

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin
Chirurgische Klinik und Poliklinik

Immunmodulation der intestinalen Karzinogenese durch das Immun-Adapterprotein MyD88

Anne Holtorf

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Percy A. Knolle
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen
2. Prof. Angelika Schnieke, Ph.D.

Die Dissertation wurde am 28.06.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.01.2017 angenommen.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACF	<i>aberrant crypt foci</i>
AOM	Azoxymethan
AP-1	<i>activator protein 1</i>
Apc	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CAC	<i>Colitis-associated cancer</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	complementary DNA
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin Dinukleotid
CRC	<i>colorectal cancer</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CTL	Cytotoxischer T-Lymphozyt
CXCL	C-X-C Motiv Chemokine
DAMP	<i>danger-associated molecular pattern</i>
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSH	Dishevelled
dsRNA	<i>double-stranded RNA</i>
DSS	<i>dextran sulfate sodium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK1/2	<i>extracellular-signal-regulated kinase 1/2</i>
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
GSK-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 beta
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase
H ₂ O _{dd}	zweifach-destilliertes Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
IBD	<i>Inflammatory bowel disease</i>
IEC	<i>intestinal epithelial cells</i>
IEN	intraepitheliale Neoplasie
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
I κ B	<i>Inhibitor of nuclear factor κB</i>
IKK	I κ B-Kinase Komplex
IL	Interleukin

IRF (3/7)	<i>Interferon regulatory factor</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	kilo Dalton
KRAS	<i>Kirsten rat sarkoma viral oncogene homolog</i>
L	Läsion
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	<i>lipoprotein receptor-related protein</i>
LSL	lox-stop-lox
mRNA	messenger RNA
MAL	<i>MyD88-adaptor-like protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MD2	Lymphozyt-Antigen 96
MHC-I	<i>major histocompatibility complex I</i> , Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex I
Min	<i>multiple intestinal lesions</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
Muc-2	Mucin-2
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
MYEL	myeloid
N	Normalgewebe
n	Anzahl
n. d.	nicht detektiert
n. s. / ns	nicht signifikant
NEMO	<i>nuclear factor κB essential modulator</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NK	Natürliche Killerzelle
P ₃ C	Pam3Cys
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered solution</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pIgR	Poly-Immunglobulin-Rezeptor
PRR	<i>pathogen-recognition-receptor</i>
q-RT-PCR	<i>quantitative Real-Time PCR</i>
RegIII	<i>regenerating islet-derived protein 3</i>
RIP-1	<i>receptor-interacting protein 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s.	siehe

SD	<i>standard deviation</i>
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SOPF	Spezifiziert opportunistisch- und pathogen-frei
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i>
TAB	TAK1-Bindeprotein
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAK	<i>transforming-growth-factor-β-activated kinase</i>
TBK	<i>TRAF-family-member-associated nuclear factor-κB activator-binding kinase</i>
TFF3	Trefoil-factor 3
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
T _H	T-Helferzelle
TIR	Toll-Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRAF	Tumor-Nekrose-Faktor-assoziiierter Faktor
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>
v/v	<i>volume/volume</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
w/v	<i>weight/volume</i>
WT	Wildtyp
ZPF	Zentrum für präklinische Forschung

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Biologie des kolorektalen Karzinoms	1
1.2	Die Rolle des Immunsystems in der Tumorgenese	4
1.3	Toll-like Rezeptoren und ihre Signalwege	7
1.4	Die intestinale Barriere und das intestinale Immunsystem	13
1.4.1	Physiologische Expression und Funktion von TLRs/MyD88 im Darmepithel	14
1.5	Die Bedeutung von TLRs/MyD88 in chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Darms	17
1.6	Die Rolle von TLRs/MyD88 bei der intestinalen Karzinogenese	18
1.6.1	Der Einfluss von TLRs/MyD88 in der Kolitis-assoziierten Karzinogenese	18
1.6.2	Die Rolle von TLRs/MyD88 in genetisch induzierten intestinalen Tumoren	19
1.7	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Materialien	25
2.1	Chemikalien	25
2.2	Geräte	27
2.3	Software	28
2.4	Verbrauchsmaterialien	28
2.5	OP-Besteck	29
2.6	Medien und Puffer	30
2.6.1	Zellkulturmedien	30
2.6.2	Puffer	30
2.7	Kommerziell erhältliche Kits	32
2.8	Enzyme	32
2.9	Antikörper	33
2.10	Oligonukleotide	34
2.11	Mausmodelle	37
3	Methoden	38
3.1	Tierexperimentelle Methoden	38
3.1.1	Blutentnahme	38
3.1.2	Organentnahme	38
3.1.3	Gewinnung muriner Primärzellen	38
3.2	Zellbiologische Methoden	39
3.2.1	Zellkultur – Kultivierung von Zelllinien und Bestimmung der Zellzahl	39
3.2.2	Generierung Knochenmarks-abgeleiteter Makrophagen	40
3.2.3	Zellstimulation	40
3.3	Molekularbiologische Methoden	41
3.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien für die Genotypisierung	41
3.3.2	Isolierung von RNA	41
3.3.3	Reverse Transkription	42
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.3.5	Auftrennung von PCR-Produkten in Agarosegelen	43

3.3.6	Quantitative <i>Real-time</i> PCR.....	44
3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	45
3.4.1	Herstellung von Lysaten aus murinem Gewebe und Zellen für Immunoblot.....	45
3.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
3.4.3	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blot).....	46
3.4.4	Immunochemische Detektion spezifischer Proteine (Immunoblot).....	47
3.5	Immunologische Methoden.....	48
3.5.1	Einbetten von Organen und Anfertigen von Gefrierschnitten.....	48
3.5.2	Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE-Färbung) von Gefrierschnitten.....	48
3.5.3	Immunfluoreszenz-Färbung von Gefrierschnitten.....	48
3.5.4	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	49
3.6	Statistische Auswertung.....	49
4	Ergebnisse.....	51
4.1	Generierung eines Mausmodells mit zelltypspezifischer Expression von <i>Myd88</i>	51
4.1.1	Zelltypspezifische Expression von <i>Myd88</i> im Mausmodell.....	52
4.1.2	Wiederherstellung MyD88-abhängiger Signalwege in intestinalen Epithelzellen bzw. Makrophagen.....	54
4.1.3	Unterschiede in der <i>Myd88</i> - und TLR-Expression in Abhängigkeit vom Zelltyp.....	58
4.1.4	Einfluss von MyD88 auf den Allgemeinzustand der Versuchstiere.....	60
4.2	Die Rolle von MyD88 im Apc ^{1638N} -induzierten Darmtumormodell.....	61
4.2.1	Allgemeinzustand der Versuchstiere.....	62
4.2.2	Tumorinzidenz.....	66
4.2.3	Tumoranzahl.....	66
4.2.4	Tumorgröße.....	69
4.2.5	Histologische Analyse der Läsionen.....	70
4.3	Tumorfördernde Wirkungen von MyD88 im prämaligen Darmepithel.....	73
4.3.1	Einfluss von MyD88 auf die Aktivierung von ERK1/2 im Darmepithel.....	74
4.3.2	Epithelzellproliferation in Abhängigkeit der <i>Myd88</i> -Expression.....	76
4.3.3	Die Rolle von MyD88 bei der Apoptose von IECs.....	79
4.3.4	Einfluss von MyD88 auf die intestinale Barriere- und Immunfunktion.....	80
4.4	Die Rolle von MyD88 im Tumorgewebe.....	82
4.4.1	Einfluss von MyD88 auf den kanonischen WNT-Signalweg.....	82
4.4.2	Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose von Tumorzellen in Abhängigkeit von MyD88.....	84
4.4.3	Einfluss von MyD88 auf die Barrierefunktion im Tumorgewebe.....	86
4.4.4	Zytokinexpression in Läsionen.....	88
4.4.5	Untersuchungen zur Anzahl intra-tumoraler Makrophagen.....	91
4.4.6	Die Rolle von MyD88 bei der Infiltration von T-Zellen.....	94
4.4.7	MyD88-abhängige Ausprägung von <i>Snai1</i> und <i>Snai2</i> in Läsionen.....	99
4.4.8	Expression verschiedener Stammzellfaktoren in Abhängigkeit von MyD88.....	102
5	Diskussion.....	104
5.1	Das neuartige Mausmodell ermöglicht die zelltypspezifische Expression von <i>Myd88</i>	107
5.2	<i>Myd88</i> -Ausprägung in intestinalen Epithelzellen und in Makrophagen fördert die intestinale Tumorgenese.....	110

5.3	MyD88-abhängige Signalwege sowohl in Darmepithelzellen, als auch in Makrophagen, sind an der Tumorinitiation beteiligt und fördern diese über unterschiedliche Mechanismen	115
5.4	MyD88 in Tumorzellen und Makrophagen ist nicht erforderlich für das Tumorwachstum, jedoch für die Tumorprogression	120
5.4.1	Einfluss von MyD88 auf das intratumorale Immunmilieu: Zellen und lösliche Faktoren des innaten Immunsystems	124
5.4.2	Einfluss von MyD88 auf das intratumorale Immunmilieu: Zellen des adaptiven Immunsystems	127
5.4.3	Die Rolle von MyD88 bei der epithelial-mesenchymalen Transition und der Ausprägung von Stammzellfaktoren	130
5.5	Zusammenfassung – Hypothese zur zelltypspezifischen Rolle von MyD88 während der intestinalen Tumorgenese	136
5.6	Ausblick.....	138
6	Zusammenfassung	142
7	Summary	144
8	Literaturverzeichnis	145
9	Anhang	162
9.1	Ergänzende Abbildung.....	162
9.2	Abbildungsverzeichnis	163
9.3	Tabellenverzeichnis	164
	Publikationen	166
	Danksagung.....	168

1 Einleitung

Bereits seit 1990 existiert ein Modell, das die Entstehung und das Voranschreiten von kolorektalen Karzinomen auf genetische Veränderungen innerhalb der intestinalen Epithelzellen und den daraus entstehenden Tumorzellen zurückführt (Fearon and Vogelstein, 1990). Jedoch bestehen solide Tumore nicht nur aus transformierten Zellen, sondern einer Vielzahl weiterer Zelltypen, die sogar die Mehrheit der Tumormasse ausmachen können. Unter anderem sind dies Zellen des Immunsystems oder des Bindegewebes (Dvorak, 1986). All diese unterschiedlichen Zelltypen bilden eine Mikroumgebung aus, die zur Biologie des Tumors beiträgt und dessen Aggressivität oder das Ansprechen auf Therapien beeinflusst (Hanahan and Weinberg, 2011). Obwohl die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate bei Darmkrebspatienten im Jahr 2010 bei über 60% lag, was für gastrointestinale Krebserkrankungen als vergleichsweise günstig betrachtet werden kann, stellen Krebserkrankungen des Darms immer noch die zweit- (Männer) bzw. dritthäufigste (Frauen) Krebs-bedingte Todesursache in Deutschland dar (Koch-Institut and Deutschland, 2013). Aus diesem Grund bedarf es nach wie vor verbesserter und zielgerichteter Therapiemöglichkeiten, wofür ein besseres Verständnis der Biologie kolorektaler Karzinome dringend erforderlich ist.

1.1 Die Biologie des kolorektalen Karzinoms

Die Tumorentstehung im Darm vollzieht sich nach den gängigen Modellen über mehrere Zwischenstufen. Gesunde Darmepithelzellen erfahren genetische Veränderungen und bilden zunächst gutartige Adenome. Diese werden aufgrund der zunehmenden Anzahl an Mutationen transformiert, aus den Adenomen entstehen maligne Adenokarzinome, die Metastasen ausbilden können. Dem klassischen Modell von Fearon und Vogelstein zufolge vollzieht sich die Entstehung und Progression von kolorektalen Karzinomen aufgrund von mehreren genetischen Veränderung innerhalb der Epithelzellen, die schrittweise geschehen und sich in den Tumorzellen anhäufen (Fearon and Vogelstein, 1990). Mutationen, die die Tumorentstehung auslösen und die Progression vorantreiben („Driver-Mutationen“) betreffen in der Regel Tumorsuppressorgene und Protoonkogene. Tumorsuppressorgene sind Gene, die durch Mutationen oder Verlust beider Wildtyp-Allele einen Aktivitätsverlust erfahren (*loss of heterozygosity*, LOH). Oft sind Tumorsuppressorgene an der Regulation des Zellzyklus beteiligt oder induzieren Apoptose in Zellen, die beispielsweise irreparable DNA-

Schäden aufweisen. Sind diese Vorgänge aufgrund des Aktivitätsverlusts eines Tumorsuppressorgens dereguliert, kann unkontrollierte Zellproliferation hervorgerufen werden. Ein Beispiel für ein Tumorsuppressorgen, welches an der Entstehung kolorektaler Karzinome beteiligt ist, ist *adenomatous polyposis coli (APC)* (Grodén *et al.*, 1991). Das im Gen codierte APC-Protein ist Bestandteil im kanonischen WNT-Signalweg, welcher das Signalprotein β -Catenin negativ reguliert (Su *et al.*, 1993). β -Catenin ist neben der Bindung an Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin auch befähigt, Bestandteil eines Transkriptionsfaktor-Komplexes zu sein (Molenaar *et al.*, 1996). Dieser Komplex induziert die Transkription verschiedener Gene, die während der Zellproliferation und der Embryogenese wichtig sind. Im nicht stimulierten Zustand ist β -Catenin im Zytoplasma an einen Proteinkomplex gebunden bestehend aus den Proteinen GSK-3 β , Axin-1/Conductin und APC. Diese Bindung ruft Phosphorylierung von β -Catenin und folglich dessen proteolytischen Abbau hervor (Willert and Nusse, 1998). Kommt es auf der Zelloberfläche zur Bindung des Liganden WNT an den Rezeptorkomplex bestehend aus Frizzled und LRP, wird das Protein Dishevelled (DSH) aktiviert (Flanagan *et al.*, 2015). DSH inhibiert daraufhin den GSK-3 β – Axin-1 – APC-Komplex, wodurch dieser nicht mehr an β -Catenin bindet. β -Catenin wiederum wird nicht mehr abgebaut, sondern akkumuliert im Zytosol, transloziert in den Zellkern und induziert Gentranskription von WNT-Zielgenen. Mutationen in und Funktionsverlust von APC ruft Instabilität im Proteinkomplex hervor, sodass β -Catenin unabhängig vom Liganden WNT und dessen Bindung an den Rezeptor stabilisiert wird. Mutationen in APC sind in 80% aller sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinome nachgewiesen worden (Grodén *et al.*, 1991; Nishisho *et al.*, 1991; Powell *et al.*, 1992). Keimbahnmutationen in einem der beiden APC-Allele und Verlust des Wildtyp-Allels (*loss of heterozygosity*, LOH) führen zur Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP). FAP-Patienten leiden an der massenhaften Ausbildung von Polypen im Kolon, die unbehandelt mit einer Wahrscheinlichkeit von annähernd 100% zu bösartigen Tumoren entarten (Kinzler and Vogelstein, 1996). Im mittlerweile klassischen Modell von Fearon und Vogelstein ist Funktionsverlust von APC der erste Schritt in der Entstehung kolorektaler Karzinome (Abb. 1). Die transformierte Epithelzelle vollzieht zahlreiche Teilungen, was zur Ausbildung aberranter Darmkrypten (*aberrant crypt foci*, ACF) führt. Im Zuge der schnellen Zellteilungen geschehen weitere Mutationen, die sich in den Zellen anhäufen. Dabei sind neben Tumorsuppressorgenen auch Protoonkogene, z. Bsp. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)*, betroffen. Das Gen codiert die GTPase KRAS, die unter anderem

für die Weiterleitung von Wachstumssignalen ins Zytosol verantwortlich ist. Die Ras-abhängige Signalweiterleitung und folglich die Induktion der Zellproliferation werden in gesunden Zellen durch Bindung von Liganden an Wachstumsfaktor-Rezeptoren hervorgerufen. Mutationen in *KRAS* können zur Expression einer aktiven, GTP-gebundenen Form des Proteins führen, das ohne Ligand-Rezeptor-Bindung Wachstumssignale hervorrufen kann. Solche Mutationen in *KRAS* sind in 20-30% aller menschlichen Tumore zu finden (Bos *et al.*, 1987; Vogelstein *et al.*, 1988). Nach Fearon und Vogelstein sind Mutationen in *KRAS* lediglich an der Ausbildung von Adenomen, nicht jedoch an den ersten Transformationsschritten beteiligt. Dagegen stehen Beobachtungen, wonach *KRAS*-Mutationen auch zu Beginn der malignen Entartung stehen können (Janssen *et al.*, 2006; Janssen *et al.*, 2002). Weitere genetische, chromosomale und epigenetische Alterationen akkumulieren in den transformierten Zellen und treiben die schrittweise Entartung des Gewebes weiter voran.

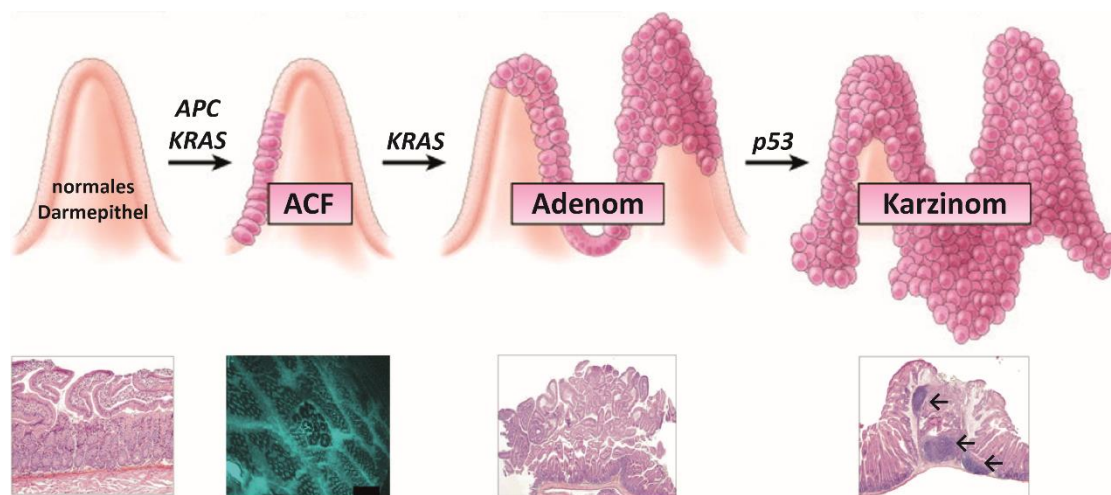


Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein. Karzinome des Darms entstehen nach diesem Modell aus dem gesunden normalen Darmepithel (links) über mehrere Zwischenstufen, den sogenannten aberranten Krypten (aberrant crypt foci, ACF), daraus resultierenden gutartigen Adenomen, und letztlich invasiven Karzinomen. Innerhalb der transformierten Zellen akkumulieren Mutationen, die in der Regel Tumorsuppressorgene (APC, p53) oder Protoonkogene (KRAS) betreffen. Die schematische Darstellung bezieht sich auf die Entstehung von Adenokarzinomen im Dünndarm, die histologischen bzw. mikroskopischen Aufnahmen zeigen die entsprechenden Stadien aus Mäusen (Aufnahmen von PD Dr. K.-P. Janssen). Abbildung entnommen aus (Terzic *et al.*, 2010), modifiziert nach (Kistner, 2014).

In der histologischen Aufnahme des Karzinoms in Abb. 1 (rechts) sind in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung ausgeprägte Immuninfiltrate zu erkennen (Pfeile), ein Beispiel für den großen Anteil, den Immunzellen an soliden Tumoren umfassen können. Seit langem ist bekannt, dass Tumore nicht ausschließlich aus Tumorzellen bestehen, sondern eine Vielzahl weiterer Zellarten enthalten: Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems, Fibroblasten,

Myofibroblasten oder auch Endothelzellen und Perizyten der Blutgefäße. Erst das Zusammenspiel der entarteten Zellen mit dem umgebenden Stroma, das aus zellulären und azellulären Bestandteilen der extrazellulären Matrix aufgebaut ist, verschaffen dem Tumor Merkmale, die die Etablierung und Progression überhaupt erst ermöglichen (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Diese Eigenschaften umfassen zum einen die Fähigkeit, die Zellproliferation selbstständig und unabhängig zu steuern. Gleichzeitig können Tumorzellen wachstumshemmende Signale ausschalten und Apoptose vermeiden. Sie müssen die Ausbildung von Blutgefäßen auslösen können. Tumorzellen besitzen zudem die Fähigkeit, aus dem Gewebeverband austreten und in anderes Gewebe eindringen zu können. Außerdem müssen sie „unsterblich“ werden, das heißt den Eintritt in die Seneszenz oder die Telomerkrise zu vermeiden, um eine unbegrenzte Anzahl an Zellteilungen durchführen zu können, was Zellen ohne Stammzeleigenschaften aufgrund von fortlaufenden Telomerverkürzungen eigentlich nicht möglich ist. Tumorzellen müssen in der Lage sein, den Metabolismus umstellen zu können, sodass möglichst viel Energie in möglichst kürzester Zeit bereitgestellt werden kann, um schnelles Wachstum zu ermöglichen. Zudem müssen sie Möglichkeiten entwickeln, die Zerstörung durch das Immunsystem zu vermeiden. Dass Tumore überhaupt in der Lage sind, diese Eigenschaften in kürzester Zeit zu entwickeln, wird durch zwei Charakteristika unterstützt, die in Tumoren zu finden sind: 1) genomische Instabilität innerhalb der Krebszellen führt zur Anreicherung von Mutationen, die Vorteile für die betroffenen Zellen zur Folge haben können, und 2) können chronische Entzündungsreaktionen im Tumor, ausgelöst durch Immunzellen, beispielsweise Proliferations- und anti-apoptotische Signale induzieren.

1.2 Die Rolle des Immunsystems in der Tumorgenese

Der Einfluss des Krebspatienten-eigenen Immunsystems in der Karzinogenese, sowie bei der Metastasierung, wird seit weit über hundert Jahren kontrovers diskutiert (Hart and Fidler, 1980; Paget, 1889). Prinzipiell ist das Immunsystem in ständiger Aktivität, wodurch nicht nur körperfremde Organismen schnellstmöglich erkannt und eliminiert werden, sondern auch körpereigene Zellen, die Schäden, infektiöse Agentien oder Entartungen aufweisen (Murphy *et al.*, 2011). Daher wäre die Annahme naheliegend, das adaptive Immunsystem würde Krebszellen als „fremd“ erkennen und bekämpfen. Diese Hypothese wurde von Paul Ehrlich bereits zu Beginn des 19. Jahrhunderts aufgestellt (Ehrlich, 1909), konnte jedoch erst in den

darauffolgenden Jahren experimentell belegt werden. An immunsupprimierten Transplantatempfängern wurde wiederholt beobachtet, dass die Inzidenz für bestimmte Tumorarten hochsignifikant gegenüber der Normalbevölkerung gesteigert war (Chapman *et al.*, 2013; Rubartelli and Lotze, 2007). So konnte auch mit Tierstudien gezeigt werden, dass Tumore in immundefizienten Mäusen schneller und aggressiver wachsen verglichen zu immunkompetenten Tieren. Transplantationsexperimente legten offen, dass Tumore, die aus immunsupprimierten Tieren stammten, in immunkompetenten Tieren nicht zur Ausbildung sekundärer Tumore fähig waren. Dagegen konnten Tumore, die sich in immunkompetenten Mäusen ausgebildet hatten, sowohl in immunkomprimierten als auch in immunkompetenten Tieren sekundäre Läsionen bilden [zusammengefasst in (Kim *et al.*, 2007; Teng *et al.*, 2008)]. Auch auf klinischer Seite konnte der tumorhemmende Einfluss des Immunsystems auf die Tumorprogression gezeigt werden: in Patientenproben von Kolon- und Ovarialkarzinomen konnten Unterschiede in der Anzahl zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) und Natürlicher Killerzellen (NK) nachgewiesen werden, wobei sich eine erhöhte Anzahl dieser Immunzell-Typen positiv auf die Prognose auswirkt (Galon *et al.*, 2006; Nelson, 2008; Pages *et al.*, 2010). Da sich Tumore trotz des ständig alarmbereiten und funktionierenden Immunsystems auch in gesunden Individuen etablieren können, wurde die Theorie aufgestellt, dass Tumorzellen Möglichkeiten entwickeln, die Detektion durch das Immunsystem auf ein Minimum zu reduzieren und der Eliminierung zu umgehen. Die Theorie des *Immunoediting* beschreibt, dass zunächst eine Vielzahl von entarteten Zellen ungerichtet entsteht, vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden (*Elimination*). Diese rasch eliminierten Tumorzellen tragen z. Bsp. eine erhöhte Anzahl von Haupt-Histokompatibilitätskomplexen Klasse I (MHC-I) auf der Oberfläche, die mit als „körperfremden“ erkannten mutierten Peptiden beladen sind. Andere, weniger immunogene Tumorzellen, die nur sehr wenige MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche tragen, werden allerdings nicht vom Immunsystem erkannt. Dieser Darwinsche Selektionsprozess führt zur Selektion von nur wenig immunogenen Tumorzellklonen. Diese häufen aufgrund der inhärenten genomischen Instabilität weitere Mutationen an, die zumindest einige der Zellen zusätzlich resistenter gegenüber dem Immunsystem machen und sich in der entstehenden Nische etablieren (*Equilibrium*). Diese Zellen können letztendlich unkontrolliert proliferieren und einen makroskopisch detektierbaren Tumor etablieren (*Escape*) (Dunn *et al.*, 2002) (Abb. 2). Im weiteren Verlauf können diese Tumore zusätzliche Eigenschaften erlangen, dem Immunsystem sogar aktiv entgegenzuwirken, indem z. Bsp. anti-

inflammatorische Signale wie die Zytokine IL-10 oder TGF- β ausgeschüttet werden und dadurch die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen (CTLs) minimiert wird (Mougiakakos *et al.*, 2010).

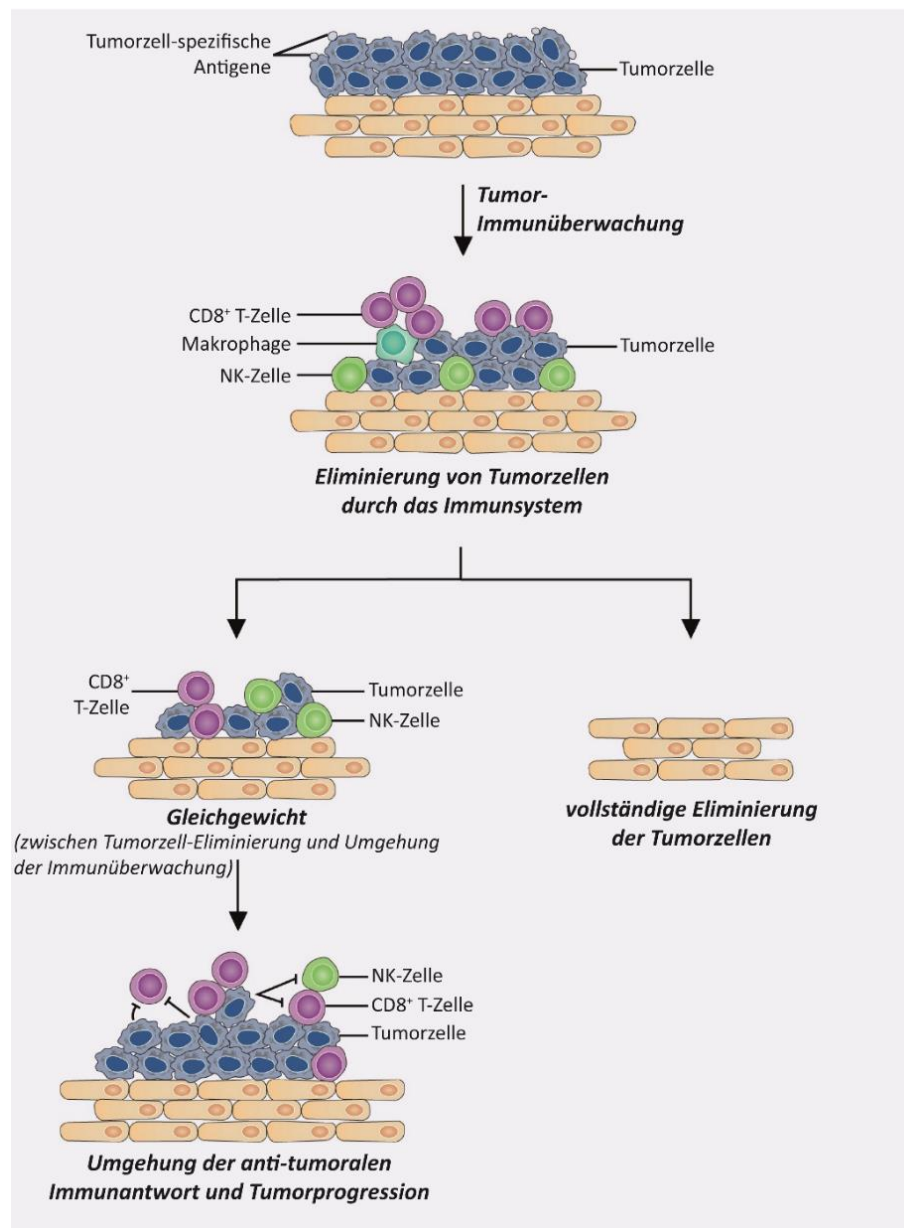


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung zur Theorie der Überwachung von Tumoren durch das Immunsystem. Tumorzellen werden aufgrund von tumorzell-spezifischen Antigenen auf ihrer Oberfläche von Zellen des Immunsystems erkannt und eliminiert. Dabei kann es zum einen zur vollständigen Eliminierung aller Tumorzellen kommen. Sind jedoch auch weniger immunogene Tumorzellen vorhanden, können diese die Erkennung durch adaptive Immunzellen umgehen, was zunächst zu einem Gleichgewicht zwischen Tumorwachstum und Eliminierung der Tumorzellen führt. Letztendlich werden alle Tumorzellen mit stark immunogenen Antigenen eliminiert, die wenig immunogenen Tumorzellen werden selektiert, können ungehindert proliferieren ohne vom Immunsystem zerstört zu werden. Abbildung entnommen von und überarbeitet nach: <http://www.biooncology.com/molecular-causes-of-cancer/immune-destruction>.

Parallel zur Theorie der *Immunosurveillance* wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Immunsystem die Tumorentstehung und Progression nicht nur verhindert, sondern sogar

aktiv fördern kann. Erste Beobachtungen zeigten, dass die Zusammensetzung von Tumorgewebe dem von heilenden Wunden ähnelt, welches von hohen Zahlen an Immunzellen, reaktivem Stroma und neu ausgebildeten Blutgefäßen charakterisiert ist. Daraus folgte Harold Dvorak die Idee des Tumors als „Wunde, die niemals heilt“ (Dvorak, 1986). Wundheilungsprozesse epithelialer Gewebe sind charakterisiert durch Entzündungen, Ausbildung neuen Gewebes und Gewebeumbau (Schafer and Werner, 2008). Einwandernde Immunzellen sind nicht nur wichtig für die Abwehr von durch die verletzte Epithelbarriere eindringenden Pathogenen, sondern sie produzieren wachstums- und proliferationsfördernde Signale und gleichzeitig anti-apoptotische Faktoren, wodurch die Bildung neuen Epithelgewebes ausgelöst wird. Die anschließende Ausschüttung des *vascular endothelial growth factors* (VEGF) fördert die Neovaskularisation, die Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) führt zur Umgestaltung der extrazellulären Matrix und Zellen beginnen zu differenzieren. All diese Vorgänge sind in ähnlicher Form in Tumoren zu finden und als *Hallmarks of Cancer* beschrieben (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011).

Die Wechselwirkungen zwischen Tumor und Immunsystem sind äußerst komplex: pro-inflammatorisches Milieu wirkt sich tumorfördernd aus, gleichzeitig müssen Tumorzellen die Zerstörung durch das Immunsystem vermeiden und dieses – zumindest teilweise – ausschalten. Entscheidend für den Verlauf der Erkrankung ist also, in welcher Form bzw. welche Komponenten des Immunsystems aktiviert werden. Man kann konzeptionell unterscheiden zwischen der Entzündungs-assoziierten Krebsentstehung (*inflammation-induced cancer*) (Elinav *et al.*, 2013), die etwa für hepatozelluläre Karzinome gut belegt ist (Pikarsky *et al.*, 2004), und einer Tumor-assoziierten Entzündungsreaktion (*cancer-related inflammation*), die sich in soliden Tumoren aufgrund von Nekrosen und anderen Ursachen ausbilden kann (Colotta *et al.*, 2009). An der Entstehung von Entzündungsreaktionen sind vor allem Komponenten des angeborenen (innaten) Immunsystems beteiligt, dazu zählen Toll-like Rezeptoren, die eine entscheidende Rolle bei der Initiierung der Immunantwort einnehmen.

1.3 Toll-like Rezeptoren und ihre Signalwege

Die erste Aktivierung des Immunsystems erfolgt in der Regel sehr rasch über das angeborene Immunsystem. Das innate Immunsystem stellt ein relativ unspezifisches, aber schnelles Verfahren zur Erkennung und Bekämpfung von körperfremden Signalen bzw. von „Gefahrensignalen“ dar. Ein zentraler Teil des innaten Immunsystems sind sogenannte

Muster-Erkennungs-Rezeptoren (*pattern-recognition-receptors*, PRRs). PRRs binden molekulare Muster, also Moleküle, die mit mikrobiellen oder viralen Pathogenen oder „Gefahrensignalen“ aus nekrotischen Zellen assoziiert sind (Kumar *et al.*, 2011; Rubartelli and Lotze, 2007). PRRs sind auf Zelloberflächen oder auch intrazellulär in Vesikeln oder im Zytosol lokalisiert und binden verschiedenste Moleküle, wie z. Bsp. Proteine oder Nukleinsäuren. Eine große Untergruppe der PRRs stellen die Toll-like Rezeptoren (TLRs) dar (Akira *et al.*, 2006). Bei TLRs handelt es sich um eine hochkonservierte Gruppe von Membran-ständigen Rezeptoren, die in allen Tiergruppen vorhanden sind. Beim Menschen sind bisher zehn TLRs bekannt und exprimiert (TLR1 – TLR10). In der Maus sind zwölf TLRs exprimiert (TLR1 – TLR9, TLR11, TLR12 und TLR13) (Moresco *et al.*, 2013). Das Gen für TLR10 ist in der Maus zwar vorhanden, aufgrund einer Retrovirus-Insertion aber inaktiviert (Kawai and Akira, 2010). Alle TLRs besitzen einen nahezu identischen Aufbau: sie enthalten eine extrazelluläre Domäne mit Leucinreichen Sequenzen, die für die Bindung der Liganden von Bedeutung sind, eine Transmembrandomäne sowie eine intrazellulär lokalisierte Toll-Interleukin-1-Rezeptor-(TIR) Domäne, die für die Weiterleitung des Signals nötig ist (Akira and Takeda, 2004). Alle TLRs binden verschiedene Liganden, die als *pathogen-associated* bzw. *danger-associated molecular patterns* (PAMPs bzw. DAMPs) bezeichnet werden. PAMPs sind Moleküle wie Proteine, Lipide oder auch Nukleinsäuren, die ausschließlich in Bakterien, Viren oder Pilzen vorkommen. DAMPs hingegen sind körpereigene Strukturen, die allerdings nur für TLRs zugänglich werden, wenn Körperzellen bei Verletzungen durch Nekrose zerstört werden. Man kann grundsätzlich zwei Gruppen von TLRs anhand ihrer Lokalisation unterscheiden: eine Gruppe besteht aus TLR1, -2, -4, -5, -6 und -11 und ist in der Plasmamembran auf der Zelloberfläche lokalisiert. All diese TLRs binden hauptsächlich an Moleküle, die Bestandteile von Plasmamembranen oder Zellwänden von Bakterien oder Pilzen sind (Kawai and Akira, 2010). Die zweite Gruppe der TLRs umfasst TLR3, -7, -8, -9 und -13. Diese sind in intrazellulären Vesikeln lokalisiert und binden bestimmte Strukturen von Nukleinsäuren (L. A. O'Neill *et al.*, 2013). Abbildung 3 zeigt eine Übersicht zur zellulären Lokalisation der TLRs und ihre Liganden in Säugetieren.

