Wechselwirkung eine Inflammation etablieren.

(oberer Bildabschnitt; gestrichelte schwarze Pfeile) Die Aufrechterhaltung der TLR-NF- κ B-Signalwegaktivierung durch anhaltende Stimulation und/oder Veränderungen wie die, in der vorliegenden Arbeit beobachtete, transkriptionelle TLR-Deregulation (**gelb markierte TLRs** = keine Veränderung der Expression, **grün markierte TLRs** = reduzierte Expression im Tumor) begünstigen, über die entgleiste NF- κ B-Zielgentranskription, möglicherweise Antiapoptose und Tumorprogression.

8.1.1 TLR- und MyD88-Expression etablierter kolorektaler Tumorzelllinien

Während Funktion und Expression des TLR-Systems in Zellen des innate Immunsystems eingehend untersucht wurden, rückt die Rolle der TLR-abhängigen Signaltransduktion kanzeröser Zellen zunehmend in den Fokus tumorbiologischer Forschung. Wechselwirkungen der immunologischen Mikroumgebung mit den Tumorzellen führen über den NF- κ B-Signalweg zu einem verlängerten Überleben der Zellen {Chen, 2007}. C-FLIP, XIAP und Phospho-AKT sind wichtige Regulatoren des Zellüberlebens und werden durch NF- κ B hochreguliert, während Bax und Caspase-9 als proapoptische Proteine inhibiert werden {Kreuz, 2004}. Neben TNF α sind auch

Toll-like Rezeptoren wichtige Induktoren des NF- κ B -Signalweges. Um die Suszeptibilität von Adenokarzinomzellen des Kolons für eine TLR-vermittelte NF- κ B -Induktion abschätzen zu können, wurden für 4 Tumorzelllinien die Expressionen des Adaptermoleküls MyD88, sowie der TLRs 2, 3, 4 und 9 untersucht. Das Adaptermolekül MyD88 wird von allen untersuchten Zelllinien in vergleichbarer Menge exprimiert, wobei weder die Stimulation MyD88-abhängiger Rezeptoren (TLR2 und 9), noch die Stimulation von MyD88 teils oder völlig unabhängiger Rezeptoren (TLR3 und 4) einen erkennbaren Einfluss auf dessen Expression hatten. Dies könnte bedeuten, dass der Signaladapter MyD88 unabhängig vom TLR- NF- κ B -Signalweg, auch bei anhaltender Stimulation, ausgeprägt wird. So wurde gezeigt, dass Moleküle wie TOLLIP (Toll-interacting protein) und das „single immunoglobulin IL1R-related molecule“ (SIGIRR) die Signaltransduktion der TLRs 2, 4 und 9 inhibieren und beispielsweise bei CEDs (chronisch entzündlichen Darmerkrankungen) pathologisch herabreguliert sind {Otte, 2004} {Steenholdt, 2009} {Wald, 2003}. Ferner ist denkbar, dass der TLR-NF- κ B-Weg über die Expressionshöhe der TLRs reguliert wird. An Mäusen wurde demonstriert, dass die kommensale Flora die TLR-Expression im Sinne eines positiven Regelkreises verstärkt, während intestinale Keimfreiheit die TLR-Expression herabsetzt {Lundin, 2008}. Bei den in der Arbeit untersuchten Tumorzellen konnte lediglich für TLR3 eine verstärkte Expression nach selektiver Stimulation mit dem spezifischen Liganden Poly(I:C) dargestellt werden. Für die TLRs 2, 4 und 9 war kein autoinduktiver Einfluss durch selektive TLR-Stimulation zu erkennen. Während unter physiologischen Umständen die Expressionen aller hier untersuchten TLRs (2, 3, 4 und 9) in intestinalen Epithelzellen detektiert werden {Otte, 2004}, wurden bei den Tumorzelllinien Expressionsabweichungen festgestellt. So exprimieren die DLD1-Zellen kein TLR4, während die HT29-Zelllinie kein TLR9 exprimiert. Die fehlende TLR4 Expression von DLD1-Zellen konnte bereits festgestellt werden {Yoshioka, 2001}. Die aus einer Lymphknotenmetastase isolierte SW620 Zelllinie, welche aus dem identischen Patienten wie die SW480-Zelllinie (Primärtumor) stammt, zeigt ebenfalls deutliche Abweichungen bei der TLR-Expression. So ist die Expression der TLRs 2 und 4 deutlich reduziert bzw. nicht detektierbar. Der unter physiologischen Umständen in intestinalen Epithelzellen (IEC) stark ausgeprägte TLR3 {Cario, 2000}, wird in der aus einer Metastase abgeleiteten Linie SW620, im Vergleich zu den übrigen Tumorzelllinien aus Primärtumoren, um das zwei- bis zehnfache geringer exprimiert. Demgegenüber ist die TLR9-Expression um das zehnfache bis 100-fache höher als in den übrigen Tumorzelllinien. Da die Aktivierung des TLR9 die Inhibierung von NF- κ B durch I κ B α aufhebt {Lee, 2006}, führt eine Hochregulation des

TLR9 in den metastasierten Zellen vermutlich zu einer verstärkten Hemmung der Apoptose. Ferner wurde bei der hoch-invasiven Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 eine hochregulierte TLR9-Expression ermittelt, welche über eine verstärkte Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP-13) die Tumorzellinvasivität weiter antreibt {Merrell, 2006}. Dementsprechend ist eine konstitutiv deregulierte TLR9-Expression bei der SW620-Zelllinie zu vermuten, was die invasiven Eigenschaften dieser Zelllinie fördern könnte. Interessanterweise ist dagegen die MyD88-Expression der SW620-Zellen mit den übrigen untersuchten Zelllinien aus primären kolorektalen Tumoren vergleichbar. Mit der vergleichsweise konstanten Expression des Adaptermoleküls MyD88 ist für die TLRs 2 und 9, und fakultativ auch TLR4, die Voraussetzung einer NF- κ B-Signalweg-Aktivierung in allen untersuchten Tumorzellen gleichermaßen gegeben. Neben der Produktion proinflammatorischer Chemokine und Zytokine wie Interleukin-1, -6, -10 und TNF α führt die NF- κ B-Aktivierung in Tumorzellen auch zu einer verstärkten Expression des Interleukin-8 {Chen, 2008}. Das NF- κ B-Zielgen IL8 besitzt neben angiogenem Potential, also einer verstärkten Neovaskularisation im Tumorkontext, eine wichtige chemotaktische Komponente, welche durch das Anziehen von Lymphozyten, insbesondere Granulozyten und Makrophagen, für die Etablierung des peritumoralen Entzündungsmilieus von Bedeutung ist {Brat, 2005}. Dabei wird postuliert, dass die Rekrutierung von Entzündungszellen durch den Tumor und eine sich anschließende Zytokin- und Chemokinproduktion der Entzündungszellen entscheidende Beiträge zur Tumorgenese und Metastasierung liefern {Chen, 2008}. Die in der Arbeit erfolgte Quantifizierung der Interleukin-8-Expression nach selektiver TLR-Stimulation bestätigt, dass Tumorzellen das Chemokin exprimieren. In laboreigenen Voruntersuchungen {Doll et al., 2010} konnte gezeigt werden, dass die IL8 Produktion in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 durch die Zytokine INF γ /TNF α stark stimuliert wird. IL8 wird von allen untersuchten Zellen ausgeprägt, wobei mit Ausnahme der HT29-Zelllinie die Expression mit der Stimulationsdauer zunimmt. Die HT29-Zellen exprimierten IL8 konstant und unabhängig von Zeit und den hier eingesetzten Stimuli. Lediglich die SW480-Zelllinie zeigte eine deutliche Steigerung der IL8 Expression nach TLR-Stimulation.

Zusammenfassend stellt sich das TLR-Expressionsmuster der untersuchten Zelllinien, auch bei selektiver Stimulation, als heterogen dar. Das Adaptermolekül MyD88 und das untersuchte Zielgen der TLR/NF- κ B Signalwege, IL8, werden von allen Zelllinien exprimiert, wobei das Chemokin IL8 in der Expression stärker variiert. Erklärbar sind diese Befunde durch den heterogenen Ursprung der Zelllinien, die aus unterschiedlichen Patienten etabliert wurden, und molekulargenetisch stark

voneinander abweichen. Selbst die beiden Zelllinien SW480 (Primärtumor) und SW620 (Metastase), die ursprünglich aus demselben Patienten isoliert wurden, zeigen starke Abweichungen in nahezu jedem hier gemessenen Transkript. Ob die beobachteten Abweichungen der TLR-Ausprägung ursächlich mit der Metastasierung zusammenhängen, oder der Anpassung an artifizielle Zellkultur-Bedingungen und langjährige Kultur in vitro geschuldet sind, kann hier nicht geklärt werden. Eine konstitutive Aktivierung des TLR-NF- κ B-Signalwegs könnte aufgetreten sein, was die fehlende Stimulierbarkeit erklären könnte. Die TLR-Expression wurde in den ursprünglich entstandenen Tumoren, aus denen die Zelllinien abgeleitet wurden, möglicherweise in Abhängigkeit zur interagierenden Mikroumgebung durch den jeweiligen Tumorzellklon angepasst. Um bessere Aussagen über die Funktionalität der einzelnen TLRs und deren Einfluss auf die Zyto- und Chemokinproduktion durch Tumorzellen treffen zu können, sollte bei weiterführenden Arbeiten die Zytokin und Chemokinkonzentration konditionierter Überstände mittels ELISA bestimmt werden. So könnten beispielsweise Konzentration und Expression des Zytokins TNF α untersucht werden, da dieses zum einen NF- κ B-Aktivatoren sind und zum anderen die peritumorale Inflammation fördern. Desweiteren sollten nicht-maligne intestinale epitheliale Zellen als Kontrolle und Makrophagen und Tumor-assoziierte Fibroblasten als Vertreter des Tumorstromas mituntersucht werden. Allerdings stellt insbesondere die Kultur von nicht-tumoral veränderten primären Epithelzellen methodisch eine grosse Herausforderung dar.

8.1.2 TLR- und MyD88-Expression in resezierten humanen Tumorproben

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache weltweit {Jemal, 2009}. In Europa war das CRC im Jahr 2012 mit 447.000 Fällen nach Brustkrebs (464.000) der am zweithäufigsten diagnostizierte Krebs. Gleichzeitig ist es in Europa heute mit 215.000 Todesfällen die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache nach Lungenkrebs (353.000) {Znaor, 2013}. Zwar ist die Mortalität des kolorektalen Karzinoms, aufgrund verbesserter Chemotherapien und Vorsorgeprogramme, in 10 Jahren (2000-2009) um 3% zurückgegangen, doch bleiben die Therapieergebnisse weiterhin unbefriedigend {Siegel, 2013} {Wolpin, 2008}. Wie bereits beschrieben, sind über 90% der kolorektalen Tumore sporadisch, mit im Einzelfall unklarer Ätiologie. Entzündungsprozesse, und darunter mit steigender Evidenz das TLR-System, liefern hier einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Tumorentstehung und Tumorprogression. Dementsprechend werden

heute neue therapeutische Ansätze, im Sinne aktiver oder passiver Krebsimmunotherapie, im Zusammenhang mit dem TLR-System propagiert {Huang, 2008} {Rakoff-Nahoum, 2009}. Um abschätzen zu können, ob die TLRs 2, 3, 4 und 9 in kolorektalen Tumoren dereguliert sind und ob diese pharmakologisch potentiell angreifbar sind, wurde ihre entsprechende Expression auf mRNA Ebene in 55 klassifizierten Tumorproben der Chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar untersucht. Im Unterschied zu den zuvor getesteten Tumorzelllinien stellt das hier verwendete Primärgewebe eine komplexe Mischung unterschiedlicher Zelltypen dar, auch wenn der Tumorzellgehalt in allen Proben mindestens 50% betrug. Somit kann nicht eindeutig nachgewiesen werden, welche Zell- und Gewebetypen für die hier beobachteten Expressionsmuster verantwortlich sind. Die beobachtete Heterogenität könnte also, zumindest teilweise, auch auf unterschiedliche Zusammensetzung der Tumorproben zurückzuführen sein, etwa auf unterschiedliche Anteile tumorinfiltrierender Immunzellen.