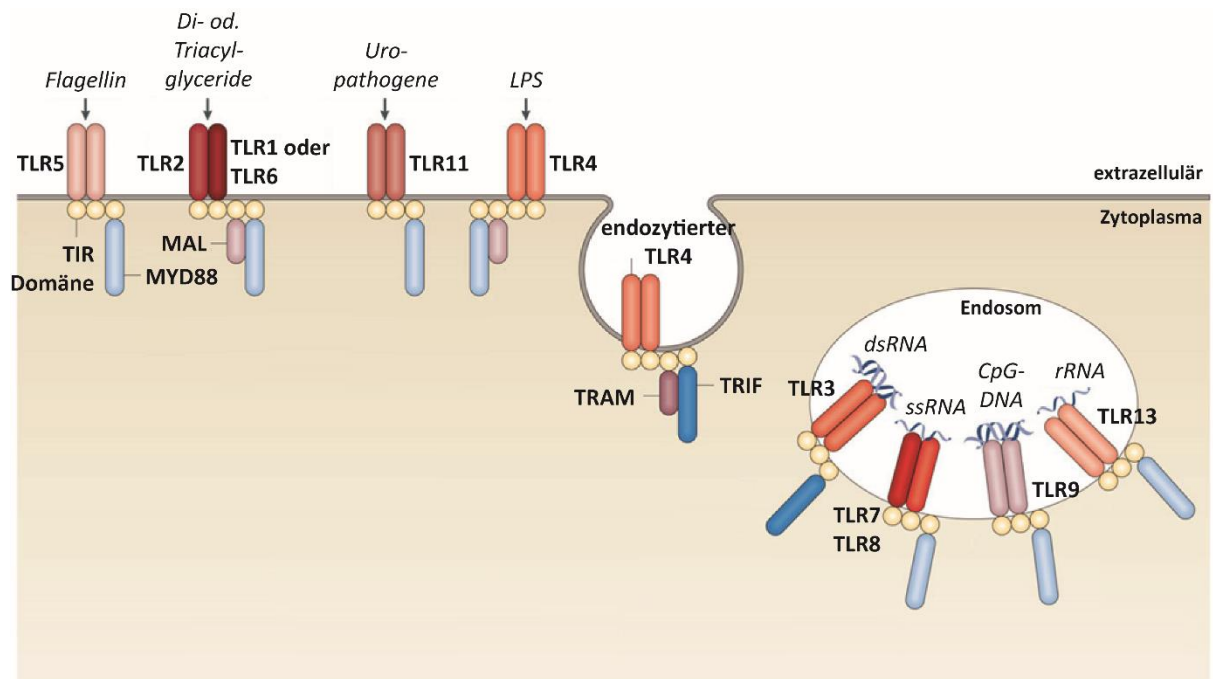


Abb. 3: Übersicht über die zelluläre Lokalisation der TLRs und ihrer Liganden in Säugetieren. Die TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 11 sind in der Plasmamembran auf der Zelloberfläche lokalisiert. TLR4, -5 und -11 bilden Homodimere, TLR2 formt Heterodimere mit TLR1 bzw. TLR6 aus. TLR4 wird nach Bindung des Liganden LPS endozytiert. Diese TLRs binden hauptsächlich an Bestandteile, die in Membranen oder Zellwänden von Pathogenen zu finden sind. Die TLRs 3, 7, 8, 9 und 13 sind intrazellulär lokalisiert, und binden an Nukleinsäuren. Alle TLRs außer TLR3 binden mit der TIR-Domäne an das Adapterprotein MyD88. TLR2 und TLR4 rekrutieren ein zusätzliches Adapterprotein (MAL/TIRAP). TLR3 und TLR4 rekrutieren nach Ligandbindung den Adapter TRIF, wobei TLR4 über TRAM an TRIF bindet. Abk.: TLR – Toll-like Rezeptor; TIR-Domäne – Toll-Interleukin-1-Rezeptor-Domäne; MyD88 – myeloid differentiation primary response gene 88; MAL – MyD88-adaptor-like Protein; TRIF – TIR-domain-containing adaptor protein inducing Interferon (IFN)- β ; TRAM – TRIF-related adaptor molecule; dsRNA – doppelsträngige RNA; ssRNA – einzelsträngige RNA; rRNA – ribosomale RNA. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach (L. A. O'Neill et al., 2013).

Neben der zellulären Lokalisierung lassen sich die TLRs außerdem anhand ihrer intrazellulären Adapterproteine in zwei Gruppen unterteilen. Nach Bindung des jeweiligen Liganden werden abhängig vom Rezeptor unterschiedliche intrazelluläre Signalwege induziert. Entscheidend ist dabei, welches Adapterprotein rekrutiert wird, da die TLRs nicht über eigene enzymatische Aktivität verfügen. Die Signalwege werden induziert durch die TIR-Domäne-enthaltenden Proteine *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) oder *TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- β* (TRIF). MyD88 wird von allen TLRs mit Ausnahme des TLR3 rekrutiert, TRIF bindet nur an TLR3 (Kawai and Akira, 2010). TLR4 ist der einzige TLR, der sowohl über MyD88 als auch über TRIF Signale weiterleitet (Akira and Takeda, 2004; Hoebe et al., 2003; Yamamoto et al., 2003). Zusätzlich zu MyD88 und TRIF werden *MyD88-adaptor-like protein* (MAL, auch als TIRAP bezeichnet) bzw. *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) als Adaptermoleküle rekrutiert (Fitzgerald et al., 2001; Oshiumi et al., 2003). Allerdings ist das Vorhandensein von MAL nur bei TLR2 und TLR4 für die Bindung von MyD88 nötig, und TRAM

führt zur Bindung von TRIF an TLR4 (Akira *et al.*, 2006). Bei den anderen TLRs sind diese Adapter nicht nötig um die Bindung von MyD88 bzw. TRIF zu induzieren. Abhängig davon, ob MyD88 oder TRIF rekrutiert wird, werden unterschiedliche Signalwege induziert. Eine vereinfachte schematische Darstellung der intrazellulären Signalkaskaden, in Abhängigkeit vom Adapterprotein ist in Abbildung 4 dargestellt. MyD88 führt nach der Bindung an den Rezeptor zur Rekrutierung eines Komplexes bestehend aus den Interleukin-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen IRAK1, IRAK2, IRAK4 und IRAK-M (Kawai and Akira, 2010). Aktivierung dieser Kinasen induziert die Interaktion mit dem Tumor-Nekrose-Faktor-assoziiierter Faktor 6 (TRAF6). TRAF6 katalysiert die Ubiquitylierung von IRAK1 und TRAF6, und diese Polyubiquitin-Ketten wiederum führen zu Dissoziation von IRAK1 und TRAF6 vom IRAK-Komplex und induzieren anschließend die Interaktion mit *transforming-growth-factor- β -activated kinase* (TAK1), TAK1-Bindeprotein 1 und 2 (TAB1 und TAB2). IRAK1 wird daraufhin abgebaut, der verbleibende Komplex aus TRAF6, TAK1, TAB1 und TAB2 transloziert ins Zytosol (Akira and Takeda, 2004). Dort wird TRAF6 ubiquityliert, was wiederum TAK1 aktiviert. TAK1 interagiert anschließend mit dem *inhibitor of nuclear factor κ B* (I κ B)-Kinase Komplex (IKK-Komplex). Der IKK-Komplex besteht aus den drei Untereinheiten IKK- α (auch als IKK1 bezeichnet), IKK- β (IKK2) und IKK- γ (*nuclear factor κ B essential modulator*, NEMO). TAK1 phosphoryliert die Untereinheit IKK- β , wodurch wiederum die Phosphorylierung des *inhibitor of NF- κ B complex* (I κ B) ermöglicht wird. Diese Phosphorylierung hat den Abbau des Inhibitors zur Folge (Moresco *et al.*, 2013). Daraufhin wird NF- κ B (p50/p65) frei, kann in den Zellkern translozieren und an die DNA binden. TAK1 phosphoryliert neben IKK- β gleichzeitig *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) (Akira and Takeda, 2004). Phosphorylierung von MAPKs und deren Aktivierung führt wiederum zur Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren wie *cAMP response element-binding protein* (CREB) und AP-1 (Moresco *et al.*, 2013). Letztendlich führt der MyD88-abhängige Signalweg zur Induktion pro-inflammatorischer (über NF- κ B) und proliferationsfördernder (über MAPKs) Gene. Der TRIF-abhängige Signalweg ruft neben der Aktivierung von NF- κ B zusätzlich den Transkriptionsfaktor IRF3 und folglich die Induktion von Typ-I-Interferonen hervor (Moresco *et al.*, 2013). Eine gesonderte Stellung nimmt TLR4 ein, der zwar zunächst auf der Zelloberfläche lokalisiert ist und den MyD88-abhängigen Weg induziert, jedoch anschließend internalisiert wird und in Endosomen TRIF rekrutiert und somit Typ-I-Interferone induziert und erneut, in einer verzögerten Antwort, NF- κ B induziert (Akira and Takeda, 2004).

Die ersten Ergebnisse aus der *Myd88*-defizienten Maus von S. Akira zeigten zunächst, dass MyD88 in den IL-1- und IL-18-Rezeptor-Signalwegen entscheidend involviert ist (Adachi *et al.*, 1998). Die IL-1- (Typ I) und IL-18-Rezeptoren enthalten, wie MyD88 und die TLRs, eine intrazellulär lokalisierte Toll-Interleukin-1-Rezeptor-(TIR) Domäne (Akira *et al.*, 2006). Dadurch interagiert MyD88 auch mit diesen Rezeptoren, und vermittelt auch IL-1- und IL-18-induzierte Signale. Der intrazelluläre Signalweg führt, analog wie die MyD88-abhängigen TLR-Signalwege, zur Aktivierung von NF- κ B und MAPKs (Dinarello, 2011). Der IL-1-Rezeptor ist in annähernd allen Geweben exprimiert (Dinarello *et al.*, 2012). TLRs hingegen sind auf einer Vielzahl von Zellen des innate und des adaptiven Immunsystems vorhanden, dazu gehören Makrophagen und Dendritische Zellen, sowie B-Zellen und bestimmte T-Zell-Populationen (Akira *et al.*, 2006). Außerdem prägen auch Zellen, die nicht zum Immunsystem gehören, TLRs aus. Dies betrifft vor allem Zellen, die in Kontakt mit der äußeren Umwelt stehen und dadurch häufig und als erstes mit „Eindringlingen“ in Berührung kommen. Dazu gehören die Epithelzellen der Haut und Schleimhäute der Atemwege, des Urogenitaltrakts und des Gastrointestinaltrakts [zusammengefasst in *Table 1* in (McClure and Massari, 2014)].

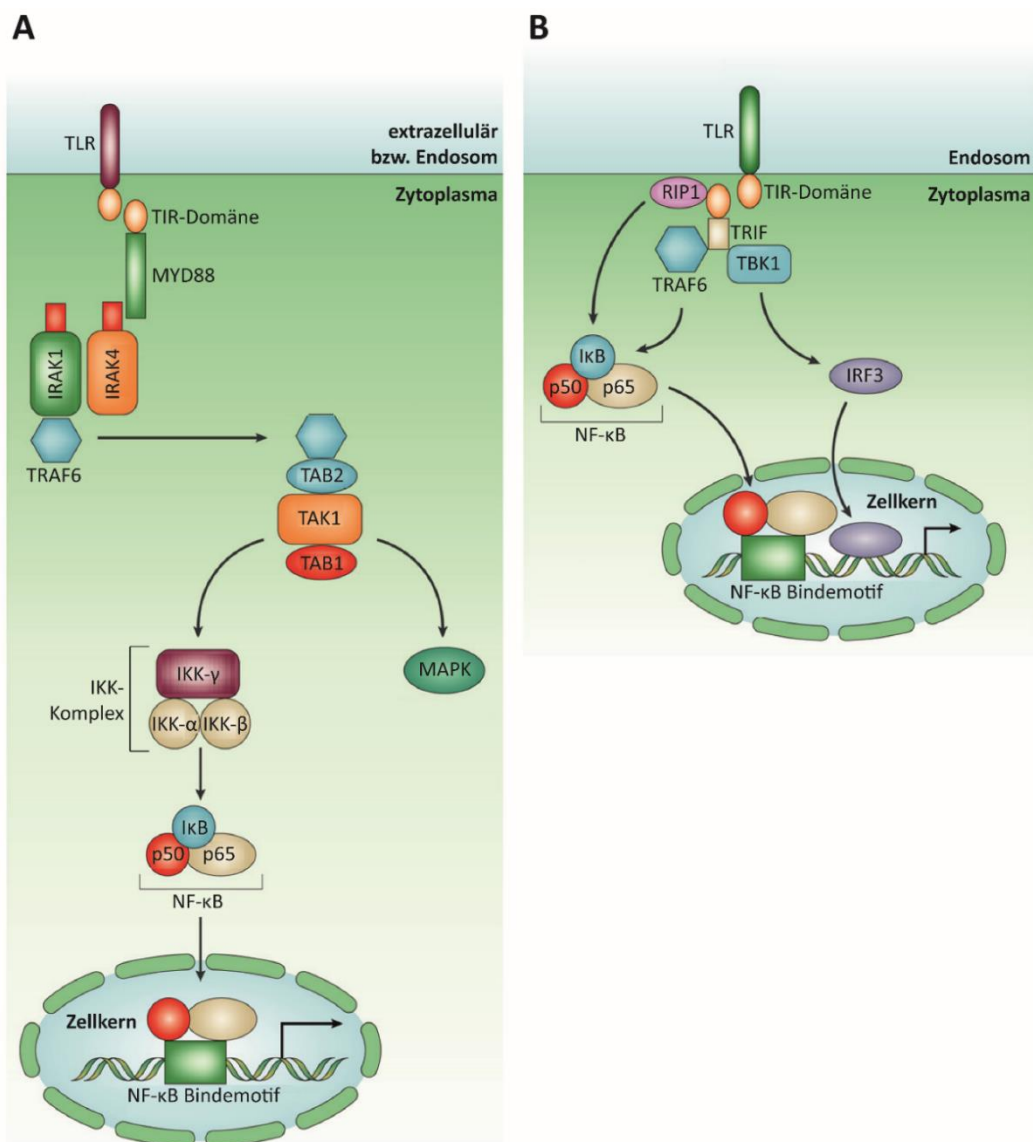


Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung zu den TLR-Signalwegen, die durch die intrazellulären Adapterproteine MyD88 (A) bzw. TRIF (B) induziert werden. (A) Nach Bindung eines Liganden an seinen TLR wird MyD88 über die TIR-Domäne rekrutiert. Dies führt zur Bindung und Aktivierung eines Komplexes bestehend aus den Kinasen IRAK1 und IRAK4, wodurch IRAK1 phosphoryliert wird. Dies erlaubt wiederum die Bindung an TRAF6. Phosphorylierung von TRAF6 führt zur Bildung eines Komplexes von TRAF6 mit TAB2, TAK1 und TAB1. TRAF6 wird ubiquitiniert und TAK1 aktiviert. TAK1 aktiviert nachfolgend MAP-Kinasen und den IKK-Komplex (bestehend aus IKK- α , - β und - γ). Dieser Komplex wiederum phosphoryliert I κ B, woraufhin dieser degradiert wird. NF- κ B (bestehend aus p50 und p65) werden frei, translozieren in den Zellkern und induzieren die Expression von Zielgenen. (B) Das N-terminale Ende des TRIF-Proteins bindet nach TLR-Aktivierung direkt an TRAF6 und TBK1, RIP-1 interagiert mit der C-terminalen Domäne von TRIF. RIP-1 und TRAF6 induzieren die Aktivierung von NF- κ B. TBK-1 phosphoryliert IRF3, welches anschließend in den Zellkern transloziert und Genexpression auslöst. Abk.: TLR – Toll-like Rezeptor; TIR-Domäne – Toll-Interleukin-1-Rezeptor-Domäne; MyD88 – myeloid differentiation primary response gene 88; IRAK – Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase; TRAF6 – Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6; TAK1 – transforming-growth-factor- β -aktivierte Kinase 1; TAB1 bzw. -2 – TAK1-Bindeprotein 1 bzw. 2; IKK-Komplex – inhibitor of nuclear factor κ B-Kinase-Komplex; I κ B – inhibitor of nuclear factor κ B; NF- κ B – nuclear factor κ B; MAPK – mitogen-activated protein kinase; TRIF - TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- β ; RIP-1 – receptor-interacting protein 1; TBK-1 - TRAF-family-member-associated nuclear factor- κ B (NF- κ B) activator (TANK)-bindende Kinase 1; IRF – Interferon-(IFN)-regulatory factor 3. Abbildungen entnommen aus und modifiziert nach (Akira and Takeda, 2004).

1.4 Die intestinale Barriere und das intestinale Immunsystem

Die Epithelzellen der Häute und Schleimhäute stehen in direktem Kontakt mit der Außenwelt, wodurch sie kontinuierlich mit potentiellen Krankheitserregern in Kontakt kommen. Sie sind damit ein wichtiger Teil der ersten Verteidigungslinie der Immunabwehr des Organismus gegen mikrobielle und virale Pathogene. Der Darm ist jedoch mit einer Vielzahl kommensaler Bakterien besiedelt, die wichtige physiologische Funktionen erfüllen. Um den Zustand konstanter Entzündungsreaktionen im Darm zu vermeiden, muss das Darmepithel bzw. das intestinale Immunsystem eine Toleranz entwickeln, um konstante Entzündungsreaktionen zu vermeiden. Zunächst wird das Eindringen von Pathogenen aus dem Lumen ins Gewebe über verschiedene Mechanismen verhindert (vgl. Abb. 5): anfänglich dient die normale „gesunde“ Bakterienflora selbst als Schutz, indem durch sie die Besiedelung des Darms mit Pathogenen erschwert bzw. verhindert wird (Biswas *et al.*, 2011). Des Weiteren ist der Darm mit einer Schleimschicht (Mucus) ausgekleidet. Der Mucus besteht aus glykosylierten Proteinmonomeren, den Mucinen, die untereinander vernetzt werden und dadurch große Proteinaggregate ausbilden (Moran *et al.*, 2011). Dadurch werden kommensale Bakterien und Pathogene im Darmlumen von den Epithelzellen ferngehalten, was Entzündungsreaktionen verhindert (Van der Sluis *et al.*, 2006), zudem wird eine tumorsuppressive Rolle für Mucin diskutiert (Yang *et al.*, 2008). Gleichzeitig werden antimikrobielle Peptide wie Defensine, Cryptdine und Immunglobuline ins Darmlumen abgegeben, die der ungehinderten Vermehrung der Bakterien entgegenwirken (Guani-Guerra *et al.*, 2010). Weiterhin bilden die intestinalen Epithelzellen *tight junctions* untereinander aus, die das Eindringen von Pathogenen ins Gewebe durch den interzellulären Raum zwischen den Epithelzellen physikalisch verhindern (S. H. Lee, 2015). Unter dem Darmepithel in der Lamina propria sind Immunzellen lokalisiert, die bei Eindringen von Bakterien ins Gewebe eine schnelle Immunreaktion auslösen (Min and Rhee, 2015).

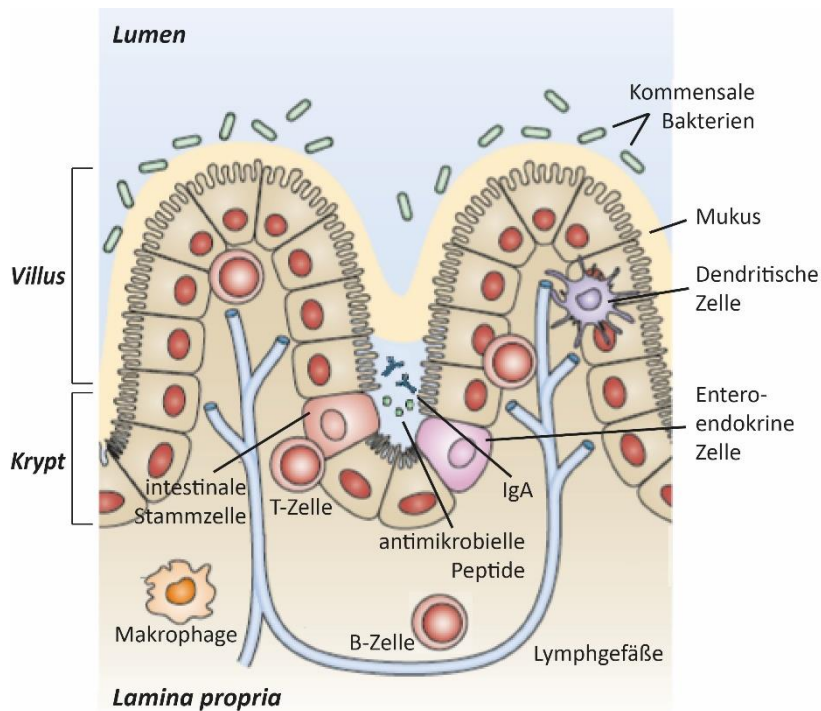


Abb. 5: Komponenten der intestinalen Barriere. Die intestinalen Epithelzellen bilden ein einschichtiges Epithel, welches eine physikalische Barriere zwischen Lumen und dem Gewebe, der Lamina propria, darstellt. Im Darmlumen befinden sich kommensale Bakterien, die durch den Mucus vom Darmepithel separiert sind. Zudem werden antimikrobielle Peptide und Immunglobulin A (IgA) ins Darmlumen abgegeben, die eine übermäßige Besiedlung mit Bakterien verhindern. In der Lamina propria befinden sich Immunzellen (Dendritische Zellen, Makrophagen, T-Zellen), die bei Eindringen von Bakterien diese schnellstmöglich eliminieren können. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach (Abreu, 2010).

1.4.1 Physiologische Expression und Funktion von TLRs/MyD88 im Darmepithel

TLRs sind die ersten Komponenten des Immunsystems, die Pathogene erkennen und daraufhin Entzündungsreaktionen auslösen. Neben den oben genannten Mechanismen zur Vermeidung kontinuierlicher Entzündungsreaktionen durch kommensale Bakterien weisen TLRs im Darmepithel ein besonderes Expressionsmuster auf. Im Dünndarm der Maus konnte die Expression aller bisher bekannten TLRs außer TLR13 auf Transkriptebene nachgewiesen werden. Die Ergebnisse konnten für die TLRs 2, 4, 5 und 9 auch auf Proteinebene bestätigt werden (Abreu, 2010). Im Kolon der Maus wurden RNAs der TLRs 2, 3, 4 und 9 nachgewiesen, und für TLR2, -4 und -9 auch die Anwesenheit der Proteine bestätigt [vergleiche *Table 1* in (Abreu, 2010)]. Im Maudarm konnten nur geringe Mengen an TLR4 nachgewiesen werden, und auch der TLR4 Co-Rezeptor MD2 ist nur schwach exprimiert (Abreu *et al.*, 2001). Die Rezeptoren sind im Darmepithel nicht ubiquitär in bzw. auf den Zelloberflächen exprimiert, sondern zeigen bestimmte zelluläre Lokalisationen. TLR2 und TLR4 z. Bsp. wurden in humanen Föten nur auf der dem Lumen abgewandten, basolateralen Seite von IECs nachgewiesen (Fusunyan *et al.*, 2001). *In vitro* polarisierte humane IECs zeigen TLR5-Expression ebenfalls nur auf der basolateralen Seite (Gewirtz *et al.*, 2001), was auch in humanen Kolonmukosa-Proben bestätigt wurde (Rhee *et al.*, 2005). In murinen Kolongewebe-Proben wurde TLR5 auf

basolateraler Seite vermutet (Rhee *et al.*, 2005), im Ileum hingegen auf der basolateralen und der apikalen Seite detektiert (Bambou *et al.*, 2004). TLR9 wurde sowohl auf apikaler als auch auf basolateraler Seite von polarisierten IECs *in vitro* nachgewiesen, und zeigte davon abhängig unterschiedliche Reaktionen auf Ligandbindung: basolaterale Induktion von TLR9 führt zur Aktivierung von NF- κ B und der MAPKs JNK1/2, wohingegen apikale TLR9-Aktivierung inhibierend auf NF- κ B wirkte (J. Lee *et al.*, 2006). In dieser Studie wurde auch eine Reaktion auf TLR3-Stimulation auf der basolateralen Seite polarisierter IECs detektiert, was die exklusive Lokalisation von TLR3 auf basolateraler Seite nahelegt, im Gegensatz zur intrazellulären Lokalisation von TLR3 in Immunzellen (Kawai and Akira, 2010). TLR4 ist in Zellen aus murinem Dünndarm im Gegensatz zu Immunzellen ausschließlich intrazellulär lokalisiert, und LPS bindet erst nach intrazellulärer Aufnahme an TLR4 (Hornef *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass TLRs vornehmlich auf basolateraler Seite bzw. intrazellulär lokalisiert zu sein scheinen, gewährleistet das Auslösen von Entzündungsreaktionen erst dann, wenn Pathogene ins Gewebe eingedrungen sind und verhindert eine pro-inflammatorische Reaktion gegenüber den kommensalen Bakterien im Lumen. Abbildung 6 fasst den aktuellen Stand an Veröffentlichungen bezüglich der TLR-Lokalisation in IECs schematisch zusammen.

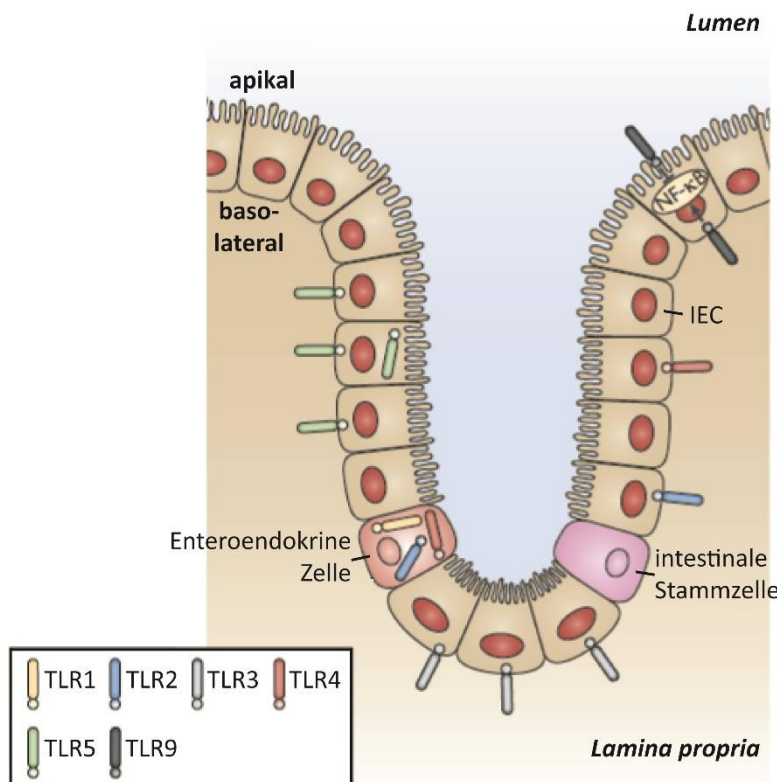


Abb. 6: Polarisierte Expression von TLRs im Darmepithel. Die TLRs 1, 2 und 4 sind im Darmepithel in nur sehr geringen Mengen ausgeprägt. Lokalisiert sind sie intrazellulär bzw. auf der basolateralen Seite von intestinalen Epithelzellen (IECs). TLR3 und TLR5 sind in vergleichsweise hohen Mengen exprimiert, konnten allerdings ebenfalls nur auf der basolateralen Seite von IECs nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass TLR9 sowohl apikal als auch basolateral lokalisiert ist, jedoch abhängig von seiner Lokalisation hemmenden bzw. aktivierenden Einfluss auf nuclear factor κ B (NF- κ B) ausübt. Abbildung entnommen aus und modifiziert nach (Abreu, 2010).

Aktivierung von TLR-Signalwegen in Immunzellen führt wie oben beschrieben zur Induktion pro-inflammatorischer Zytokine und zur Auslösung von Entzündungsreaktionen. Im Darmepithel sind TLR-Signale außerdem an der Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere beteiligt. So wurde gezeigt, dass die Expression verschiedener antimikrobieller Peptide im Darm von TLRs bzw. MyD88 abhängig ist. Faktoren der *regenerating islet-derived protein 3* (Reg3 oder RegIII)-Familie binden an Peptidoglykane in der Zellwand gram-positiver Bakterien. Es wurde gezeigt, dass die Expression von RegIII β und RegIII γ in IECs MyD88-defizienter Mäuse signifikant reduziert ist (Frantz *et al.*, 2012; Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007; Vaishnavaa *et al.*, 2008). Die Zusammensetzung des Mucus ist vermutlich ebenfalls von TLRs/MyD88 abhängig. Die Expression von *Trefoil factor 3* (TFF3), welches von IECs exprimiert und sekretiert wird, wird nach Aktivierung von TLR2 induziert (Podolsky *et al.*, 2009). Die Menge von Mucin-2 (Muc-2) als Hauptbestandteil des Mucus ist nach IEC-spezifischer Deletion von *Myd88* stark reduziert (Frantz *et al.*, 2012). Immunglobulin A (IgA) ist in allen Schleimhäuten vorhanden und dient der Neutralisierung potentieller Krankheitserreger. Im Darm wird IgA von B-Zellen in der Lamina propria produziert und anschließend über den Poly-Immunglobulin-Rezeptor (pIgR) auf der Oberfläche von IECs ins Darmlumen transportiert (Macpherson *et al.*, 2008). Dabei scheinen TLRs/MyD88 sowohl die Anzahl von B-Zellen als auch die Menge an pIgR zu beeinflussen: Kolonisierung von keim-frei gehaltenen Mäusen führt zur Zunahme von IgA-produzierenden B-Zellen in der Lamina propria und zur Induktion der pIgR-Expression (Hooper *et al.*, 2001). Beide Eigenschaften werden über TLRs/MyD88 vermittelt: TLR-Aktivierung in murinem Darm führt zu erhöhter Anzahl an IgA-produzierenden B-Zellen in der Lamina propria (Shang *et al.*, 2008), und Deletion von *Myd88* in IECs reduziert die Expression von pIgR (Frantz *et al.*, 2012). Desweiteren wird der Einfluss von TLRs/MyD88 auf die Proliferation von IECs kontrovers diskutiert: zunächst wurde gezeigt, dass die Proliferationsraten von IECs in keimfreien Mäusen um die Hälfte reduziert waren verglichen zu Tieren mit normaler Darmflora (Abrams *et al.*, 1963), was einen proliferations-fördernden Einfluss von TLRs/MyD88-vermittelten Signalen vermuten lässt. Rakoff-Nahoum *et al.* hingegen zeigten, dass die Proliferationsrate von IECs in MyD88-defizienten Tieren mit kommensaler Bakterienflora sogar erhöht ist im Vergleich zu WT-Tieren (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Eine andere Studie beschreibt, dass TLR-defiziente Tiere verringerte Proliferation von Darmepithelzellen aufweisen verglichen mit Wildtyp-Tieren (Fukata *et al.*, 2005). Es wird auch diskutiert, dass die Ausprägung von MyD88 in Immunzellen, im Besonderen in

Makrophagen, einen positiven Einfluss auf die Proliferationsrate von IECs hat, mutmaßlich vermittelt durch parakrine Faktoren (Pull *et al.*, 2005).

1.5 Die Bedeutung von TLRs/MyD88 in chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Darms

Aufgrund der pro-inflammatorischen Wirkung von TLRs/MyD88 bei der Immunantwort sind viele Studien bezüglich ihrer Auswirkung auf entzündliche Erkrankungen des Darms durchgeführt worden. Die häufigsten chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (*inflammatory bowel diseases*, IBD) sind Morbus Crohn und Ulzerative Colitis (Saleh and Trinchieri, 2011). Eine Anfälligkeit für chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen kann zum einen durch hereditäre Veränderungen im Patienten bestimmt werden. Varianten, die mit dem Auftreten von IBD in Zusammenhang gebracht wurden, betreffen Gene, die an der innate oder adaptiven Immunantwort beteiligt sind, oder beim Aufbau der intestinalen Barriere mitwirken (Xavier and Podolsky, 2007). Eine defekte intestinale Barriere ermöglicht das Eindringen von kommensalen Bakterien, welche in der Lamina propria wiederum Entzündungen auslösen. Dass intestinale Bakterien an der Entstehung von IBD beteiligt sind, wird aus klinischen Studien ersichtlich, in denen gezeigt wird, dass IBD-Patienten mit Antibiotikabehandlung deutlich mildere Krankheitsverläufe aufweisen (Gionchetti *et al.*, 2003; Sutherland *et al.*, 1991). Wie oben beschrieben sind TLRs/MyD88 zum einen verantwortlich für das Erkennen von Pathogen-assoziierten Mustern, zum anderen sind sie bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere nötig. Es ist publiziert, dass die Ausprägung von TLRs, sowie die TLR-abhängige Signalweiterleitung in Darmepithelzellen von Patienten mit Morbus Crohn und Ulzerativer Kolitis dereguliert sind (Cario, 2010; Sato *et al.*, 2009). In Mausstudien mit chemisch induzierter DSS-Kolitis wurde gezeigt, dass MyD88-Defizienz die Anfälligkeit für Kolitis erhöht (Frantz *et al.*, 2012), zudem führt eine globale *Myd88*-Defizienz (*Myd88-knockout*) zu verstärkter Mortalität und Morbidität nach chemisch induzierter Entzündung (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Mäuse mit IEC-spezifischer Deletion von NEMO und daraus folgender Inaktivierung von NF- κ B entwickeln spontane Kolitis (Nenci *et al.*, 2007). In einem anderen Modell mit IEC-spezifischer Deletion von IKK- β zeigen Tiere nach Infektion mit dem Nematoden *Trichuris* verstärkte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine bei gleichzeitigem Ausbleiben einer Pathogen-spezifische T_H2-Immunantwort, die Tiere entwickeln intestinale Entzündungen (Zaph *et al.*, 2007). Obwohl die Aktivierung von NF- κ B

über TLRs/MyD88 in der Regel pro-inflammatorisch wirkt und Entzündungsreaktionen auslöst, scheint der Signalweg in IECs also an der Unterdrückung der Apoptose bzw. Beseitigung von Entzündungsreaktionen beteiligt zu sein. Offen bleibt allerdings, über welchen Mechanismus TLRs/MyD88 vor Kolitis schützen: dies könnte zum einen die Rekrutierung von Immunzellen sein, die eindringende Pathogene beseitigen, oder das Aufrechterhalten der intestinalen Barriere und damit das Eindringen ins Gewebe verhindern.

1.6 Die Rolle von TLRs/MyD88 bei der intestinalen Karzinogenese

Eine Rolle für TLRs bei der Darmkrebsentstehung wird gegenwärtig intensiv diskutiert. Grundlegend ist bekannt, dass Polymorphismen in TLR-Genen beim Menschen mit dem Auftreten von soliden Tumoren assoziiert sind (Achyut *et al.*, 2007; Tahara *et al.*, 2007). Außerdem wurde gezeigt, dass TLR4 und das Adapterprotein MyD88 in Kolonkarzinomen überexprimiert sind, und dass diese Überexpression mit einer signifikant schlechteren Prognose für betroffene Patienten einhergehen (Wang *et al.*, 2010). Eine andere Studie mit Daten aus einer chinesischen Kohorte zeigte hingegen, dass *Myd88*-Expression in kolorektalen Karzinomen signifikant verringert ist verglichen zu Normalgeweben (Li *et al.*, 2014). Labor-eigene Untersuchungen an humanen Proben bestätigten diese Daten: Transkripte von MyD88, TLR2 und TLR4 sind in kolorektalen Karzinomgeweben stark reduziert ausgeprägt im Vergleich zur gesunden Kolonmukosa (Gros, 2014). Demzufolge bleibt es umstritten, ob TLRs/MyD88 tumorfördernde oder tumorhemmende Eigenschaften besitzen.

1.6.1 Der Einfluss von TLRs/MyD88 in der Kolitis-assoziierten Karzinogenese

Chronisch-entzündliche Erkrankungen der Darmmukosa erhöhen das Risiko für die Entstehung von Darmkrebs: jeder fünfte IBD-Patient entwickelt Kolitis-assoziierte Karzinome (Lakatos and Lakatos, 2008). Ein Einfluss von TLRs/MyD88 auf die Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wurde mehrfach beschrieben, ob bzw. inwiefern TLRs bei der Entwicklung von Darmkrebs aus chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (*colitis-associated cancer*, CAC) heraus eine Rolle spielen, wird umfangreich in Mausmodellen untersucht. In Mausmodellen wird die Entstehung von CAC chemisch induziert. Häufig wird Versuchstieren dafür das Karzinogen Azoxymethan (AOM) verabreicht und anschließend das inflammatorische Reagenz Natrium-Dextransulfat (*dextran sulfate sodium*, DSS), das zu massiver Schädigung der Epithelbarriere führt, dem Trinkwasser zugegeben. Abhängig vom

Protokoll entwickeln AOM/DSS-behandelte Tiere innerhalb weniger Wochen ACFs und Adenome im Colon (De Robertis *et al.*, 2011). In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass globales Ausschalten von *Myd88* zu einer signifikant reduzierten Anzahl von Läsionen führt (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007). In diesem Modell blieb allerdings die Frage ungeklärt, in welchen Zelltypen MyD88 die AOM/DSS-induzierte Karzinogenese fördert. In einer weiteren Publikation wurde gezeigt, dass die Deletion von IKK- β in Enterozyten und daraus resultierende Inhibierung von NF- κ B im Darmepithel ebenfalls die Anzahl intestinaler Läsionen nach AOM/DSS-Behandlung reduziert (Greten *et al.*, 2004). Demzufolge fördert die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs in Darmepithelzellen die Kolitis-assoziierte Karzinogenese. In dieser Publikation wurde weiterhin gezeigt, dass eine Hemmung des NF- κ B-Signalwegs in Darmepithelien keinen Einfluss auf die Proliferation der IECs nach AOM/DSS-Behandlung hat, jedoch über eine erhöhte Apoptoserate zur verminderten Anzahl an Läsionen führte (Greten *et al.*, 2004). Gleichzeitig zeigte eine gewebspezifische Deletion von IKK- β in myeloiden Zellen eine stark reduzierte Häufigkeit von Läsionen im Kolon nach der AOM/DSS-Behandlung. Als zugrundeliegender Mechanismus wurde eine starke Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine vorgeschlagen, wodurch wiederum die IEC-Proliferation weniger stark gefördert wird, verglichen zur Kontrollgruppe. Ergebnisse einer anderen Publikation lassen ebenfalls vermuten, dass MyD88 die Proliferation und Apoptose von Darmepithelzellen, sowie die Expression von Zytokinen beeinflusst und dieses Zusammenspiel die Entstehung von Kolitis-assoziierten Karzinomen fördert (Salcedo *et al.*, 2010).