Die TLR3-Expression der untersuchten Tumorproben zeigte eine stadienspezifische Deregulation, wobei die relative Expression mit steigendem UICC-Grad abnahm. Das Expressionsniveau des Normalgewebes liegt dabei deutlich über dem der Tumorgruppen, zudem ist die TLR3-Expression in Lebermetastasen gegenüber den korrespondierenden Primärtumoren (Stadium UICC IV) nochmals weiter reduziert. Diese stadienabhängige Deregulation der relativen TLR3-Expression konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits bei Voruntersuchungen anhand von Microarray-Analysen für humane Kolorektaltumore (n=31) dargestellt werden {Rimkus, 2006}. Eine weitere Microarray-Analyse zeigt, dass auch benigne Adenome signifikant weniger TLR3 als das entsprechende Normalgewebe exprimieren, wobei eine höhere Suszeptibilität für virale Infektionen als kanzerogene Folge diskutiert wird {Niedzielska, 2009}. Denkbar ist, dass Tumorzellen die TLR3-Expression reduzieren, um die Interferon- β -Expression zu mindern. Das Zytokin führt u.a. über die Proteinkinase R (PKR) zur Inhibition der Proteinsynthese und wirkt zudem über p53-Induktion proapoptotisch. So wurde gezeigt, dass Poly (I:C) als chemotherapeutisches Adjuvans durch selektive TLR3-Stimulation die Tumorzellsterblichkeit signifikant erhöhte {Jiang, 2008}. Die Korrelation der TLR3-Expressionswerte mit den histopathologischen und klinischen Daten der Patienten zeigt, dass die stadienspezifische Deregulation prognostische Bedeutung hat. Interessanterweise ist für das untersuchte Patientenkollektiv ein signifikant reduziertes Gesamtüberleben bei einer TLR3-Expression über einen Schwellenwert (cutpoint: 0,89) ermittelt worden (p-Wert: 0,031). Ebenso zeigte sich ein signifikant reduziertes tumorspezifisches Überleben (p-Wert: 0,088) bei einer TLR3-Expression

über einem Schwellenwert (Schwellenwert/cutpoint: 0,89). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass der TLR3 im Normalgewebe zwar deutlich höher exprimiert wird als im Tumorgewebe, jedoch in Tumoren zwei Untergruppen bestehen. Eine relativ hohe Expression in Tumoren (die jedoch im Vergleich zu Normalgewebe reduziert ist), stellt sich dabei als prognostisch schlechter dar. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die TLR3-vermittelte Apoptose, da Patienten mit nekrotisierenden Tumoren eine schlechtere Prognose haben. Freiwerdende Zellkomponenten, darunter auch doppelsträngige RNA als mutmaßlicher endogener TLR3-Ligand, verstärken dabei die peritumorale Entzündung, was in einer vermehrten Produktion von Zyto- und Chemokinen mündet {Lotze, 2005}. Auch für den TLR4 konnte eine Deregulation festgestellt werden. Dabei ist die TLR4-Expression ebenfalls im Normalgewebe signifikant höher als die der einzelnen und zusammengefassten Tumorguppen UICC II, III und IV. Ein signifikanter Unterschied der TLR4-Expression zwischen Primärtumoren und Metastasen konnte hier nicht nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde für das gesamte Kollektiv ein signifikant reduziertes rezidivfreies Überleben (p-Wert: 0,004) bei einer TLR4-Expression unter einem Schwellenwert (cutpoint: 0.47) berechnet. Demgegenüber stehen aktuelle Literaturbefunde, die eine Zunahme der TLR4-Expression in kolorektalen Tumoren und Lebermetastasen auf Proteinniveau durch immunhistochemische Färbungen anzeigen. Es wurde ein reduziertes Gesamtüberleben bei hoher Expression von TLR4 und MyD88 an einem Kollektiv von 108 Patienten mit CRC beschrieben {Wang, 2010}. Unterschiedliche Regulationsmechanismen von TLR4 und MyD88 auf Transkriptions-, bzw. Proteinniveau könnten eine mögliche Erklärung für die abweichenden Befunde darstellen, da in der hier vorliegenden Arbeit nur die mRNA-Expression untersucht wurde. Andere Studien belegen, dass eine TLR4-Hemmung die Tumorbildung {Huang, 2008} und das Metastasierungspotential von Tumorzellen senkt {Earl, 2009}. Verschiedene Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Genpolymorphismen in den TLRs und dem Krankheitsverlauf in soliden Tumoren nachweisen {Achyut, 2007} {Tahara, 2007} {Slattery, 2012}. Aus physiologischen Gesichtspunkten wiederum ist die TLR4-Signaltransduktion für den Aufbau und Erhalt der Gewebemöostase von grosser Bedeutung. So konnte in vitro festgestellt werden, dass eine TLR4-Stimulation mit LPS die Wundheilung beschleunigt {Koff, 2006}, während es in TLR4-MyD88-Knockout-Mäusen zu gesteigerter Apoptose intestinaler Epithelzellen mit kompensatorisch tumoraler Gewebeproliferation kommt {Fukata, 2005} {Rakoff-Nahoum, 2004}. Folglich könnte die reduzierte TLR4-Expression das reduzierte rezidivfreie Überleben durch die verminderte Expression des für die Prostaglandin-Synthese verantwortlichen Enzyms COX2, sowie der EGFR-Aktivität

(engl.: *epidermal growth factor receptor*, Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors) bedingen {Fukata, 2007}, da diese eine verminderte Hemmung der Apoptose im Tumor und der Mikroumgebung nach sich ziehen. In einem nächsten Schritt werden demnach Zellbestandteile freigesetzt, die eine Stimulation des peritumoralen Entzündungsgewebes auslösen, und konsekutiv eine überschüssige Ausschüttung tumorogener Chemo- und Zytokine bedingen. Bei gesonderter Betrachtung der UICC II Tumorgruppe konnten, aufgrund vorliegender klinischer Daten, zwei Subgruppen (rezidiert und rezidivfrei) gebildet werden. Dabei konnte ermittelt werden, dass das Kollektiv mit Rezidiven weniger TLR2, als die rezidivfreie Gruppe exprimiert. Wie der TLR4 bedingt auch der TLR2 bei selektiver Stimulation eine verstärkte Antiapoptose {Chen, 2008} {Huang, 2007}. So konnte bei Lungenkarzinomzelllinien durch TLR2-Stimulation über Aktivierung der MAPK- (mitogen-activated protein kinase) und NF- κ B-Signalwege ein verlängertes Überleben der Tumorzellen beobachtet werden {Huang, 2007}. Diese Befunde lassen erneut den Schluss zu, dass verstärkte tumorale Apoptose mit konsekutiver Stimulation des peritumoralen Entzündungsgewebes die Prognose von Patienten verschlechtern und das Tumorwachstum begünstigt. Neben den TLRs 2, 3, 4 und 9 wurde die Expression des Adaptermoleküls MyD88 in den Tumorproben untersucht. Für die Tumore der UICC IV Gruppe zeigte sich eine signifikant reduzierte MyD88-Expression im Vergleich zum Normalgewebe (p-Wert: 0,0013) und der UICC II Gruppe (p-Wert: 0,0407). Da MyD88, mit Ausnahme von TLR3, für alle übrigen untersuchten TLRs die Signaltransduktion vermittelt und den NF- κ B-Signalweg aktiviert, stellt es einen wesentlichen Faktor der Antiapoptose dar {Chen, 2008} {Rakoff-Nahoum, 2009} {Wang, 2010}. Wie bei den TLRs 2 und 4 ist deshalb eine reduzierte Expression des Adaptermoleküls mit einer verstärkten Apoptose von Tumorzellen bzw. peritumoralen Entzündungszellen und der sich anschliessenden proinflammatorischen Wirkung von freiwerdenden Zellbestandteilen in Verbindung zu bringen. Entsprechend dieser Annahme ist die Expression von Zyto- und Chemokinen in den untersuchten Tumorproben als hoch und prognostisch negativ einzuschätzen. Bei Korrelation der Interleukin-8-Expression mit klinischen und histopathologischen Daten des untersuchten Patientenkollektivs, konnten diesbezüglich zwei prognostische Aussagen getroffen werden. Erstens kommt es bei einer IL8-Expression über einen Schwellenwert (cutpoint: 2,27) zu einer hoch signifikanten Verschlechterung des rezidivfreien Überlebens (p-Wert < 0,001) und zweitens verschlechtert sich das Gesamtüberleben bei einer IL8-Expression über einen Schwellenwert (1,73) signifikant (p-Wert: 0,036). Vorbefunde unserer Arbeitsgruppe zeigen eine stadienspezifische Deregulation der IL8-Expression,

wobei die Expression des Zytokins mit zunehmendem Tumorstadium signifikant hochreguliert wird {Doll et al., 2010}. Die Expression von IL8 erfolgt NF- κ B-abhängig und wird von Zyto- und Chemokinen wie TNF α oder IL-1 β angeregt {Hoffmann, 2002}. Die gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass Toll-like-Rezeptoren in Tumoren dereguliert sind und Einfluss auf die Prognose haben. Aufgrund der Expressionsmuster und aktuellen Literatur kann die Annahme getroffen werden, dass eine proapoptotische Deregulation der untersuchten TLRs als prognostisch ungünstig einzuschätzen ist. Denkbar ist, dass Tumornekrose aufgrund des deregulierten TLR-Systems der Tumorzellen zur Aktivierung von peritumoralen Entzündungszellen führt, indem diese freierwerdende Tumorzellbestandteile in Form endogener Liganden binden. Bei nachfolgender Entzündungsantwort kommt es zur Freisetzung von Chemokinen mit angiogenetischem, zellmigratorischem und prometastatischem Potential wie IL8, welche Tumorprogression und –rezidivierung begünstigen. Die Konzentration von Entzündungs- und Tumorzellen, sowie deren histologische Verteilung in den gewonnenen Tumorproben, könnte eine Erklärung für die divergierenden Daten sein. Eine histopathologische Prüfung der zu untersuchenden Tumorproben wäre deshalb bei weiterführenden Arbeiten von großer Bedeutung. Desweiteren sollten Tumorproben ex-vivo mit selektiven TLR-Liganden stimuliert werden und die Chemo- und Zytokinproduktion mittels ELISA und qRT-PCR auf Konzentration und Expression untersucht werden. Um den Einfluss von Tumorzellbestandteilen auf das Tumorstroma vergleichen zu können, wäre eine Stimulation von Makrophagen mit lysierten Tumorzellen und anschließender Überprüfung der Chemo- und Zytokinproduktion mittels ELISA und qRT-PCR von großem Interesse. Ausserdem sollten TNF α und COX2 bei den diskutierten Untersuchungen aufgrund ihres tumorigenen Potentials mitberücksichtigt werden.