1.6.2 Die Rolle von TLRs/MyD88 in genetisch induzierten intestinalen Tumoren

Nicht nur in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Kolitis-assoziierten Tumoren haben TLRs und MyD88 einen großen Einfluss, sondern vermutlich auch in spontan auftretenden, somit durch zellautonome genetisch hervorgerufene Läsionen, die die große Mehrzahl aller klinisch beobachteten Fälle von Darmkrebs darstellen. Nur wenige Studien belegen bislang, dass MyD88 tumorfördernde Auswirkungen in Mausmodellen zur genetischen intestinalen Tumorgenese hat. Diese Studien wurden bisher meist am *Apc*^{Min/+}-Mausmodell durchgeführt, das im Folgenden kurz vorgestellt werden soll. *Apc*^{Min/+}-Mäuse tragen eine heterozygote Keimbahn-Mutation im *Apc* Tumorsuppressor-Gen, welche nach Verlust des Wildtyp-Allels (LOH) zur Ausbildung multipler intestinaler Neoplasien (Min) führt, ähnlich dem Phänotyp von FAP-Patienten (A. R. Moser *et al.*, 1993). Die erste Studie zum

Einfluss von MyD88 in einem genetischen Modell für kolorektale Karzinogenese wurde 2007 veröffentlicht (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007). Hier wurde gezeigt, dass global *Myd88*-defiziente *Apc*^{Min/+}-Tiere eine deutlich verringerte Anzahl an intestinalen Neoplasien ausbilden. Dieser Publikation zufolge hatte die *Myd88*-Defizienz keinen nachweisbaren Einfluss auf die Proliferation innerhalb der Polypen, erhöhte aber die Apoptoserate. Weiterhin wurde eine verringerte Expression pro-inflammatorischer Gene und anderer Transkripte, die in Gewebereparaturprozesse und der intestinalen Homöostase involviert sind, in *Myd88*-knockout Tieren beschrieben (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007). Eine zweite Studie in *Apc*^{Min/+}-Tieren konnte diese Ergebnisse weitgehend bestätigen (S. H. Lee *et al.*, 2010). Diese Publikation beschreibt sowohl einen fördernden Einfluss von MyD88 auf die Zellproliferation von Epithelzellen, als auch einen hemmenden Einfluss auf die Apoptose. Doppeltransgene *Apc*^{Min/+} × *MyD88*^{-/-}-Tiere wurden mit Knochenmark aus Wildtyp-Tieren rekonstruiert, um ein MyD88-profizientes hämatopoetisches System zu regenerieren; daraufhin wurden aber keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl intestinaler Polypen festgestellt. Daraus folgerten die Autoren, dass die Ausprägung von *Myd88* in Knochenmarkszellen keine Rolle in der intestinalen Karzinogenese spielt (S. H. Lee *et al.*, 2010). Stattdessen zeigten sie, dass der TLR/MyD88-Signalweg im Darmgewebe die Phosphorylierung und somit die Aktivität der MAPKs ERK1/2 verstärkt, was zur Stabilisierung des Transkriptionsfaktors c-Myc führt. Somit wurde gefolgert, dass MyD88 spezifisch in IECs die Tumorgenese fördert.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Bezüglich der Bedeutung von TLR/MyD88-abhängigen Signalwegen in der Entstehung von kolorektalen Karzinomen sind, wie zuvor beschrieben, nur wenige bzw. bislang widersprüchliche Befunde veröffentlicht. Es bleibt zunächst zu klären, welchen Einfluss MyD88 in der genetisch induzierten intestinalen Karzinogenese ausübt. Da TLRs und MyD88 sowohl in Darmepithelzellen, als auch in Immunzellen ausgeprägt wird und beide Zelltypen an der Tumorgenese beteiligt sind, sollte außerdem untersucht werden, welche zelltypspezifischen Effekte MyD88 für die Darmkrebsentstehung maßgeblich sind, bzw. über welchen molekularen und zellulären Mechanismus MyD88 zur Tumorentstehung beiträgt. Einen Überblick über die möglichen zelltypspezifischen Funktionen von MyD88 in der intestinalen Karzinogenese zeigt Abb. 7.

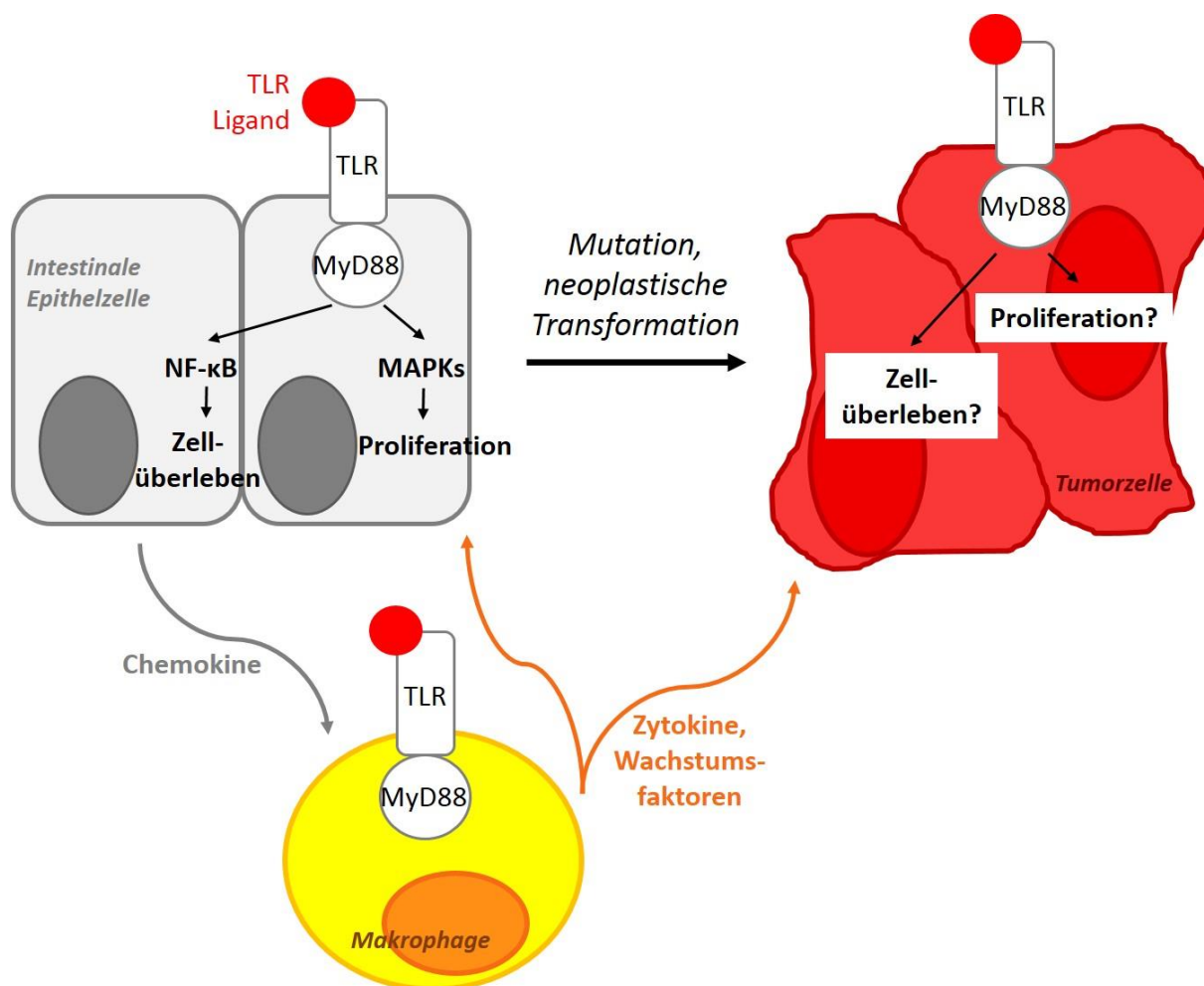


Abb. 7: Arbeitshypothese – vereinfachte schematische Darstellung zur Rolle von TLRs/MyD88 in intestinalen Epithelzellen, Tumorzellen und Makrophagen. In gesunden intestinalen Epithelzellen führt die Bindung eines Liganden an den jeweiligen (MyD88-abhängigen) TLR zur Aktivierung von NF-κB, was das Zellüberleben fördert. Ebenso induziert MyD88 die MAPKs, die wiederum die Zellproliferation fördern. Außerdem werden Chemokine sezerniert, die Immunzellen rekrutieren. TLR-/MyD88-Aktivierung auf Makrophagen führt hauptsächlich zur Expression und Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Wie sich TLR-/MyD88-Aktivierung in Tumorzellen auswirkt, ist bisher noch Gegenstand von Untersuchungen. Als Ausgangshypothese für die vorliegende Arbeit wird postuliert, dass MyD88-abhängige Signalwege entweder Tumorzell-intrinsisch auf die Tumorzellen wirkt durch die Förderung von Zellüberleben und –proliferation, oder über extrinsische Signale von Makrophagen die Tumorentstehung und/oder das Tumorstadium beeinflusst.

Aufgrund bisher veröffentlichter Daten bezüglich der zelltypspezifischen Funktion von MyD88 wird in der vorliegenden Arbeit die Arbeitshypothese aufgestellt, dass MyD88 in Darmepithelzellen bzw. in Makrophagen jeweils unterschiedliche zelltypspezifische Funktionen erfüllt. Verschiedene Publikationen belegen, dass die physiologische Aktivierung von NF-κB in unveränderten IECs deren Proliferation fördert, bzw. die Apoptose hemmt. Zusätzlich werden auto- und parakrine Signalmoleküle synthetisiert, die wichtig für die Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase sind (vgl. Abschnitt 1.4.1). An humanen

intestinalen Zelllinien konnte unter anderen in Labor-eigenen Vorarbeiten gezeigt werden, dass eine Induktion MyD88-abhängiger Signalwege die Expression des Zytokins IL-8 hervorruft (Gros, 2014). IL-8 und andere Chemokine rekrutieren Immunzellen, welche eindringende Pathogene beseitigen bzw. Wundheilungsprozesse bei Gewebsverletzungen auslösen. Die Aktivierung MyD88-abhängiger Signalwege in Immunzellen/Makrophagen löst vor allem eine Ausprägung und Sekretion von Entzündungsmediatoren aus. Diese fördern wiederum Zellproliferation, um offene Wunden im Epithelverband nach Gewebsverletzungen zu schließen. Zusätzlich werden weitere Immunzellen rekrutiert, die für die Eliminierung von eingedrungenen Pathogenen nötig sind. Wie TLRs/MyD88 direkt in Tumorzellen wirkt bzw. welche Folgen eine *Myd88*-Defizienz in den Tumorzellen hat, konnte bisher nicht zufriedenstellend gezeigt werden. Naheliegend wäre, dass eine MyD88-Induktion in den aus Epithelzellen abgeleiteten Tumorzellen die Tumorzellproliferation induziert oder die Apoptose inhibiert und somit die Tumorgenese unterstützt. Daneben könnte eine durch die Aktivität von MyD88 in Krebszellen hervorgerufene Rekrutierung von zytotoxischen Effektor-Immunzellen bei der Eliminierung der entarteten Zellen wichtig sein und somit tumorhemmende Wirkungen haben, wobei sich diese Effekte nicht wechselseitig ausschließen müssen.

Um diese komplexen Zusammenhänge *in vivo* zu entschlüsseln, sollte in der vorliegenden Arbeit ein neuartiges Mausmodell analysiert werden, welches eine zelltypspezifische Expression von *Myd88* ermöglicht. Dazu wurde das „*Myd88-lox-stop-lox*-Modell“ (*Myd88^{LSL}*) verwendet (Gais *et al.*, 2012). Das Wildtyp-Allel von *Myd88* besteht aus sechs Exonen. Im *Myd88^{LSL}*-Modell ist eine sogenannte *Intron-gene-trap* in Intron 1 des *Myd88*-Gens inseriert. Dieses Element enthält ein Transkriptions-Terminations-Signal, wodurch die Expression des Gens inhibiert bzw. an dieser Stelle abgebrochen wird. Die *Intron-gene-trap* ist mit loxP-Elementen flankiert, die die Entfernung der Kasette durch homologe Rekombination in genomischer DNA, vermittelt durch die Rekombinase Cre, und somit eine Re-Expression des Gens in bestimmten Geweben ermöglichen (Abb. 8).

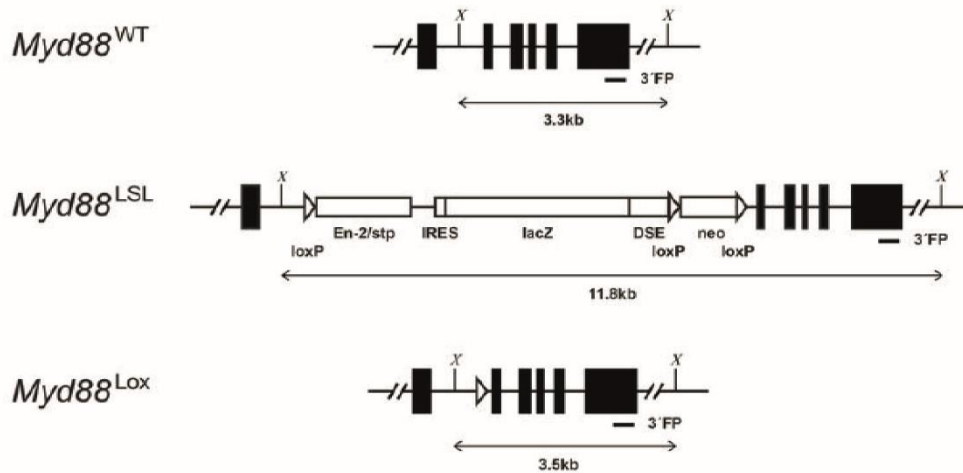


Abb. 8: Strategie der „switch-on“ Mutagenese von Myd88. Schematische Darstellung des Myd88 Wildtyp-Allels ($Myd88^{WT}$), des konditionell inaktivierten Myd88-Allels („lox-stop-lox“, $Myd88^{LSL}$) und des Myd88-Allels nach dem Entfernen der „Intron-gene-trap“ durch homologe Rekombination mittels der Cre-Rekombinase ($Myd88^{Lox}$). Abk.: En-2/stp – engrailed-2 splice acceptor site und Stop-Codons in allen Leserastern; IRES – interne ribosomale Eintrittsstelle; lacZ – β -Galaktosidase Expressionskassette; DSE – downstream element; neo – Neomycin-Resistenzkassette; TK – Herpesvirus 1 Thymidin-Kinase Expressionskassette; 3'FP – 3' flankierende Sonde. Abbildung entnommen aus (Gais et al., 2012).

Um eine Re-Expression von *Myd88* spezifisch in intestinalen Epithelzellen bzw. in myeloiden Zellen zu erhalten, wurden $Myd88^{LSL}$ -Tiere mit transgenen p villin-Cre- (el Marjou et al., 2004) bzw. LysM-Cre-Tieren verpaart (Clausen et al., 1999). Die beiden Linien exprimieren die Cre-Rekombinase unter der Aktivität einer regulatorischen 9 kb-Region des murinen p villin-Gens, bzw. des LysM-Promoters, wodurch die Rekombinase Cre entweder nur in Darmepithelzellen, bzw. in myeloiden Zellen ausgeprägt wird. Daraufhin wird nur in den jeweiligen Zelltypen die *Intron-gene-trap* aus dem $Myd88^{LSL}$ -Allel entfernt und die stabile Re-Expression von *Myd88* ermöglicht, während die übrigen Zelltypen weiterhin *Myd88*-defizient sind. Nachfolgend wurden *Myd88*-defiziente $Myd88^{LSL}$ -Tiere sowie die zelltypspezifischen Linien $Myd88^{IEC}$ und $Myd88^{MYEL}$ mit dem Tumormodell $Apc^{1638N/+}$ verpaart (Abb. 9). Das $Apc^{1638N/+}$ -Modell trägt eine heterozygote Keimbahn-Mutation in Exon 15 des *Apc*-Gens (Fodde et al., 1994). Im Gegensatz zum $Apc^{Min/+}$ -Modell entwickeln diese Tiere deutlich weniger Läsionen im Darm, wodurch $Apc^{1638N/+}$ -Tiere ein höheres Alter erreichen. Während die Polypen in $Apc^{Min/+}$ -Mäusen vor allem im distalen Dünndarm entstehen, sind Läsionen in $Apc^{1638N/+}$ -Tieren im Duodenum und Jejunum zu finden. Die Läsionen im $Apc^{Min/+}$ -Modell sind als benigne Polypen beschrieben, Läsionen aus $Apc^{1638N/+}$ -Mäusen zeigen auch maligne Gewebsveränderungen und können sich mitunter zu invasiven Karzinomen weiterentwickeln.

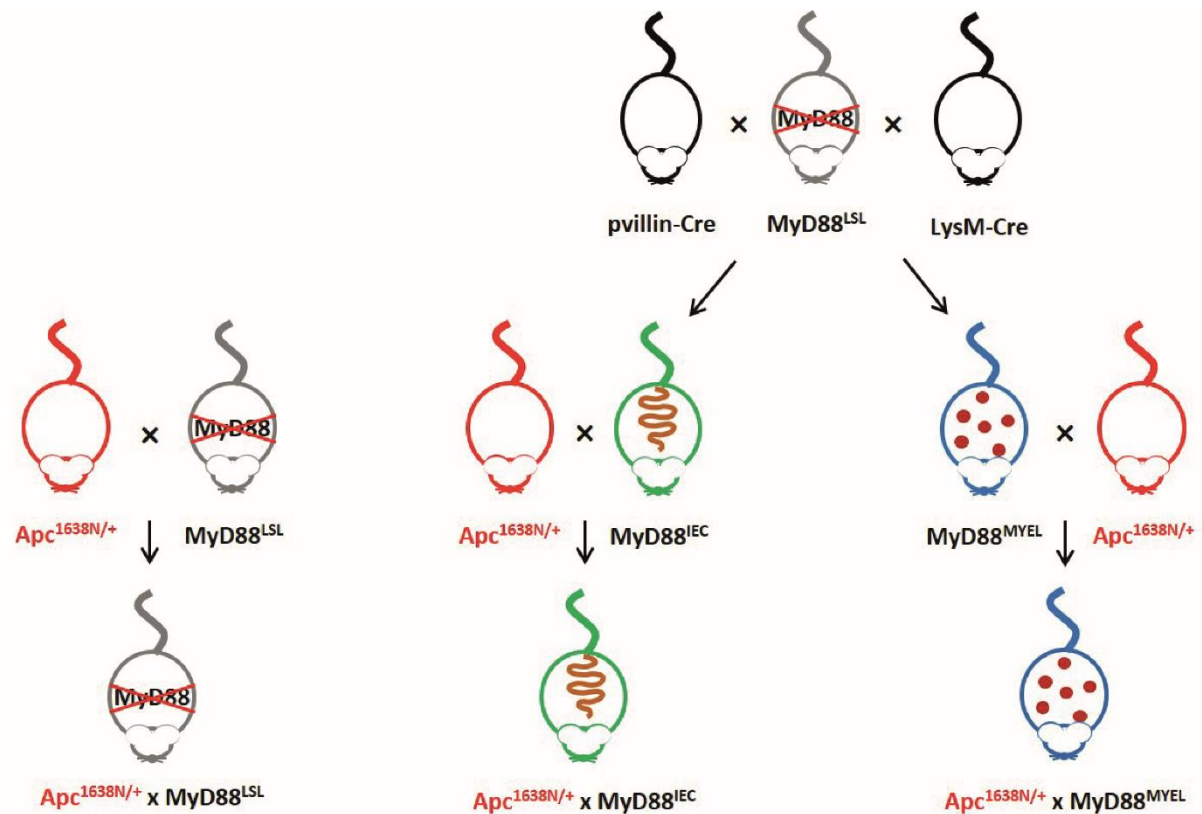


Abb. 9: Schematisch dargestellte Vorgehensweise zur Generierung von global Myd88-defizienten Tieren, bzw. zur zelltypspezifischen Myd88-Expression im Apc^{1638N/+}-Tumormodell. MyD88^{LSL}-Tiere tragen das „lox-stop-lox“-Allel und sind somit MyD88-defizient. Pvillein-Cre-Tiere exprimieren die Cre unter Aktivität des villin-Promoters, damit wird die „intron-gene-trap“ in intestinalen Epithelzellen entfernt und Myd88 nur in diesen Zellen re-exprimiert (MyD88^{IEC}). In LysM-Cre-Mäusen wird die Rekombinase Cre unter Aktivität des LysM-Promoters und somit in myeloiden Zellen exprimiert, die „Intron-gene-trap“ ausschließlich in diesen Zellen entfernt und Myd88 nur in myeloiden Zellen re-exprimiert (MyD88^{MYEL}). Diese drei Linien wurden anschließend mit dem Apc^{1638N/+}-Tumormodell verpaart, um MyD88-defiziente Apc^{1638N/+}-Tiere zu generieren (Apc^{1638N/+} x MyD88^{LSL}) bzw. um Apc^{1638N/+}-Mäuse zu erhalten, die Myd88 ausschließlich in intestinalen Epithelzellen und daraus resultierenden Tumorzellen (Apc^{1638N/+} x MyD88^{IEC}) bzw. in myeloiden Zellen (Apc^{1638N/+} x MyD88^{MYEL}) ausdrücken.

Mit Hilfe dieses Modells sollte in der vorliegenden Arbeit *in vivo* ermittelt werden, ob MyD88-abhängige Signalwege grundsätzlich tumorfördernde oder tumorhemmende Funktionen während der genetisch induzierten Tumorgenese haben. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob die Einflüsse von MyD88 Darmepithelzell- und Tumorzell-intrinsische Effekte sind, oder ob myeloide Zellen (insbesondere Makrophagen) nicht-zellautonom auf die Tumorentstehung und –progression entscheidenden Einfluss ausüben.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

2 × DynAmo™ Color Flash Probe Master Mix	Biozym, Hessisch Oldendorf
4-(2-Aminoethyl) benzensulfonylfluorid (Pefabloc SC®)	Roche, Mannheim
Accutase	Sigma, Steinheim
Acrylamidlösung (30 % Acrylamid/Bis Solution)	BioRad, München
Agarose	Sigma, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Steinheim
Antibiotic-Antimycotic (ABAM)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
β-Glycerolphosphat	Sigma, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim
β-Mercaptoethanol (steril)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Benzamidin	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim
Complete Mini Protease Inhibitor Tabletten (EDTA-frei)	Roche, Mannheim
DAPI (2-(4-Carbamimidoylphenyl)-1H-indol-6-carboximidamid)	Sigma, Steinheim
Desoxynukleotide (dNTP)	Fermentas, St. Leon-Rot
Diethylether	Otto Fischer GmbH & Co KG, Saarbrücken
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Biomol, Hamburg
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
ECL Reagenz	Perbio Science, Bonn
Eosin Y	Sigma, Steinheim
Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i> , EGF)	Sigma, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol p. A.	Merck, Darmstadt
Ethanol (70%, 96%, 100%)	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Steinheim
Eukitt Einbettmedium	O. Kindler GmbH & Co KG, Freiburg
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
GeneRuler™ 100bp DNA Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Gentamycin	Sigma, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe

Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
HEPES Pufferlösung	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Insulin Injektionslösung	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
Isofluran	Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Lipopolysaccharid (LPS) von <i>E. coli</i> , Serotyp 0127:B8	Enzo Life Technologies, Lörrach
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Fermentas, St. Leon-Rot
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver ("Blotting Grade" Blocker)	Bio-Rad, München
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Sigma, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Orthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma, Steinheim
ODN 2216 (CpG Oligonukleotide)	Invivogen, San Diego, CA, USA
Oligo-dT-Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
Orange G	Sigma, Steinheim
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Pepstatin A	Sigma, Steinheim
Phenol-Chloroform	Sigma, Steinheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Steinheim
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Dulbecco, Pulver	Biochrom, Berlin
Phosphatgepufferte Salzlösung Dulbecco (DPBS), steril	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Dulbecco, low endotoxin	Biochrom, Berlin
<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i> (polyI:C)	Invivogen, San Diego, CA, USA
Ponceau S	Sigma, Steinheim
Pyridin-2-Aldoxin-Methiodid-3-Cystein (Pam ₃ Cys)	EMC, Tübingen
Random-Hexamer-Primer	Fermentas, St. Leon-Rot
ReBlot™ Plus Mild	Merck, Darmstadt
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) VLE, 1640	Biochrom, Berlin
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe

Taq-Puffer + (NH ₄) ₂ SO ₄ (-MgCl ₂) (10×)	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Puffer + KCl (-MgCl ₂) (10×)	Fermentas, St. Leon-Rot
TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin)	Bio-Rad, München
Trireagenz	Sigma, Steinheim
Tris-Puffer	Roth, Karlsruhe
TritonX-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA (1x)	Biochrom, Berlin
Türks Lösung	Merck, Darmstadt
Tween 20 Detergens	Calbiochem, Darmstadt
Universal Probe Library (UPL) Sonden	Roche, Mannheim

2.2 Geräte

Autoklav (Systec D-65)	Systec, Linden
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Entwicklermaschine (TYPON Optimax)	Protec, Oberstenfeld
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Fischer Scientific, Ingolstadt
Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele	Biometra, Göttingen
ELISA Mikroplatten Lesegerät (Mithras LB 940)	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Gel Doc™ XR System	Bio-Rad, München
Heizblock (Blockthermostat BT 200)	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Kryostat Leica CM3050 S	Leica, Nussloch
LightCycler® 480 Instrument II	Roche, Mannheim
Mikrowelle	Moulinex, Alencon, FRA
NanoDrop ND-1000	Nanodrop Techn., Montchanin, DE, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand, Berlin
Mikroplatten-Waschgerät (ELISA-Platten)	Tecan Group, Maennedorf, CH
Mikroskop AxioVert 200M	Carl Zeiss GmbH, Jena
Mikroskop-Kamera AxioCam MRm CCD	Carl Zeiss GmbH, Jena
Plattformschüttler rotierend (Rotamax 120)	Heidolph Instruments, Schwalbach
Proteintransferkammer (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell)	Bio-Rad, München
Reinstwasseranlage (PURELAB Ultra)	Elga LabWater, Celle
Rotationsrad (Mixing Rotor)	Renner, Darmstadt
Rührer (IKAMAG RH)	Ika Labortechnik, Staufen
Sterilbank (HERAsafe® HSP 18)	Heraeus, Hanau
Stromquellen (Power Pack P25 T)	Biometra, Göttingen

T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge (Hereaus™ Pico™ Microcentrifuge)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge (Microcentrifuge 5415D, 5415R)	Eppendorf, Hamburg
TissueLyser II	Qiagen, Hilden
Vortexer (VF2)	Ika Labortechnik, Staufen
Waagen	Sartorius, Göttingen
Zellkulturmikroskop (Invertoskop ID03)	Carl Zeiss GmbH, Jena
Zentrifuge (Megafuge 2.0R)	Heraeus, Hanau

2.3 Software

Adobe Photoshop (Version 2012.0.4)	Adobe Systems, San José, CA, USA
Adobe Illustrator (Version 2012.0.4)	Adobe Systems, San José, CA, USA
Axiovision (Version 4.8.2)	Carl Zeiss GmbH, Jena
EndNote X7	Thomson Reuters, NY, USA
GraphPad InStat 3.1	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
GraphPad PRISM® Version 4	GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA
ImageJ	NIH, Bethesda, MD, USA
LightCycler® 480 SW 1.5	Roche, Mannheim
MS Excel 2013	Microsoft, Redmond, WA, USA
MS PowerPoint 2013	Microsoft, Redmond, WA, USA
MS Word 2013	Microsoft, Redmond, WA, USA
NCBI Blast (Align Sequences Nucleotide BLAST)	NCBI, Bethesda, MD, USA

2.4 Verbrauchsmaterialien

Alaunstifte zur Blutstillung	Stern Haaratelier und Friseurbedarf, Bremen
Cryomold Intermediate #4566	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Deckgläser (20 × 20 mm)	Josef Reske GmbH & Co KG, Aindling-Arnhofen
Dispenserkugeln, Stahl, rostfrei (5 mm)	Qiagen, Hilden
EDTA-Blutröhrchen mit Kapillare	Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth
Einmalhandschuhe	Semper Care, Wien, AT
Einmalspritze 1 ml Omnifix-F	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Einmalspritze 10 ml Omnifix-F	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Falcon 15 ml Reaktionsröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon 50 ml Reaktionsröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpipettenspitzen	Kisker Biotech GmbH Co. KG, Steinfurt
Kanülen (20 gauge)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kleenex Papiertücher	Kimberly Clark Worldwide, Roswell, FL, USA
Kryoröhrchen 1 ml	Alpha Laboratories Ltd, Eastleigh, Hampshire, UK
Nitrocellulosemembran	AppliChem GmbH, Darmstadt
Petrischalen (10 cm)	Greiner-bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Kisker Biotech, Steinfurt
Serologische Pipetten 5 / 10 / 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,5 / 1 / 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße Safe Lock 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Hyperfilm MP	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Superfrost Objektträger	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Whatman-Papier	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Wiegeschalen	Roth, Karlsruhe
Zellkulturschalen 6-well, 24-well, 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht

2.5 OP-Besteck

Ohrlochstecher	Tri-City Tool & Die Inc, Bay City, MI, USA
Schere	Gebrüder Martin GmbH & Co KG, Tuttlingen
Skalpell	Feather Safety, Razor Co., Osaka, Japan
Pinzette	World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA

2.6 Medien und Puffer

2.6.1 Zellkulturmedien

Für die nachfolgend aufgeführten Zellkulturmedien wurde das verwendete fötale Kälberserum zunächst für 30 min bei 56°C inaktiviert.

2.6.1.1 Konditioniertes Medium für Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen

Die Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung Knochenmarks-abgeleiteter Makrophagen wurde aus der Dissertation von Petra Gais übernommen.

Komponenten	Menge
Basismedium RPMI VLE, 1640	
Fötales Kälberserum (FKS)	10% (v/v)
L-Glutamin	2 mM
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml
β-Mercaptoethanol	55 nM
M-CSF (aus L929-Zellüberstand)	10 % (v/v)

Tabelle 1: Zusammensetzung des konditionierten Mediums für Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen.

2.6.1.2 Medium für isolierte murine intestinale Epithelzellen

Die Zusammensetzung des Mediums für isolierte intestinale Epithelzellen aus Maudarm entspricht dem *primary culture medium* von Falguières und Kollegen übernommen (Falguières *et al.*, 2008).

Komponenten	Menge
Basismedium DMEM VLE	
Fötales Kälberserum (FKS)	10% (v/v)
L-Glutamin	2 mM
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml
Antibiotic-Antimycotic (100 ×)	1 × (v/v)
Gentymycin	0,5 mg/ml
EGF	10 ng/ml
Insulin	2,5 ng/ml

Tabelle 2: Zusammensetzung des Mediums für isolierte murine intestinale Epithelzellen.

2.6.2 Puffer

Die Angaben zu den Komponenten in den nachfolgend aufgeführten Puffern beziehen sich auf die Endkonzentrationen. Soweit nicht anders angegeben sind alle Puffer in H₂Odd angesetzt worden.

Mausschwanz-Lysepuffer	NaCl	100 mM
	Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
	SDS	0,5 % (w/v)
	EDTA, pH 8,0	5 mM
50 × Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	Tris, pH 8,0	2 M
	Eisessig	1 M
	EDTA, pH 8,0	0,1 M
DNA-Auftragspuffer grün (6×)	TAE	1 × (v/v)
	Orange G	1 mg/ml
	Xylencyanol	1 mg/ml
	Glycerol	50 % (v/v)
SDS-Probenpuffer (3×)	Tris/HCl, pH 6,8	1 mM
	SDS	6 % (w/v)
	Glycerin	30 % (v/v)
	β-Mercaptoethanol	16 % (v/v)
	Bromphenolblau	1 mM
SDS- Laufpuffer (5×)	Tris	248 mM
	Glycin	1,9 M
	SDS	0,5 % (w/v)
Transblotpuffer (10×)	Tris	450 mM
	Glycin	390 mM

Für die Herstellung des 1 × Transblotpuffers wird der 10 × Transblotpuffer im Verhältnis 1/10 in H₂O mit 20 % Methanol verdünnt.

Poncau S Färbepuffer	Ponceau S	0,2 % (w/v)
	Eisessig	5 % (v/v)
TBS-Puffer (10×)	Tris/HCl, pH 7,6	200 mM
	NaCl	1,4 M

Lysepuffer für die Isolierung intestinaler Epithelzellen aus murinem Darmgewebe	NaCl	130 mM
	EDTA, pH 8,0	10 mM
	HEPES	10 mM
	FKS	10 % (v/v)
	DTT	1 mM

Die Zusammensetzung des Lysepuffers wurde aus der Masterarbeit von Cornelia Ochs übernommen (Ochs, 2012).

RIPA-Puffer	Tris/HCl, pH 7,4	50 mM
	NP-40	1 % (v/v)
	Na-deoxycholat	0,25 % (w/v)
	NaCl	150 mM
	EDTA, pH 8,0	1 mM

Kurz vor Gebrauch Protease- und Phosphataseinhibitoren zugeben:	β -Glycerophosphat	1 mM
	Benzamidin	1 mM
	Na ₃ VO ₄	1 mM
	NaF	1 mM
	Pefabloc	1 mM
	Pepstatin A	1 μ g/ml
	PIC	2 \times
	PMSF	1 mM
	SDS	0,1 % (w/v)

2.7 Kommerziell erhältliche Kits

Mouse IL-6 ELISA Duoset	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
RNeasy Mini Plus Kit	Qiagen, Hilden
PCR Purification and Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

2.8 Enzyme

Taq-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K	Sigma, Steinheim

2.9 Antikörper

Primärantikörper gegen [Klon]	generiert in	Bezugsquelle (Katalognummer)	Anwendung und Endkonzentration
alpha-Tubulin [DM1A]	Maus	Calbiochem (CP06)	WB, 1:2000 (5% Milch, TBS-T)
beta-Aktin [AC-40]	Maus	Sigma Aldrich (A4700)	WB, 1:2000 (5% Milch, TBS-T)
beta-Catenin	Maus	BD (610154)	WB, 1:2000 (5% Milch, TBS-T)
mCD3e [145-2C11]	Arm. Hamster	BD (553057)	IF, 1:100 (PFA-Fixierung; BSA, PBS)
mCD4 [RM4-5]	Ratte	BioLegend (100506)	IF, 1:50 (PFA-Fixierung; BSA, PBS)
mCD8a [53-6.7]	Ratte	BioLegend (100702)	IF, 1: 50 (PFA-Fixierung; BSA, PBS)
CD11b [M1/70]	Ratte	BD (550282)	IF, 1:100 (PFA-Fixierung; BSA, PBS)
cleaved Caspase-3 [5A1E]	Kaninchen	Cell Signaling (9664)	IF, 1:200 (PFA-Fixierung; BSA, PBS)
IkappaB-alpha	Kaninchen	Cell Signaling (9242)	WB, 1:1000 (5% Milch, TBS-T)
Ki67	Kaninchen	Novocastra (NCL-Ki67p)	IF, 1:500 (PFA-Fixierung; BSA, PBS)
MyD88	Kaninchen	Abcam (ab2068)	WB, 1:1000 (5% Milch, TBS-T)
p44/42 MAPK [137F5]	Kaninchen	Cell Signaling (4695)	WB, 1:1000 (5% Milch, TBS-T)
phospho-IkappaB-alpha (Ser32)	Kaninchen	Cell Signaling (9241)	WB, 1:1000 (5% Milch, TBS-T)
phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	Cell Signaling (9101)	WB, 1:1000 (5% Milch, TBS-T)
Slug [C19G7]	Kaninchen	Cell Signaling (9585)	IF, 1:400 (PFA-Fixierung; BSA, PBS)

Tabelle 3: In der vorliegenden Arbeit verwendete Primärantikörper, deren Bezugsquelle mit Bestell- bzw. Katalognummer sowie ihre Anwendung und die eingesetzte bzw. verwendete Endkonzentration. Abk.: WB – Western Blot; IF – Immunfluoreszenz.

Sekundärantikörper gegen [Klon]	generiert in	Bezugsquelle (Katalognummer)	Anwendung und Konzentration
Arm. Hamster-IgG Alexa488-konjugiert	Ziege	Jackson ImmunoResearch (127-545-160)	IF, 1:100 (BSA, PBS)
Kaninchen-IgG Alexa488-konjugiert	Ziege	Invitrogen (A-11008)	IF, 1:300 (BSA, PBS)
Kaninchen-IgG Cy3-konjugiert [pAK]	Ziege	Jackson ImmunoResearch (111-165-003)	IF, 1:300 (BSA, PBS)
Kaninchen-IgG HRP-konjugiert	Ziege	Jackson ImmunoResearch (111-035-003)	WB, 1:4000 (5% Milch, TBS-T)
Maus-IgG HRP-konjugiert	Ziege	Jackson ImmunoResearch (115-035-003)	WB, 1:4000 (5% Milch, TBS-T)
Ratte-IgG Cy3-konjugiert	Ziege	Jackson ImmunoResearch (112-165-167)	IF, 1:200 (BSA, PBS)

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete konjugierte Sekundärantikörper, deren Bezugsquelle mit Bestell- bzw. Katalognummer sowie ihre Anwendung und die eingesetzte Endkonzentration. Abk.: WB – Western Blot; IF – Immunfluoreszenz.

2.10 Oligonukleotide

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Martinsried synthetisiert. Die Sequenzen aller Oligonukleotide sind in 5'-3' Orientierung aufgeführt.

Primer	Sequenz 5'-3'	Verwendung	PCR-Programm
APC-C2	GGA AAA GTT TAT AGG TGT CCC TTC T	APC1638N- Genotypisierung	94°C 300 sec
APC-A2	TCA GCC ATG CCA ACA AAG TCA		94°C 30 sec } 35x
APC-PN3	GCC AGC TCA TTC CTC CAC TC		55°C 45 sec } 72°C 45 sec } 72°C 300 sec
P53	GAA GGG TGT AGA GGC TCC TC	MyD88- Genotypisierung	94°C 420 sec
P58	GCG TCA GAT CTC ATT ATG GG		94°C 60 sec } 35x
NeoP02	ACA TTG GGT GGA AAC ATT CC		57°C 60 sec } 72°C 60 sec } 72°C 420 sec
Cre8	CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG	LysMCre- Genotypisierung	95°C 600 sec
Lys1	CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC		95°C 60 sec } 34x
Lys2	TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC		58°C 60 sec } 72°C 120 sec } 72°C 600 sec
Cre 198 as	CGC GAA CAT CTT CAG GTT CT	pvillinCre- Genotypisierung	94°C 300 sec
2 kb seq	CAA GCC TGG CTC GAC GGC C		94°C 45 sec } 30x 55°C 45 sec } 72°C 45 sec } 72°C 300 sec

Tabelle 5: Die in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Genotypisierung der Versuchstiere.

Primer	Sequenz 5'-3'	Zieltranskript	Roche Sonde
mTFIID_left	CGG TCG CGT CAT TTT CTC	TFIID	#107
mTFIID_right	GGG TTA TCT TCA CAC ACC ATG A	Referenz	
mBirc5_left	CCG ATG ACA ACC CGA TAG A	Survivin (<i>Birc5</i>)	#71
mBirc5_right	CAT CTG CTT CTT GAC AGT GAG G		
mE-Cadherin_left	ATC CTC GCC CTG CTG ATT	E-Cadherin	#18
mE-Cadherin_right	ACC ACC GTT CTC CTC CGT A	(<i>Cdh1</i>)	
mFoxP3_left	GCG AAA GTG GCA GAG AGG TA	FoxP3 (<i>Foxp3</i>)	#92
mFoxP3_right	CCA CAG CAT GGG TCT GTC T		
mGATA3_left	TTA TCA AGC CCA AGC GAA G	GATA3 (<i>Gata3</i>)	#108
mGATA3_right	TGG TGG TGG TCT GAC AGT TC		
mGranzymeB_left	ACA TGG CCT TAC TTT CGA TCA	Granzyme B	#66
mGranzymeB_right	GCC CCC AAA GTG ACA TTT ATT	(<i>Gzmb</i>)	
mIL-1beta_left	TGT AAT GAA AGA CGG CAC ACC	IL-1beta (<i>Il1b</i>)	#78
mIL-1beta_right	TCT TCT TTG GGT ATT GCT TGG		
mIL-6_left	GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC AGG A	IL-6 (<i>Il6</i>)	#6
mIL-6_right	CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GAA		

mIL-10_left mIL-10_right	CAG AGC CAC ATG CTC CTA GA TGT CCA GCT GGT CCT TTG TT	IL-10 (<i>Il10</i>)	#41
mIL-22_left mIL-22_right	TGA CGA CCA GAA CAT CCA GA AAT CGC CTT GAT CTC TCC AC	IL-22 (<i>Il22</i>)	#94
mIL-23p19_left mIL-23p19_right	TCC CTA CTA GGA CTC AGC CAA C GCT GCC ACT GCT GAC TAG AA	IL-23, Untereinheit p19 (<i>Il23a</i>)	#19
mIL-23R_left mIL-23R_right	CCA AGT ATA TTG TGC ATG TGA AGA AGC TTG AGG CAA GAT ATT GTT GT	IL-23 Rezeptor (<i>Il23r</i>)	#94
mJAM-A_left mJAM-A_right	AGA ACA AAG AAA GGG ACT GCA C ACC AGG AAC GAC CAG GTC T	JAM-A (<i>F11r</i>)	#26
mMUC-2_left mMUC-2_right	ACC CCT TGG ACA CAG TCA AT CAA CTT CAG CTC TGT CCC CTA	Mucin 2 (<i>Muc2</i>)	#6
mMyD88_E1_fwd mMyD88_E2_rev	TGG CCT TGT TAG ACC GTG A AAG TAT TTC TGG CAG TCC TCC TC	MyD88 (<i>Myd88</i>)	#17
mN-Cadherin_left mN-Cadherin_right	GCC ATC ATC GCT ATC CTT CT CCG TTT CAT CCA TAC CAC AAA	N-Cadherin (<i>Cdh2</i>)	#18
mOPN_left mOPN_right	GAG GAA ACC AGC CAA GG AC TGC CAG AAT CAG TCA CTT TCA	Osteopontin (<i>Spp1</i>)	#52
mPigr_left mPigr_right	CTG TGC CCG AAA CTG GAT TCA GGT TGG CTT CTT GTA TGA G	Polymerischer Immunglobulin Rezeptor (<i>Pigr</i>)	#80
mRORgammaT_left mRORgammaT_right	CAC TGC CAG CTG TGT TGC T TGC AAG GGA TCA CTT CAA TTT	RORgammaT (<i>Rorc</i>)	#101
mSnai1_left mSnai1_right	CTT GTG TCT GCA CGA CCT GT CAG GAG AAT GGC TTC TCA CC	Snail (<i>Snai1</i>)	#71
mSnai2_left mSnai2_right	CAT TGC CTT GTG TCT GCA AG AGA AAG GCT TTT CCC CAG TG	Slug (<i>Snai2</i>)	#71
mT-bet_left mT-bet_right	TCA ACC AGC ACC AGA CAG AG AAA CAT CCT GTA ATG GCT TGT G	T-bet (<i>Tbx21</i>)	#19
mTLR2_left mTLR2_right	GGG GCT TCA CTT CTC CTG CTT AGC ATC CTC CTG AGA TTT GAC G	TLR2 (<i>Tlr2</i>)	#50
mTLR3_left mTLR3_right	GAT ACA GGG ATT GCA CCC ATA TCC CCC AAA GGA GTA CAT TAG A	TLR3 (<i>Tlr3</i>)	#26
mTLR4_left mTLR4_right	GGA CTC TGA TCA TGG CAC TG CTG ATC CAT GCA TTG GTA GGT	TLR4 (<i>Tlr4</i>)	#2
mTLR5_KP_left mTLR5_KP_right	CAG GAG AAT TGG CTT CTC ACC TGG CCA TGA AGA TCA CAC C	TLR5 (<i>Tlr5</i>)	#18
mTLR9_left mTLR9_right	GAA TCC TCC ATC TCC CAA CAT CCA GAG TCT CAG CCA GCA CT	TLR9 (<i>Tlr9</i>)	#79

mTNFalpha_left	TGA CTA TGT CTC AGC CTC TTC	TNFalpha (<i>Tnf</i>)	#49
mTNFalpha_right	GAG GCC ATT TGG GAA CTT CT		
mVimentin_left	TGC GCC AGC AGT ATG AAA	Vimentin (<i>Vim</i>)	#79
mVimentin_right	GCC TCA GAG AGG TCA GCA AA		
UPL-CyclinD1-left	TCT TTC CAG AGT CAT CAA GTG TG	CyclinD1 (<i>Ccnd1</i>)	#72
UPL-CyclinD1-right	GAC TCC GAA GGG CTT AAT C		

Tabelle 6: Verwendete Primer für die quantitative RT-PCR basierend auf dem UPL real-time qPCR-System von Roche, Mannheim. Die Primer wurden mit Hilfe des Universal ProbeLibrary Assay Design Center von Roche designt (<http://lifescience.roche.com>).

2.11 Mausmodelle

Alle Versuchstiere wurden im spezifiziert opportunistisch und pathogen-freien (SOPF) Bereich des Zentrums für präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums rechts der Isar der TU München gezüchtet und gehalten.

Mausstamm	Hintergrund	Beschreibung	Herkunft
WT	C57Bl/6N	Wildtyp-Kontrollen	Charles River, Sulzfeld
Apc^{1638N/+}	C57Bl/6N	<i>Knock-in</i> im Tumorsuppressorgen <i>adenomatous polyposis coli</i> (APC), Allel Apc1638N, heterozygot	R. Fodde, Rotterdam, NL (Fodde <i>et al.</i> , 1994)
MyD88^{LSL/LSL}	C57Bl/6N	konditioneller <i>Knock-in</i> einer geflochten <i>Intron-gene-trap</i> im <i>Myd88</i> -Gen, der ein Transkriptions-Terminierungs-Element enthält; Allel MyD88 „lox-Stop-lox“ (LSL)	B. Holzmann, München (Gais <i>et al.</i> , 2012)
villin-Cre	C57Bl/6N	Expression der Rekombinase Cre in intestinalen Epithelzellen unter Kontrolle des murinen Villin-Gen Promoters (9kb-Region)	Inst. Curie, Paris, FR (el Marjou <i>et al.</i> , 2004)
LysM-Cre	C57Bl/6N	Expression der Rekombinase Cre in myeloiden Zellen durch gezielte Insertion der Cre cDNA im murinen Lysozym M Genlocus	I. Förster, Bonn (Clausen <i>et al.</i> , 1999)

Tabelle 7: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausmodellen, deren genetischer Hintergrund und die jeweilige Bezugsquelle.

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

3.1.1 Blutentnahme

Die Mäuse wurden durch Inhalationsnarkose mit Diethylether betäubt. Die Blutentnahme erfolgte aus dem retrobulbären Venengeflecht. Das Blut wurde in mit EDTA beschichteten Kapillarröhrchen aufgefangen und noch am selben Tag am Institut für Klinische Chemie und Hämatologie am Klinikum rechts der Isar mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.1.2 Organentnahme

Nach Betäubung mit Diethylether wurden die Mäuse durch Genickbruch schmerzfrei getötet. Die Organentnahme erfolgte unter möglichst sterilen Bedingungen. Die Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in Tissue Tek-Gel eingebettet und bei -80°C eingefroren. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -80°C.

3.1.3 Gewinnung muriner Primärzellen

3.1.3.1 Isolierung von intestinalen Epithelzellen aus murinem Dünndarmgewebe

Zur Isolierung intestinaler Epithelzellen aus murinem Dünndarmgewebe wurde der Darm zunächst der Maus entnommen, longitudinal geöffnet und in auf 37°C vorgewärmten PBS mehrmals gewaschen um den Darminhalt zu entfernen. Zur Ablösung der Zellen vom Gewebe wurde der Darm schnellstmöglich in 37°C warmen Lysepuffer (50 ml Lysepuffer vorgelegt in 50 ml Falconröhrchen) gegeben. Dieser wurde für 45 – 60 min in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 200 U/min geschüttelt, bis der Puffer durch die abgelösten Zellen trüb wurde. Anschließend wurde das restliche Darmgewebe entfernt und verworfen und die Zellen bei 1.500 U/min für 5 min abzentrifugiert. Um die isolierten IECs zu vereinzeln wurden sie in 20 ml IEC-Medium resuspendiert und durch einen 100 µm Filter gegeben. Anschließend konnten die Zellen durch Lebend-Tod-Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und für Stimulationsversuche ausgebracht werden.

3.1.3.2 Gewinnung von Knochenmark zur Generierung Knochenmarks-abgeleiteter Makrophagen

Zur Generierung Knochenmarks-abgeleiteter Makrophagen wurde von den Versuchstieren zunächst Knochenmark isoliert. Hierfür wurden Ober- und Unterschenkel entnommen und weitgehend von Muskel- und Fettgewebe befreit, kurz mit 70%igem Ethanol und anschließend mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Enden der Knochen mit einer Schere abgetrennt und die Röhrenknochen mit sterilem PBS (in einer 10 ml Spritze, 27G Kanüle) gespült um das Knochenmark in ein 15 ml Falconröhrchen zu überführen. Um die Zellen zu vereinzeln wurden sie kräftig geschüttelt, anschließend bei 1.500 U/min für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml konditionierten RPMI-Medium aufgenommen und in eine 10 cm Petrischale überführt.

[Teile des Abschnitts 3.1 wurden aus der Dissertation von Larissa Kistner übernommen (Kistner, 2014)].

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Zellkultur – Kultivierung von Zelllinien und Bestimmung der Zellzahl

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter Umluft-Sterilbänken durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte im jeweils benötigten Medium im Brutschrank bei 37°C, 7% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Zellen wurden regelmäßig nach Erreichen einer Konfluenz von 80 – 100% passagiert. Die Zellen wurden mit Accutase (Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen) von den Zellkulturplatten für ca. 5 min bei 37°C abgelöst. Durch Zugabe von PBS wurde die Accutase verdünnt, die Suspension sofort in ein Falcon überführt und die Zellen abzentrifugiert (1.500 U/min, 3 min, RT). Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und in den gewünschten Verdünnungen auf neue Platten ausgebracht.

Die Bestimmung der Lebend-Zellzahl erfolgte durch Anfärben der toten Zellen mit einer 0,2%igen Trypanblau-Lösung in PBS. Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen wurden vor dem Zählen mit Türkscher Lösung angefärbt, wodurch noch verbliebene Erythrozyten zunächst lysiert wurden, damit diese die Zellzahl nicht verfälschen. Das Auszählen der weiß verbliebenen und damit lebenden Zellen wurde in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

3.2.2 Generierung Knochenmarks-abgeleiteter Makrophagen

Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen wurden aus Vorläuferzellen aus dem Knochenmark der Versuchstiere gewonnen. Die Knochenmarkszellen wurden wie in Abschnitt 3.1.3.2 beschrieben aus den Tieren gewonnen. In der ersten Nacht in Kultur adhären Erythrozyten-Vorläuferzellen, Monozyten verbleiben in Suspension. Dadurch konnten am darauffolgenden Tag die Makrophagen-Vorläuferzellen mit dem Medium abgenommen, nochmals bei 1.500 U/min abzentrifugiert und in frischem konditionierten Medium aufgenommen werden. Es wurden 5×10^6 Zellen je Petrischale ausgesät und für 5 Tage in Kultur genommen. An Tag 3 wurden pro Schale nochmals 5 ml frisches Medium zugegeben. Ab Tag 5 waren die Vorläuferzellen zu Makrophagen differenziert und konnten dann für Stimulationsversuche eingesetzt werden.

3.2.3 Zellstimulation

Für die Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten wurden die Primärzellen (murine IECs und Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen) in einer Suspension von 1×10^6 Zellen/ml ausgesät. Für die Bestimmung der Zytokinproduktion mittels ELISA wurden 5×10^5 Zellen/well in 48-well Platten verwendet. Für anschließende RNA-Aufreinigung aus den Zellen wurden 1×10^6 Zellen/well in 6-well Platten in einem Volumen von 2 ml/well ausgesät. Für Proteinbestimmung mittels Western Blot wurden 5×10^6 Zellen in einem Volumen von 10 ml Medium auf 10 cm Zellkulturschalen ausgebracht. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit Pam3Cys (Endkonzentration 10 µg/ml), polyI:C (100 µg/ml) oder LPS (1 µg/ml) über verschiedene Zeiträume stimuliert. Für die Analyse der Zytokinproduktion wurden 400 µl des Überstandes in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und sofort bei -80°C eingefroren. Zur RNA-Aufreinigung und Proteinanalyse wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Accutase (Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen) von den Zellkulturplatten abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden daraufhin in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, nochmals mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1.500 U/min, 3 min) und die Zellpellets bis zur RNA-Aufreinigung bzw. Herstellung der Proteinlysate bei -80°C aufbewahrt.

Murine IECs konnten aufgrund ihrer kurzen Überlebensdauer nach Separation vom restlichen Darmgewebe nur kurze Zeit in Kultur genommen werden. Nach der Isolierung wurden 5×10^6 Zellen/well in 6-well Platten ausgebracht. Nach einer einstündigen Ruhezeit bei 37°C im

Brutschrank wurden die Zellen mit verschiedenen TLR-Agonisten für eine Stunde stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Medium in 15 ml Falconröhrchen überführt und bei 1.500 U/min für 3 min bei RT abzentrifugiert. Die Zellen wurden nochmals in einem ml PBS aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewaschen, und das Pellet bis zur RNA-Aufreinigung bei -80°C aufbewahrt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien für die Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde den Jungtieren im Alter von ca. drei Wochen Schwanzbiopsien entnommen. Die Schwanzproben wurden ü. N. in 500 µl Lysepuffer (Zusammensetzung in Abschnitt 2.6.2) und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 56°C und 700 U/min verdaut. Am darauffolgenden Tag wurden 500 µl Isopropanol zugegeben, um die DNA zu fällen. Nach 10 minütiger Inkubation wurde die DNA für 30 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die DNA zwei Mal mit je 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen (10 min, 14.000 U/min). Nachdem das DNA-Pellet vollständig getrocknet war, wurden je 400 µl H₂O zugegeben und die DNA ü. N. gelöst. Die genomische DNA wurde am nächsten Tag für die PCR eingesetzt und konnte über einen längeren Zeitraum bei 4°C gelagert werden.

3.3.2 Isolierung von RNA

Für die Isolierung von RNA aus Zellen oder Gewebe wurden ausschließlich RNase-freie Lösungen, Pipettenspitzen und Geräte verwendet.

Die Isolierung von RNA aus murinem Gewebe erfolgte aus schockgefrorenen und bei -80°C gelagerten Proben. Es wurden jeweils ca. 10-20 mg Gewebe im gefrorenen Zustand abgewogen und schnellstmöglich mit je 1 ml Trireagenz versetzt. Das Gewebe wurde anschließend im Tissue Lyzer zerkleinert. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT wurden je 200 µl Phenol-Chloroform-Gemisch zugegeben, kurz invertiert und nochmals 5 min bei RT inkubiert. Zur Abtrennung der Nukleinsäuren wurden die Proben bei 12.000 U/min und 4°C für 15 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Im Anschluss wurden 350 µl der Nukleinsäuren in der oberen farblosen Phase abgenommen, auf gDNA Eliminator Säulen gegeben und für 30 sec bei 10.000 U/min zentrifugiert, um genomische DNA an den Filter zu

binden. Die RNA im Durchfluss (ca. 350 μ l) wurde anschließend mit 350 μ l 70%igem Ethanol vermischt und mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Zur Eluierung der RNA wurden zwei Mal je 30 μ l RNase-freies Wasser auf den Filter gegeben, ca. eine Minute bei RT inkubiert und bei 10.000 U/min für 30 sec zentrifugiert. Die RNA wurde anschließend sofort auf Eis gestellt und bei -80°C gelagert.

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wurden ca. 1×10^6 Zellen in RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol lysiert. Das Lysat wurde im Anschluss mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Die RNA wurde erneut zwei Mal mit je 30 μ l nach kurzer Inkubation bei RT von den Filtern eluiert, auf Eis gekühlt und längerfristig bei -80°C aufbewahrt.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm am NanoDrop.

3.3.3 Reverse Transkription

Für das Umschreiben der mRNA in komplementäre DNA (cDNA) wurden 2 μ g RNA eingesetzt. Nach Zugabe von oligo-dT-Primern und Random-Hexamer-Primern wurde das Gemisch für 10 min bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen.

Ansatz	Menge
mRNA	2 μ g
Oligo-dT-Primer [10 μ M]	1 μ l
Random-Hexamer-Primer [10 μ M]	1 μ l
mit H₂O auf Gesamtvolumen von 27 μl auffüllen	

Tabelle 8: Menge der mRNA, oligo-dT-Primer und Random-Hexamer-Primer für die reverse Transkription.

Nach anschließendem Abkühlen auf Eis wurden dNTPs, RT-Puffer, RNase-Inhibitor und Reverser Transkriptase nach folgendem Ansatz zugegeben:

Ansatz	Menge
5 \times RT-Puffer	8 μ l
dNTPs [40 μ M]	2 μ l
RNase-Inhibitor	1 μ l
Reverse Transkriptase	2 μ l
Gesamtvolumen	13 μl

Tabelle 9: Menge an RT-Puffer, dNTPs, RNase-Inhibitor und reverser Transkriptase für einen Ansatz.

Der 40 µl Gesamtansatz wurde für 1 h bei 42°C inkubiert, um die RNA in cDNA umzuschreiben. Die Reaktion wurde durch 5-minütige Inkubation bei 95°C abgestoppt. Die erhaltene cDNA wurde als Matrize in die qRT-PCR eingesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Analyse der Genotypen der Versuchstiere erfolgte durch PCR. Durch spezifische, zum gesuchten DNA-Abschnitt komplementäre Primer, können definierte DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Nach Hitzedenaturierung bei 94°C können die Primer an komplementäre DNA-Abschnitte binden und dadurch anschließend die hitzestabile Taq-Polymerase diesen Abschnitt amplifizieren. Mit jedem Zyklus aus Denaturierung, Primer-Annealing und Amplifikation werden die gewünschten Abschnitte exponentiell vervielfältigt. Ein Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Ansatz	Menge
gDNA	3 µl
10 × Reaktionspuffer (KCl bzw. NH ₄ (Cl ₂), -MgCl ₂)	5 µl
MgCl ₂ [25mM]	1,5 µl
dNTPs [5 mM]	1 µl
Primer forward [25 µM]	1,5 µl
Primer reverse [25 µM]	1,5 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
H ₂ O	36 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 10: PCR-Ansatz für Genotypisierungen.

Die Dauer und Temperaturen der Reaktionszyklen wurden auf das jeweilige Primerpaar abgestimmt und sind in Abschnitt 2.10, Tabelle 5 aufgeführt. Die PCR-Produkte konnten im Anschluss in einem Agarosegel analysiert werden.

3.3.5 Auftrennung von PCR-Produkten in Agarosegelen

Zur Analyse von PCR-Produkten wurden diese mittels Agarosegel-Elektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Nach Aufkochen von 1% Agarose in 100 ml 1 × TAE-Puffer (w/v) zum Lösen der Agarose wurden 2,5 µl Ethidiumbromid-Lösung zugegeben. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in eine Kammer mit 1 × TAE-Puffer gelegt, die PCR-Ansätze mit je 10 µl 6 × DNA-Auftragspuffer versetzt und aufgetragen. Die DNA wurde bei 100 V für

ca. 30 min aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht werden. Als Größenmarker diente ein 100 bp Größenstandard.

3.3.6 Quantitative *Real-time* PCR

Quantitative Real-time PCRs (qRT-PCRs) ermöglichen es Aussagen über die Menge an Transkripten zu treffen und somit die Expression verschiedener Gene zu analysieren. Bei dieser PCR wird die zur mRNA komplementäre DNA (cDNA) als Matrize eingesetzt. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten qRT-PCRs wurden nach dem Prinzip der *Universal Probe Library* (UPL) von Roche durchgeführt. Neben den für die jeweiligen Gene spezifischen Primer werden den Ansätzen Sonden zugegeben. Diese Sonden aus der UPL sind kurze Oligonukleotide, die eine zufällige Nukleotidsequenz besitzen und am 5'-Ende mit einem Fluorophor am 3'-Ende mit einem Quencher gekoppelt sind, welcher durch die räumliche Nähe zum Fluorophor die Lichtemission verhindert. Nach der Denaturierung der doppelsträngigen cDNA lagern sich die Primer sowie die jeweilige Sequenzspezifische Sonde an. Bei der Amplifikation des DNA-Abschnittes wird der an der Sonde befindliche Quencher durch die Polymerase zerstört, das Fluorophor somit frei und das ausgesendete Fluoreszenzsignal detektiert werden. Durch die Zugabe der sequenzspezifischen Sonde wird die Reaktion nochmals genauer, da nur PCR-Produkte detektiert werden, die durch die spezifischen Primer amplifiziert werden und die Sonde gebunden haben. Die Primer wurden möglichst Intron-übergreifend gelegt, um mögliche Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen.

Ein Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Ansatz	Menge
cDNA (1:100 verdünnt)	5 µl
2 × Dynamo Flash Color Mix	10 µl
Primer left [20 µM]	0,2 µl
Primer right [20 µM]	0,2 µl
UPL Sonde	0,2 µl
H ₂ O	4,4 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 11: Zusammensetzung für einen Ansatz für die quantitative RT-PCR.

Die qRT-PCRs wurden im LightCycler 480 von Roche mit folgendem Programm durchgeführt:

Programm	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	95	15	40
Primer-Annealing	60	60	
Amplifikation	60	15	
Kühlung	40	60	1

Tabelle 12: Programm für die quantitative RT-PCR im LightCycler 480 II.

[Teile des Abschnitts 3.3 wurden aus der Dissertation von Larissa Kistner übernommen (Kistner, 2014)].

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Lysaten aus murinem Gewebe und Zellen für Immunoblot

Alle Arbeitsschritte zur Herstellung von Lysaten aus Gewebe oder Zellen wurden auf Eis bzw. in auf 4°C vorgekühlten Geräten durchgeführt.

Für die Herstellung von Lysaten aus murinem Gewebe wurden ca. 20 mg schockgefrorene Gewebestücke in 2 ml Reaktionsgefäße vorgelegt. Dem Gewebe wurde 100 µl vorgekühlter RIPA-Puffer (mit Protease- und Phosphataseinhibitoren, s. Abschnitt 2.6.2) pro 10 mg Gewebe und eine Metallkugel (Qiagen) zugegeben und im TissueLyzer bei einer Frequenz von 30 Mal/sec für 3 min homogenisiert. Die Homogenisate wurden anschließend 15 min bei 4°C rotiert und danach 15 min bei 14.000 U/min und 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden bei -80°C gelagert.

Die Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen erfolgte aus pelletierten und -80°C gelagerten Zellen (Abschnitt 3.2.3). Die Zellen wurden in je 400 µl vorgekühltem RIPA-Puffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Nach 15-minütigem Rotieren bei 4°C und anschließender Zentrifugation (14.000 U/min, 15 min, 4°C) wurden die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei -80°C aufbewahrt.

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen in Zell- bzw. Gewebelysaten wurden diese zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Lysate wurden zuvor mit 3 × SDS-Puffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. β -Mercaptoethanol im SDS-Probenpuffer reduziert Disulfidbrückenbindungen und das Detergens SDS zerstört hydrophobe Wechselwirkungen in nativen Proteinen und somit deren Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen. Zusätzlich erhalten die Proteine durch das SDS eine stark negative Ladung, wodurch sie während der Elektrophorese zum Pluspol wandern und dabei nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt werden. Die Proteine wurden während der Elektrophorese zunächst in einem großporigen Sammelgel gesammelt und dann im Trenngel aufgetrennt. Je nach Masse des zu analysierenden Proteins wurden die Porengrößen des Gels durch das Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid im Trenngel variiert (s. Tabelle 13). Die Gele wurden in die Elektrophoresekammern eingespannt, diese mit 1 × SDS-Laufpuffer aufgefüllt, und die Lysate direkt nach dem Aufkochen in die Taschen des Sammelgels geladen. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde außerdem der „PageRuler Prestained Protein Ladder“ aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V im Sammelgel, die Auftrennung im Trenngel bei 120 V, bis das Bromphenolblau im SDS-Probenpuffer den unteren Rand des Trenngels erreicht hatte.

Zusammensetzung	Trenngel		Sammelgel
Gel-Menge	5 ml/Gel		2 ml/Gel
Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration	8 %	10 %	5 %
Proteingröße [kDa]	70 – 130	30 – 70	
ddH ₂ O	2,3 ml	1,9 ml	1,4 ml
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	1,3 ml	1,7 ml	0,33 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml	-
1 M Tris/HCl, pH 6,8	-	-	250 μ l
10 % SDS	50 μ l	50 μ l	20 μ l
10 % APS	50 μ l	50 μ l	20 μ l
TEMED	3 μ l	2 μ l	2 μ l

Tabelle 13: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele.

3.4.3 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blot)

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte in einer Semi-dry Elektrophorese-Apparatur (Bio-Rad, München). Dazu wurden zunächst für je ein Gel 4 Whatman-Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran (zugeschnitten auf die Größe des

SDS-Gels) in 1 × Transferpuffer equilibriert. Die Membran wurde auf zwei Whatman-Filterpapiere gelegt, das SDS-Gel darauf geschichtet und mit zwei weiteren Whatman-Filterpapieren abgedeckt. Eventuell vorhandene Luftblasen zwischen den Schichten wurden vorsichtig entfernt. Der Transfer erfolgte bei 2 mA/cm² Membranfläche für 60 min, bei dem die Proteine in Richtung Anode wandern und auf der Membran durch ionische Wechselwirkungen adsorbieren. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau-S Lösung reversibel gefärbt, um den Erfolg des Transfers zu überprüfen.

3.4.4 Immunochemische Detektion spezifischer Proteine (Immunoblot)

Die Detektion der Proteine erfolgte indirekt. Nach einstündiger Inkubation der Membran mit 5 % Milch bzw. BSA (w/v) in TBS-T bei RT wurden zunächst die gesuchten Proteine mit Antigen-spezifischen Primärantikörpern inkubiert, und dieser im nächsten Schritt mit Spezies-spezifischen Sekundärantikörpern, die mit der Meerrettichperoxidase konjugiert sind, detektiert. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte ü. N. bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T bei RT wurden die Membranen mit den Sekundärantikörpern für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Inkubations- und Waschschrte erfolgten unter leichtem Schwenken. Nach erneutem Waschen konnten die Proteine durch die gebundenen Antikörper mit dem ECL-Reagenz detektiert werden. Die Meerrettichperoxidase katalysiert die Oxidation von, in dem Reagenz enthaltenem, Luminol, wobei Energie in Form von Chemolumineszenz frei wird, die wiederum mit Röntgenfilm detektiert werden kann. Dazu wurde die ECL-Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membranen für ca. 1 min bei RT damit umspült. Anschließend wurden die Membranen in eine Klarsichtfolie gelegt und im Dunkeln die Chemolumineszenzsignale durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert. Die Signale auf den Röntgenfilmen wurden mit Hilfe einer Entwicklermaschine sichtbar gemacht. Anschließend konnten das ECL-Reagenz und die Antikörper durch Inkubation mit 1 × ReBlot™ Plus Mild für 20 min bei RT entfernt und weitere Proteine auf der Membran durch erneute Inkubation mit Antikörpern detektiert werden.

[Teile dieses Abschnitts 3.4 wurden aus der Dissertation von Karin Fehlner übernommen (Fehlner, 2014)].

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Einbetten von Organen und Anfertigen von Gefrierschnitten

Versuchstieren entnommene Organe wurden in TissueTek (Sakura Finetek, Staufen) eingebettet und umgehend bei -80°C eingefroren und gelagert. Zum Anfärben des Gewebes wurden zunächst $6\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte an einem Kryostat (Leica, Wetzlar) angefertigt und auf SuperFrost® Objektträger übertragen. Die luftgetrockneten Schnitte wurden direkt im Anschluss für Immunfluoreszenz- bzw. Hämatoxylin- und Eosin-(HE-)Färbungen eingesetzt.

3.5.2 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE-Färbung) von Gefrierschnitten

Zur histologischen Untersuchung von murinem Gewebe wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Hämatoxylin färbt den Zellkern blau, durch Eosin wird Zytoplasma rosa gefärbt. Zunächst wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten für 1 min in 4 % Formalin fixiert. Nach einem Waschschrift mit ddH₂O wurden die Schnitte zuerst 5 min mit Hämatoxylin inkubiert und anschließend 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Im zweiten Färbeschritt wurden die Schnitte für 1 min mit Eosin inkubiert und erneut gewaschen. Daraufhin wurden die Objektträger nacheinander kurz mit 70%, 96% und 2 Mal mit 100% Ethanol inkubiert, um das Gewebe zu dehydrieren. Der Ethanol wurde durch kurzes Eintauchen in Xylol verdrängt und in Eukitt eingebettet.

3.5.3 Immunfluoreszenz-Färbung von Gefrierschnitten

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die frisch angefertigten Schnitte auf den Objektträgern zunächst mit einem hydrophoben Markerstift (Pap Pen, Kisker Biotech, Steinfurt) umrandet. Alle folgenden Wasch- und Färbeschritte erfolgten in einer „feuchten Kammer“, um das Austrocknen der Gewebe zu vermeiden. Die Schnitte wurden mit vorgewärmten 3%igen PFA für 20 min bei RT fixiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurde das Gewebe mit 0,1% TritonX-100 in PBS (v/v) permeabilisiert, wenn intrazelluläre Proteine detektiert werden sollten. Beim Anfärben von Oberflächenproteinen entfiel dieser Schritt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden unspezifische Bindestellen mit 2% BSA in PBS (w/v) für 20 min blockiert. Anschließend wurde der Antigen-spezifische Primärantikörper in 2% BSA in PBS auf das Gewebe gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden daraufhin erneut gewaschen und der Spezies-spezifischen und Fluoreszenz-markierten

Sekundärantikörper (in 2% BSA in PBS) zugegeben. Gleichzeitig wurden Zellkerne mit DAPI gefärbt. Die Inkubation erfolgte erneut für 1 h bei RT im Dunkeln. Gleichzeitig wurde ein Gewebeschnitt nur mit dem Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt, um die Spezifität der Färbungen zu überprüfen. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Schnitte in Gelatine eingedeckelt. Die Begutachtung und Auswertung der Färbungen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Zeiss, Jena).

3.5.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Nachweis von IL-6 nach TLR-Stimulation von Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen oder murinen Zelllinien (s. Abschnitt 3.2.3) im Zellkulturüberstand erfolgte mit dem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Dabei wird das nachzuweisende Protein durch einen Antigen-spezifische Antikörper (*capture antibody*) an eine Mikrotiterplatte gebunden. Nachdem das gesuchte Protein daran gebunden hat, wird ein zweiter Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des gesuchten Proteins gerichtet ist (*detection antibody*), zugegeben. Der *detection antibody* ist mit einem Enzym gekoppelt, welches nach Zugabe des zugehörigen Substrates einen Farbumschlag hervorruft und der wiederum spektrophotometrisch detektiert werden kann.

Die Versuche mit Zellkulturüberständen wurden mit dem IL-6 Quantikine-ELISA-Kit der Firma R&D nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Waschschriffe wurden mit einem HydroFlex-Mikrotiterplatten-Waschgerät durchgeführt. Die Detektion des Farbumschlags bei 450 nm und die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Lesegerätes MithrasLB 940.

[Teile dieses Abschnitts wurden aus der Dissertation von Larissa Kistner übernommen (Kistner, 2014)].

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism®, Version 5.00. Alle Daten sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwerte \pm SD (*standard deviation*, Standardabweichung) dargestellt. Normalverteilte Messdaten wurden mit Hilfe des ungepaarten T-Tests, nicht-normalverteilte Daten mit dem Mann-Whitney-Test ausgewertet. Der Fisher's exact T-Test wurde mit dem Programm GraphPad InStat 3.1 durchgeführt. Daten

sind als signifikant bezeichnet worden, wenn die Zufallswahrscheinlichkeit für die erhaltenen Ergebnisse unter 5 % lag. Es wurden folgende Definitionen festgelegt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; *** = $p < 0,0001$.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung eines Mausmodells mit zelltypspezifischer Expression von *Myd88*

Grundlage der vorliegenden Arbeit war die Züchtung eines Mausmodells, das eine zelltypspezifische Ausprägung des Immunadapter-Proteins *Myd88* ermöglicht. Mit Hilfe dieses Modells sollte untersucht werden, ob eine globale MyD88-Defizienz tumorfördernde oder tumorhemmende Auswirkungen hat. Des Weiteren erlaubt das Modell durch Cre/LoxP-vermittelte gewebespezifische Expression die Klärung der Frage, welche Zellen an der intestinalen Karzinogenese entscheidend beteiligt sind. Hier sollten, basierend auf Vorbefunden, im Speziellen die intestinalen Epithelzellen (IECs) und Makrophagen analysiert werden.