8.1.3 TLR- und MyD88-Expression in murinen Gewebeproben

Genetisch definierte Mausmodelle wurden von verschiedenen Gruppen in der Vergangenheit vielfach eingesetzt, um die Bedeutung der TLR/MyD88-Signalwege für die Tumorentstehung zu überprüfen. Entsprechende Literaturbefunde belegen mehrfach eine tumorfördernde Rolle des TLR-Systems für Darmtumore. So wurden für das transgene Apc^{Min/+}MyD88^{-/-} - Mausmodell mit globaler MyD88-Defizienz, hoch-signifikante phänotypische Unterschiede zur parentalen Apc^{Min/+} Maus nachgewiesen. Während Letztere mit zahlreichen tumoralen Läsionen im gesamten Intestinum und einem reduzierten Überleben imponiert, konnten, mit MyD88-Defizienz und der konsekutiv gestörten TLR-Signaltransduktion, in der transgenen

$Apc^{Min/+}MyD88^{-/-}$ - Maus sowohl Sterblichkeit, als auch Tumorlast und -durchmesser dramatisch reduziert werden {Rakoff-Nahoum, 2007}. Eine weitere Arbeit konnte im doppel-transgenen $Apc^{Min/+}MyD88^{-/-}$ Mausmodell im Vergleich zur $Apc^{Min/+}$ Maus ein geringeres phospho-ERK-Niveau feststellen, wodurch die Phosphorylierung und damit Stabilisierung des Onkoproteins c-Myc reduziert ist. Die Tumorlast und Tumorgroße war auch hier im $Apc^{Min/+}MyD88^{-/-}$ Mausmodell geringer {Lee, 2010}. Eine weitere Arbeit wies eine tumorhemmende Wirkung für den TLR5 bei Kolonkarzinomen im Xenotransplantat-Mausmodell nach {Rhee, 2008}. An Mausmodellen konnte auch belegt werden, dass eine verstärkte TLR-Signaltransduktion eine erhöhte inflammationsbedingte Karzinogenese bedingt. SIGIRR (*engl. Single-immunoglobulin interleukin-1 receptor-related*), auch als TIR-8 bekannt (*engl.: Toll/interleukin-1 Rezeptor 8*), ist Mitglied der TIR-Domäne enthaltenden Rezeptorfamilie und endogener TLR-Inhibitor {Qin, 2005}. An TIR-8-defizienten Mausmodellen wurde gezeigt, dass bei oraler Gabe von DSS (*engl. dextran sulfate sodium*) und des Mutagens Azoxymethan der Mangel des TLR-Negativregulators eine erhöhte Suszeptibilität für inflammationsbedingte Neoplasien nach sich zieht {Xiao, 2007} {Garlanda, 2007}. Da die TLRs und ihr Adapter MyD88 in Immunzellen und Nicht-Immunzellen ausgeprägt werden {Abreu, 2010}, muss ihre Rolle in unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen differenziert betrachtet werden. Dies sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines neuartigen Cre/LoxP-basierten Mausmodells geschehen. Um den zelltypspezifischen Einfluss des Adaptermoleküls MyD88 auf die kolorektale Tumorgenese abschätzen zu können, wurden in unserer Arbeitsgruppe Mausmodelle etabliert, die global kein MyD88 ausprägen ($MyD88^{stp/stp}$) oder MyD88 selektiv in intestinalen Epithelzellen ($MyD88^{IEC}$) oder myeloiden Zellen ($MyD88^{myel}$) re-exprimieren, während der Rest der Gewebe MyD88-defizient bleibt {Gais, 2012}. Dies konnte genetisch durch Einfügung einer von LoxP-DNA-Sequenzen flankierten Transkriptions-Stop-Kassette in 3'-Richtung hinter dem ersten Exon des murinen Myd88-Gens erzielt werden (sogenanntes „Stop/Stop“-Allel). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine MyD88-Defizienz in den Mausmodellen p villin-Kras^{V12G}, sowie Apc^{1638N} zu einer erheblichen Senkung der Tumorlast führt (M. Martini und K.P. Janssen, unveröffentlichte Beobachtungen). Ebenso konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass das tumorigene Potential von MyD88 in Makrophagen größer ist, als das der intestinalen Zellen {A. Holtorf und K.P. Janssen, unveröffentlichte Beobachtungen}. Um den Einfluss der MyD88-Expression auf die intestinale TLR-Expression abschätzen zu können, wurden für je eine $MyD88^{stp/stp}$ -, $MyD88^{myel}$ -, $MyD88^{IEC}$ - und $MyD88^{WT}$ -Maus die Expressionen der TLRs 2, 3, 4 und 9 in Kolongewebebeobachtungen quantifiziert. Zur unabhängigen

Verifikation des Genotyps wurde ausserdem die Expression von MyD88 auf Transkriptionsniveau gemessen. Wie zu erwarten, war keine MyD88-Expression in den Kolonproben der MyD88^{stp/stp}-Maus detektierbar, während bei der MyD88^{IEC}-Maus eine zur Wildtyp-Maus vergleichbare MyD88-Expression nachgewiesen wurde. In der MyD88^{myel}-Maus war wiederum keine MyD88-Expression nachweisbar. Während bei Gewebereparatur und in der Mikroumgebung von Tumoren zahlreiche Makrophagen nachweisbar sind {Chen, 2008}, ist aufgrund der fehlenden MyD88-Expression denkbar, dass unter physiologischen Umständen der Anteil myeloider Zellen im Darm relativ klein ist. Eine Rekrutierung durch Epithel- und Tumorzellen könnte u.a. nach erfolgter TLR-Stimulation, durch das chemotaktische Zytokin IL8 realisiert werden. Alle untersuchten TLRs wurden in der MyD88^{WT}-Maus nachgewiesen, wobei der TLR4 am stärksten exprimiert wird. In absteigender Reihenfolge werden auch die TLRs 2, 3 und 9 exprimiert. Die MyD88^{stp/stp}-Maus mit globaler MyD88-Defizienz exprimiert im Vergleich zur MyD88^{WT}-Maus mehr TLR2 als 4, während der TLR9 nicht detektierbar ist. Die TLR3-Expression war dagegen im Kolongewebe der MyD88^{stp/stp}-Maus erhöht. Die MyD88^{IEC}-Maus mit selektiver MyD88-Reexpression in intestinalen Epithelzellen exprimiert alle untersuchten TLRs, wobei TLR2 im Gesamtvergleich am geringsten exprimiert wird. Bei der MyD88^{myel}-Gruppe mit selektiver MyD88-Reexpression in Monozyten/Makrophagen wurden ebenfalls alle untersuchten TLRs nachgewiesen, wobei die TLR4-Expression von allen untersuchten Gruppen die niedrigste ist und die des TLR9 an der absoluten Nachweisbarkeitsgrenze liegt. Diesen Ergebnissen zufolge erfolgt die Expression der TLRs 2 und 4 im murinen Kolongewebe MyD88-unabhängig, welches vermutlich durch alternative Adaptermoleküle wie TIRAP bedingt ist {Chen, 2008} {Rakoff-Nahoum, 2009}. Denkbar ist, dass aufgrund erhaltener Signaltransduktion die Expression der TLR2 und 4 aufrechterhalten wird. Bei Betrachtung der fehlenden TLR9-Expression in der MyD88^{stp/stp}-Maus und der gegebenen TLR9-Abhängigkeit zum Adaptermolekül MyD88 {Chen, 2008} {Akira, 2004} kann vermutet werden, dass die fehlende Signaltransduktion die TLR9-Expression, im Sinne eines positiven Regelkreises, attenuiert. Interessanterweise ist die TLR3-Expression der MyD88^{stp/stp}-Maus deutlich höher als die der übrigen Mausstämme. Dies könnte eine Kompensation darstellen, welche durch die fehlende Signaltransduktion der MyD88-abhängigen TLR-Signalwege (5, 7 und 9) bedingt wird. Insbesondere für die sich ebenfalls endolysosomal-befindlichen TLRs 7 und 9 {Rakoff-Nahoum, 2009}, wäre eine reaktive Mehrexpression vorstellbar. Um den Einfluss von MyD88 auf die Expression von Chemo- und Zytokinen abzuschätzen, wurde die Expression der Prostaglandin-Synthase COX2 quantifiziert. Wie vermutet, stellt sich die Expression

in den transgenen Mausmodellen als reduziert dar. Während bei der MyD88^{stp/stp}-Maus keine Expression nachzuweisen ist, exprimieren die MyD88^{IEC}- und MyD88^{myel}-Mäuse das COX2-Enzym im Vergleich zur MyD88^{WT}-Maus in reduzierter Menge. Dies belegt die Beobachtung, dass sowohl intestinale Epithelzellen, als auch Makrophagen das proliferativ wirksame Enzym COX2 exprimieren, wobei MyD88 an der Induktion beteiligt ist {Rakoff-Nahoum, 2009}. Um den Einfluss von MyD88 auf die TLR-Signaltransduktion und deren Funktionalität zu untersuchen, wurden die TLRs 2 (MyD88-unabhängig) und 9 (MyD88-abhängig) in ex-vivo Organkulturen (Kolon, Jejunum und Milz) von MyD88^{stp/stp}-, MyD88^{IEC}-und Wildtypmäusen selektiv stimuliert. Mittels ELISA wurden die Zyto- und Chemokinkonzentrationen von Interleukin-6 und TNF α in den konditionierten Überständen quantifiziert. Für das Kolon zeigt sich bei der IL6-Produktion, dass die Mausmodelle, unabhängig ihres transgenen Hintergrunds, eine geringere Sensibilität für die selektive TLR-Stimulation als die Wildtypmaus haben. Letztere reagiert mit einer verstärkten IL6-Produktion adäquat auf die TLR-Stimulationen, wobei die TLR9 stimulierte Probe die höchste Konzentration erreicht. Die TNF α -Konzentration war insgesamt erheblich niedriger als die von IL6, so dass die Messungen an der Nachweisgrenze lagen, und eine Interpretation der Befunde schwierig ist, so sezernierte beispielsweise die Wildtypmausprobe bei Stimulation scheinbar weniger TNF α . Denkbar wäre, dass trotz intestinaler MyD88-Reexpression die MyD88-Funktionalität in den transgenen Mäusen beeinträchtigt ist, da die IL6-Produktion der Wildtypmaus über den MyD88-abhängigen TLR9 stärker induziert wird. Bei IL6-Detektion konditionierter Überstände murinen Dünndarmgewebes zeigt sich ein zum Kolon vergleichbares Bild. So reagiert lediglich die Wildtypmaus auf die selektive TLR-Stimulation mit einer verstärkten IL6-Konzentration, wobei der stimulierte TLR2 die IL6-Produktion am stärksten anregt. Analog zu den konditionierten Überständen von Kolon und Jejunum wurde die höchste IL6-Konzentration der Milz-Gewebeproben in der Wildtyp-Gruppe gemessen, wobei die selektive TLR2-Stimulation den deutlichsten Konzentrationsanstieg auslöste. Alle untersuchten Mausgenotypen reagieren auf Stimulation der Milzzell-TLRs mit verstärkter IL6-Produktion. Die Detektion des Zytokins TNF α aus Überständen von stimuliertem Milzgewebe fiel sehr schwach aus, wobei die höchsten Werte hier jeweils in den TLR9-stimulierten Ansätzen gemessen wurden. Zusammenfassend lassen die stimulierten ex-vivo-Organulturen lediglich erkennen, dass die IL6-Sekretion in allen untersuchten Geweben deutlich höher ist als die TNF α -Produktion. Ausserdem wurde deutlich, dass die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen vor allem von Leukozyten bestimmt werden, da die stimulierten Immungewebe (Milz) wesentlich höhere Werte als die

Darmgewebeproben erreichten. In weiterführenden Arbeiten sollte die MyD88^{myel}-Maus zum Vergleich hinzugezogen werden, wodurch die inflammatorische Potenz myeloider Zellen in intestinalen Geweben abgeschätzt werden könnte. Desweiteren sollte die Konzentration des antiapoptotisch und proliferativ wirksamen COX2 mitbestimmt werden, womit dessen TLR- und MyD88-abhängige Induzierbarkeit überprüft werden könnte. Ferner sollten auch der TLR3, als MyD88-unabhängiger TLR, und der TLR4, als wichtiger NF- κ B-Induktor, mitstimuliert werden. Zuletzt sollte durch Kreuzung von Mauslinien, die die hier vorgestellten, gewebespezifischen MyD88-Expressionsmuster zeigen, mit Mausmodellen für Tumorentstehung im Darmtrakt, in vivo die Bedeutung der Toll-like Rezeptoren und ihres Adapterproteins MyD88 für die Tumorgenese analysiert und aufgeklärt werden.