Für die Zucht wurde das MyD88 *lox stop lox*-Modell (MyD88^{LSL}) herangezogen (Gais *et al.*, 2012). Durch eine sogenannte *Intron-gene-trap*, welche zwischen Exon 1 und Exon 2 im Genlocus *Myd88* stabil inseriert ist, wird die Transkription des Gens inaktiviert (s. Einleitung, Abb. 8). Die *Intron-gene-trap* ist mit loxP-DNA-Motiven flankiert, die das Entfernen der Kassette durch homologe Rekombination ermöglichen. Für die zelltypspezifische Re-Expression von *Myd88* wurden MyD88^{LSL}-Mäuse mit pvillin-Cre-Tieren verpaart (el Marjou *et al.*, 2004). Dieses transgene Mausmodell exprimiert die Cre Rekombinase unter Aktivität des pvillin-Promoters und somit ausschließlich im Darmepithel. Verpaarung der beiden Linien führt zur Expression der Cre in IECs, wo die *Intron-gene-trap* im *Myd88*^{LSL}-Allel vollständig und irreversibel entfernt und *Myd88* re-exprimiert wird (MyD88^{LSL} × pvillinCre → MyD88^{IEC}; Abb. 10 A). Parallel dazu wurden MyD88^{LSL}-Tiere mit LysM-Cre-Mäusen verpaart, in denen Cre in myeloiden Immunzellen exprimiert wird (Goren *et al.*, 2009), was die Re-Expression von *Myd88* in der myeloiden Linie (hauptsächlich Makrophagen) zur Folge hat (MyD88^{MYEL}). MyD88-Defizienz bzw. –Re-Expression wurden sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene untersucht, um die Funktionalität des Systems experimentell zu überprüfen.

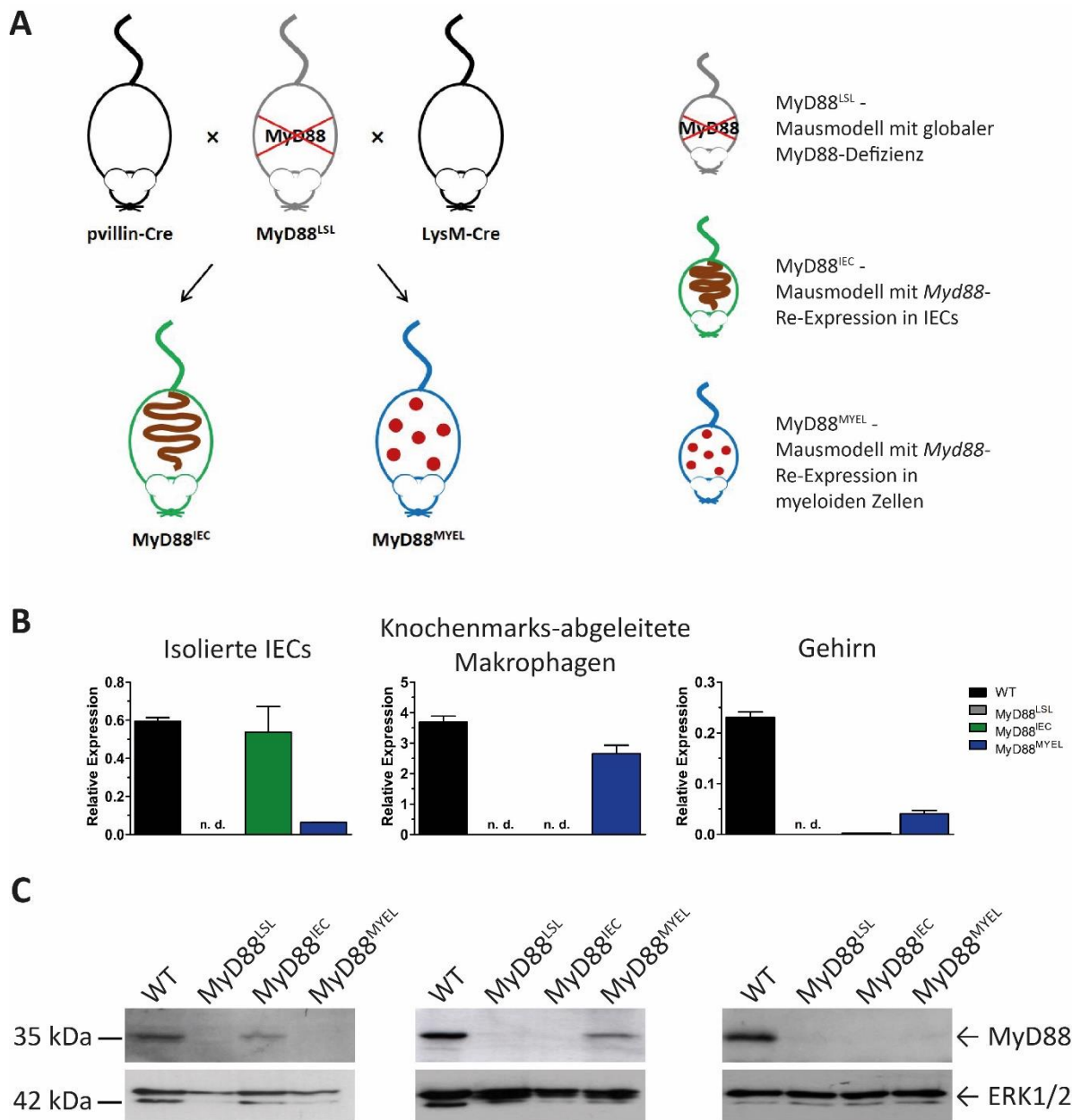


Abb. 10: Generierung eines Mausmodells zur zelltypspezifischen Myd88-Expression. (A) Schematische Darstellung zur Generierung der Mauslinien mit zelltypspezifischer Expression von Myd88 in intestinalen Epithelzellen (IECs) bzw. myeloiden Immunzellen. **(B)** Zur Untersuchung der Myd88-Expression wurde mRNA aus IECs, Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen und Gehirngewebe isoliert, in cDNA übersetzt und mit qRT-PCR quantifiziert. Als Referenztranskript diente TF2D. Die Menge der cDNA wurde auf die Myd88 Expression in der Milz von Wildtyp-Mäusen normalisiert. $N \geq 3$ pro Mauslinie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD, n.d.: nicht detektierbar. **(C)** Western Blot für das MyD88 Protein in isolierten IECs, Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen und Gehirn bei 35 kDa. Zur Überprüfung der Gesamtproteinmengen wurden die Membranen anschließend mit einem spezifischen Antikörper gegen die MAPK ERK1/2 (42/44 kDa) gefärbt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel. Abk.: WT – Wildtyp.

4.1.1 Zelltypspezifische Expression von Myd88 im Mausmodell

Die relative Menge an *Myd88*-Transkripten wurde mit quantitativer RT-PCR untersucht. Es wurden IECs und Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen aus Wildtyp- (WT), MyD88^{LSL}-, MyD88^{IEC}- und MyD88^{MYEL}-Mäusen isoliert bzw. *ex vivo* generiert, daraus RNA isoliert und in

cDNA transkribiert. Gehirngewebe aus den vier Mauslinien diente hier als Kontrolle. In isolierten IECs konnten *Myd88*-Transkripte in Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 10 B, links). In *MyD88^{LSL}*-IECs wurde erwartungsgemäß keine *MyD88*-cDNA detektiert. In IECs aus *MyD88^{IEC}*-Mäusen, die eine Re-Expression im Darmepithel aufweisen sollen, wurden *MyD88*-Transkripte in Wildtyp-IECs vergleichbaren Mengen gemessen. *MyD88^{MYEL}*-IECs zeigten dagegen sehr geringe, jedoch wiederholt nachweisbare Mengen an *MyD88*-cDNA. Dies ist vermutlich auf das natürliche Vorhandensein von myeloiden Immunzellen im Darm zurückzuführen, die während der IEC-Isolation ebenfalls aufgereinigt wurden. In Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen wurden *Myd88*-Transkripte in Zellen aus Wildtyp-, sowie aus *MyD88^{MYEL}*-Mäusen in vergleichbaren Mengen detektiert (Abb. 10 B, Mitte). In Makrophagen aus *MyD88^{LSL}*- und *MyD88^{IEC}*-Tieren konnte dagegen keine cDNA von *Myd88* nachgewiesen werden. Im Gehirn, das hier als Kontrolle diente, wurden *Myd88*-Transkripte lediglich in Wildtyp-Gewebe nachgewiesen (Abb. 10 B, rechts). Auch hier konnte *MyD88* nicht im Gewebe aus *MyD88^{LSL}*-Tieren detektiert werden, was die Funktionalität der eingefügten „Stop“-Kassette belegt. Die *Myd88*-cDNA lag in Gehirnen von *MyD88^{IEC}*-Tieren an der Nachweisgrenze. In *MyD88^{MYEL}*-Tieren wurden geringe Mengen an cDNA reproduzierbar amplifiziert. Diese schwache Re-Expression von *Myd88* im Gehirn von *MyD88^{MYEL}*-Tieren ist vermutlich auf physiologisch vorkommende Mikroglia-Zellen zurückzuführen, Nervengewebs-spezifische Immunzellen, in denen ebenfalls der LysM-Promoter aktiv ist.

MyD88-Defizienz und gewebespezifische Re-Expression konnten ebenso auf Proteinebene mit Western Blot bestätigt werden. Das *MyD88* Protein wurde in IECs in Wildtyp- und *MyD88^{IEC}*-Tieren detektiert, nicht aber in Epithelzellen aus *MyD88^{LSL}*- und *MyD88^{MYEL}*-Mäusen (Abb. 10 C, links). Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen aus Wildtyp- und *MyD88^{MYEL}*-Tieren enthielten erwartungsgemäß das *MyD88* Protein; in guter Übereinstimmung mit der mRNA-Expression konnte kein Protein in den Immunzellen aus *MyD88^{LSL}*- und *MyD88^{IEC}*-Tieren nachgewiesen werden (Abb. 10 C, Mitte). In Gehirnen war das Protein nur in Wildtyp-Tieren vorhanden, in Geweben von *MyD88^{LSL}*-, *MyD88^{IEC}*- und *MyD88^{MYEL}*-Tiere wurde das Protein nicht detektiert (Abb. 10 C, rechts). *MyD88*-Protein im Gehirn von *MyD88^{MYEL}*-Tieren konnte trotz der oben aufgeführten schwachen mRNA-Expression nicht nachgewiesen werden.

4.1.2 Wiederherstellung MyD88-abhängiger Signalwege in intestinalen Epithelzellen bzw. Makrophagen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl mRNA als auch Protein von *Myd88* in IECs bzw. Makrophagen re-exprimiert wird, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die MyD88-abhängigen Signalwege wiederhergestellt sind.

4.1.2.1 Wiederherstellung des MyD88-abhängigen TLR2-Signalwegs in intestinalen Epithelzellen

Zur Untersuchung, ob MyD88-abhängige Signalwege nach der Re-Expression wieder funktionell sind, wurden isolierte IECs *in vitro* mit Pam3Cys (P_3C) behandelt. P_3C ist Ligand für TLR2, der ausschließlich an den Adapter MyD88 bindet und auf MyD88 zur Signalweiterleitung angewiesen ist. Nach einstündiger Behandlung mit P_3C *in vitro* wurden die IECs geerntet, um RNA zu isolieren und die Expression von in der Literatur beschriebenen TLR-Zielgenen mittels qRT-PCR zu untersuchen. Die Expression von *Tnf* ($TNF\alpha$) in IECs aus Wildtyp-Mäusen war nach P_3C -Stimulation leicht erhöht im Vergleich zu unbehandelten IECs (Abb. 11). Ebenso wurde *Tnf*-Expression in Epithelzellen aus MyD88^{IEC}-Mäusen induziert. In MyD88-defiziente IECs aus MyD88^{LSL}- und MyD88^{MYEL}-Tieren hingegen scheint sich die Menge an *Tnf*-Transkripten nach TLR2-Stimulation zu verringern. Nach einstündiger Stimulation der IECs ist die Expression von *Tnf* in MyD88^{LSL}- und MyD88^{MYEL}-Tieren signifikant verringert verglichen mit Ergebnissen aus Wildtyp-IECs. Zwischen Wildtyp- und MyD88^{IEC}-Zellen konnte hier kein signifikanter Unterschied bestimmt werden ($p = 0,3259$).

Neben $TNF\alpha$ wurden auch die Transkription der Gene *Interleukin-6 (Il6)*, *Cxcl1* und *Cxcl2* nach TLR2-Stimulation untersucht. In eigenen Vorarbeiten an humanen Darmzelllinien konnte diese Zytokine als TLR-Zielgene beschrieben werden (Gros, 2014). In murinen IECs wurden jedoch keine Transkripte von *Il6*, *Cxcl1* und *Cxcl2* detektiert.

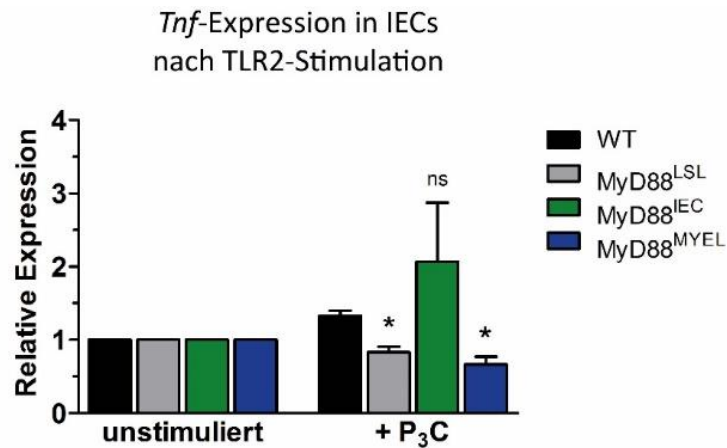


Abb. 11: *Tnf*-Expression in isolierten intestinalen Epithelzellen nach TLR2-Stimulation. Zur Überprüfung der Wiederherstellung MyD88-abhängiger Signalwege in Darmepithelzellen wurden von jeder Mauslinie IECs ($n \geq 2$ Mäuse pro Linie) isoliert und anschließend mit Pam3Cys (P_3C) als Ligand für TLR2 in vitro über 1 h stimuliert. Nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wurde die Expression von *Tnf* als TLR2-Zielgen mittels RT-PCR quantifiziert. Als Referenztranskript diente TF2D. Die Daten wurden auf unstimulierte Zellen normalisiert (unstimulierte Zellen entsprechen dem Wert 1,0). Für die statistische Analyse wurden die Expressionswerte von *Tnf* nach Stimulation aus MyD88^{LSL}-, MyD88^{IEC}- bzw. MyD88^{MYEL}-Zellen auf die Werte aus Wildtyp-Zellen bezogen. Abk.: WT – Wildtyp.

4.1.2.2 Wiederherstellung MyD88-abhängiger Signalwege in Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen

Zur Überprüfung MyD88-abhängiger Signalwege in Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen bestanden verschiedene experimentelle Nachweismöglichkeiten. Zunächst wurde hier die Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalweges untersucht. MyD88 leitet Signale von den Rezeptoren ins Zellinnere weiter, wo zum einen *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) aktiviert werden, zum anderen das Freiwerden von NF- κ B von dessen Inhibitor *inhibitor of kappa B subunit alpha* ($I\kappa B\alpha$) induziert wird (Kawai and Akira, 2010). NF- κ B ist in unstimulierten Zellen im Zytosol an $I\kappa B\alpha$ gebunden, der Kernimport wird dadurch gehemmt. Aktivierung des Signalweges führt zur Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$ und dessen proteolytischem Abbau. NF- κ B wird frei und kann in den Zellkern translozieren. TLR4 ist der einzige TLR, der neben MyD88 auch TRIF als Adapterprotein nutzt. Der TRIF-abhängige Signalweg induziert neben NF- κ B auch Typ-I-Interferone (Kawai and Akira, 2010). Die Phosphorylierung und der Abbau von $I\kappa B\alpha$ kann dabei experimentell über Western Blot-Analysen nachverfolgt werden. Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen aus Wildtyp-, MyD88^{LSL}- und MyD88^{MYEL}-Mäusen wurden nach der *ex vivo* Generierung zu gleichen Mengen auf Zellkulturschalen ausgebracht und 24 h später mit Lipopolysaccharid (LPS) als TLR4-Ligand über verschiedene Zeitspannen behandelt, die Zellen anschließend gerntet und Proteine mittels Immunoblot analysiert.

Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen aus allen drei Maus-Linien zeigten kaum phosphoryliertes $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) im unstimulierten Zustand (gekennzeichnet als „--“, siehe Abb. 12 A), und gleichzeitig große Mengen an $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ Gesamtprotein. Das deutet darauf hin, dass der NF- κ B-Signalweg im unstimulierten Zustand weitgehend inaktiv ist. In Wildtyp-Makrophagen wurde bereits nach 5 min LPS-Stimulation deutlich phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ detektiert (Abb. 12 A, links). Die Menge an phosphoryliertem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nahm nach 10 min wieder deutlich ab. 30 min nach LPS-Zugabe wurde eine Abnahme von Gesamt- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ Protein deutlich, mutmaßlich aufgrund des in der Literatur gut dokumentierten proteolytischen Abbaus des Proteins nach dessen Phosphorylierung. Nach 60 min nahm die Menge an $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ wieder leicht zu. Auch die Menge an phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ist leicht erhöht, was vermutlich auf die zuvor beschriebene verzögerte Aktivierung von NF- κ B über den TRIF-abhängigen Signalweg nach TLR4-Aktivierung zurückzuführen ist, der auch in MyD88-defizienten Tieren noch funktionsfähig ist. In MyD88-defizienten Makrophagen aus MyD88^{LSL}-Tieren konnte innerhalb der ersten 30 min nach LPS-Zugabe keine Zunahme von phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nachgewiesen werden (Abb. 12 A, Mitte). Zwar scheint die Proteinmenge von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ abzunehmen, allerdings ist dies vermutlich auf vermindertes Gesamt-Protein in den Proben zurückzuführen, da auch α -Tubulin als Beladungskontrolle deutlich reduziert ist. Nach 60-minütiger LPS-Stimulation ist auch hier, wie in Wildtyp-Makrophagen, eine Zunahme an phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ zu beobachten. Dies ist vermutlich auf die MyD88-unabhängige Aktivierung von NF- κ B über den Adapter TRIF zurückzuführen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die erhöhten Mengen an p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ durch erhöhte Gesamt-Proteinmengen hervorgerufen wurde (vgl. Beladungskontrolle α -Tubulin). In Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen aus MyD88^{MYEL}-Tieren ist bereits 5 min nach LPS-Zugabe eine deutliche Zunahme von phosphoryliertem $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ zu beobachten (Abb. 12 A, rechts), vergleichbar mit den Ergebnissen aus Wildtyp-Makrophagen. Gleichzeitig nahm die Menge an Gesamt- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ab. Nach einer Stunde ist wie zuvor schon phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ im Western Blot detektierbar, möglicherweise wie bereits aufgeführt durch TRIF hervorgerufen.

Zusammenfassend wurde beobachtet, dass die Mengen an phospho- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ bei intaktem MyD88-Signalweg (Wildtyp und MyD88^{MYEL}) 5 min nach TLR4-Stimulation deutlich zunahm, während die Menge an Gesamt- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ abnahm. In MyD88^{LSL}-Makrophagen konnte zum gleichen Zeitpunkt keine Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ detektiert werden. In allen drei genetischen Maus-Modellen erfolgte Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ nach 60-minütiger LPS-

Stimulation, was vermutlich auf eine Induktion von NF- κ B durch den zweiten, MyD88-unabhängigen Signalweg zurückzuführen ist.

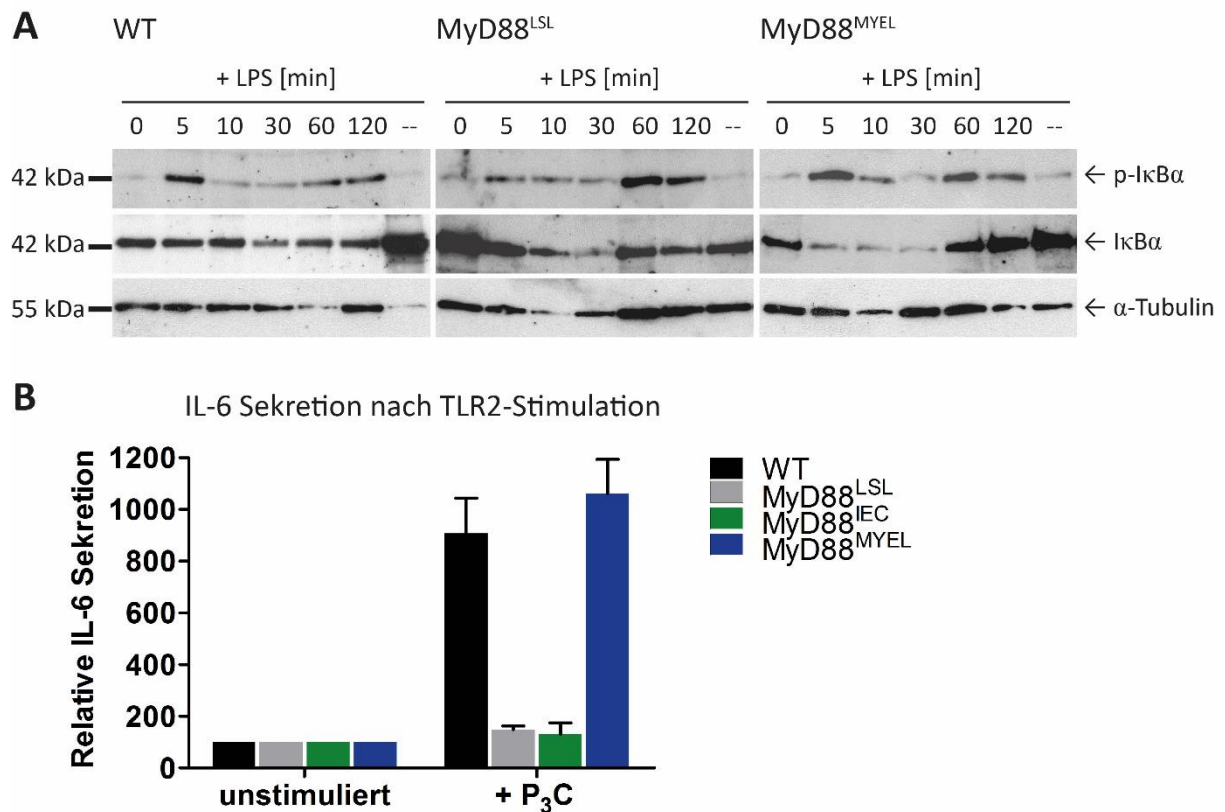


Abb. 12: Wiederherstellung MyD88-abhängiger Signalwege in Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen. (A) Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen aus Wildtyp- (WT), MyD88^{LSL}- und MyD88^{MYEL}-Mäusen wurden vor der Stimulation geerntet (unstimuliert, gekennzeichnet als „--“) bzw. in vitro mit 1 μ g/ml LPS stimuliert und nach entsprechend angegebenen Zeitpunkten geerntet. Proteinlysate dieser Zellen wurden über Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen phospho-I κ B α (42 kDa), Gesamt-I κ B α (42 kDa) und α -Tubulin als Ladekontrolle (55 kDa) analysiert. Jeweils ein repräsentatives Beispiel ist dargestellt. (B) Nach Stimulation von Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen in vitro mit Pam3Cys (P₃C) über 24 h wurden die Überstände abgenommen und mit ELISA die Konzentration von sekretiertem IL-6 bestimmt. Angegeben sind die relativen Mengen an IL-6 normalisiert auf unstimulierte Zellen (entspricht 100). N \geq 3 pro Mauslinie.

Eine weitere Möglichkeit, um die Wiederherstellung des MyD88-abhängigen Signalwegs in Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen zu untersuchen, ist die Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. Im Speziellen wurde in der vorliegenden Arbeit die Sekretion des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) in den Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen aus den vier verschiedenen Mauslinien (Wildtyp, MyD88^{LSL}, MyD88^{IEC} und MyD88^{MYEL}) wurden über 24 h mit dem TLR2-Liganden P₃C behandelt. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und die Menge an IL-6 gemessen. Wildtyp-Zellen sezernierten nach Zugabe von P₃C eine um ca. 900-fach erhöhte Menge IL-6 ins Medium (Abb. 12 B). MyD88-defiziente Makrophagen aus MyD88^{LSL}- und MyD88^{IEC}-Tieren sezernierten

nach 24-stündiger P₃C-Behandlung vergleichbare geringe Mengen an IL-6 wie unstimulierte Zellen. Nach Re-expression von *Myd88* in myeloiden Zellen von MyD88^{MYEL}-Mäusen wurde ein Anstieg der IL-6 Sekretion um die 1000-fache Menge gemessen, vergleichbar zu Wildtyp-Zellen.

4.1.3 Unterschiede in der *Myd88*- und TLR-Expression in Abhängigkeit vom Zelltyp

Die Untersuchung von MyD88-abhängigen Signalwegen in intestinalen Epithelzellen gestaltet sich aufgrund ihrer kurzen Überlebensdauer der IECs *ex vivo* schwierig, wie die oben aufgeführten Versuche zeigten. Hinzu kommt, dass TLRs im Darmepithel in der Regel in geringen Mengen exprimiert sind, vermutlich um eine überschießende Immunreaktion gegenüber den kommensalen Darmbakterien zu vermeiden (Marques and Boneca, 2011). Viele TLRs sind auf Zellen in den Krypten exprimiert, möglichst weit entfernt vom Darmlumen, Epithelzellen in den Villi hingegen exprimieren nur sehr wenig TLRs. TLRs sind zudem meist auf der basolateralen, dem Darmlumen abgewandten Seite der Zellen, oder gar intrazellulär in Vesikeln lokalisiert. Aufgrund dessen sollte im Folgenden überprüft werden, ob MyD88 sowie vor allem welche verschiedenen TLRs überhaupt in IECs und Makrophagen exprimiert sind, und ob MyD88-Defizienz einen Einfluss auf deren Expression hat. Dazu wurde RNA aus unstimulierten isolierten IECs und Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen isoliert und die Transkripte von *Myd88*, den MyD88-abhängigen TLR2, -4, -5 und -9, sowie dem MyD88-unabhängigen TLR3 mittels qRT-PCR untersucht. *Myd88* ist sowohl im Darmepithel als auch in Makrophagen von Wildtyp-Tieren (graue Symbole) ausgeprägt (Abb. 13, oben links). Die durchschnittliche relative Expression von *Myd88* ist in Makrophagen höher als in IECs. In Zellen aus MyD88^{LSL}-Tieren wurden sowohl in IECs als auch in Makrophagen *Myd88*-Transkripte in geringsten Mengen detektiert (rot), entsprechend den oben bereits beschriebenen Befunden (vgl. Abb. 10 B). Der Unterschied zwischen Wildtyp- und MyD88^{LSL}-IECs war annähernd signifikant ($p = 0,0902$), die Menge *Myd88*-Transkripten in Makrophagen unterschied sich signifikant. Die MyD88-abhängigen TLRs 2 und 9 sind in nur sehr geringen Mengen in IECs vorhanden, unabhängig von der *Myd88*-Expression. Es wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert (TLR2 $p = 0,5586$; TLR9 $p = 0,1383$). TLR4-Transkripte konnten in den isolierten IECs beider Mausmodelle nicht detektiert werden. Die TLRs 2, 4 und 9 werden dagegen in Makrophagen in relativ großen Mengen ausgeprägt. Die durchschnittliche Expression der Rezeptoren scheint dabei in MyD88^{LSL}-Zellen etwas

verringert zu sein im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (TLR2 $p = 0,2967$; TLR9 $p = 0,2754$), die TLR4-Expression ist in MyD88-defizienten Makrophagen signifikant verringert verglichen mit Wildtyp-Makrophagen. TLR5 hingegen ist deutlich stärker in IECs als in Makrophagen exprimiert. Hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und MyD88^{LSL}-Zellen erreicht (IECs $p = 0,4199$; Makrophagen $p = 0,0821$). TLR3, als einziger MyD88-unabhängiger TLR, konnte im Darmepithel von Wildtyp- und MyD88^{LSL}-Mäusen in vergleichbaren Mengen detektiert werden ($p = 0,6824$). MyD88-defiziente Makrophagen zeigten signifikant verringerte Mengen an TLR3-Transkripten verglichen mit Wildtyp-Makrophagen.

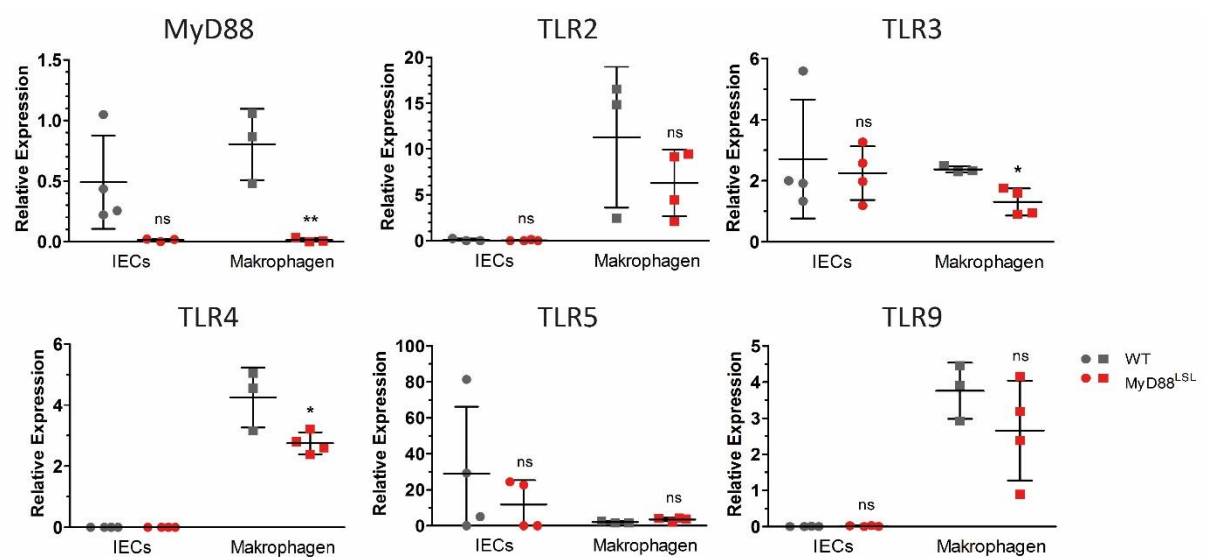


Abb. 13: Expression von Myd88 und verschiedenen TLRs in Abhängigkeit vom Zelltyp. Wildtyp- und MyD88^{LSL}-Mäusen wurden IECs aus Dünndarm isoliert und Makrophagen ex vivo aus Knochenmarkszellen abgeleitet. An den unstimulierten Zellen wurde die Expression von Myd88 überprüft. Gleichzeitig wurde analysiert, inwiefern sich die Ausprägung verschiedener TLRs in den unterschiedlichen Zelltypen unterscheidet und ob Myd88-Defizienz Einfluss auf die Expression von MyD88-abhängiger TLRs (TLR2, TLR4, TLR5 und TLR9), sowie teilweise und ganz MyD88-unabhängiger TLRs (TLR4 bzw. TLR3) hat. Die Expression auf Transkriptebeine wurde mittels qRT-PCR ermittelt, als Referenztranskript diente TF2D. Die Werte wurden auf Milz aus Wildtyp-Mäusen normalisiert. $N \geq 3$ pro Mauslinie. Abk.: WT – Wildtyp.

4.1.4 Einfluss von MyD88 auf den Allgemeinzustand der Versuchstiere

Nach Überprüfung der MyD88-Defizienz bzw. –Re-Expression sollte im Folgenden dessen Einfluss auf den Allgemeinzustand der Tiere beobachtet werden. Da die Mäuse im SOPF-Bereich des ZPFs am Klinikum rechts der Isar gezüchtet und gehalten wurden und somit Pathogen-frei sind, konnten trotz des Immundefekts keinen Erkrankungen oder Infektionen an den Tieren beobachtet werden. Entwicklung und Wachstum, sowie die Lebensdauer und Fertilität der Tiere waren unverändert und vergleichbar zu Wildtyp-Tieren (genetischer Hintergrund C57Bl/6N). Diese Befunde stehen in guter Übereinstimmung zu publizierten Vorbefunden zu Mauslinien mit globaler *Myd88*-Defizienz (*Knock-out*) (Adachi *et al.*, 1998). Zur genaueren Charakterisierung der Tiere wurde ihnen Blut entnommen und am Institut für Klinische Chemie und Hämatologie der TUM mittels Durchflusszytometrie analysiert (sog. „Kleines Blutbild“). In der Anzahl von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten sowie bei der Menge an Hämoglobin und dem Hämatokrit-Wert wurden keine Unterschiede zwischen den Modellen festgestellt ($n \leq 2$ pro Gruppe, Daten nicht gezeigt).

4.1.4.1 Einfluss der *Myd88*-Defizienz bzw. –Re-Expression auf die Darmhistologie

Um die Rolle von MyD88 der Entstehung intestinaler Läsionen in Mäusen beurteilen zu können, musste zunächst untersucht werden, ob MyD88 bereits im gesunden Darm Einfluss auf dessen Morphologie nimmt. Dazu wurden aus jedem Modell (Wildtyp, MyD88^{LSL}, MyD88^{IEC} und MyD88^{MYEL}, $n = 3$ Mäuse pro Modell) Dünndarmgewebe und Kolon entnommen, in Tissue Tek eingebettet und 6 μm dünne Gefrierschnitte angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) von Anja Conrad (AG Janssen) angefärbt, um eine histologische Begutachtung zu ermöglichen. Da die folgenden Untersuchungen der vorliegenden Arbeit an Dünndarmgewebe durchgeführt wurden, soll hier näher darauf eingegangen werden. In Abbildung 14 ist je ein repräsentatives Beispiel der vier Modelle dargestellt. Die hier abgebildeten Gewebe aus Wildtyp- und MyD88^{MYEL}-Tieren stammen aus dem Dünndarm (Jejunum). Die Villi sind typischerweise elongiert und fingerförmig (\times), die darunterliegende Muskulatur relativ dünn ausgeprägt (Stern). Im direkten Vergleich der Gewebe aus den beiden Mäusen sind keine Unterschiede zu erkennen, die etwa auf Immunzellinfiltrate, Entzündungsprozesse oder Neoplasien schließen lassen. Das Dünndarmgewebe von MyD88^{LSL}- und MyD88^{IEC}-Tieren ist aus dem weiter distal gelegenen Ileum-Abschnitt

entnommen. Die Villi sind hier etwas kürzer und die Muskelschicht etwas stärker ausgestaltet. Auch hier sind im direkten Vergleich der beiden Gewebeproben keine Unterschiede festzustellen. Auch in den untersuchten Kolongeweben sind keine Auffälligkeiten zu beobachten gewesen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keine Veränderungen im Normalgewebe zu beobachten waren, die MyD88-Expression bzw. –Defizienz im Darmepithel demnach keinen Einfluss auf die Histologie des Darmtrakts hat.

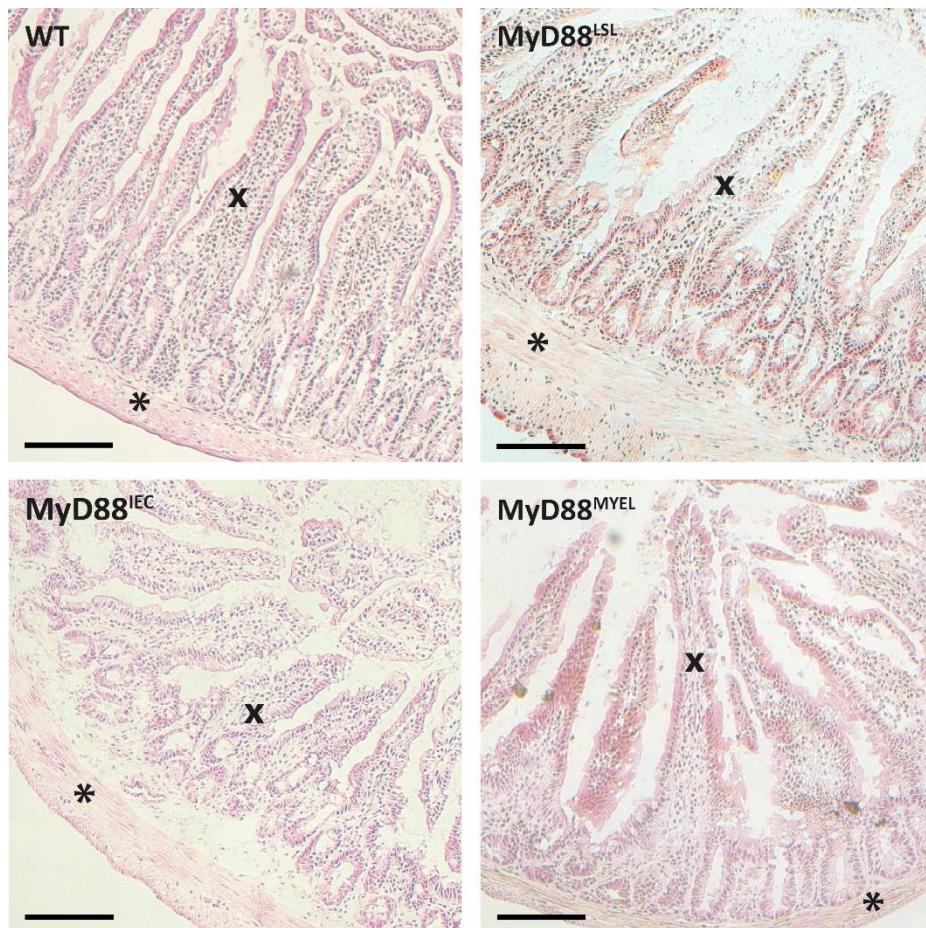


Abb. 14: Einfluss von MyD88 auf die Dünndarm-Histologie. Hämatoxylin-Eosin-(HE) Färbungen von normalem Darmgewebe aus einer Wildtyp- (WT), MyD88-defizienten (MyD88^{LSL}), MyD88^{IEC}- und MyD88^{MYEL}-Maus. Die Schnitte wurden von Jejunum (MyD88^{LSL} und MyD88^{IEC}) bzw. Ileum (WT und MyD88^{MYEL}) angefertigt. Die Villi (x) und das Bindegewebe (Stern) weisen keine morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Modellen auf. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m.