8.1.4 Synopse der Diskussion

Daten, die an humanen und murinen Gewebeproben und Zellen erhoben wurden, belegen, dass das Toll-like Rezeptorsystem sich einerseits am Erhalt der Gewebemöostase, andererseits aber auch an inflammatorischen und neoplastischen Vorgängen beteiligt {Fukata, 2006} {Burstein, 2008}. Gemeinsam sind diese Prozesse das Resultat interzellulärer Kommunikation, welche noch weitgehend unverstanden ist. Postuliert wird, dass eine deregulierte Interaktion von Tumorzellen und ihrer komplexen Mikroumgebung, aus Fibroblasten, Blutgefäßen und Immunzellen besteht, welche Progression von Tumoren begünstigt {Chen, 2007}. So wurde für die, in dieser Arbeit, untersuchten Tumorproben eine stadienspezifische Deregulation der TLR3-Expression gezeigt, wobei die Expression mit steigender Malignität abnahm. Die reduzierte TLR3-Expression bedingt möglicherweise eine Reduktion der Interferon- β -Expression, was antiapoptotisch wirkt {Jiang, 2008}. Die vom selben Patienten stammenden und in der Arbeit untersuchten, kolorektalen Tumorzelllinien SW480 (solider Tumor) und SW620 (Lymphknotenmetastase) belegten eine zehnfach höhere TLR9-Expression der metastasierten Zelllinie. Eine dadurch verstärkte Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP-13), könnte möglicherweise die Tumorzellinvasivität antreiben {Merrell, 2006}. Die TLR4-Expression der untersuchten Tumorproben war stadienspezifisch mit zunehmendem UICC-Grad reduziert. Eine konsekutiv reduzierte COX2-Expression (Cyclooxygenase-2) sowie EGFR-Aktivität (*engl.: epidermal growth factor receptor*, Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors), bedingen so möglicherweise vermehrtes tumorales und peritumorales Zellsterben {Fukata, 2007}.

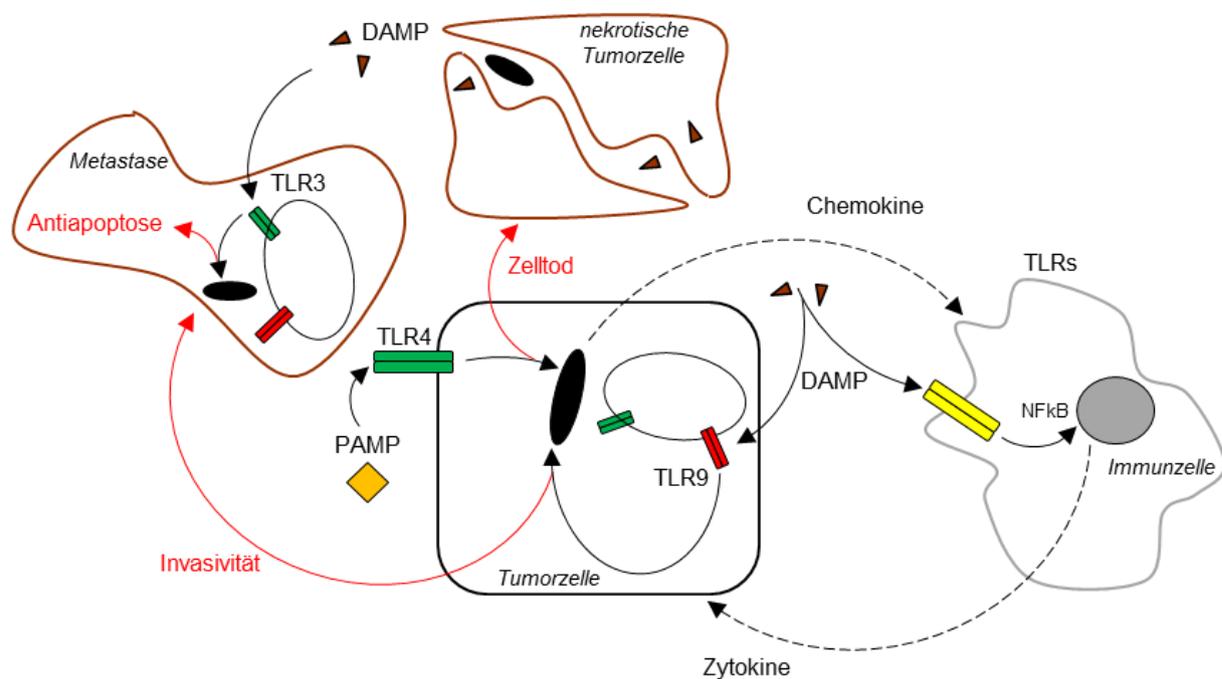


Abbildung 41: Hypothetische Darstellung der Auswirkung deregulierter TLR-Expressionen in Tumorzellen und immunologischer Mikroumgebung

(**schwarze durchgezogene Pfeile**) In Tumorzellen bedingt die Aktivierung von dereguliert-exprimierten Toll-like Rezeptoren (**rot markierte TLRs** = erhöhte Expression; **gelb markierte TLRs** = keine Veränderung der Expression; **grün markierte TLRs** = reduzierte Expression) durch Liganden (u.a. durch PAMP/ DAMP), eine nukleäre Translokation von Transkriptionsfaktoren (u.a. NF- κ B). (**oberer schwarz-unterbrochener Pfeil**) In der Folge wird die Expression proinflammatorischer Chemo- und Zytokine verstärkt, wobei insbesondere die Chemokine eine chemotaktische Infiltration von Immunzellen ins Tumorgewebe auslösen (u.a. vermittelt durch IL8). (**unterer schwarz-unterbrochener Pfeil**) Die tumorinfiltrierenden Immunzellen z.B. Makrophagen zeigen ihrerseits eine NF- κ B-Signalwegaktivierung (u.a. durch DAMP/ PAMP/ TNF α), mit sich anschließender Chemo-/Zytokin-Ausschüttung, wodurch die Entzündung chronifiziert, und ein tumor-förderndes Milieu geschaffen wird. Durch Modulation der entsprechenden TLR-Quantität reagiert die Tumorzelle auf anfallende Stimuli im Entzündungsmilieu und kann so pro-invasive (TLR9), anti- (TLR3) und/oder proapoptotische Gene (TLR4) verstärkt exprimieren. (**roter Pfeil: Zelltod**) Die reduzierte TLR4-Expression verursacht (u.a. durch verminderte COX2-Expression) Tumorzellnekrosen, wodurch anfallende endogene (DAMPs) Liganden eine TLR-Aktivierung mit „Feedback“-Verstärkung der Entzündung auslösen {Fukata, 2007}. (**roter Pfeil: Invasivität**) Der hochregulierte TLR-9 wird in der Folge verstärkt stimuliert, was über Aktivitätszunahme der Matrix-Metalloproteinase 13 die Invasivität steigert {Merrell, 2006}. (**roter Pfeil: Antiapoptose**) Weiteren Anpassungen der TLR-Quantität (u.a. TLR3) folgt eine gesteigerte Antiapoptose {Jiang, 2008}.

9 Zusammenfassung

9.1 Deutsch

Das Kolorektalkarzinom (CRC) ist die vierthäufigste tumorassoziierte Todesursache weltweit, wobei über 90% der Fälle sporadisch auftreten. Mit einer jährlichen Inzidenz von 47.9 und einer Mortalität von 17.6 pro 100.000 Menschen, ist das kolorektale Karzinom die dritthäufigste bösartige Tumorerkrankung der industrialisierten Welt. Nach dem Adenom-Karzinom-Modell der Tumorentstehung akkumulieren zellautonome Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen in Darmepithelzellen, und verursachen so eine schrittweise Entartung der Zelle. Daneben wird heute ein wichtiger Beitrag des adaptiven und des angeborenen Immunsystems vermutet. Tatsächlich sind inflammatorische Vorgänge über multiple Mechanismen an der Karzinogenese beteiligt, so dass für verschiedene Organsysteme ein Zusammenhang von chronischer Entzündung und Tumorgenese bestätigt werden konnte: chronische Bronchitis und Lungenkarzinom, chronische Pankreatitis und Pankreaskarzinom, sowie HCV-/ HBV-Infektion (Hepatitis-C- und Hepatitis-B-Virus) und Hepatozelluläres Karzinom. Die evolutionär konservierten Toll-like Rezeptoren (TLRs) zählen zu den Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems und sind zentrale Mediatoren der innate Immunantwort. Über intrazelluläre Adapterproteine wie MyD88 führen TLRs zur Aktivierung der NF- κ B- und MAPK-Signalwege, und initiieren proinflammatorische und proliferations-stimulierende Signalkaskaden, die in ihrer Summe tumorfördernd wirken. Laboreigene Vorbefunde und Arbeiten anderer Forschungsgruppen zeigen anhand genetisch definierter Mausmodelle, dass eine Myd88-Gendefizienz die Darmtumormlast in Mäusen mit einer Mutation des Tumorsuppressors Apc signifikant senkt. Ferner zeigen Literaturbefunde, dass eine hohe Ausprägung von Myd88 und TLR4 in humanen Kolorektalkarzinomen mit einer schlechten klinischen Prognose korreliert ist. In dieser Arbeit wurde die Expressionshöhe des zentralen TLR-Signaladapters Myd88, sowie ausgewählter TLRs untersucht, deren Signaltransduktion entweder gar nicht (TLR3), teilweise (TLR4), bzw. ausschliesslich von MyD88 abhängig sind (TLR2 und TLR9). Zusätzlich wurde die Ausprägung eines der Zielgene der TLR/NF- κ B -Signalwege, des proinflammatorischen Chemokins Interleukin-8, untersucht. Hierzu wurden etablierte humane Zelllinien kolorektaler Karzinome (SW480, SW620, DLD1 und HT29), sowie operativ resezierte Tumorproben (n=55) mittels qRT-PCR analysiert, und die erhobenen

Expressionswerte mit klinischen Daten korreliert. Des Weiteren wurde der Einfluss des Adapterproteins MyD88 auf die TLR-Expression und die Aktivität der TLR-abhängigen Signalwege mit Hilfe transgener Mausmodelle untersucht. Die in Vorarbeiten etablierten Mausmodelle sind durch eine Cre/LoxP-abhängige, gewebespezifische Expression von Myd88 in intestinalen Tumorzellen oder Makrophagen, bei globaler Myd88-Defizienz in allen übrigen Geweben, definiert. Um die Funktionalität der TLR-Signalwege zu überprüfen, wurden ex-vivo-Organkulturen mit TLR-Liganden stimuliert und anschliessend die Konzentration des Zytokins IL6 in konditionierten Überständen mittels ELISA bestimmt. Das TLR-Expressionsmuster der untersuchten humanen Zelllinien stellt sich, auch nach selektiver TLR-Stimulation, als heterogen dar, während das Signaladaptermolekül MyD88 von allen Zelllinien ausgeprägt wird. Eine Expression des TLR-Zielgens IL8 wurde in den Tumorzellen nachgewiesen und sie variierte vergleichsweise stärker als bei MyD88. Die Expressionsanalysen humaner Tumorproben ergaben eine stadienspezifische Deregulation des TLR3, wobei die Expression im Vergleich zum Normalgewebe und mit steigendem UICC-Grad der Tumore hochsignifikant abnimmt. Die Korrelation der intratumoralen TLR3-Expression mit den klinischen Daten ergab ein signifikant reduziertes Gesamtüberleben und ein verringertes tumorspezifisches Überleben bei einer TLR3-Expression über dem ermittelten Schwellenwert. Die TLR4-Expression ist im Normalgewebe signifikant höher als in Tumoren der Stadien UICC II, III und IV. Gleichzeitig wurde für das gesamte Kollektiv ein signifikant reduziertes rezidivfreies Überleben bei einer TLR4-Expression unter dem Schwellenwert berechnet. Somit ergab sich ein gegensätzlicher Einfluss der Expressionshöhe von TLR3 und TLR4 auf den Krankheitsverlauf. Die Korrelation der Interleukin-8-Expression mit den klinischen Daten ergab, dass eine IL8-Expression über dem Schwellenwert mit einer signifikanten Verschlechterung des rezidivfreien und Gesamtüberlebens assoziiert ist. Dieser Befund lässt darauf schliessen, dass eine generelle Aktivierung der TLR-Signalwege, die zur erhöhten intratumoralen IL8-Produktion führen, mit einem aggressiven Tumorwachstum assoziiert ist. Die an stimulierten murinen ex-vivo-Organkulturen erhobenen Daten zeigten, dass die IL6-Sekretion in allen untersuchten Geweben deutlich höher ist als die TNF α -Produktion. Ausserdem wurde deutlich, dass die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen vor allem von Leukozyten bestimmt werden, da die stimulierten Immungewebe (Milz) wesentlich höhere Werte als die Darmgewebeproben erreichten. Aufgrund gewonnener Erkenntnisse und vorliegender Literaturbefunde lässt sich den TLR-Signalkaskaden ein großes proinflammatorisches und proliferations-förderndes Potential zuschreiben. Interaktionen von Karzinomzellen mit der tumoralen Mikroumgebung könnten dabei

TLR/NF- κ B -vermittelt eine Verschlechterung der Prognose bedingen. Eine pharmakologische Modulation der TLR-Signalwege wäre deshalb zukünftig von grossem therapeutischen Interesse. Allerdings muss aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse zwischen den einzelnen TLR-Signalwegen, die tumorfördernd oder tumorhemmend sein können, differenziert werden.