4.2 Die Rolle von MyD88 im Apc^{1638N}-induzierten Darmtumormodell

Für die Identifizierung der Rolle von *Myd88* bei der intestinalen Karzinogenese *in vivo* wurden die zuvor generierten Mauslinien MyD88^{LSL}, MyD88^{IEC} und MyD88^{MYEL} (vgl. Abschnitt 4.1) mit einem Apc^{1638N/+}-Mausmodell verpaart. Apc^{1638N/+}-Mäuse tragen eine heterozygote Mutation im Gen *adenomatous polyposis coli* (*Apc*) an Aminosäure-Position 1638 des codierten Proteins (Fodde *et al.*, 1994). Kommt es zum spontanen Verlust des Wildtyp-Allels (*loss of*

heterozygosity, LOH) in Zellen des Darmepithels und wird nur noch das Apc^{1638N} -Allel exprimiert, so führt dies zu einer aberranten Aktivierung des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalwegs. Dies führt zu unkontrollierter Teilung intestinaler Epithelzellen, die wiederum Adenome oder invasive Karzinome ausbilden können. Die Züchtung der $Apc^{1638N/+}$ -Tiere mit globaler MyD88-Defizienz, bzw. zelltypspezifischer Re-Expression erfolgte wie in Abbildung 15 schematisch dargestellt.

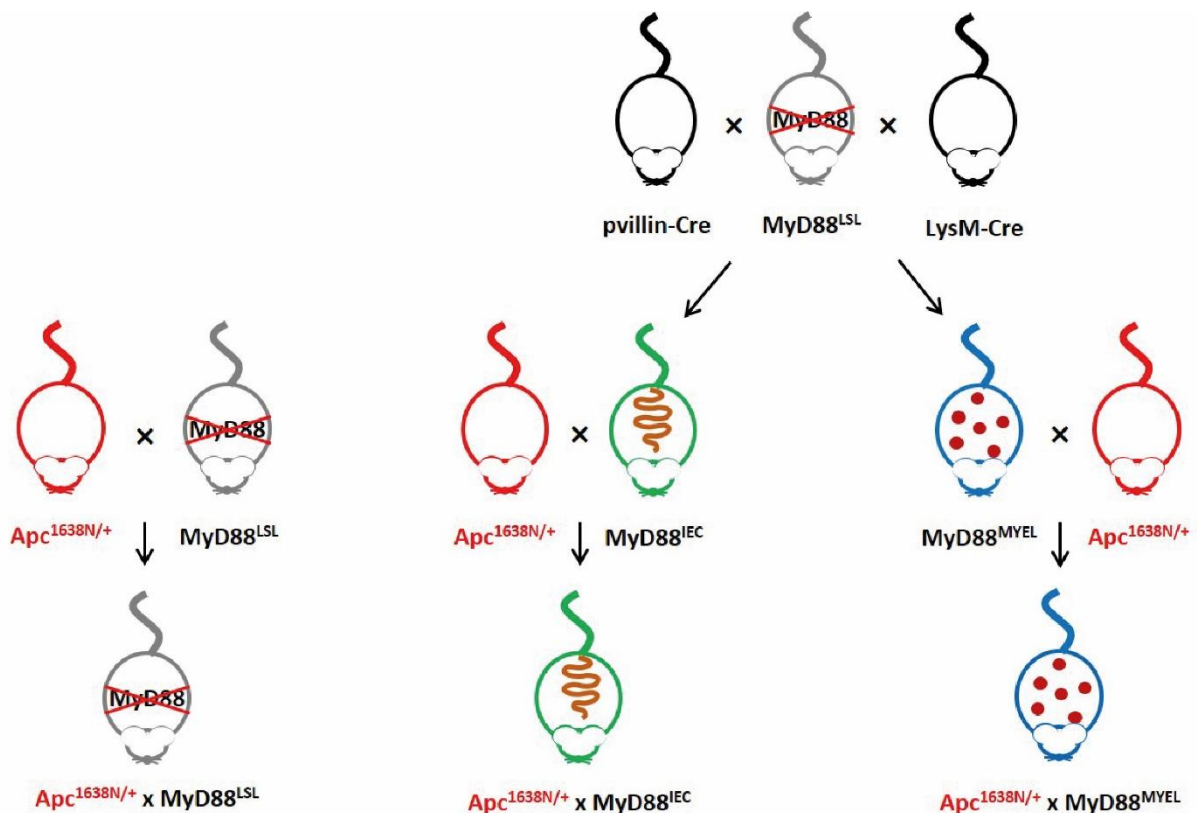


Abb. 15: Schematische Darstellung zur Generierung von Mauslinien mit globaler Myd88-Defizienz ($MyD88^{LSL}$) bzw. zelltypspezifischer Re-Expression von Myd88 ($MyD88^{IEC}$ und $MyD88^{MYEL}$) im Tumormodell $Apc^{1638N/+}$.

4.2.1 Allgemeinzustand der Versuchstiere

$Apc^{1638N/+}$ -Tiere (genetischer Hintergrund: mehr als 20 Generationen C57Bl/6N) sind in den ersten Lebensmonaten zunächst symptomfrei. Ab einem Alter von ca. 11 Monaten zeigte ein Teil der Tiere äußerliche Anzeichen von tumorbedingter Morbidität wie Gewichtsverlust, Anämie (blasse Pfoten und Ohren) und in einigen Fällen gesträubtes Fell. Waren diese Krankheitserscheinungen zu beobachten, wurden die Tiere aus ethischen Gründen erlöst. Bei *Myd88*-defizienzen $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$ -Tieren waren Krankheitserscheinungen, wie z. Bsp. Auftreten von Anämie, bis zum Alter von 12 Monaten deutlich seltener zu beobachten. Tiere aus den Linien $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$ bzw. $MyD88^{MYEL}$ zeigten, ebenso wie parentale $Apc^{1638N/+}$ -

Tiere, erste Krankheitserscheinungen ab einem Alter 11 oder 12 Monaten. Um einen direkten Vergleich zwischen den Modellen bezüglich der Tumorentwicklung gewährleisten zu können, wurden alle Tiere im Alter von 12 Monaten geopfert, auch $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ -Mäuse, obwohl diese seltener äußerliche Krankheitsanzeichen aufwiesen.

Nach Betäubung wurde einer kleinen Stichprobenanzahl von Tieren Blut entnommen und ein sogenanntes „kleines Blutbild“ erstellt. Hier erwiesen sich die Anzahl von Leukozyten und Thrombozyten zwischen den vier verschiedenen Modellen als unverändert im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren mit gleichem genetischem Hintergrund (Daten der „Kleinen Blutbilder“ nicht gezeigt, $n \leq 2$ /Gruppe).

Vor der Organentnahme wurde das Körpergewicht ermittelt, das eine erste Einschätzung des Allgemeinzustands der Versuchstiere erlaubt. Verglichen wurden alle genetischen Linien zum einen mit gesunden Wildtyp-Tieren, sowie mit der parental, *Myd88*-profizienten Linie $Apc^{1638N/+}$. Wildtyp-Mäuse im Alter von 12 Monaten wogen durchschnittlich 37,3 g (Abb. 16 A). Tumortragende $Apc^{1638N/+}$ -Mäuse im gleichen Alter besaßen ein durchschnittliches Körpergewicht von nur 29,7 g, was hochsignifikant unter dem Gewicht der Wildtyp-Tiere lag. Auch das Gewicht der Mäuse aus den anderen genetisch veränderten Linien ($Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$, $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$) war signifikant niedriger verglichen mit Wildtyp-Mäusen. Bei einem Vergleich der Tumormodelle untereinander ist zu erkennen, dass sich das Körpergewicht von $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ -Tieren nicht von dem parental $Apc^{1638N/+}$ -Tiere unterscheidet ($Apc^{1638N/+}$ - $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$: $p = 0,6945$; $Apc^{1638N/+}$ - $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$: $p = 0,2545$). Eine Ausnahme stellten $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Mäuse dar, die ein durchschnittliches Körpergewicht von 33,3 g besaßen, was signifikant erhöht ist verglichen mit $Apc^{1638N/+}$ -Mäusen.

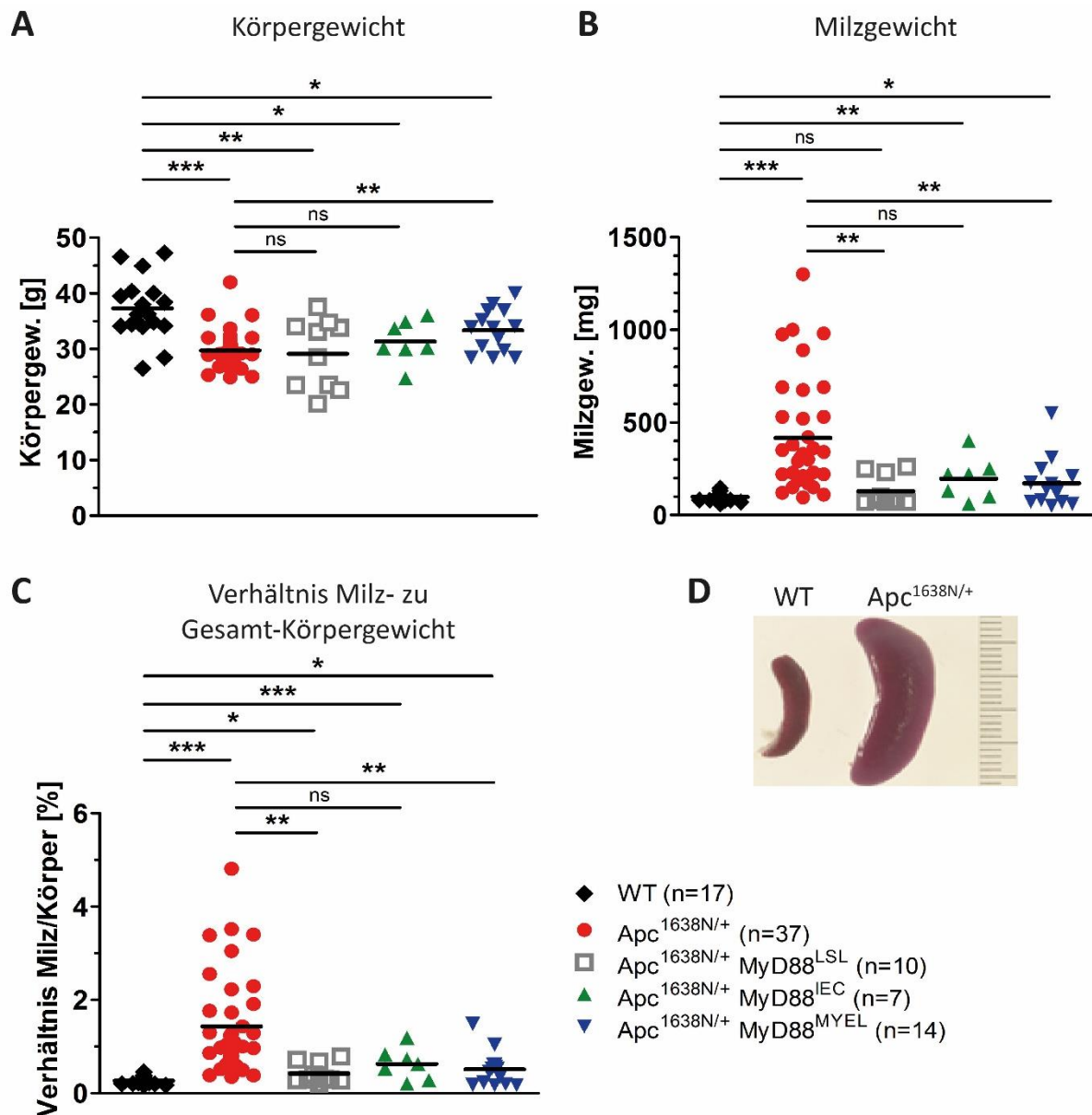


Abb. 16: Körpergewicht und Milzgewicht der Versuchstiere. Körpergewicht (A), Milzgewicht (B) und das Verhältnis von Milz- zu Gesamt-Körpergewicht (C). Alle Tiere wurden im Alter von 12 Monaten (± 1 Monat) analysiert. Jeder Punkt entspricht einem analysierten Versuchstier. Abb. D zeigt exemplarisch eine normale Milz einer Wildtyp-Maus (links) und eine pathologisch stark vergrößerte Milz einer $Apc^{1638N/+}$ -Maus (rechts) (Foto: PD Dr. K.-P. Janssen). Abk.: WT – Wildtyp.

Nach dem Eröffnen der Bauchhöhle der Tiere wurden zunächst das Unterhautgewebe und die Peritonealmembran auf das Vorhandensein von Desmoiden untersucht. Desmoide sind gutartige Läsionen der Haut, die in dem verwendeten Mausmodell in ähnlicher Form wie bei FAP-Patienten auftreten (Smits *et al.*, 1998). Diese Desmoide wurden bei allen Mauslinien mit mutiertem $Apc^{1638N/+}$ -Allel beobachtet, unabhängig von der *Myd88*-Expression. Die Inzidenz lag hier in allen Linien bei annähernd 100%.

In $Apc^{1638N/+}$ -Mäusen ist bei Auftreten der Darmläsionen eine Vergrößerung der Milz zu beobachten (Splénomegalie) (Janssen *et al.*, 2006). Die Vergrößerung der Milz ist auf die tumorbedingte Blutarmut und die daraus resultierende extramedulläre Blutbildung (Blutbildung außerhalb des Knochenmarks) in der Milz zurückzuführen. Auch hier wurde das Milzgewicht, das in erster Näherung als Maß für die Schwere der Tumorerkrankung in diesem Mausmodell herangezogen werden kann, mit gesunden Wildtyp-Tieren, sowie mit tumortragenden Tieren des parentalen Stammes $Apc^{1638N/+}$ verglichen. Durchschnittlich wog die Milz einer 12 Monate alten gesunden Wildtyp-Maus 97,9 mg (Abb. 16 B). Die Milz einer gleichaltrigen $Apc^{1638N/+}$ -Maus mit *post mortem* makroskopisch nachgewiesenen Darmläsionen ist hochsignifikant durchschnittlich um das 4-fache vergrößert und wiegt 416,8 mg (Abb. 16 B und D). In *Myd88*-defizienten Mäusen ($Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$) war eine deutlich Verringerung des Milzgewichts im Vergleich zu *Myd88*-profizienten $Apc^{1638N/+}$ -Tieren zu beobachten. Das Milzgewicht lag in der Linie $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ durchschnittlich bei 128,0 mg und somit im Bereich, der für Wildtyp-Tiere bestimmt worden war (kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp, $p = 0,1685$), dagegen aber hochsignifikant niedriger im Vergleich zu $Apc^{1638N/+}$ -Mäusen. Die beiden Mauslinien mit gewebespezifischer Re-Expression von *Myd88* zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ein signifikant erhöhtes Milzgewicht ($Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ sowie $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$) (Abb. 16 B). Das durchschnittliche Gewicht der Milzen in diesen beiden Gruppen lag ebenfalls deutlich unter dem parentaler $Apc^{1638N/+}$ -Tiere. Zwischen $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ -Mäusen war der Unterschied nur knapp nicht signifikant ($p = 0,0597$).

Wurde das Gewicht der Milz ins Verhältnis zum Gesamt-Körpergewicht der Tiere gesetzt, zeigten sich keine starken Abweichungen zu den bereits aufgeführten Analysen. Wie in Abbildung 16 C zu sehen ist, liegt der prozentuale Anteil des Milzgewichts zum Gesamt-Körpergewicht in allen tumortragenden Linien signifikant über dem von gesunden Wildtyp-Tieren. Bei einem Vergleich der Linien mit einem Apc^{1638N} -Allel ist zu erkennen, dass das Verhältnis von Milz- zum Körpergewicht bei der Linie $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ von den parentalen, *Myd88*-profizienten $Apc^{1638N/+}$ -Tieren knapp nicht signifikant abwich ($p = 0,0548$), während global *Myd88*-defiziente Tiere und solche mit Re-Expression in myeloiden Zellen weniger stark ausgeprägte Splénomegalie zeigten.

4.2.2 Tumorinzidenz

Nach der Analyse des Körpergewichts und der Milz wurde den Tieren der gesamte Darmtrakt entnommen und longitudinal eröffnet, um das Vorkommen von Darmläsionen makroskopisch zu untersuchen. Mit der Analyse wurde am Magenausgang begonnen und der gesamte Darm bis einschließlich des Rektums betrachtet. In allen untersuchten $Apc^{1638N/+}$ -Mäusen im Alter von 12 Monaten wurden Läsionen im Darm beobachtet. Die Tumorinzidenz lag bei den insgesamt 39 untersuchten Tieren somit bei 100% (Tabelle 14). In den MyD88-defizienten $Apc^{1638N/+}$ -Mäusen waren dagegen in nur 5 von insgesamt 10 Tieren makroskopisch Läsionen sichtbar, was einer Inzidenz von 50% entspricht und sich hochsignifikant von parentalen $Apc^{1638N/+}$ -Mäusen unterscheidet. Ist *Myd88* in intestinalen Epithelzellen re-exprimiert, sind wiederum in allen Tieren Darmläsionen zu beobachten. Auch die Expression von *Myd88* in myeloiden Zellen führte zur Ausbildung von Darmläsionen in allen untersuchten Tieren. Globale MyD88-Defizienz hat demnach in 50% aller Tiere eine scheinbar protektive Funktion bei Entstehung von Darmläsionen, hingegen führt die Ausprägung von MyD88 sowohl in intestinalen Epithelzellen oder in myeloiden Zellen zur Ausbildung von Darmläsionen mit einer Inzidenz von jeweils 100%. Die Tumorinzidenz ist in beiden Gruppen signifikant höher verglichen mit global *Myd88*-defizienten Tieren ($Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$).

	Tumorinzidenz	p-Wert (vgl. mit $Apc^{1638N/+}$)	p-Wert (vgl. mit $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$)
$Apc^{1638N/+}$ (n = 39)	100%	-	0,0001
$Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ (n = 10)	50%	0,0001	-
$Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ (n = 7)	100%	n.s.	0,044
$Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ (n = 14)	100%	n.s.	0,0059

Tabelle 14: Übersicht über die Tumorinzidenz im Darmtrakt der Versuchstiere in Abhängigkeit der MyD88-Expression. Alle Tiere wurden im Alter von 12 Monaten (± 1 Monat) analysiert. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Fisher's exact t-test.

4.2.3 Tumoranzahl

Anhand der Anzahl der Läsionen im Darm lassen sich Rückschlüsse auf die Rolle von *Myd88* in Bezug auf die Tumorentstehung ziehen. Betrachtet man die Anzahl der makroskopisch sichtbaren Läsionen im Darmtrakt, lassen sich signifikante Unterschiede feststellen. In 12 Monate alten $Apc^{1638N/+}$ -Tiere sind durchschnittlich 3,4 ($\pm 1,9$) Läsionen erkennbar (Abb. 17 A und B). In allen untersuchten MyD88-defizienten $Apc^{1638N/+}$ -Tiere ($Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$) wurden durchschnittlich 0,7 ($\pm 0,8$) Läsionen festgestellt. In dem Teil der MyD88-defizienten

Apc^{1638N/+}-Mäuse, die Läsionen ausbildeten, war die Anzahl der Tumore mit nur einer oder zwei pro Tier (durchschnittlich $1,4 \pm 0,8$ in 5 von 10 untersuchten Tieren) nach wie vor signifikant niedriger. Re-Expression von *Myd88* in intestinalen Epithelzellen führte zur Tumorentstehung in allen untersuchten Tieren, die Anzahl der entstandenen Läsionen ($1,6 \pm 0,5$) ist jedoch signifikant niedriger verglichen mit *Apc*^{1638N/+}-Mäusen. Gleichzeitig ist die Anzahl der Läsionen in *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{IEC}-Mäusen signifikant höher im Vergleich zur gesamten Gruppe global *Myd88*-defizienter *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL}-Mäuse. Im Vergleich zu den tumortragenden *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL}-Tieren wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. In *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{MYEL}-Tieren sind durchschnittlich $2,3 (\pm 1,1)$ Läsionen im Darm beobachtet worden. Dieser Wert ist damit ebenfalls signifikant niedriger verglichen mit parentalen *Apc*^{1638N/+}-Tieren. Gleichzeitig liegt die Tumoranzahl in dieser Gruppe signifikant über der gesamten *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL}-Gruppe. Auch hier wurde wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen tumortragenden *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL}-Tieren und *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{MYEL}-Tieren beobachtet. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Linien mit gewebespezifischer Re-Expression von *Myd88* (*Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{IEC} und *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{MYEL}) konnte ebenfalls nicht festgestellt werden ($p = 0,1351$).

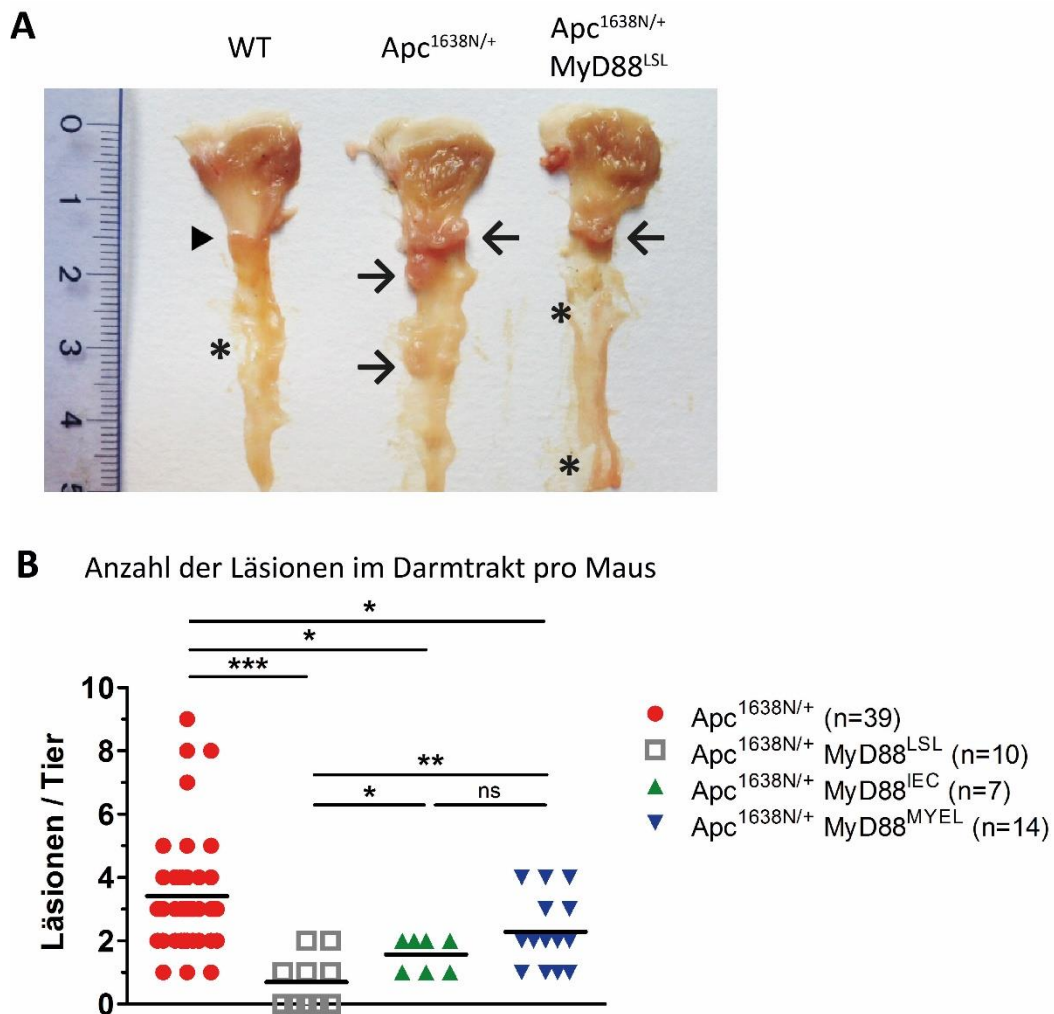


Abb. 17: Anzahl von Läsionen im Darmtrakt der Mäuse. (A) Magen und der erste Abschnitt des Dünndarms (Duodenum) je einer Wildtyp- (WT), $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{LSL}-Maus. Die Periampulläre Region der WT-Maus zeigt keine Auffälligkeiten (Pfeilspitze). In der Periampullären Region der $Apc^{1638N/+}$ -Maus (Mitte) ist eine ca. 4 mm große Läsion zu erkennen. Direkt anschließend im Duodenum folgt eine zweite, ebenfalls ca. 4 mm große Läsion. Ungefähr 1,5 cm distal von der Periampullären Region ist eine dritte Läsion zu sehen (Pfeile). Am Übergang vom Magen zum Dünndarm der $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{LSL}-Maus ist eine etwa 3 mm große Läsion lokalisiert (Pfeil). Weitere Läsionen sind nicht beobachtet worden. Sterne (*) zeigen auf durch die Präparation hervorgerufene Riss-Artefakte im Gewebe. (B) Durchschnittliche Anzahl an Läsionen im Darmtrakt der Tiere. Ein Punkt entspricht einem Versuchstier. Alle Tiere wurden im Alter von 12 Monaten (\pm 1 Monat) analysiert.

Betrachtet man die anatomische Verteilung der Läsionen im Darm, so sind zwischen den vier Modellen keine signifikanten Unterschiede beobachtet worden. In $Apc^{1638N/+}$ -Mäusen entstehen Läsionen in der Regel im Dünndarm, in guter Übereinstimmung mit dem publizierten Phänotyp dieser Mauslinie (Fodde *et al.*, 1994). In annähernd jeder $Apc^{1638N/+}$ -Maus ist eine Läsion am Übergang vom Magen zum Dünndarm (Periampulläre Region) zu sehen (vgl. Abb. 17 A). Weitere Läsionen sind im daran anschließenden ersten Abschnitt des Dünndarms, dem Duodenum, zu beobachten. Je weiter distal man mit der Untersuchung des Darms fortfährt, desto weniger Läsionen sind in der Regel zu sehen. Labor-eigenen

Erfahrungen nach ist im letzten Abschnitt des Dünndarms (Ileum) durchschnittlich nur in einem von 10 Tieren eine Läsion zu beobachten, im Kolon noch seltener. Alle hier untersuchten $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ -Mäuse entwickelten Läsionen ausschließlich in der Periapullären Region, somit in direkter Nachbarschaft des Magenausgangs und im Duodenum. Jejunum, Ileum und Kolon waren in diesen Mäusen in keinem Fall betroffen. $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ -Mäuse entwickelten ebenfalls Läsionen im oberen Abschnitt des Dünndarms, in nur einer von 7 untersuchten Tieren wurde ein Tumor im Ileum beobachtet. Ebenso wurden Läsionen in $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Tieren weitestgehend im Bereich Periapulläre Region/Duodenum nachgewiesen. In einer der 14 Mäuse dieser Gruppe entstand eine Läsion im Jejunum, abgesehen davon waren der distale Bereich des Dünndarms und das Coecum oder Kolon nicht betroffen.

4.2.4 Tumorgröße

Während der makroskopischen Untersuchung der Tiere wurde der größte Durchmesser der jeweiligen Läsionen vermessen und festgehalten. Die Durchmesser der beobachteten Läsionen sind in Abb. 18 dargestellt. Läsionen in $Apc^{1638N/+}$ -Mäusen wiesen Durchmesser von 1 bis zu 10 mm auf. $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ -Tiere entwickelten Läsionen zwischen 0,5 – 8 mm ($p = 0,9620$). $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ -Läsionen waren zwischen 2 und 10 mm groß ($p = 0,4587$), die Durchmesser von $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Läsionen lagen zwischen 1 und 9 mm ($p = 0,2282$). Die durchschnittlichen Größen aller vier Modelle betragen zwischen 4,1 und 5,1 mm und unterschieden sich nicht signifikant im Vergleich zur parentalen $Apc^{1638N/+}$ -Linie.

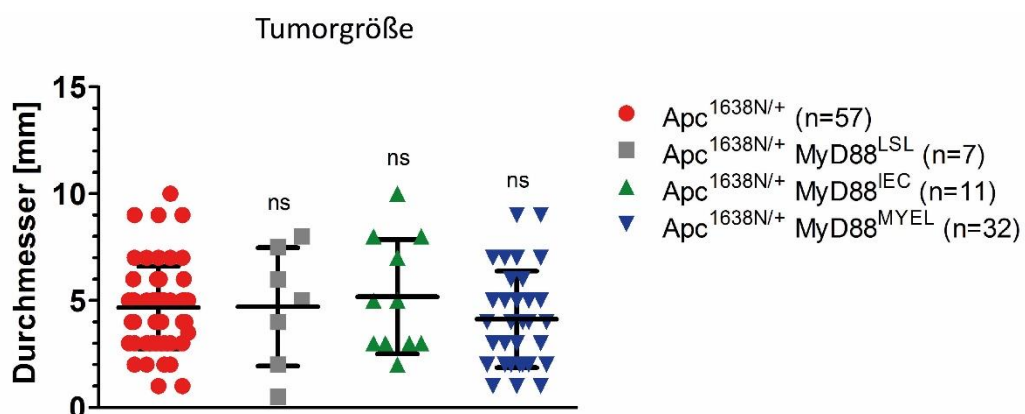


Abb. 18: Größe der Läsionen. Bei allen makroskopisch sichtbaren Läsionen im Darm wurde der Durchmesser (angegeben in mm) gemessen. Jeder Punkt entspricht einer Läsion.

4.2.5 Histologische Analyse der Läsionen

Anhand histologischer Begutachtung können die makroskopisch identifizierten Läsionen in Bezug auf Stadium und Malignität untersucht werden. Für die histologische Analyse der Tumore wurden Gefrierschnitte der Läsionen mit Hämatoxylin und Eosin (HE) von Anja Conrad (AG Janssen) gefärbt und von Frau Dr. Julia Slotta-Huspenina, Oberärztin am Institut für Pathologie der Technischen Universität München, begutachtet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Die Läsionen ließen sich in gutartige Geschwülste der Mukosa (Adenome) oder in intraepitheliale Neoplasien (IENs) einteilen. Intraepitheliale Neoplasien sind Formen von Dysplasien, Veränderungen des Gewebes, bei denen bereits eine De-Differenzierung der Darmmukosa zu beobachten ist. Diese De-Differenzierungen sind an der veränderten Morphologie der Epithelzellen (Atypien) zu erkennen. In der Betrachtung der Darmläsionen wurden in Abhängigkeit der De-Differenzierung der Gewebe niedriggradig entartete IENs (low-grade IEN) und hochgradig entartete IENs (high-grade IEN) diagnostiziert. High-grade IENs gelten als Vorstufen von Karzinomen.

Modell	Befund		
	Adenom	Low-grade IEN	High-grade IEN
Apc ^{1638N/+} (n = 6)	0%	33,3%	66,7%
Apc ^{1638N/+} MyD88 ^{LSL} (n = 5)	40%	40%	20%
Apc ^{1638N/+} MyD88 ^{IEC} (n = 4)	0%	75%	25%
Apc ^{1638N/+} MyD88 ^{MYEL} (n = 4)	0%	100%	0%

Tabelle 15: Zusammenfassung der histo-pathologischen Befunde der Läsionen. Die Befunde wurden als Adenome (gutartige Veränderungen der Darmmukosa), niedrig- (low-grade) und hochgradige (high-grade) intraepitheliale Neoplasien (IEN) zusammengefasst.

Alle untersuchten Läsionen aus Apc^{1638N/+}-Tieren wurden als IEN eingestuft. Abhängig von der Schwere der De-Differenzierung des Gewebes sind ein Drittel der Läsionen als geringgradige IEN und zwei Drittel als hochgradige IEN beurteilt worden. In Abbildung 19, oben links, ist eine repräsentative Läsion einer Apc^{1638N/+}-Maus abgebildet. Der Stern hebt Normalmukosa hervor, die an die Läsion angrenzt. Innerhalb der Läsion sind Drüsenstrukturen erkennbar, in denen die Epithelzellen stark de-differenziert sind (s. Ausschnittsvergrößerung). Dies wird deutlich anhand der übereinander angeordneten und unregelmäßig angelegten Zellkerne in der Epithelschicht (Pfeilspitze). Es wurden fünf Läsionen aus Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}-Tieren untersucht. Zwei dieser Läsionen wiesen hyperproliferative, aber gutartige Gewebsveränderungen auf und wurden somit als Adenome diagnostiziert. Drei weitere Läsionen sind als IEN anzusehen, wovon zwei einen sehr geringen De-Differenzierungsgrad

aufwiesen. In Abbildung 19 ist die Läsion einer $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ -Maus mit sehr gering ausgeprägter De-Differenzierung zu sehen. Die Epithelzellen der Drüsen sind als regelmäßig und einschichtig angelegtes Epithel zu erkennen (Pfeile). Alle analysierten Läsionen aus $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ -Mäusen wurden als IEN eingestuft, in nur einer Läsion konnte eine hochgradige De-Differenzierung festgestellt werden. Tumorzellen dieser Läsion weisen teilweise unregelmäßige und mehrschichtige Anordnung auf (Abb. 19, unten links, Vergrößerung, Pfeilspitze). Auch alle analysierten Läsionen aus $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Mäusen wiesen dysplastische Veränderungen auf. Diese zeigten nur geringe De-Differenzierungsgrade. In Abbildung 19 unten rechts ist zu erkennen, dass die Läsion, die an Normalgewebe angrenzt (Stern), sowohl noch normal erscheinende Epithelzellen (Pfeil) als auch einige unregelmäßig und mehrschichtig angelegte Epithelzellen enthält (Pfeilspitze).