9.2 Summary (English)

Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy in the western world, and the fourth most common cancer-associated cause of death worldwide, with an annual incidence of 47.9 and a mortality of 17.6 cases per 100 000 people. According to the established adenoma-carcinoma-sequence of colorectal tumorigenesis, an accumulation of mutations in oncogenes and tumor suppressor genes in epithelial cells lead to continuous cellular dedifferentiation and malignant transformation. In addition to these cell-autonomous processes, the impact of the adaptive and innate immune system on cancer cells and tumor formation is currently the focus of extensive studies. In fact, chronic inflammatory processes are linked by multiple mechanisms with carcinogenesis, and the association of inflammation and tumorigenesis has been affirmed for different organ systems: chronic bronchitis and lung cancer, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma, as well as chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. The well conserved Toll-like-Receptors (TLRs) belong to the family of pattern recognition receptors and are central mediators of the innate immune response. The TLRs rely on intracellular signal adaptor proteins like MyD88, to activate the NF- κ B- und MAPK- signal pathways, which in turn activate proinflammatory and proliferative signal cascades, ultimately leading to cancer formation. Previous findings from our working group, as well as literature reports, demonstrated that Myd88 deficiency significantly reduced the tumor burden in transgenic mice with mutation in the Apc tumor suppressor gene. Furthermore, reported findings show that elevated intratumoral expression of Myd88 and TLR4 is correlated with poor clinical prognosis. Therefore, the aim of this thesis was to quantify the relative expression of the main signal adaptor MyD88, the Toll-like receptors 2, 3, 4 and 9, in colorectal cancer cell lines and patient samples. Moreover, the putative TLR-target gene IL8 (CXCL8), a proinflammatory chemokine which is expressed TLR/NF- κ B dependently, was analyzed. A panel of established human colorectal carcinoma cell lines (SW480, SW620, DLD1 and HT29) and surgically resected human colon carcinoma tissue samples (from n=55 patients) were analysed

by qRT-PCR, and the expression values were correlated with clinical data. The expression of TLRs, as well as the TLR-target gene IL8, appeared heterogeneous, whereas expression of the signal adaptor MyD88 remained relatively constant in all examined cell lines. The expression analysis of human tissue samples demonstrated a tumor stage specific deregulation of TLR3. TLR3 expression showed a highly significant negative correlation with increasing malignancy. The correlation of intratumoral TLR3 expression with clinical data revealed a significantly reduced overall survival, as well as reduced tumor specific survival, in patients with TLR3 expression above the calculated threshold value. The TLR4 expression in normal colon mucosa samples was significantly higher than in corresponding tumor samples. Furthermore, intratumoral TLR4 expression of the patient population demonstrated prognostic significance. Disease free survival was significantly reduced when TLR4 expression was lower than the calculated threshold value. Consequently, expression of TLR3 and TLR4 has opposing effects on the progression of the colorectal cancer. The correlation of intratumoral IL8 expression with the clinical data showed a significantly reduced overall survival, and disease free survival, in the group of patients with high IL8 expression. This result suggests that a general activation of the TLR signal pathways, with a pro-inflammatory environment, as indicated by increased IL8 expression, is associated with aggressive tumor growth. Moreover, the influence of MyD88 on TLR expression and the activity of TLR-dependent pathways were examined with transgenic mouse models, which had been established in preliminary studies. The murine models are characterized by a Cre/LoxP-dependent, tissue-specific re-expression of MyD88 in either intestinal epithelial cells or in macrophages, on a global MyD88-deficient background. The analysis of the TLR-dependent signalling pathway was performed with specific in vitro TLR-ligands on ex-vivo organ explant cultures, and subsequent cytokine detection by ELISA. The data obtained from ex-vivo organ explant cultures showed that IL6 secretion was distinctly higher than the production of TNF α . In addition, stimulated spleen tissue as secondary lymphoid organ produced far higher cytokine and chemokine levels than intestinal tissue. The results obtained here, in addition with reported literature findings, underline the proinflammatory and proliferative potential of TLR signalling pathways. The TLR/NF- κ B-mediated interaction of carcinoma cells with their stroma environment could result in more aggressive tumor growth and poor clinical prognosis. Pharmacological modulation of TLR signaling could have great therapeutic benefits. However, it has to be considered that the different TLR pathways might have opposing effects on tumor growth.

10 Literaturverzeichnis

- Aaltonen**, L.A., R. Salovaara, P. Kristo, F. Canzian, A. Hemminki, P. Peltomaki, R.B. Chadwick, H. Kaariainen, M. Eskelinen, H. Jarvinen, J.P. Mecklin, and A. de la Chapelle. **1998**. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med.* 338:1481-1487.
- Abal**, M., A. Obrador-Hevia, K.P. Janssen, L. Casadome, M. Menendez, S. Carpentier, E. Barillot, M. Wagner, W. Ansorge, G. Moeslein, H. Fsihi, V. Bezrookove, J. Reventos, D. Louvard, G. Capella, and S. Robine. **2007**. APC inactivation associates with abnormal mitosis completion and concomitant BUB1B/MAD2L1 up-regulation. *Gastroenterology.* 132:2448-2458.
- Abreu**, M.T. **2010**. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol.* 10:131-144.
- Abreu**, M.T., P. Vora, E. Faure, L.S. Thomas, E.T. Arnold, and M. Arditi. **2001**. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 167:1609-1616.
- Achyut**, B.R., U.C. Ghoshal, N. Moorchung, and B. Mittal. **2007**. Association of Toll-like receptor-4 (Asp299Gly and Thr399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions. *Hum Immunol.* 68:901-907.
- Akira**, S., and K. Takeda. **2004**. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4:499-511.
- Alcock**, H.E., T.J. Stephenson, J.A. Royds, and D.W. Hammond. **2003**. Analysis of colorectal tumor progression by microdissection and comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer.* 37:369-380.
- Apetoh**, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M.C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F.J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J.P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. Andre, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer, and L. Zitvogel. **2007**. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 13:1050-1059.
- Balkwill**, F., and L.M. Coussens. **2004**. Cancer: an inflammatory link. *Nature.* 431:405-406.
- Battle**, E., J.T. Henderson, H. Beghtel, M.M. van den Born, E. Sancho, G. Huls, J. Meeldijk, J. Robertson, M. van de Wetering, T. Pawson, and H. Clevers. **2002**. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell.* 111:251-263.
- Beachy**, P.A., S.S. Karhadkar, and D.M. Berman. **2004**. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature.* 432:324-331.

- Becker**, C., M.C. Fantini, C. Schramm, H.A. Lehr, S. Wirtz, A. Nikolaev, J. Burg, S. Strand, R. Kiesslich, S. Huber, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, P.R. Galle, M. Blessing, S. Rose-John, and M.F. Neurath. **2004**. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity*. 21:491-501.
- Beutler**, B., Z. Jiang, P. Georgel, K. Crozat, B. Croker, S. Rutschmann, X. Du, and K. Hoebe. **2006**. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol*. 24:353-389.
- Bogunovic**, M., S.H. Dave, J.S. Tilstra, D.T. Chang, N. Harpaz, H. Xiong, L.F. Mayer, and S.E. Plevy. **2007**. Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 292:G1770-1783.
- Bos**, J.L., E.R. Fearon, S.R. Hamilton, M. Verlaan-de Vries, J.H. van Boom, A.J. van der Eb, and B. Vogelstein. **1987**. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*. 327:293-297.
- Brat**, D.J., A.C. Bellail, and E.G. Van Meir. **2005**. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol*. 7:122-133.
- Burstein**, E., and E.R. Fearon. **2008**. Colitis and cancer: a tale of inflammatory cells and their cytokines. *J Clin Invest*. 118:464-467.
- Burt**, R.W., J.S. Barthel, K.B. Dunn, D.S. David, E. Drelichman, J.M. Ford, F.M. Giardiello, S.B. Gruber, A.L. Halverson, S.R. Hamilton, M.K. Ismail, K. Jasperson, A.J. Lazenby, P.M. Lynch, E.W. Martin, Jr., R.J. Mayer, R.M. Ness, D. Provenzale, M.S. Rao, M. Shike, G. Steinbach, J.P. Terdiman, D. Weinberg, and Nccn. **2010**. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Colorectal cancer screening. *J Natl Compr Canc Netw*. 8:8-61.
- Campbell**, S.L., R. Khosravi-Far, K.L. Rossman, G.J. Clark, and C.J. Der. **1998**. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene*. 17:1395-1413.
- Camus**, M., M. Tosolini, B. Mlecnik, F. Pages, A. Kirilovsky, A. Berger, A. Costes, G. Bindea, P. Charoentong, P. Bruneval, Z. Trajanoski, W.H. Fridman, and J. Galon. **2009**. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. *Cancer Res*. 69:2685-2693.
- Cario**, E., and D.K. Podolsky. **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.
- Chen**, R., A.B. Alvero, D.A. Silasi, and G. Mor. **2007**. Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *Am J Reprod Immunol*. 57:93-107.
- Chen**, R., A.B. Alvero, D.A. Silasi, K.D. Steffensen, and G. Mor. **2008**. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene*. 27:225-233.
- Chen**, Z.J. **2005**. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol*. 7:758-765.
- Cho**, J.H. **2008**. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 8:458-466.
- Chuang**, T.H., and R.J. Ulevitch. **2000**. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw*. 11:372-378.

- Clevers, H., and R. Nusse. 2012.** Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*. 149:1192-1205.
- Coopersmith, C.M., C. Chandrasekaran, M.S. McNevin, and J.I. Gordon. 1997.** Bi-transgenic mice reveal that K-rasVal12 augments a p53-independent apoptosis when small intestinal villus enterocytes reenter the cell cycle. *J Cell Biol*. 138:167-179.
- Cronin, J.G., M.L. Turner, L. Goetze, C.E. Bryant, and I.M. Sheldon. 2012.** Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol Reprod*. 86:51.
- De Jager, P.L., D. Franchimont, A. Waliszewska, A. Bitton, A. Cohen, D. Langelier, J. Belaiche, S. Vermeire, L. Farwell, A. Goris, C. Libioulle, N. Jani, T. Dassopoulos, G.P. Bromfield, B. Dubois, J.H. Cho, S.R. Brant, R.H. Duerr, H. Yang, J.I. Rotter, M.S. Silverberg, A.H. Steinhart, M.J. Daly, D.K. Podolsky, E. Louis, D.A. Hafler, J.D. Rioux, I.B.D.G.C. Quebec, and N.I.G. Consortium. 2007.** The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun*. 8:387-397.
- Doll, D., L. Keller, M. Maak, A.L. Boulesteix, J.R. Siewert, B. Holzmann, and K.P. Janssen. 2010.** Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival. *Int J Colorectal Dis*. 25:573-581.
- Dove, W.F., L. Clipson, K.A. Gould, C. Luongo, D.J. Marshall, A.R. Moser, M.A. Newton, and R.F. Jacoby. 1997.** Intestinal neoplasia in the ApcMin mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status. *Cancer Res*. 57:812-814.
- Downward, J. 1998.** Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*. 8:49-54.
- Du, X., A. Poltorak, Y. Wei, and B. Beutler. 2000.** Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw*. 11:362-371.
- Earl, T.M., I.B. Nicoud, J.M. Pierce, J.P. Wright, N.E. Majoras, J.E. Rubin, K.P. Pierre, D.L. Gorden, and R.S. Chari. 2009.** Silencing of TLR4 decreases liver tumor burden in a murine model of colorectal metastasis and hepatic steatosis. *Ann Surg Oncol*. 16:1043-1050.
- Ekbom, A., C. Helmick, M. Zack, and H.O. Adami. 1990.** Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*. 323:1228-1233.
- el Marjou, F., K.P. Janssen, B.H. Chang, M. Li, V. Hindie, L. Chan, D. Louvard, P. Chambon, D. Metzger, and S. Robine. 2004.** Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis*. 39:186-193.
- Ernst, P.B., H. Takaishi, and S.E. Crowe. 2001.** Helicobacter pylori infection as a model for gastrointestinal immunity and chronic inflammatory diseases. *Dig Dis*. 19:104-111.
- Fearon, E.R., and B. Vogelstein. 1990.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61:759-767.
- Fodde, R., and R. Smits. 2001.** Disease model: familial adenomatous polyposis. *Trends Mol Med*. 7:369-373.