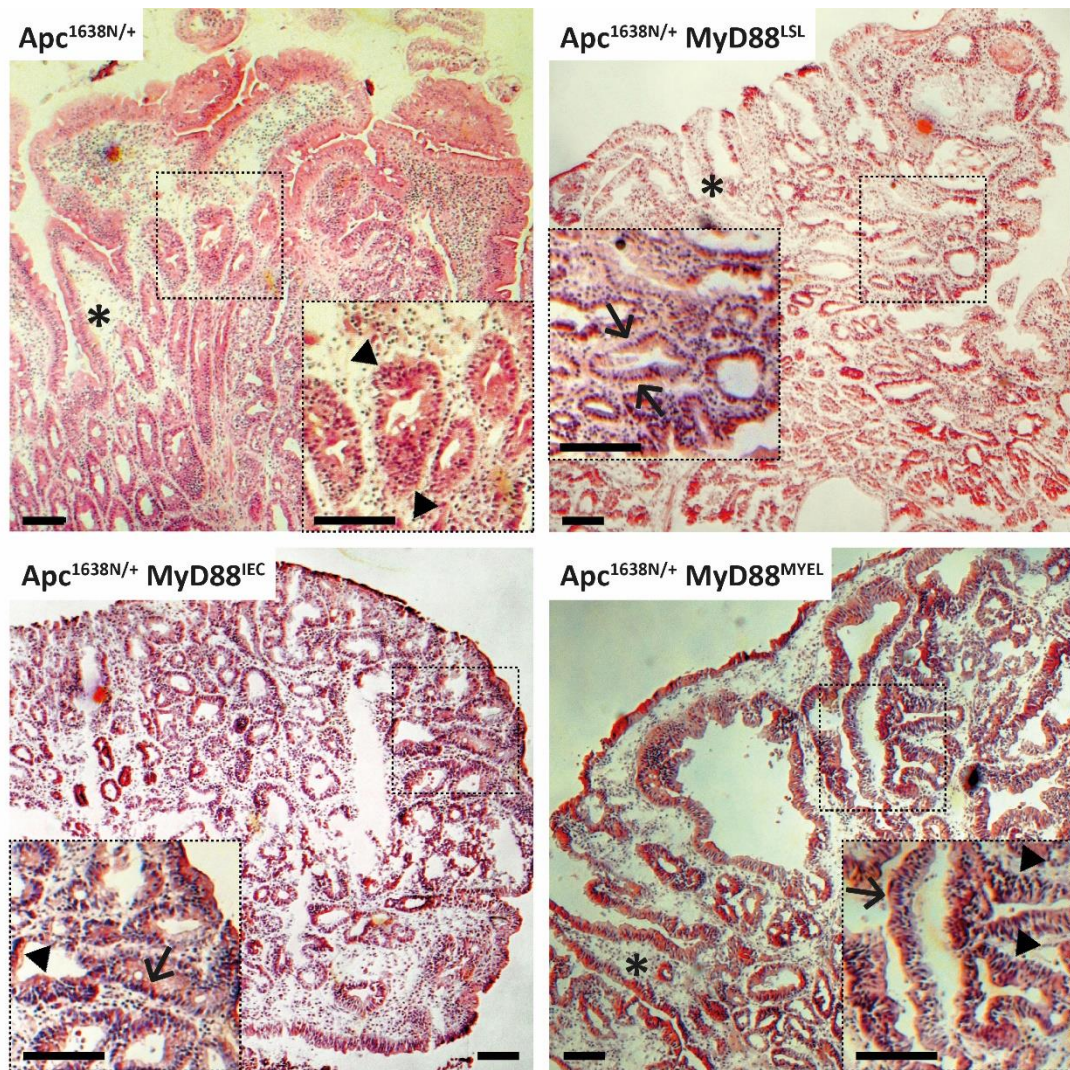


Abb. 19: Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von repräsentativen Läsionen aus den vier Mausmodellen $Apc^{1638N/+}$, $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$, $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$. Sterne (*) in den Bildern $Apc^{1638N/+}$, $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$ zeigen an die Läsionen angrenzende Villi von Normalgewebe. Pfeile (→) verdeutlichen Drüsen in den Läsionen, in denen die Epithelschicht einschichtig und regelmäßig erscheint ($Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$). Die Pfeilspitzen (▶) deuten auf stark de-differenzierte Epithelzellen (zu sehen in der $Apc^{1638N/+}$, $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$ - und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$ -Läsion). Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m.

Die Beobachtungen aus den zelltypspezifischen $Apc^{1638N/+} MyD88$ -Mauslinien legen nahe, dass MyD88 die Tumorgenese im Darmtrakt auf zwei Wegen fördert. Zum einen ist die Tumorzinzidenz in $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$ -Mäusen um 50% reduziert. Globale MyD88-Defizienz schützt demnach mutmaßlich die Tiere weitgehend vor Tumorentstehung. Falls sich trotz Abwesenheit von MyD88 Tumoren ausbilden, ist deren Malignität im Vergleich aller Linien am geringsten ausgeprägt. Läsionen der beiden zelltypspezifischen Linien $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$ bzw. $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$, deren Tumorzinzidenz in beiden Gruppen bei 100% liegt, zeigen einen intermediären Phänotyp mit geringem De-Differenzierungsgrad. $Apc^{1638N/+}$ -Läsionen sind größtenteils hochgradig de-differenziert und somit maligner.

4.3 Tumorfördernde Wirkungen von MyD88 im prämaligen Darmepithel

Zunächst sollte untersucht werden, inwiefern *Myd88* im gesunden, prämaligen Darmepithel die Tumorinitiation fördert. Die Tumorinitiation in *Apc*^{1638N/+}-Mäusen erfolgt nach Verlust des Wildtyp-*Apc*-Allels (*loss of heterozygosity*, LOH) in Zellen des Darmepithels (IECs), vor allem vermutlich in eher undifferenzierten Zellen mit Stammzeleigenschaften. Die Wahrscheinlichkeit, dass in einer der Zellen ein Heterozygotie-Verlust auftritt, vergrößert sich mit der Anzahl an Teilungen, die das Darmepithel insgesamt durchläuft. Es wird nach Literaturbefunden vermutet, dass MyD88 die Zellproliferation von Darmepithelzellen fördert, indem es die MAP-Kinasen ERK1/2 aktiviert (S. H. Lee *et al.*, 2010) (Abb. 20, A). Neben MAPKs induzieren MyD88-abhängige Signalwege vor allem den Transkriptionsfaktor NF-κB (Moresco *et al.*, 2013). Es wurde gezeigt, dass Aktivierung von NF-κB Darmepithelien vor Apoptose schützt (Zaph *et al.*, 2007). Ein möglicher Mechanismus ist die Expression des Gens *Birc5* (*baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5*), welches als TLR-Zielgen beschrieben wurde (Nomi *et al.*, 2010) (Abb. 20, B). *Birc5* codiert das Protein Survivin, das die apoptotischen Schlüsselfaktoren Caspase-3 und Caspase-7 inhibiert (Tamm *et al.*, 1998). Weitere Vorbefunde zeigen, dass die TLR/MyD88-abhängigen Signalwege noch weitere Funktionen für die Homöostase des Darmepithels, sowie des intestinalen Immunsystems haben können. Der Mucus, der den Darm auskleidet, stellt einen physikalisch-chemischen Mechanismus zur Ausbildung einer intestinalen Barriere dar, die zur Herstellung und Aufrechterhaltung eines Schutzmechanismus gegen intestinale Bakterien nötig ist. Ein Bestandteil dieser Schleim- oder Mucus-Schicht ist das Protein Mucin-2, welches im Gen *Muc2* codiert ist und dessen Expression als MyD88-abhängig beschrieben wurde (Frantz *et al.*, 2012) (Abb. 20, C). Außerdem ist die Expression von *Pigr*, das den poly-Immunglobulin-Rezeptor (pIgR) codiert, als MyD88-abhängig beschrieben worden (Frantz *et al.*, 2012). pIgR ist für den Transport der Immunglobuline IgA und IgM durch Darmepithelzellen ins Darmlumen verantwortlich (Abb. 20, D), wo diese antimikrobiell wirken und somit vor übermäßiger Besiedlung des Darms mit Bakterien schützen. Epithelzellen bilden untereinander elektronendichte *Tight Junctions* aus, die das Eindringen von Bakterien in den Körper durch die Zwischenräume zwischen den Epithelzellen verhindern. Im Darmepithel ist das Protein JAM-A (*junctional adhesion molecule A*, Gen-Name *F11r*) ausgeprägt und am Aufbau von *Tight Junctions* beteiligt (Monteiro *et al.*, 2013). Es wurde berichtet, dass interzelluläre

Adhäsionsmoleküle mitunter TLR/MyD88-abhängig reguliert werden sollen (Sawa *et al.*, 2008a). Ist die Barrierefunktion gestört, könnten Bakterien durch das Epithel ins Gewebe eindringen und dort Entzündungsreaktionen auslösen. Pro-inflammatorisches Milieu im Darm wirkt sich wiederum tumorfördernd aus (Feagins *et al.*, 2009).

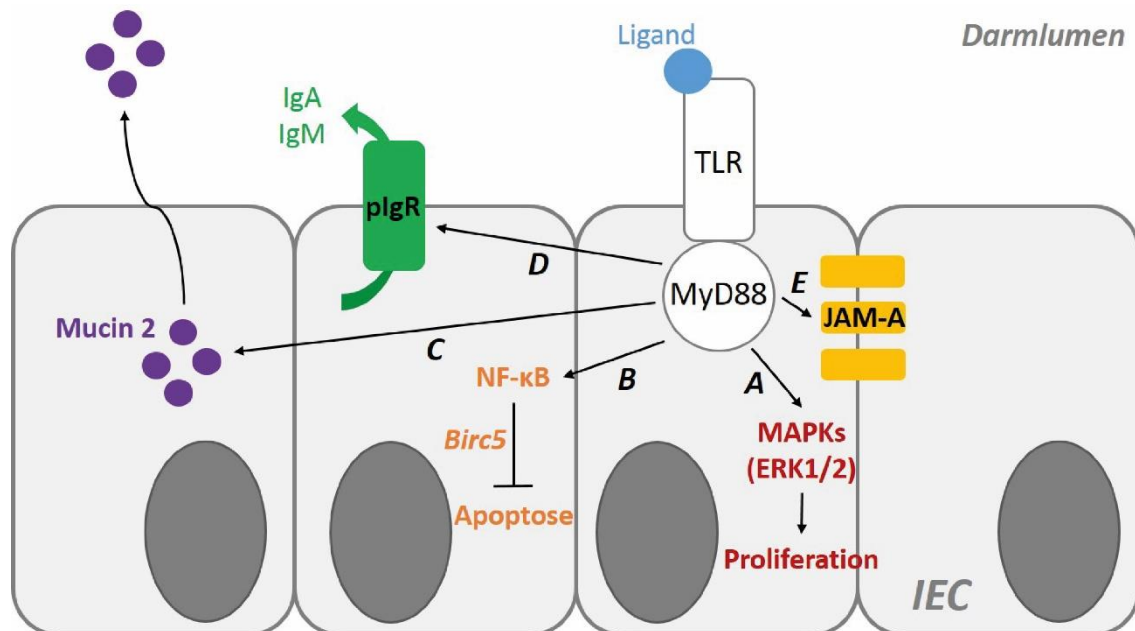


Abb. 20: Vereinfachte schematische Darstellung zu den möglichen, bislang publizierten Funktionen von MyD88 in gesundem Darmepithel, die in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollten. Die Bindung eines Liganden an seinen Toll-like Rezeptor (TLR) führt zur Rekrutierung des intrazellulären Adapterproteins MyD88, welches verschiedene Funktionen in intestinalen Epithelzellen (IEC) induziert. Es wurde beschrieben, dass MyD88 die MAP-Kinasen ERK1/2 aktiviert und Zellproliferation induziert (A). MyD88 aktiviert zudem den Transkriptionsfaktor NF-κB, was IECs vor Apoptose schützt, vermutlich über die Induktion des Gens Birc5 (B), welches das Protein Survivin codiert und die Caspase-Aktivität inhibiert. MyD88 soll außerdem wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der intestinalen Immunabwehr und der Epithelbarriere haben. So wurde gezeigt, dass MyD88-Defizienz zu verminderter Expression von Muc2 und dem poly-Immunglobulin-Rezeptor (pIgR) in IECs führt (C und D). MyD88-abhängige TLR-Signalwege induzieren weiterhin die Expression von Adhäsionsmolekülen, in Tight Junctions des Darmepithels ist JAM-A (junctional adhesion molecule A) ausgeprägt (E).

Diese möglichen Funktionen von MyD88 im gesunden Darmgewebe, die in Publikationen und Vorarbeiten vorgeschlagen wurden, sollten im Folgenden experimentell untersucht werden.

4.3.1 Einfluss von MyD88 auf die Aktivierung von ERK1/2 im Darmepithel

Die Phosphorylierung von ERK1/2 im gesunden Darmgewebe wurde mittels Immunoblot untersucht. Hierzu wurden Proteinlysate von schockgefrorenen Gewebestücken aus distalem Dünndarmgewebe (Ileum) angefertigt. Dem Lysepuffer wurden Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt, um Proteinabbau und Dephosphorylierung der Proteine weitestgehend zu verhindern. ERK1/2 wurde mit Antikörpern gegen phospho-ERK1/2 (bindet

ausschließlich an phosphoryliertes, und somit aktiviertes ERK1/2) und Gesamt-ERK1/2 (bindet an ERK1/2-Protein, unabhängig von Phosphorylierungen) gefärbt. Repräsentative Immunoblots sind in Abbildung 21 A dargestellt. Die Abbildung zeigt jeweils Gewebe von zwei verschiedenen Mäusen aus jeder genetischen Linie. In Dünndarmgewebe von Wildtyp-Mäusen konnte MyD88-Protein detektiert werden, sowie in beiden Proben phosphoryliertes ERK1/2-Protein (p-ERK1/2) in vergleichbaren Mengen. Gesamt-ERK1/2-Protein ist ebenfalls in vergleichbaren Mengen enthalten. Im Darmgewebe von MyD88-defizienten Tieren (MyD88^{LSL}) war, wie erwartet, kein MyD88-Protein zu detektieren. P-ERK1/2 konnte in beiden Proben in unterschiedlichen Mengen nachgewiesen werden, während die Menge an Gesamt-ERK1/2 in den abgebildeten Proben ähnlich ist. Nach Cre/LoxP-vermittelter Re-Expression von *Myd88* im intestinalen Epithel (MyD88^{IEC}) ist MyD88-Protein, wie zuvor bereits gezeigt, deutlich nachweisbar. Auch hier ist p-ERK1/2 in unterschiedlichen Mengen nachweisbar, und die Signalintensitäten des Gesamt-ERK1/2-Proteins ist in beiden Proben wieder vergleichbar. Auch im Darm von MyD88^{MYEL}-Mäusen ist p-ERK1/2 in unterschiedlichen Mengen vorhanden, obwohl Gesamt-ERK1/2 in annähernd gleichen Mengen enthalten ist. Es wurden demnach unterschiedliche Mengen von phospho-ERK1/2 detektiert, mutmaßlich aufgrund der schwierigen Detektion von Phospho-Epitopen, jedoch unabhängig von *Myd88*-Expression.

Posttranslationale Proteinphosphorylierungen sind relativ instabil und können bei der Herstellung von Lysaten durch Phosphatase-Aktivität rasch abgebaut werden. Um bei dieser Untersuchung Artefakte zu vermeiden, welche durch methodische Handhabung bedingt sind, wurden die Immunoblots mit unabhängigen Gewebeproben aus anderen Tieren wiederholt. Um die erhaltenen Ergebnisse zusammenfassen zu können, wurden die Flächen und relativen Intensitäten der Proteinbanden densitometrisch erfasst und mit dem Programm *ImageJ* quantifiziert. Zunächst wurde das Verhältnis von p-ERK1/2 bzw. von Gesamt-ERK1/2 zur Ladekontrolle β -Aktin ermittelt. Anschließend konnte das Verhältnis von p-ERK1/2 zu Gesamt-ERK1/2-Protein ermittelt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 B zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass das Verhältnis von phosphoryliertem ERK1/2 zu Gesamt-ERK1/2 in Wildtyp-Tieren sowie im Modell MyD88^{IEC} jeweils einen Wert von etwa 1,5 bis 2,0 aufweist. In Geweben aus MyD88^{LSL}- und MyD88^{MYEL}-Tieren liegt das Verhältnis von p-ERK1/2 zu ERK1/2 dagegen bei etwa 0,75 und ist damit deutlich reduziert. Demzufolge konnte eine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren reduzierte Menge an p-ERK1/2 im Darm von Tieren detektiert werden, die

global MyD88-defizient waren, der Unterschied verfehlte allerdings knapp das Signifikanzniveau ($p = 0,0813$). Bei Re-Expression von *Myd88* vor allem in Darmepithelzellen, aber auch in myeloiden Zellen, war keine signifikante Veränderung gegenüber Wildtyp-Tieren zu beobachten ($\text{MyD88}^{\text{IEC}} p = 0,933$; $\text{MyD88}^{\text{MYEL}} p = 0,2141$).

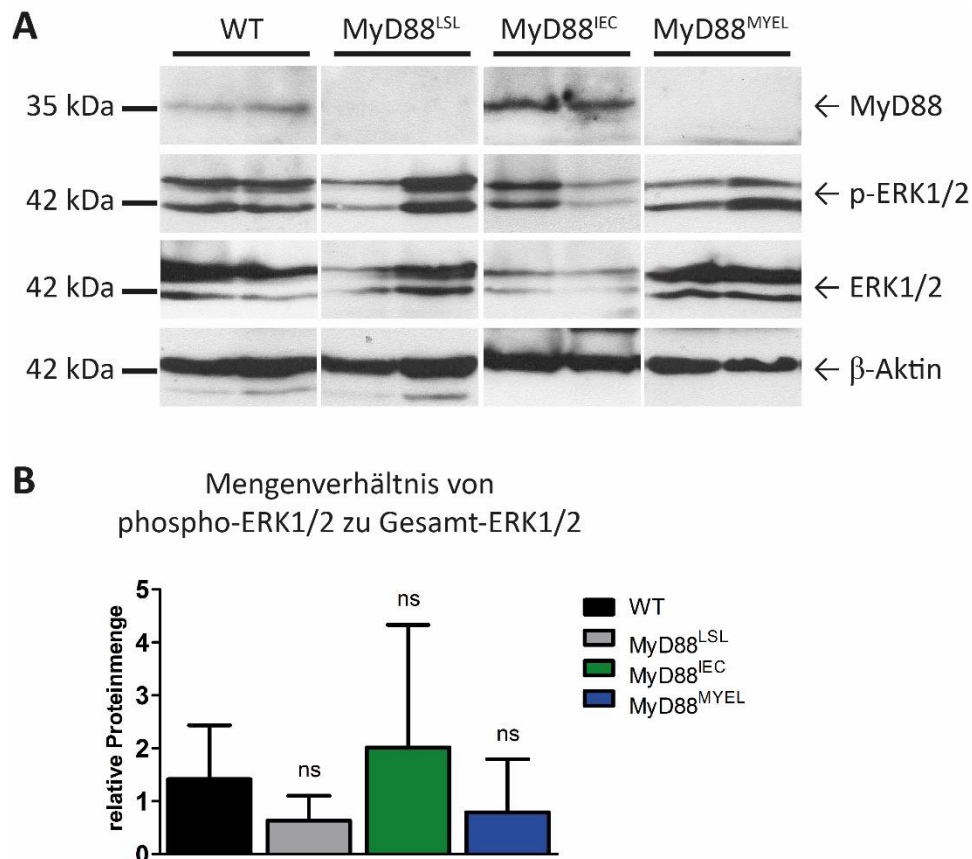


Abb. 21: ERK1/2-Phosphorylierung in Abhängigkeit der Myd88-Expression im prämaligen Darmgewebe. Proteinlysate aus Dünndarmgeweben (Ileum) der Linien $\text{Apc}^{1638\text{N}/+}$, $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{LSL}}$, $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{IEC}}$ und $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{MYEL}}$ wurden mittels Immunoblot auf das Vorhandensein von MyD88- (35 kDa), p-ERK1/2- (42 kDa) und Gesamt-ERK1/2-Protein (42 kDa) untersucht. Als Ladekontrolle wurden die Membranen mit anti- β -Aktin-Antikörper gefärbt (42 kDa). Abgebildet sind jeweils zwei repräsentative Beispiele pro Mauslinie (A). Die Intensitäten der p-ERK1/2- und ERK1/2-Proteinbanden wurden mit dem Programm ImageJ densitometrisch ausgewertet und ins Verhältnis zueinander gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. $N \geq 4$ pro Mausmodell (B).

4.3.2 Epithelzellproliferation in Abhängigkeit der *Myd88*-Expression

Es wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung von ERK1/2 zu erhöhter Zellproliferation führt. Ob die beobachtete reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 im Darmepithel des MyD88-defizienten Modells $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{LSL}}$ auch mit verringerter Proliferation von IECs einhergeht, sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden. Zum besseren Verständnis der aufgeführten Versuchsdaten soll hier kurz der Aufbau des Darmepithels dargestellt werden.

Die Teilung von IECs findet ausschließlich in der Proliferationszone in den Krypten des Darms statt (Abb. 22 A). Intestinale Stammzellen, die sich am unteren Ende der Krypten befinden (gelb markiert), teilen sich asymmetrisch. Die daraus hervorgehenden Zellen, die zu IECs differenzieren, proliferieren vorübergehend innerhalb des sogenannten *Transit Amplifying Compartments* (blau markiert). Durch die andauernde Teilung in dieser Zone werden die darüber liegenden Epithelzellen nach oben in die Villi geschoben, wo sie differenzieren und am apikalen Ende des Villus angekommen in Apoptose gehen und ins Darmlumen abgegeben und ausgeschieden werden (Fre *et al.*, 2008). Proliferierende Zellen lassen sich mit einem Antikörper gegen das Protein Ki67 anfärben, das in allen Phasen des Zellzyklus vorhanden ist, mit Ausnahme der G₀-Phase. Anhand der Anzahl von Ki67-positiven Zellen in der Proliferationszone bzw. anhand der Länge dieser Ki67-positiven Proliferationszone können Rückschlüsse hinsichtlich der relativen Teilungsrate von IECs gezogen werden (Franziska Rohde, 2008). Die Ki67-Färbungen, die mikroskopischen Aufnahmen, sowie die Längenmessungen wurden von Frau Anja Conrad (AG Janssen) angefertigt. Es wurde Dünndarmgewebe aus jeweils 5 ($Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$), 6 ($Apc^{1638N/+}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$), bzw. 7 ($Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$) Tieren untersucht. In Abbildung 22 B sind repräsentative Ki67-Färbungen von gesundem Dünndarmgewebe aus je einer Maus pro Gruppe dargestellt. Die Länge der Ki67-positiven Proliferationszone der abgebildeten $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$ -Maus erscheint verkürzt im Vergleich zu den anderen drei Modellen. Es wurden Gewebeschnitte aus mehreren Tieren gegen Ki67 gefärbt und die Länge der Proliferationszone gemessen, wobei darauf geachtet wurde, dass nur Gewebeareale mit eindeutiger und korrekter anatomischer Orientierung analysiert wurden, um Schnittartefakte und Verzerrungen zu vermeiden. Die Proliferationszone parentaler $Apc^{1638N/+}$ -Tiere besitzt durchschnittlich eine Länge von ca. 100 μm (Abb. 22 C). $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$ -Tiere haben eine im Vergleich hochsignifikant kürzere Proliferationszone von 80 μm . In Tieren mit *Myd88* Re-Expression im Darmepithel war diese Verkürzung teilweise aufgehoben ($Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$ -Mäuse: Proliferationszone von ca. 90 μm), nicht jedoch bei Re-Expression von MyD88 in myeloiden Zellen. Die Längen der Proliferationszonen von $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$, bzw. $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$ unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,1545$, bzw. $p = 0,4385$).

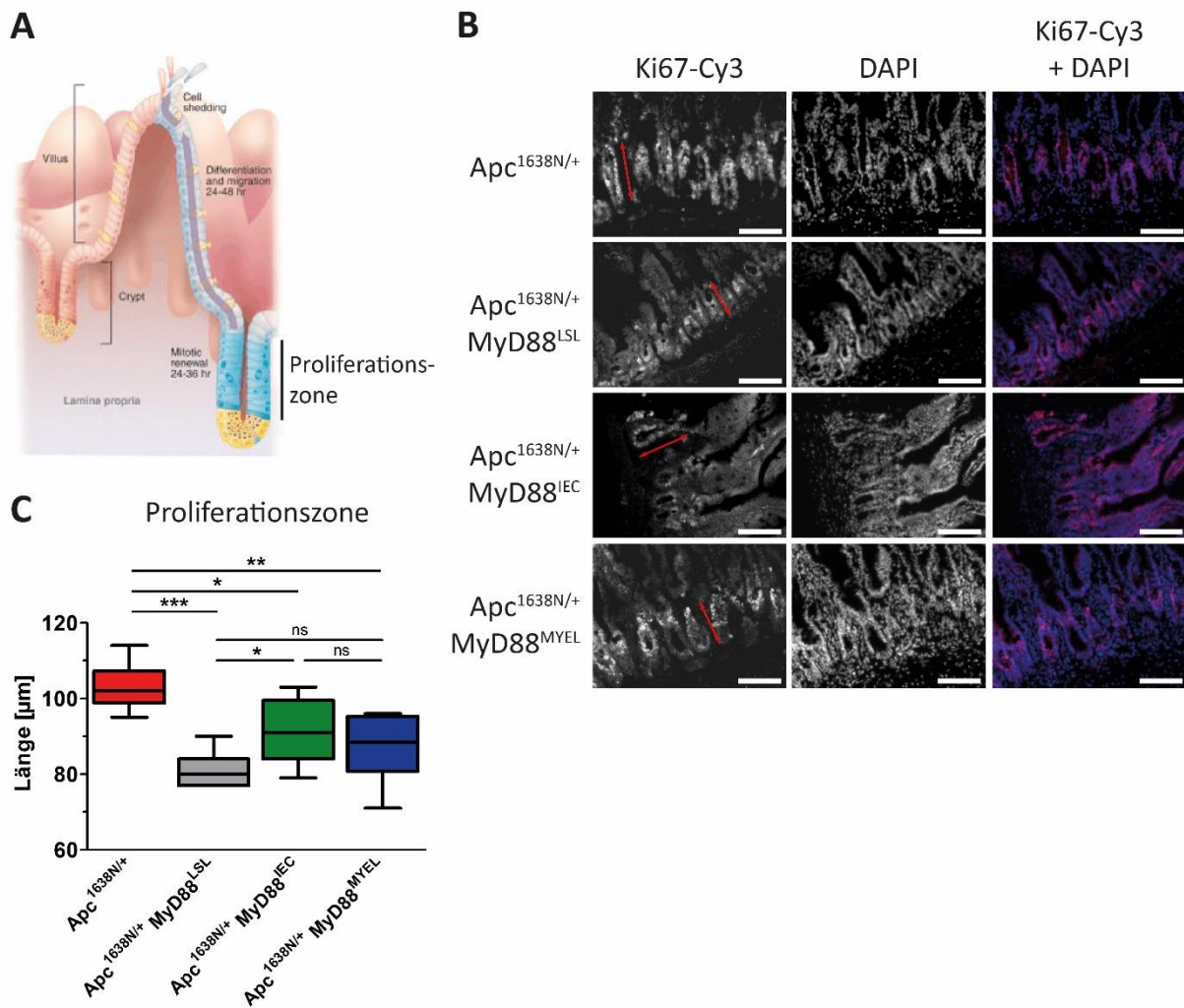


Abb. 22: Proliferation intestinaler Epithelzellen im prämaligen Darmepithel in Abhängigkeit von MyD88. (A) Schematische Darstellung des Darmepithels (Radtke and Clevers, 2005). Die Teilung der Darmepithelzellen erfolgt ausschließlich in der Proliferationszone (mitotic renewal, blau eingefärbte Zellen). Die proliferierenden Epithelzellen lassen sich mit einem anti-Ki67-Antikörper (Cy3, rot) anfärben (B). Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel jeder Mauslinie. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. Die Länge der mit Ki67 angefärbten Proliferationszonen (rote Pfeile) wurde für mehrere Tiere ermittelt und statistisch analysiert. $N \geq 5$ pro Mauslinie (C).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen bezüglich der ERK1/2-Phosphorylierung wurden in dem parentalen, MyD88-profizienten Modell $Apc^{1638N/+}$, sowie in Tieren mit Darmepithel-spezifischer Expression von *Myd88* ($Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$) die ausgeprägtesten Proliferationszonen detektiert. MyD88-defiziente Tiere besitzen eine hochsignifikant verkürzte Proliferationszone und damit vermutlich weniger teilungsaktive IECs. Auch $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$ -Tiere wiesen neben verminderten Mengen an p-ERK1/2-Protein auch verkürzte Proliferationszonen auf. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass MyD88 speziell in IECs die Proliferation der Zellen fördert. Dieser Effekt könnte zum Teil durch die Aktivierung von ERK1/2 vermittelt werden. Hier ist anzumerken, dass sich die Struktur und der Aufbau des

prämaligen Darmepithels in den unterschiedlichen Modellen nicht unterschieden (vgl. Abb. 14). Insbesondere war die Gesamtlänge der Villi auch bei MyD88-defizienten Tieren nicht deutlich verändert.

4.3.3 Die Rolle von MyD88 bei der Apoptose von IECs

Es wurde mittlerweile mehrfach publiziert, dass Aktivierung von NF- κ B im Darmepithel die Zellen vor Apoptose schützt, [u. a. (Zaph *et al.*, 2007)]. Da NF- κ B durch MyD88-abhängige Signalwege induziert wird, sollte im folgenden Abschnitt der Einfluss von MyD88-Defizienz bzw. zelltypspezifischer Expression auf die Apoptose von IECs untersucht werden. Dazu wurden Gefrierschnitte von Dünndarm gegen die gespaltene, aktivierte Form der Caspase-3 gefärbt. Bei der Auswertung wurden allerdings nur vereinzelt *cleaved Caspase-3*-positive Zellen beobachtet, sodass sich hier keine abschließenden Aussagen bezüglich der Apoptoserate von IECs in Abhängigkeit von MyD88 treffen lassen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Unlängst wurde der anti-apoptotische Faktor *Birc5* als TLR-Zielgen beschrieben (Nomi *et al.*, 2010). Das von *Birc5* codierte Protein Survivin inhibiert die Caspase-Aktivität und schützt Zellen somit vor Caspase-induzierter Apoptose (Tamm *et al.*, 1998). Anhand der mRNA-Menge von *Birc5* wurde hier untersucht, inwiefern die Expression des Gens im Darmepithel von MyD88 abhängt. Die Ergebnisse sind Abbildung 23 dargestellt. Die relative Expression von *Birc5* war in Wildtyp-Darmgewebe und in $Apc^{1638N/+}$ -Tieren nahezu identisch ($p = 0,8949$). Dagegen war die *Birc5*-Expression in $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{LSL}-Mäusen signifikant reduziert. Diese Reduktion war bei Re-Expression von *Myd88* im Darmepithel ($Apc^{1638N/+}$ MyD88^{IEC}) nicht mehr zu beobachten, hier konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Wildtyp- ($p = 0,2209$) und parental $Apc^{1638N/+}$ -Tieren ($p = 0,2563$) beobachtet werden. $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{MYEL}-Mäuse zeigten eine relative Expression von *Birc5*, die signifikant unterhalb der gemessenen Werte aus Wildtyp- und $Apc^{1638N/+}$ -Mäusen liegt.

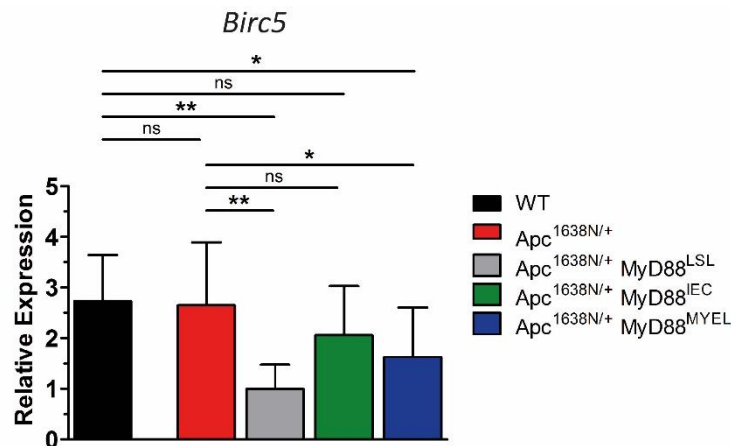


Abb. 23: Expression von Birc5 (Survivin) im gesunden Darmgewebe. Die relative Menge an Birc5-Transkripten wurde mit quantitativer RT-PCR gemessen, als Referenz diente die Expression von TF2D. Die Daten wurden auf Normalgewebe aus Wildtyp-Tieren normalisiert. $N \geq 5$ pro Mausmodell. Abk.: WT – Wildtyp.

Den Ergebnissen zufolge führt MyD88-Defizienz zu reduzierten Mengen an *Birc5*-Transkripten im Darmepithel. Auch in *Apc*^{1638N/+} MyD88^{MYEL}-Tieren, in denen IECs ebenfalls MyD88-defizient sind, sind reduzierte Mengen von *Birc5*-Transkripten zu beobachten. Die hier erhobenen Befunde zur *Birc5*-Ausprägung erlauben jedoch keine direkte Aussage über die tatsächliche Apoptoserate.

4.3.4 Einfluss von MyD88 auf die intestinale Barriere- und Immunfunktion

An der Ausbildung der intestinalen Barriere sind verschiedene Faktoren beteiligt. Mucin 2 ist ein Protein, welches von intestinalen Epithelzellen synthetisiert und ins Darmlumen abgegeben wird, wo es an der Ausbildung des Mucus beteiligt ist. Die Expression des Gens *Muc2* wurde als MyD88-abhängig beschrieben (Frantz *et al.*, 2012). Die in dieser Arbeit untersuchten Mausmodelle zeigen jedoch keine Unterschiede bezüglich der *Muc2*-Expression im Darmgewebe (Abb. 24 A). *Muc2*-Transkripte sind sowohl in Wildtyp-Mäusen als auch in den *Apc*^{1638N/+} MyD88-Modellen in gleichen Mengen vorhanden und damit unabhängig von MyD88 exprimiert. Die Expression des poly-Immunglobulin-Rezeptors (*Pigr*) erscheint in allen Tieren mit mutiertem *Apc*^{1638N}-Allel erhöht verglichen mit Wildtyp-Mäusen (Abb. 24 B). Innerhalb der vier *Apc*^{1638N/+}-Modelle wurden aber keine Unterschiede bezüglich der *Pigr*-Expression in Abhängigkeit von MyD88 detektiert. Die Expression von *F11r*, welches das Protein JAM-A codiert, ist ebenfalls als TLR-abhängig beschrieben worden (Sawa *et al.*, 2008a). *F11r*-Transkripte wurden in Geweben von Wildtyp-Tieren, parentalen *Apc*^{1638N/+}-Tieren wie auch in MyD88-defizienten *Apc*^{1638N/+} MyD88^{LSL}-Tieren in gleichen Mengen gemessen (Abb. 24

C). Die Expression von *F11r* war in den zelltypspezifischen Re-Expressions-Modellen $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ im Vergleich um zwei Drittel reduziert und liegt signifikant unterhalb den Daten der übrigen Modelle.

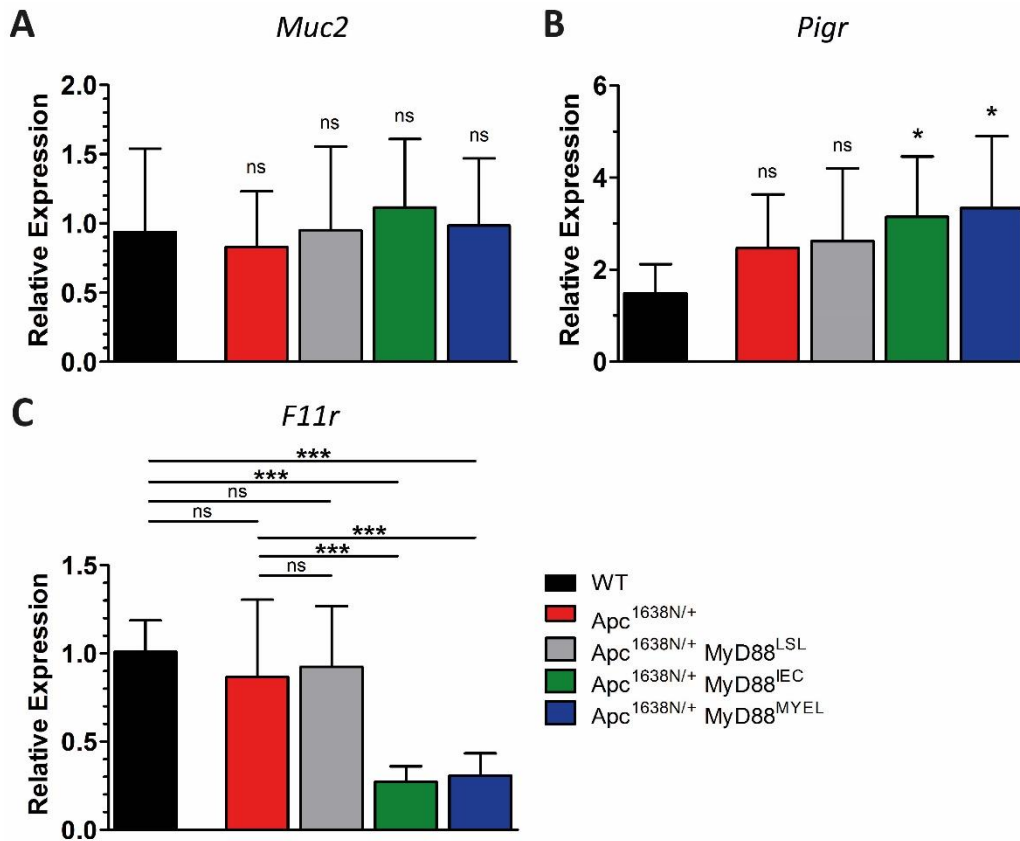


Abb. 24: Expression verschiedener Transkripte im Darmgewebe, die im Zusammenhang mit der intestinalen Barrierefunktion stehen und von denen eine Abhängigkeit von der Myd88-Expression beschrieben wurde. Die Expression der Gene *Muc2* (A), *Pigr* (B) und *F11r* (C) wurde mit quantitativer RT-PCR untersucht. Die jeweiligen Gruppengrößen entsprechen $n \geq 4$ (A und B) bzw. $n \geq 5$ (C). Als Referenztranskript diente TF2D. Die Werte wurden auf Darmgewebe aus Wildtyp-Tieren normalisiert.