- Fukata**, M., A. Chen, A. Klepper, S. Krishnareddy, A.S. Vamadevan, L.S. Thomas, R. Xu, H. Inoue, M. Arditi, A.J. Dannenberg, and M.T. Abreu. **2006**. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*. 131:862-877.
- Fukata**, M., A. Chen, A.S. Vamadevan, J. Cohen, K. Breglio, S. Krishnareddy, D. Hsu, R. Xu, N. Harpaz, A.J. Dannenberg, K. Subbaramaiah, H.S. Cooper, S.H. Itzkowitz, and M.T. Abreu. **2007**. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*. 133:1869-1881.
- Fukata**, M., K.S. Michelsen, R. Eri, L.S. Thomas, B. Hu, K. Lukasek, C.C. Nast, J. Lechago, R. Xu, Y. Naiki, A. Soliman, M. Arditi, and M.T. Abreu. **2005**. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 288:G1055-1065.
- Furrie**, E., S. Macfarlane, G. Thomson, G.T. Macfarlane, Microbiology, G. Gut Biology, T. Tayside, and B. Tumour. **2005**. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*. 115:565-574.
- Gais**, P., D. Reim, G. Jusek, T. Rossmann-Bloeck, H. Weighardt, K. Pfeffer, F. Altmayr, K.P. Janssen, and B. Holzmann. **2012**. Cutting edge: Divergent cell-specific functions of MyD88 for inflammatory responses and organ injury in septic peritonitis. *J Immunol*. 188:5833-5837.
- Garlanda**, C., F. Riva, T. Veliz, N. Polentarutti, F. Pasqualini, E. Radaelli, M. Sironi, M. Nebuloni, E.O. Zorini, E. Scanziani, and A. Mantovani. **2007**. Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family. *Cancer Res*. 67:6017-6021.
- Gaspar**, C., and R. Fodde. **2004**. APC dosage effects in tumorigenesis and stem cell differentiation. *Int J Dev Biol*. 48:377-386.
- Girling**, J.E., and M.P. Hedger. **2007**. Toll-like receptors in the gonads and reproductive tract: emerging roles in reproductive physiology and pathology. *Immunol Cell Biol*. 85:481-489.
- Goel**, A., C.N. Arnold, D. Niedzwiecki, J.M. Carethers, J.M. Dowell, L. Wasserman, C. Compton, R.J. Mayer, M.M. Bertagnolli, and C.R. Boland. **2004**. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res*. 64:3014-3021.
- Gooden**, M.J., G.H. de Bock, N. Leffers, T. Daemen, and H.W. Nijman. **2011**. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 105:93-103.
- Gryfe**, R. **2009**. Inherited colorectal cancer syndromes. *Clin Colon Rectal Surg*. 22:198-208.
- Guardavaccaro**, D., and H. Clevers. **2012**. Wnt/beta-catenin and MAPK signaling: allies and enemies in different battlefields. *Sci Signal*. 5:pe15.
- Hanahan**, D., and R.A. Weinberg. **2011**. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646-674.
- Harmey**, J.H., C.D. Bucana, W. Lu, A.M. Byrne, S. McDonnell, C. Lynch, D. Bouchier-Hayes, and Z. Dong. **2002**. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. *Int J Cancer*. 101:415-422.

- Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, and M. Kracht. 2002.** Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 72:847-855.
- Holtmann, H., J. Enninga, S. Kalble, A. Thiefes, A. Dorrie, M. Broemer, R. Winzen, A. Wilhelm, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, K. Resch, and M. Kracht. 2001.** The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. *J Biol Chem.* 276:3508-3516.
- Huang, B., J. Zhao, S. Shen, H. Li, K.L. He, G.X. Shen, L. Mayer, J. Unkeless, D. Li, Y. Yuan, G.M. Zhang, H. Xiong, and Z.H. Feng. 2007.** *Listeria monocytogenes* promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. *Cancer Res.* 67:4346-4352.
- Huang, B., J. Zhao, J.C. Unkeless, Z.H. Feng, and H. Xiong. 2008.** TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene.* 27:218-224.
- Huang, Y., S. Wang, and T. Kelly. 2004.** Seprase promotes rapid tumor growth and increased microvessel density in a mouse model of human breast cancer. *Cancer Res.* 64:2712-2716.
- Huang, Y.H., P.W. Wang, M.M. Tiao, M.H. Chou, Y.Y. Du, C.C. Huang, and J.H. Chuang. 2011.** Glucocorticoid modulates high-mobility group box 1 expression and Toll-like receptor activation in obstructive jaundice. *J Surg Res.* 170:e47-55.
- Janssen, K.P. 2003.** Murine models of colorectal cancer: studying the role of oncogenic K-ras. *Cell Mol Life Sci.* 60:495-506.
- Janssen, K.P., M. Abal, F. El Marjou, D. Louvard, and S. Robine. 2005.** Mouse models of K-ras-initiated carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1756:145-154.
- Janssen, K.P., P. Alberici, H. Fsihi, C. Gaspar, C. Breukel, P. Franken, C. Rosty, M. Abal, F. El Marjou, R. Smits, D. Louvard, R. Fodde, and S. Robine. 2006.** APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology.* 131:1096-1109.
- Janssen, K.P., F. el-Marjou, D. Pinto, X. Sastre, D. Rouillard, C. Fouquet, T. Soussi, D. Louvard, and S. Robine. 2002.** Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology.* 123:492-504.
- Jasperson, K.W., T.M. Tuohy, D.W. Neklason, and R.W. Burt. 2010.** Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 138:2044-2058.
- Jasperson, K.W., T.M. Vu, A.L. Schwab, D.W. Neklason, M.A. Rodriguez-Bigas, R.W. Burt, and J.N. Weitzel. 2010.** Evaluating Lynch syndrome in very early onset colorectal cancer probands without apparent polyposis. *Fam Cancer.* 9:99-107.
- Jemal, A., F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. 2011.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 61:69-90.
- Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, and M.J. Thun. 2009.** Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 59:225-249.
- Jiang, D., J. Liang, J. Fan, S. Yu, S. Chen, Y. Luo, G.D. Prestwich, M.M. Mascarenhas, H.G. Garg, D.A. Quinn, R.J. Homer, D.R. Goldstein, R. Bucala, P.J. Lee, R. Medzhitov, and P.W. Noble. 2005.** Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med.* 11:1173-1179.

- Jiang, Q., H. Wei, and Z. Tian. 2008.** Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway. *BMC Cancer*. 8:12.
- Kaisho, T., and S. Akira. 2000.** Critical roles of Toll-like receptors in host defense. *Crit Rev Immunol*. 20:393-405.
- Karin, M., and F.R. Greten. 2005.** NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 5:749-759.
- Kawai, T., and S. Akira. 2007.** TLR signaling. *Semin Immunol*. 19:24-32.
- Kawai, T., and S. Akira. 2010.** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 11:373-384.
- Kawai, T., S. Sato, K.J. Ishii, C. Coban, H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi, and S. Akira. 2004.** Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol*. 5:1061-1068.
- Kelly, M.G., A.B. Alvero, R. Chen, D.A. Silasi, V.M. Abrahams, S. Chan, I. Visintin, T. Rutherford, and G. Mor. 2006.** TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res*. 66:3859-3868.
- Kim, E.C., and P. Lance. 1997.** Colorectal polyps and their relationship to cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 26:1-17.
- Kim, S.H., K.A. Roth, A.R. Moser, and J.I. Gordon. 1993.** Transgenic mouse models that explore the multistep hypothesis of intestinal neoplasia. *J Cell Biol*. 123:877-893.
- Kindler, T., M.G. Cornejo, C. Scholl, J. Liu, D.S. Leeman, J.E. Haydu, S. Frohling, B.H. Lee, and D.G. Gilliland. 2008.** K-RasG12D-induced T-cell lymphoblastic lymphoma/leukemias harbor Notch1 mutations and are sensitive to gamma-secretase inhibitors. *Blood*. 112:3373-3382.
- Kinzler, K.W., and B. Vogelstein. 1996.** Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 87:159-170.
- Koff, J.L., M.X. Shao, S. Kim, I.F. Ueki, and J.A. Nadel. 2006.** Pseudomonas lipopolysaccharide accelerates wound repair via activation of a novel epithelial cell signaling cascade. *J Immunol*. 177:8693-8700.
- Kramps, T., O. Peter, E. Brunner, D. Nellen, B. Froesch, S. Chatterjee, M. Murone, S. Zullig, and K. Basler. 2002.** Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell*. 109:47-60.
- Kreuz, S., D. Siegmund, J.J. Rumpf, D. Samel, M. Leverkus, O. Janssen, G. Hacker, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, P. Scheurich, and H. Wajant. 2004.** NFkappaB activation by Fas is mediated through FADD, caspase-8, and RIP and is inhibited by FLIP. *J Cell Biol*. 166:369-380.
- Lee, J., J.H. Mo, K. Katakura, I. Alkalay, A.N. Rucker, Y.T. Liu, H.K. Lee, C. Shen, G. Cojocaru, S. Shenouda, M. Kagnoff, L. Eckmann, Y. Ben-Neriah, and E. Raz. 2006.** Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol*. 8:1327-1336.
- Lee, S.H., L.L. Hu, J. Gonzalez-Navajas, G.S. Seo, C. Shen, J. Brick, S. Herdman, N. Varki, M. Corr, J. Lee, and E. Raz. 2010.** ERK activation drives intestinal tumorigenesis in Apc(min/+) mice. *Nat Med*. 16:665-670.

- Leggett, B., and V. Whitehall. 2010.** Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 138:2088-2100.
- Li, Q., S. Withoff, and I.M. Verma. 2005.** Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends Immunol.* 26:318-325.
- Lin, W.W., and M. Karin. 2007.** A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 117:1175-1183.
- Lotze, M.T., and K.J. Tracey. 2005.** High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol.* 5:331-342.
- Lundin, A., C.M. Bok, L. Aronsson, B. Bjorkholm, J.A. Gustafsson, S. Pott, V. Arulampalam, M. Hibberd, J. Rafter, and S. Pettersson. 2008.** Gut flora, Toll-like receptors and nuclear receptors: a tripartite communication that tunes innate immunity in large intestine. *Cell Microbiol.* 10:1093-1103.
- Luo, J.L., S. Maeda, L.C. Hsu, H. Yagita, and M. Karin. 2004.** Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell.* 6:297-305.
- Maeda, S., H. Kamata, J.L. Luo, H. Leffert, and M. Karin. 2005.** IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell.* 121:977-990.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2003.** RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 3:459-465.
- Malvin, N.P., H. Seno, and T.S. Stappenbeck. 2012.** Colonic epithelial response to injury requires Myd88 signaling in myeloid cells. *Mucosal Immunol.* 5:194-206.
- McDermott, E.P., and L.A. O'Neill. 2002.** Ras participates in the activation of p38 MAPK by interleukin-1 by associating with IRAK, IRAK2, TRAF6, and TAK-1. *J Biol Chem.* 277:7808-7815.
- Merrell, M.A., J.M. Ilvesaro, N. Lehtonen, T. Sorsa, B. Gehrs, E. Rosenthal, D. Chen, B. Shackley, K.W. Harris, and K.S. Selander. 2006.** Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. *Mol Cancer Res.* 4:437-447.
- Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher, and J. Tschopp. 2004.** RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol.* 5:503-507.
- Michelsen, K.S., and M. Arditi. 2007.** Toll-like receptors and innate immunity in gut homeostasis and pathology. *Curr Opin Hematol.* 14:48-54.
- Mor, G., S. Straszewski, and M. Kamsteeg. 2002.** Role of the Fas/Fas ligand system in female reproductive organs: survival and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 64:1305-1315.
- Nakao, A., T. Imamura, S. Souchelnytskyi, M. Kawabata, A. Ishisaki, E. Oeda, K. Tamaki, J. Hanai, C.H. Heldin, K. Miyazono, and P. ten Dijke. 1997.** TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J.* 16:5353-5362.
- Naugler, W.E., T. Sakurai, S. Kim, S. Maeda, K. Kim, A.M. Elsharkawy, and M. Karin. 2007.** Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science.* 317:121-124.
- Naugler, W.E., T. Sakurai, S. Kim, S. Maeda, K. Kim, A.M. Elsharkawy, and M. Karin. 2007.** Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science.* 317:121-124.

- Neufeld, K.L., F. Zhang, B.R. Cullen, and R.L. White. 2000.** APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO Rep.* 1:519-523.
- Niedzielska, I., Z. Niedzielski, M. Tkacz, T. Orawczyk, K. Ziąja, J. Starzewski, U. Mazurek, and J. Markowski. 2009.** Toll-like receptors and the tendency of normal mucous membrane to transform to polyp or colorectal cancer. *J Physiol Pharmacol.* 60 Suppl 1:65-71.
- Nitsche, U., R. Rosenberg, A. Balmert, T. Schuster, J. Slotta-Huspenina, P. Herrmann, F.G. Bader, H. Friess, P.M. Schlag, U. Stein, and K.P. Janssen. 2012.** Integrative marker analysis allows risk assessment for metastasis in stage II colon cancer. *Ann Surg.* 256:763-771; discussion 771.
- Nojiri, K., K. Sugimoto, K. Shiraki, M. Tameda, Y. Inagaki, S. Kusagawa, S. Ogura, J. Tanaka, M. Yoneda, N. Yamamoto, H. Okano, Y. Takei, M. Ito, C. Kasai, H. Inoue, and K. Takase. 2013.** The expression and function of Toll-like receptors 3 and 9 in human colon carcinoma. *Oncol Rep.* 29:1737-1743.
- Ohue, M., N. Tomita, T. Monden, M. Fujita, M. Fukunaga, K. Takami, I. Yana, T. Ohnishi, T. Enomoto, M. Inoue, and et al. 1994.** A frequent alteration of p53 gene in carcinoma in adenoma of colon. *Cancer Res.* 54:4798-4804.
- O'Neill, L.A., and A.G. Bowie. 2007.** The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 7:353-364.
- Oshima, M., and M.M. Taketo. 2002.** COX selectivity and animal models for colon cancer. *Curr Pharm Des.* 8:1021-1034.
- Otte, J.M., E. Cario, and D.K. Podolsky. 2004.** Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 126:1054-1070.
- Peek, R.M., Jr., and M.J. Blaser. 2002.** Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2:28-37.
- Pierik, M., S. Joossens, K. Van Steen, N. Van Schuerbeek, R. Vlietinck, P. Rutgeerts, and S. Vermeire. 2006.** Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 12:1-8.
- Popivanova, B.K., K. Kitamura, Y. Wu, T. Kondo, T. Kagaya, S. Kaneko, M. Oshima, C. Fujii, and N. Mukaida. 2008.** Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest.* 118:560-570.
- Qin, J., Y. Qian, J. Yao, C. Grace, and X. Li. 2005.** SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *J Biol Chem.* 280:25233-25241.
- Rakoff-Nahoum, S., and R. Medzhitov. 2007.** Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science.* 317:124-127.
- Rakoff-Nahoum, S., and R. Medzhitov. 2008.** Role of toll-like receptors in tissue repair and tumorigenesis. *Biochemistry (Mosc).* 73:555-561.
- Rakoff-Nahoum, S., and R. Medzhitov. 2009.** Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer.* 9:57-63.
- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, and R. Medzhitov. 2004.** Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 118:229-241.

- Rhee**, S.H., E. Im, and C. Pothoulakis. **2008**. Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology*. 135:518-528.
- Riede**, U.N., H.E. Schäfer, and M. Werner. **2004**. Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme Georg Verlag.
- Rimkus**, C., M. Martini, J. Friederichs, R. Rosenberg, D. Doll, J.R. Siewert, B. Holzmann, and K.P. Janssen. **2006**. Prognostic significance of downregulated expression of the candidate tumour suppressor gene SASH1 in colon cancer. *Br J Cancer*. 95:1419-1423.
- Roach**, J.C., G. Glusman, L. Rowen, A. Kaur, M.K. Purcell, K.D. Smith, L.E. Hood, and A. Aderem. **2005**. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:9577-9582.
- Roberts**, D.M., K.C. Slep, and M. Peifer. **2007**. It takes more than two to tango: Dishevelled polymerization and Wnt signaling. *Nat Struct Mol Biol*. 14:463-465.
- Rosenberg**, D.W., C. Giardina, and T. Tanaka. **2009**. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 30:183-196.
- Rubie**, C., V.O. Frick, S. Pfeil, M. Wagner, O. Kollmar, B. Kopp, S. Graber, B.M. Rau, and M.K. Schilling. **2007**. Correlation of IL-8 with induction, progression and metastatic potential of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 13:4996-5002.
- Schiffman**, M., P.E. Castle, J. Jeronimo, A.C. Rodriguez, and S. Wacholder. **2007**. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 370:890-907.
- Schreinemachers**, D.M., and R.B. Everson. **1994**. Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study. *Epidemiology*. 5:138-146.
- Schubbert**, S., K. Shannon, and G. Bollag. **2007**. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*. 7:295-308.
- Shibata**, H., K. Toyama, H. Shioya, M. Ito, M. Hirota, S. Hasegawa, H. Matsumoto, H. Takano, T. Akiyama, K. Toyoshima, R. Kanamaru, Y. Kanegae, I. Saito, Y. Nakamura, K. Shiba, and T. Noda. **1997**. Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science*. 278:120-123.
- Shishodia**, S., and B.B. Aggarwal. **2002**. Nuclear factor-kappaB activation: a question of life or death. *J Biochem Mol Biol*. 35:28-40.
- Siegel**, R., D. Naishadham, and A. Jemal. **2013**. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 63:11-30.
- Singh**, J.C., S.M. Cruickshank, D.J. Newton, L. Wakenshaw, A. Graham, J. Lan, J.P. Lodge, P.J. Felsburg, and S.R. Carding. **2005**. Toll-like receptor-mediated responses of primary intestinal epithelial cells during the development of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 288:G514-524.
- Slattery**, M.L., J.S. Herrick, K.L. Bondurant, and R.K. Wolff. **2012**. Toll-like receptor genes and their association with colon and rectal cancer development and prognosis. *Int J Cancer*. 130:2974-2980.
- Smith**, K.J., K.A. Johnson, T.M. Bryan, D.E. Hill, S. Markowitz, J.K. Willson, C. Paraskeva, G.M. Petersen, S.R. Hamilton, B. Vogelstein, and et al. **1993**. The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:2846-2850.

- Smits, R., M.F. Kielman, C. Breukel, C. Zurcher, K. Neufeld, S. Jagmohan-Changur, N. Hofland, J. van Dijk, R. White, W. Edelmann, R. Kucherlapati, P.M. Khan, and R. Fodde. 1999.** Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev.* 13:1309-1321.
- Steenholdt, C., L. Andresen, G. Pedersen, A. Hansen, and J. Brynskov. 2009.** Expression and function of toll-like receptor 8 and Tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 44:195-204.
- Stevens, V.L., A.W. Hsing, J.T. Talbot, S.L. Zheng, J. Sun, J. Chen, M.J. Thun, J. Xu, E.E. Calle, and C. Rodriguez. 2008.** Genetic variation in the toll-like receptor gene cluster (TLR10-TLR1-TLR6) and prostate cancer risk. *Int J Cancer.* 123:2644-2650.
- Su, L.K., K.W. Kinzler, B. Vogelstein, A.C. Preisinger, A.R. Moser, C. Luongo, K.A. Gould, and W.F. Dove. 1992.** Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science.* 256:668-670.
- Swann, J.B., M.D. Vesely, A. Silva, J. Sharkey, S. Akira, R.D. Schreiber, and M.J. Smyth. 2008.** Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:652-656.
- Tabeta, K., P. Georgel, E. Janssen, X. Du, K. Hoebe, K. Crozat, S. Mudd, L. Shamel, S. Sovath, J. Goode, L. Alexopoulou, R.A. Flavell, and B. Beutler. 2004.** Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3516-3521.
- Tahara, T., T. Arisawa, F. Wang, T. Shibata, M. Nakamura, M. Sakata, I. Hirata, and H. Nakano. 2007.** Toll-like receptor 2 -196 to 174del polymorphism influences the susceptibility of Japanese people to gastric cancer. *Cancer Sci.* 98:1790-1794.
- Takayama, T., M. Ohi, T. Hayashi, K. Miyanishi, A. Nobuoka, T. Nakajima, T. Satoh, R. Takimoto, J. Kato, S. Sakamaki, and Y. Niitsu. 2001.** Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology.* 121:599-611.
- Tanabe, H., T. Ayabe, B. Bainbridge, T. Guina, R.K. Ernst, R.P. Darveau, S.I. Miller, and A.J. Ouellette. 2005.** Mouse paneth cell secretory responses to cell surface glycolipids of virulent and attenuated pathogenic bacteria. *Infect Immun.* 73:2312-2320.
- Tesniere, A., F. Schlemmer, V. Boige, O. Kepp, I. Martins, F. Ghiringhelli, L. Aymeric, M. Michaud, L. Apetoh, L. Barault, J. Mendiboure, J.P. Pignon, V. Jooste, P. van Endert, M. Ducreux, L. Zitvogel, F. Piard, and G. Kroemer. 2010.** Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene.* 29:482-491.
- Tsung, A., R. Sahai, H. Tanaka, A. Nakao, M.P. Fink, M.T. Lotze, H. Yang, J. Li, K.J. Tracey, D.A. Geller, and T.R. Billiar. 2005.** The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med.* 201:1135-1143.

- Vogelstein, B., E.R. Fearon, S.R. Hamilton, S.E. Kern, A.C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A.M. Smits, and J.L. Bos. 1988.** Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 319:525-532.
- Wald, D., J. Qin, Z. Zhao, Y. Qian, M. Naramura, L. Tian, J. Towne, J.E. Sims, G.R. Stark, and X. Li. 2003.** SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol.* 4:920-927.
- Wang, E.L., Z.R. Qian, M. Nakasono, T. Tanahashi, K. Yoshimoto, Y. Bando, E. Kudo, M. Shimada, and T. Sano. 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.
- Wolpin, B.M., and R.J. Mayer. 2008.** Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology.* 134:1296-1310.
- Xiang, L., S. Wang, X. Jin, W. Duan, X. Ding, and C. Zheng. 2012.** Expression of BMP2, TLR3, TLR4 and COX2 in colorectal polyps, adenoma and adenocarcinoma. *Mol Med Rep.* 6:973-976.
- Xiao, H., M.F. Gulen, J. Qin, J. Yao, K. Bulek, D. Kish, C.Z. Altuntas, D. Wald, C. Ma, H. Zhou, V.K. Tuohy, R.L. Fairchild, C. de la Motte, D. Cua, B.A. Vallance, and X. Li. 2007.** The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. *Immunity.* 26:461-475.
- Xu, H., Q. Wu, S. Dang, M. Jin, J. Xu, Y. Cheng, M. Pan, Y. Wu, C. Zhang, and Y. Zhang. 2011.** Alteration of CXCR7 expression mediated by TLR4 promotes tumor cell proliferation and migration in human colorectal carcinoma. *PLoS One.* 6:e27399.
- Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003.** Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 301:640-643.
- Yoshioka, T., Y. Morimoto, H. Iwagaki, H. Itoh, S. Saito, N. Kobayashi, T. Yagi, and N. Tanaka. 2001.** Bacterial lipopolysaccharide induces transforming growth factor beta and hepatocyte growth factor through toll-like receptor 2 in cultured human colon cancer cells. *J Int Med Res.* 29:409-420.
- Zeestraten, E.C., M. Maak, M. Shibayama, T. Schuster, U. Nitsche, T. Matsushima, S. Nakayama, K. Gohda, H. Friess, C.J. van de Velde, H. Ishihara, R. Rosenberg, P.J. Kuppen, and K.P. Janssen. 2012.** Specific activity of cyclin-dependent kinase I is a new potential predictor of tumour recurrence in stage II colon cancer. *Br J Cancer.* 106:133-140.
- Zhou, R., H. Wei, R. Sun, and Z. Tian. 2007.** Recognition of double-stranded RNA by TLR3 induces severe small intestinal injury in mice. *J Immunol.* 178:4548-4556.
- Znaor, A., C. van den Hurk, M. Primic-Zakelj, D. Agius, D. Coza, A. Demetriou, N. Dimitrova, S. Eser, H. Karakilinc, S. Zivkovic, F. Bray, and J.W. Coebergh. 2013.** Cancer incidence and mortality patterns in South Eastern Europe in the last decade: gaps persist compared with the rest of Europe. *Eur J Cancer.* 49:1683-1691.
- Zuber, J., O.I. Tchernitsa, B. Hinzmann, A.C. Schmitz, M. Grips, M. Hellriegel, C. Sers, A. Rosenthal, and R. Schafer. 2000.** A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat Genet.* 24:144-152.

11 Abbildungsverzeichnis

1. Modell der kolorektalen Karzinogenese	S.11
2. vereinfachte, schematische Darstellung des Ras-Signalweges.....	S.12
3. vereinfachte, schematische Darstellung des Wnt-Signalwegs	S.13
4. Schematische Darstellung inflammations-bedingter Tumorgenese.....	S.15
5. HE- Histoschnittbilder humanen Kolons in 5-facher Vergrößerung	S.16
6. schematische Darstellung der TLR-Signalwege	S.21
7. schematische Darstellung von möglichen APC-Genprodukten.....	S.23
8. Mausmodelle für die kolorektale Tumorgenese	S.24
9. Einfluss eines MyD88-Knockouts auf die spontane intestinale Tumorgenese von Apc ^{Min/+} Mäusen.....	S.26
10. relative MyD88-Expression in Tumorzelllinien mit und ohne selektive TLR-Stimulation	S.53
11. relative TLR2-Expression in Tumorzelllinien mit und ohne selektive TLR-Stimulation	S.54
12. relative TLR3-Expression in Tumorzelllinien mit und ohne selektive TLR-Stimulation	S.56
13. relative TLR4-Expression in Tumorzelllinien mit und ohne selektive TLR-Stimulation	S.57
14. relative TLR9-Expression in Tumorzelllinien mit und ohne selektive TLR-Stimulation	S.58
15. relative IL8-Expression in Tumorzelllinien mit und ohne selektive TLR- Stimulation	S.59
16. relative TLR-Expressionen in humanen Kolorektaltumoren.....	S.64
17. TLR-Expressionsanalyse patientenspezifischer Gewebeproben („Matched samples“)	S.66
18. relative TLR-Expressionen rezidivierender und nicht-rezidivierender humaner Kolorektaltumore des UICC II Stadiums.....	S.67
19. Verteilung der Expressionswerte in graphischer Darstellung.....	S.69
20. Dargestellte „cut-off“-Berechnung mittels Statistikprogramm „R“	S.70
21. Kaplan-Meier-Analyse für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit der TLR3-Expression	S.71
22. Kaplan-Meier-Analyse für das tumorspezifische Überleben in Abhängigkeit der TLR3-Expression	S.72

23. Kaplan-Meier- Analyse für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit von der TLR4-Expression.....	S.73
24. relative MyD88-Expression in humanen Kolorektaltumoren.....	S.74
25. MyD88-Expression fortgeschrittener Kolorektalkarzinome	S.75
26. Kaplan-Meier-Analyse für das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der MyD88-Expression	S.76
27. Kaplan-Meier-Analyse für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit von der MyD88-Expression.....	S.77
28. relative IL8-Expression humaner Kolorektaltumore	S.78
29. relative IL8-Expression rezidivierender und nicht-rezidivierender humaner Kolorektaltumore des UICC II Stadiums	S.79
30. Kaplan-Meier-Kurve für das tumorspezifische Überleben in Korrelation mit der IL8-Expression	S.80
31. Kaplan-Meier-Kurve für das rezidivfreie Überleben in Korrelation mit der IL8-Expression	S.81
32. Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben in Korrelation mit der IL8-Expression	S.82
33. PCR-Nachweis des loxP-Allels zur MyD88 ^{stp/stp} –Genotypisierung.....	S.85
34. PCR-Nachweis des Villin-Cre-Allels in einer MyD88 ^{stp/stp} –Maus zur MyD88 ^{IEC} -Genotypisierung	S.85
35. relative MyD88-Expression muriner Kolonproben	S.86
36. relative TLRs-Expression muriner Kolonproben	S.87
37. relative COX2-Expression muriner Kolonproben.....	S.88
38. IL6-Zytokindetektion nach 24h-Ex-Vivo-Stimulation des Kolons (links) und des Jejunums (rechts)	S.90
39. IL6-Zytokindetektion nach 24h-Ex-Vivo-Stimulation der Milz.....	S.91
40. Vereinfachte Darstellung potentieller Wechselwirkungen von intestinalen Epithel- und Tumorzellen mit der Mikroumgebung.....	S.95
41. Schematische Zusammenfassung der Diskussion mit hypothetischer Darstellung der Wechselwirkung von Tumorzellen und immunologischer Mikroumgebung.....	S.107

12 Tabellenverzeichnis

1. Übersicht wichtiger Toll-Like Rezeptoren (TLRs) mit ihren jeweiligen Liganden, Adaptermolekülen und nachgeordneten intrazellulären Signalwegen	S.19
2. Liste der für PCR verwendeten Oligonukleotide (für murine DNA)	S.37
3. Liste der für RT-PCR verwendeten Oligonukleotide(humaner mRNA) ...	S.37
4. Liste der für qRT-PCR verwendeten Oligonukleotide. Die aufgeführten Oligonukleotide dienen der Bindung muriner mRNA	S.38
5. Liste der in der Arbeit verwendeten humanen Zelllinien. Alle Zellen sind epithelialen Ursprungs und entstammen Adenokarzinomen des Kolons	S.39
6. Übersicht des Patientenkollektivs mit Anzahl und Stadiumverteilung UICC-klassifizierter Tumorproben	S.39
7. Liste der in der Arbeit verwendeten Mausstämme	S.40
8. Liste der verwendeten PCR-Programme zur Mausgenotypisierung	S.45
9. Annealing-Temperaturen der verwendeten Oligonukleotide für qRT-PCR	S.47
10. vereinfachte Zusammenfassung relativer Zielgen-Expressionen in isolierten Darmtumorzellen des Menschen	S.60
11. Patientenkollektiv mit klinischen und histopathologischen Daten	S.62
12. Liste der für die Kaplan-Meier-Analysen verwendeten klinischen und histopathologischen Daten des Patientenkollektivs	S.68
13. Signifikante Korrelationen logarithmierter Expressionswerte von kolorektalen Tumoren	S.83

13 Anhang

13.1 Klinische Klassifikation kolorektaler Tumore

Die UICC (Union internationale contre le cancer) korreliert für die gleichnamige Einteilung statistische Erkenntnisse über Prognose und Verlauf mit der TNM-Klassifikation. Letztere ist eine polyhierarchische Klassifikation (sog. Facettenklassifikation) welche durch Berücksichtigung des Wachstums- und Streuungsverhalten von Tumoren dem Staging dient.

TNM-Klassifikation für Kolon und Rektum		
T1	Submukosa	
T2	Muscularis propria	
T3	Subserosa, , perikolisches / perirektales Gewebe	
T4	A	Viszerales Peritoneum
	B	Benachbarte Organe
N1	A	1 Lymphknoten
	B	2-3 Lymphknoten
	C	Satellitenläsionen ohne Lymphknotenbefall
N2	A	4-6 Lymphknoten
	B	> 7 Lymphknoten
M1	A	1 Organ
	B	> 2 Organe oder Peritoneum

TNM-Klassifikation für das kolorektale Karzinom. T (Infiltrationsstatus des Primärtumors), N (Lymphknotenmetastasierung) und M (Metastasierungsgrad)

7. Auflage (Erscheinungsjahr 2010) UICC-Klassifikation für Kolon und Rektum				
UICC I		T1-2	N0	M0
UICC II	A	T3	N0	M0
	B	T4A	N0	M0
	C	T4B	N0	M0
UICC III	A	T1-2	N1	M0
		T1	N2A	M0
	B	T3-4A	N1	M0
		T2-3	N2A	M0
		T1-2	N2B	M0
	C	T4A	N2A	M0
		T3-4A	N2B	M0
		T4B	N1-2	M0
	UICC IV	A	jedes T	jedes N
B		jedes T	jedes N	M1B

UICC-Klassifikation für das kolorektale Karzinom

An erster Stelle danke ich ganz herzlich Herrn PD Dr. Klaus-Peter Janssen für die Möglichkeit meine Promotion in seiner tollen Arbeitsgruppe realisieren zu dürfen. Die engagierte Betreuung, sein Wissen sowie seine stets positive und freundliche Art machten die Arbeit im Labor zu einer wertvollen und lehrreichen Zeit.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Ulrich Nitsche für sein hilfreiches Interesse, die Bereitstellung der klinischen Daten und die Unterstützung bei statistischen Fragen.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Felicitas Altmayr bedanken, die mir immer bei allen Problemen weiterhelfen konnte und ausserdem meine Dissertation korrigierte.

Frau Dr. Melanie Laschinger und Herrn Prof. Dr. Bernhard Holzmann danke ich für die konstruktiven Diskussionen und wichtigen Beiträge im Rahmen der „Progress Reports“.

Alexandra Gnann und Melanie Martini danke ich für die Einführung in die Laborarbeit und deren guten Beiträge bei methodischen Fragestellungen.

Ebenso möchte ich mich bei Gabi Jusek, Widya Johannes, Anja Conrad, Sabine Leis, Anne Holtorf, Tanja Weiss, Karin Fütterer und Tanja Rossmann für die hilfreiche und freundliche Unterstützung bei der Promotion bedanken.

Herrn Dr. Matthias Maak danke ich für seine technischen Hilfestellungen und die wichtigen alltäglichen Aufmunterungen in Bild und Wort.

Der Gesamtheit der Personen gilt mein herzlicher Dank für die hervorragende Organisation, bereitwillige Unterstützung, den freundlichen Umgang und das fröhliche Arbeitsklima.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mir das Studium und die Promotion ermöglichten. Sie und mein Bruder haben mich immer unterstützt und durch alle Höhen und Tiefen begleitet. Danke.

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Gros

Vornamen: Nicolas

Geburtsdatum: 11.09.1985

Geburtsort: Basel

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

UNIVERSITÄTSLAUFBAHN

07/12 – 08/13 **Promotion:** Einzureichen an der TU München

02/12 – 05/12 **2. Staatsexamen:** Bestanden an der TU München [Note: gut]

10/07 – 02/12 **Klinik:** 5.-13. Fachsemester an der TU München

08/07 – 09/07 **1. Staatsexamen:** Bestanden an der Universität Regensburg [Note: gut]

10/05 – 09/07 **Vorklinik:** 1.-4. Fachsemester an der Universität Regensburg

SCHULLAUFBAHN

07/05 **Abitur:** Gymnasium Kolleg St. Blasien [Note: 2,4]

09/98 – 06/05 **Gymnasium Kolleg St. Blasien** (St. Blasien; BRD) 7.- 13. Klasse

09/96 – 08/98 **Hans-Thoma-Gymnasium** (Lörrach; BRD) 5.- 6. Klasse

08/94 – 08/96 **Grundschule Rümplingen** (Rümplingen; BRD) 3.- 4. Klasse

08/93 – 07/94 **Germanschool New York** (White Plains; USA) 2. Klasse

08/92 – 08/93 **Grundschule Rümplingen** (Rümplingen; BRD) 1. Klasse

VORSCHULE

09/90 – 07/92 **Kindergarten Rümplingen** (Rümplingen; BRD)

03/87 – 8/90 **Kindergarten Antananarivo** (Antananarivo; Madagaskar)