In den untersuchten Mausmodellen hat sich die *Muc2*-Expression als MyD88-unabhängig herausgestellt. Die Expression von *Pigr* erscheint in den *Apc*-mutierten Modellen verglichen mit Wildtyp-Tieren erhöht, ist aber ebenso wie *Muc2* unabhängig von MyD88. Zudem konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp-, $Apc^{1638N/+}$ - und MyD88-defizienten $Apc^{1638N/+}$ -Tieren bezüglich der *F11r*-Transkriptmengen festgestellt werden. Ist *Myd88* nur in IECs bzw. Makrophagen exprimiert, so ist *F11r*-mRNA in signifikant niedrigeren Mengen ausgeprägt. MyD88 scheint somit in beiden Zelltypen zugleich für die Expression von *F11r* wichtig zu sein. Ob in diesen Modellen durch die verminderte Expression von *F11r* tatsächlich ein Barrieredefekt entsteht, muss in weiterführenden Experimenten erarbeitet werden.

4.4 Die Rolle von MyD88 im Tumorgewebe

Die Beobachtungen aus den Mausmodellen hinsichtlich der Tumorgroße und Tumordifferenzierung lassen den Schluss zu, dass MyD88-Defizienz neben der Tumorentstehung auch die Tumorprogression verlangsamt. Sowohl getrennte *Myd88*-Expression in Darmepithelzellen oder in Makrophagen förderte die Tumorprogression, jedoch ist das Vorhandensein von MyD88 in beiden Zelltypen zugleich wichtig, um den Phänotyp herzustellen, der in *Apc*^{1638N/+}-Tieren zu beobachten war. Die Rolle von MyD88 im Tumorgewebe sollte im folgenden Abschnitt untersucht werden.

4.4.1 Einfluss von MyD88 auf den kanonischen WNT-Signalweg

Die Tumorinitiation im *Apc*^{1638N/+}-Mausmodell erfolgt nach Verlust des Wildtyp-*Apc*-Allels. Solange das funktionsfähige Wildtyp-Allel exprimiert wird und damit funktionstüchtiges *Apc*-Protein in den Darmepithelzellen vorhanden ist, ist der Proteinkomplex stabil, der zur Phosphorylierung und Degradierung von β -Catenin führt. Nach dem LOH kommt es zur Stabilisierung von β -Catenin, wodurch es im Nukleus die Expression verschiedener WNT-Zielgene induziert. Kürzlich wurde beschrieben, dass der TLR4-Signalweg zur Stabilisierung von β -Catenin beiträgt (Santaolalla *et al.*, 2013). Daher sollte untersucht werden, ob MyD88 im Darmgewebe Einfluss auf die Proteinstabilität von β -Catenin hat und somit die Tumorinitiation beeinflussen könnte. Dazu wurden Proteinlysate von gesundem Darmgewebe und Tumorgewebe aus denselben Tieren angefertigt und β -Catenin-Protein *via* Immunoblot untersucht. In allen vier untersuchten Modellen wurden sehr geringe Mengen von β -Catenin im gesunden Darmgewebe (N) detektiert und es waren prominente Abbaubanden zu beobachten (Abb. 25 A). In den Läsionen ist die β -Catenin Proteinbande bei ca. 100 kDa deutlich zu erkennen, gleichzeitig wurden weniger Abbaubanden detektiert. β -Catenin wird damit unabhängig von MyD88 wie erwartet im gesunden Darmepithel rasch abgebaut, in den Läsionen hingegen stabilisiert. MyD88 hat in dem vorgestellten Mausmodell keinen nachweisbaren Einfluss auf β -Catenin-Stabilität.

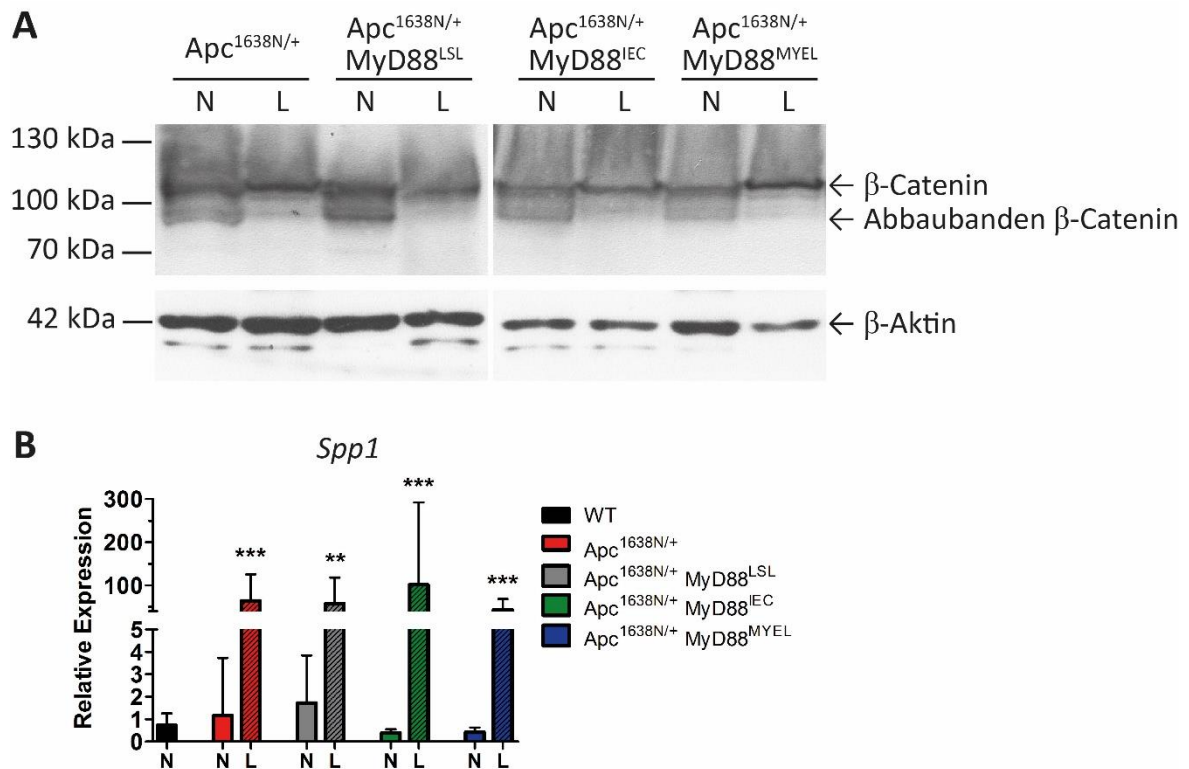


Abb. 25: Einfluss von MyD88 auf den WNT-Signalweg. (A) Immunoblot zu β -Catenin im Normal- (N) und Tumorgewebe (L) von Apc^{1638N/+}, Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}, Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC} und Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}-Mäusen. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Immunoblot. Die Membran wurde mit einem anti- β -Catenin-Antikörper (100 kDa) und anschließend anti- β -Aktin-Antikörper als Ladekontrolle (42 kDa) gefärbt. (B) Expression von *Spp1* (Osteopontin) als WNT-Zielgen in Abhängigkeit von MyD88 in Normal- (N) und Tumorgewebe (L). Als Referenztranskript wurde TF2D verwendet. $N \geq 5$ pro Gruppe. Die Werte sind in Relation zu Messwerten aus Normaldarm von Wildtyp-Mäusen (WT) berechnet. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test.

Um dieses Ergebnis mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen, wurde die Expression des WNT-/ β -Catenin-Zielgens *Spp1* (Osteopontin) untersucht (F. Rohde *et al.*, 2007). Transkriptmengen von *Spp1* wurden mittels quantitativer RT-PCR in gesunden Darmgeweben (N) und Läsionsgeweben (L) ermittelt. Die relative Expression von *Spp1* im gesunden Darmepithel von Wildtyp-, Apc^{1638N/+}, Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}, Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC} und Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}-Mäusen ist unverändert (Abb. 25 B). In allen vier Modellen steigt die Menge von *Spp1*-Transkripten im Tumorgewebe auf das 100-Fache an. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen bezüglich der β -Catenin Proteinstabilität konnten somit keine Unterschiede hinsichtlich der Expression des β -Catenin-Zielgens *Spp1* in Abhängigkeit von MyD88 beobachtet werden.

4.4.2 Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose von Tumorzellen in Abhängigkeit von MyD88

Im prämaligen Darmepithel konnte gezeigt werden, dass MyD88 die Proliferation und Selbsterneuerung zu fördern scheint, da bei MyD88-Defizienz die Epithelzellproliferation verringert war (vgl. Abschnitt 4.3.2). Daher sollte hier der Einfluss von MyD88 auf die Zellproliferation im Tumorkontext überprüft werden. Hierzu wurde das Protein Cyclin D1 (codiert in *Ccnd1*) untersucht, ein zentraler Regulator des Zellzyklus. Es reguliert die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (*cyclin-dependent kinase 4* und *6*, CDK4 und CDK6), deren Aktivität wichtig ist für den Übergang von der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus und damit die Zellproliferation fördert. *Ccnd1* wurde in verschiedenen soliden Tumoren als überexprimiert beschrieben [zusammengefasst in (Zeestraten *et al.*, 2012)]. Zudem wurde *Ccnd1* als Zielgen von WNT (Tetsu and McCormick, 1999), sowie von TLR/MyD88/NF-κB beschrieben (Pahl, 1999). Die Expression von *Ccnd1* im Normalgewebe der verschiedenen Modelle unterscheidet sich nur geringfügig (Abb. 26 A). In Läsionen von *Apc*^{1638N/+}-Mäusen, die eine starke Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs zeigen, ist die Menge an *Ccnd1*-Transkripten hochsignifikant erhöht. Bei globaler *Myd88*-Defizienz erreicht diese Erhöhung nur knapp nicht das Signifikanzniveau: in *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL}-Läsionen ist die *Ccnd1*-Expression zwar immer noch erhöht verglichen mit Normalgewebe, jedoch ist die Expression nur etwa halb so hoch verglichen mit *Apc*^{1638N/+}-Läsionen ($p = 0,0567$). Wird *Myd88* in Darmepithelzellen oder in Makrophagen re-exprimiert, ist *Ccnd1* im Tumor erneut signifikant erhöht. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression von *Ccnd1* im Tumor parentaler *Apc*^{1638N/+}-Tiere wie erwartet WNT-abhängig signifikant erhöht ist. Eine *Myd88*-Expression im Darmepithel oder in Makrophagen genügt, um die *Ccnd1*-mRNA signifikant zu erhöhen. Dagegen ist bei völliger MyD88-Defizienz keine signifikant unterschiedliche Menge an *Ccnd1*-mRNA intratumoral zu detektieren.

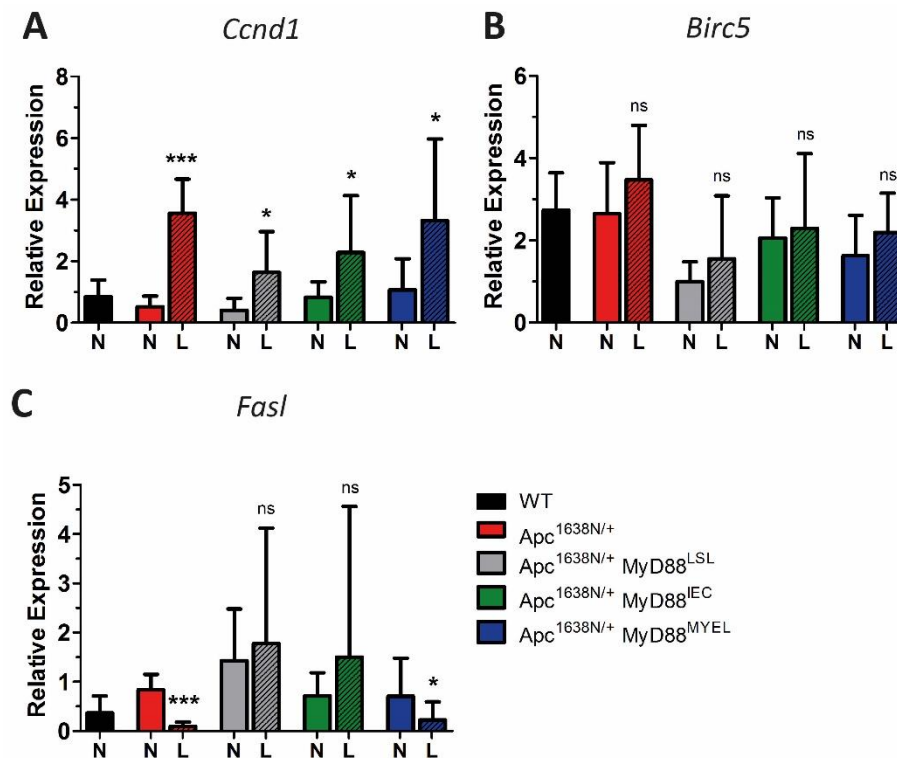


Abb. 26: MyD88-Abhängigkeit der Expression von Genen, die die Proliferation und Apoptose von Tumorzellen beeinflussen im Normal- (N) und Tumorgewebe (L). Die Expression von *Ccnd1* (Cyclin D1, **A**), *Birc5* (Survivin, **B**) und *Fasl* (Fas Ligand, **C**) wurden mit quantitativer RT-PCR gemessen (Referenztranskript: TF2D). Die Werte wurden in Relation zu Normaldarm aus Wildtyp-Mäusen gesetzt. $N \geq 5$ pro Mausmodell. Die statistische Analyse der Werte aus *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL}-Tieren für *Ccnd1*, bzw. aller Daten für das Gen *Fasl* erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test, alle übrigen Daten wurden mit dem ungepaarten T-Test ausgewertet. Abk.: WT – Wildtyp.

Im gesunden Darmgewebe konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von *Birc5* in Abhängigkeit von *Myd88*-Expression in IECs erfolgt (vgl. Abschnitt 4.3.3). Das von *Birc5* codierte Protein Survivin schützt Zellen vor Apoptose, indem es die Caspase-Aktivität inhibiert (Tamm *et al.*, 1998). Die Expression von *Birc5* ist in allen vier Mauslinien im Tumorgewebe leicht erhöht im Vergleich zu den jeweiligen gesunden Darmgeweben (Abb. 26 B). Es konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Normal- und zugehörigen Tumorgeweben festgestellt werden (*Apc*^{1638N/+} $p = 0,1686$; *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL} $p = 0,4191$; *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{IEC} $p = 0,7301$; *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{MYEL} $p = 0,1946$). Die Menge an *Birc5*-Transkripten war in *MyD88*-defizienten *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL}-Tieren im Vergleich aller Linien am geringsten.

Fas Ligand, codiert im Gen *Fasl*, ist ein weiterer Faktor, der das Zellüberleben reguliert. Fas Ligand wird hauptsächlich von zytotoxischen T-Zellen exprimiert und induziert Apoptose in den Zielzellen, die den Fas-Rezeptor ausdragen (Nagata, 1997; Peter *et al.*, 2015). Die Expression von *Fasl* unterschied sich nicht in den Normalgeweben, mit Ausnahme der Linie

$Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$, jedoch ist in dieser Gruppe eine hohe Standardabweichung zu beobachten (Abb. 26 C). Die Mengen an *FasI*-mRNA sind in Läsionen von $Apc^{1638N/+}$ -Tieren hochsignifikant verringert. In $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Läsionen ist ebenfalls eine signifikante Abnahme der *FasI*-Transkripte gezeigt. In jeweils zwei Läsionen der $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ -Modelle wurden vergleichsweise hohe Werte für *FasI*-Transkripte gemessen, sodass im Gegensatz zu den beiden anderen Linien hier keine signifikanten Unterschiede in der *FasI*-Expression festgestellt wurden ($Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ $p = 0,7922$; $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ $p = 0,0753$). Insgesamt wurde beobachtet, dass die Ausprägung des Fas Liganden in Tumoren deutlich verringert ist, wobei der Trend darauf hinweist, dass diese Funktion von MyD88 in Makrophagen ausgeht.

4.4.3 Einfluss von MyD88 auf die Barrierefunktion im Tumorgewebe

Die intestinale Barriere wird durch verschiedene physiologische Mechanismen erzeugt (vgl. Abschnitt 4.3). In Darmtumoren verliert das Gewebe seine eigentliche Struktur, es gehen z. Bsp. im Verlauf der Entdifferenzierung Zell-Zell-Kontakte zwischen den Epithelzellen verloren. Bakterien aus dem Lumen könnten leichter ins Tumorgewebe eindringen und dort Entzündungen hervorrufen. In diesem Abschnitt sollte die intratumorale Expression von Genen untersucht werden, die zur Bildung und Aufrechterhaltung dieser Barriere wichtig sind. Die Ausprägung von *Muc2*, *Pigr* und *F11r* wurde im gesunden Gewebe bereits untersucht (vgl. Abschnitt 4.3.4). Es konnten dabei keine Unterschiede bezüglich der *Muc2*-Expression in Abhängigkeit von MyD88 beobachtet werden. In allen untersuchten Läsionen ist dagegen die Menge an *Muc2*-Transkripten stark reduziert (Abb. 27 A), in $Apc^{1638N/+}$, $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Läsionen erreicht diese Reduktion das Signifikanzniveau im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe. Auch in $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ -Tumoren ist eine vergleichbare Abnahme von *Muc2*-Transkripten zu sehen, aufgrund der geringen Gruppengröße von $n = 2$ bei den Läsionen wurde hier allerdings keine Signifikanz erreicht ($p = 0,1235$). Eine MyD88-abhängige Expression von *Muc2* im Darm- und Tumorgewebe kann demzufolge ausgeschlossen werden.

Die Expression von *Pigr* erscheint ebenfalls unabhängig von MyD88 zu erfolgen. In den Läsionen aller untersuchten Mausmodelle ist die Menge an *Pigr*-mRNA leicht reduziert, allerdings sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Normal- und

Tumorgewebe detektiert worden ($Apc^{1638N/+}$ $p = 0,5725$; $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ $p = 0,3587$; $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ $p = 0,2031$; $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ $p = 0,3904$) (Abb. 27 B).

F11r wurde in Normalgewebe in den Modellen mit zelltypspezifischer Rekonstitution von *Myd88*, nicht aber in dem Modell mit globaler *MyD88*-Defizienz, weniger stark exprimiert im Vergleich zum Wildtyp. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das codierte Protein JAM-A in Darmläsionen von *Apc*-mutierten Tieren in verminderten Mengen vorhanden ist (Grivennikov *et al.*, 2012). In den Läsionen des $Apc^{1638N/+}$ -Modells ist die *F11r*-Expression verringert, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant vom zugehörigen gesunden Darmepithel ($p = 0,1088$) (Abb. 27 C). In allen weiteren Modellen wurden ebenso keine signifikanten Unterschiede bezüglich der *F11r*-Expression zwischen Normal- und Läsionsgewebe festgestellt ($Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ $p = 0,9128$; $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ $p = 0,4172$; $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ $p = 0,8194$).

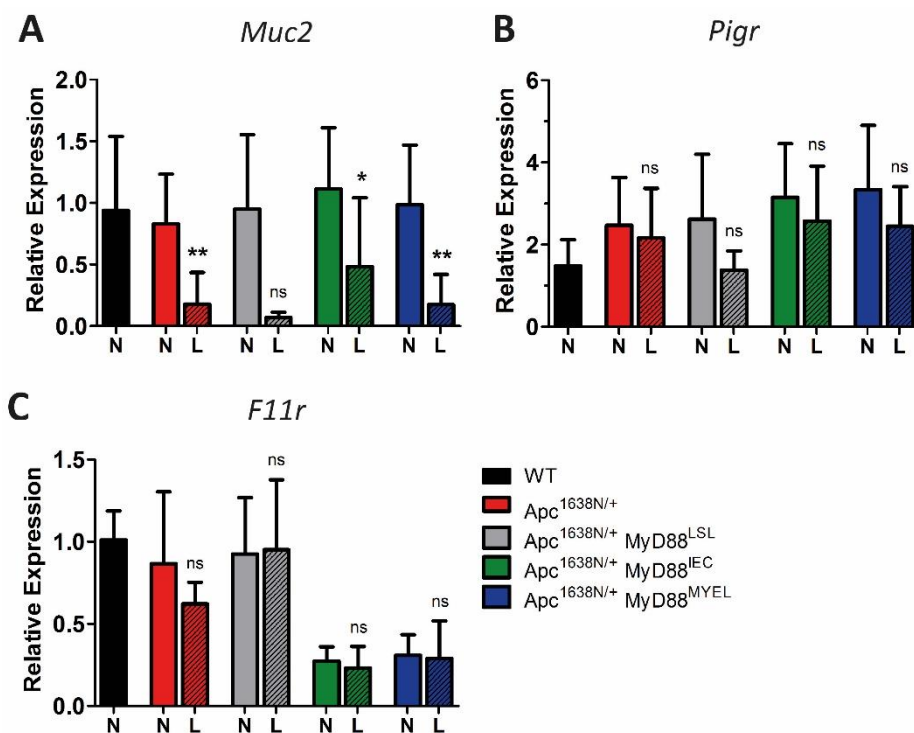


Abb. 27: Expression von Genen, die die intestinale Barrierefunktion beeinflussen, in Abhängigkeit von *MyD88* in Normal- (N) und Tumorgewebe (L). Die Expression von *Muc2* (Mucin-2, A), *Pigr* (poly-Immunglobulin-Rezeptor, B) und *F11r* (JAM-A, C). $N \geq 3$ pro Mausmodell. Als Referenztranskript wurde TF2D verwendet. Die Werte sind in Relation zu Normaldarm aus Wildtyp-Mäusen gesetzt. Abk.: WT – Wildtyp.

Somit werden die Gene *Muc2* und *Pigr* in Läsionen in deutlich geringeren Mengen exprimiert im Vergleich zum gesunden Darmepithel, während die *F11r*-Expression annähernd unverändert ist. Ob daraus ein funktionaler Barriere Defekt entsteht, kann allerdings nur durch

weiterführende Experimente geklärt werden. Die Ausprägung dieser Gene erscheint jedoch unabhängig von MyD88.

4.4.4 Zytokinexpression in Läsionen

TLR-induzierte Aktivierung von NF- κ B führt zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine. Eine Zunahme pro-inflammatorischer Zytokine in Tumorgewebe wurde bereits beschrieben: so konnte gezeigt werden, dass die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-22, IL-23 und TNF α in Läsionen aus Apc-induzierten Tumormodellen hochreguliert sind (Grivennikov *et al.*, 2012; Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007). Da fast alle TLRs, sowie die Rezeptoren für IL-1 und IL-18 über MyD88 Signale intrazellulär weiterleiten, sollte im folgenden Abschnitt die Expression pro-inflammatorischer Zytokine in Abhängigkeit von MyD88 untersucht werden. Hierzu wurden mRNAs aus Normal- und Läsionsgewebe aus Wildtyp-Mäusen und den vier Apc^{1638N/+}-Modellen isoliert und die Transkripte von IL-1 β , IL-6, IL-22, IL-23 und TNF α quantifiziert.

Die Ergebnisse zur *Il22*-, *Il23*- und *Tnf*-Expression sind in Abbildung 28 dargestellt. *Il22* ist im gesunden Darmgewebe aller untersuchten Tiere stark exprimiert, mit der Ausnahme von Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}-Mäusen, wo sich im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine starke Verringerung zeigt. Im parental Apc^{1638N/+}-Modell, sowie in den Linien mit zelltypspezifischer Re-Expression von *Myd88* (Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC} und Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}), ist das Zytokin im Tumor in signifikant geringeren Mengen exprimiert. Im global *Myd88*-defizienten Modell Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL} konnte aufgrund der wenigen Messdaten der Tumore von n = 2 keine statistische Analyse erfolgen, jedoch war hier die gleiche Tendenz zu beobachten (Abb. 28 A). *Il23* erscheint ebenfalls, sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe, unabhängig von MyD88 exprimiert zu werden. Die Werte aus den Normalgeweben sind in den vier Modellen mit mutiertem Apc^{1638N}-Allel vergleichbar. In allen vier Linien steigt die Menge von *Il23*-Transkripten in den Läsionen stark an, sodass signifikante Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe in den Modellen Apc^{1638N/+}, Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL} und Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL} erreicht werden. Der Unterschied in Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC} zwischen Normal- und Tumorgewebe ist nur knapp nicht signifikant (p = 0,0672), jedoch ist die gleiche Tendenz zu erkennen (Abb. 28 B). *Tnf* wird, ebenso wie *Il23*, im gesunden Darmgewebe unabhängig von MyD88 in ähnlichen Mengen exprimiert (Abb. 28 C). In allen vier Apc^{1638N/+}-basierten Modellen ist *Tnf* in den Läsionen hochsignifikant hochreguliert, wobei kein Einfluss von MyD88 festzustellen war.

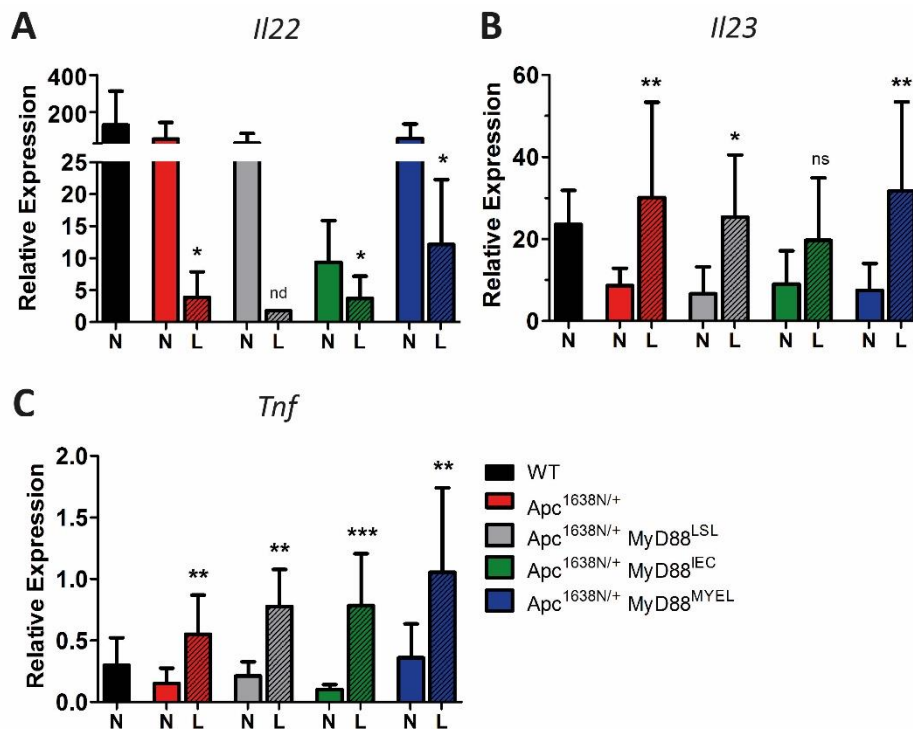


Abb. 28: Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-22 (Il22), IL-23 (Il23) und TNF α (Tnf) im Normal- (N) und Tumorgewebe (L) in Abhängigkeit der MyD88-Expression. (A) Il22-Expression: $n \geq 4$ pro Gruppe, außer für die *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL} L-Gruppe ($n = 2$), für die keine statistische Analyse durchgeführt wurde. Die statistische Analyse der *Apc*^{1638N/+}, *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{IEC}- und *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{MYEL}-Modelle erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. (B) Il23-Expression: $n \geq 5$ pro Mauslinie. (C) Tnf-Expression: $n \geq 5$ pro Mauslinie. Als Referenz für alle Zielgene wurde die Expression von TF2D gemessen. Die Daten wurden in Relation zur Expression der Zytokine in Milz von Wildtyp-Tieren gesetzt. Abk.: nd – statistische Analyse nicht durchgeführt, WT – Wildtyp.

Die beiden pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 sind die einzigen in dieser Arbeit untersuchten Zytokine, deren Expression von *Myd88* abhängig war. *Il1b* ist im gesunden Darmgewebe aller untersuchten Mäuse in gleichen Mengen exprimiert (Abb. 29 A). *Il1b*-Transkripte waren in den Läsionen von parental *Apc*^{1638N/+}-Tieren signifikant erhöht, während in *MyD88*-defizienten Mäusen (*Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL}) keine Unterschiede bezüglich der Mengen an *Il1b*-Transkript zwischen Normal- und Tumorgewebe detektiert wurden ($p = 1,000$). Eine zelltypspezifische Rekonstitution der *Myd88*-Expression konnte den Phänotyp der parental *Apc*^{1638N/+}-Tiere wiederherstellen, wobei es keinen Unterschied machte, ob die Re-Expression im Darmepithel oder in Makrophagen erfolgte. Sehr ähnliche Beobachtungen, die eine drastische Tumor-spezifische Steigerung der Expression bei einer hochsignifikanten Abhängigkeit von *MyD88* ergab, wurden für das Zytokin *Il6* gemacht, wobei auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunder Darmmukosa und Läsionen in *MyD88*-defizienten *Apc*^{1638N/+}-Tieren ermittelt wurden ($p = 0,9307$) (Abb. 29 B).

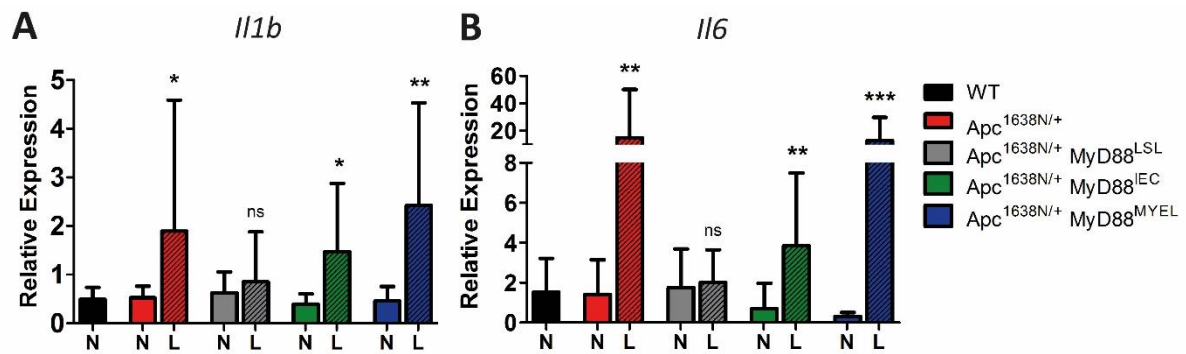


Abb. 29: Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1beta (Il1b) und IL-6 (Il6) im Normal- (N) und Tumorgewebe (L) in Abhängigkeit der Myd88-Expression. Die Expression der Gene wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Als Referenztranskript wurde TF2D verwendet. Die Daten wurden in Relation zur Expression der Zytokine in Milz von Wildtyp-Tieren gesetzt. $N \geq 5$ pro Mausmodell. Die statistische Analyse der Daten von N und L der jeweiligen Mausmodelle erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test. Abk.: WT – Wildtyp.

Bezüglich der Expression pro-inflammatorischer Zytokine war zu beobachten, dass IL-1 β , IL-6, IL-23 und TNF α in Läsionen von Apc^{1638N/+}-Tieren stark erhöht sind, während IL-22 reduziert war. Eine Abhängigkeit von MyD88 hat sich allerdings nur bei den Zytokinen IL-1 β und IL-6 herausgestellt. Beide Interleukine zeigten in Apc^{1638N/+}- und Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}-Tieren die gleichen Expressionsmuster. Auffällig ist, dass *Il1b* und *Il6* in Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}-Läsionen ebenfalls in größeren Mengen exprimiert werden, verglichen mit gesundem Darmepithel, ihre Werte aber, vor allem für IL-6, bei weitem nicht das Ausmaß erreichen wie bei parentalen Apc^{1638N/+}-Tieren, oder bei Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}-Tumoren. In MyD88-defizienten Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}-Tieren war hingegen keinerlei Erhöhung der *Il1b*- und *Il6*-Expression in Läsionen zu beobachten. Folglich werden *Il1b* und *Il6* im Darm- und Tumorgewebe in Abhängigkeit von MyD88 exprimiert, wobei die Ausprägung von *Myd88* in Makrophagen entscheidend ist, um den parentalen Phänotyp der Apc^{1638N/+}-Tiere hinsichtlich der *Il1b*- und *Il6*-Expression herzustellen.

IL-10 ist ein Zytokin mit anti-inflammatorischer Wirkung und wird von Zellen des innate und des adaptiven Immunsystems exprimiert (Saraiva and O'Garra, 2010). Es wurde gezeigt, dass *Il10*-Induktion nach TLR-Stimulation und Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 sowie des NF- κ B-Signalwegs in Monozyten erfolgt (Saraiva and O'Garra, 2010). Im gesunden Darmgewebe von Wildtyp-Tieren und den hier generierten genetisch definierten Linien wurde *Il10* in vergleichbaren Mengen exprimiert (Abb. 30). Eine Regulation von *Il10* durch MyD88-abhängige Signalwege kann in diesen Mausmodellen im Darmgewebe nicht eindeutig bestätigt werden. In allen vier Mauslinien mit Apc^{1638N}-Allel ist die *Il10*-Expression in Läsionen

verringert, es wurden aber keine signifikanten Unterschiede ermittelt ($Apc^{1638N/+}$ $p = 0,1051$; $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ $p = 0,0928$; $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ $p = 0,4006$; $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ $p = 0,0629$).

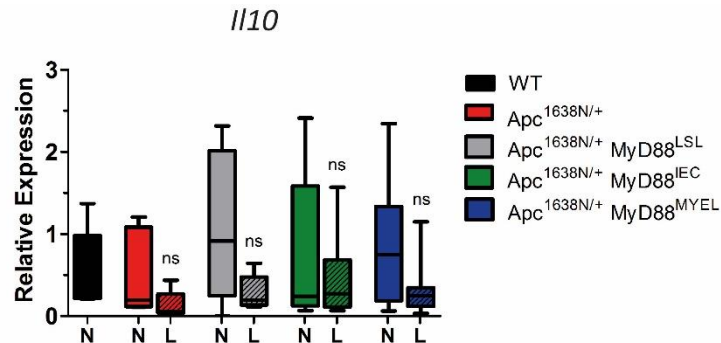


Abb. 30: Expression von Il10 (IL-10) im Normal- (N) und Tumorgewebe (L) in Abhängigkeit der Myd88-Expression. Die Il10-Expression wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Als Referenztranskript wurde TF2D verwendet. Die Daten wurden in Relation zur Expression von Il10 in der Milz von Wildtyp-Tieren gesetzt. $N \geq 5$ pro Mausmodell. Die Messwerte sind als Box-Plot mit Antenne (Whisker) vom kleinsten zum größten Wert dargestellt. Abk.: WT – Wildtyp.

4.4.5 Untersuchungen zur Anzahl intra-tumoraler Makrophagen

Aktuell gilt durch zahlreiche Befunde als gesichert, dass das Immunsystem eine bedeutende Rolle bei der Tumorgenese einnimmt (Hanahan and Weinberg, 2011). Im folgenden Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, inwiefern TLR/MyD88-Signalwege die Anwesenheit von innate und adaptiven Immunzellen in Läsionen beeinflussen, nachdem zuvor bereits die Ausprägung von immun-regulatorischen Zytokinen untersucht worden war. Zunächst sollte die Infiltration von Makrophagen untersucht werden. Dazu wurde zum einen die Expression von *Lyz2* (Lysozym M) gemessen, da Lysozym M hauptsächlich von Makrophagen synthetisiert wird (Cross *et al.*, 1988). *Lyz2*-mRNA wurde in sowohl gesunden Darmgeweben als auch in Läsionen nachgewiesen (Abb. 31 A). Beim Vergleich der Transkriptmengen in Normal- und Tumorgeweben wurden keine signifikanten Unterschiede in den Mausmodell $Apc^{1638N/+}$, $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ ermittelt ($Apc^{1638N/+}$ $p = 0,3015$; $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ $p = 0,8807$; $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ $p = 0,9600$). Nur in $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ -Tieren wurde ein signifikanter Anstieg von *Lyz2*-mRNA in Läsionen im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe detektiert. Zur unabhängigen Überprüfung dieser Ergebnisse wurden Gefrierschnitte aus gesundem Gewebe und Läsionen von Anja Conrad (AG Janssen) mit einem *Mac1*-(*Macrophage-1 antigen*) Antikörper gefärbt. Es wurden von jedem Modell Gewebe aus jeweils drei Tieren analysiert. Jeweils ein Beispiel ist in Abbildung

31 B (Normalgewebe) bzw. 31 C (Läsion) abgebildet. In den abgebildeten Normalgeweben scheinen mehr Mac-1-positive Zellen in $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL-}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC-}$ Modellen vorzuliegen. In der Summe aus allen untersuchten Proben konnten jedoch keine Unterschiede in der Anzahl Mac-1-positiver Zellen im Normalgewebe (Jejunum) der vier Modelle ermittelt werden. In den untersuchten Tumorgeweben wurden etwas mehr Mac-1-positive Zellen detektiert, verglichen mit Normalgewebe aus den jeweiligen Tieren (Abb. 31 C). Allerdings konnten erneut keine Unterschiede hinsichtlich Mac-1-positiver Zellen in Abhängigkeit der *Myd88*-Expression detektiert werden. Zusätzlich wurden die Gewebe gegen F4/80 gefärbt. Dabei wurden ebenfalls keine Unterschiede an F4/80-positiven Zellen ermittelt (Daten nicht gezeigt).

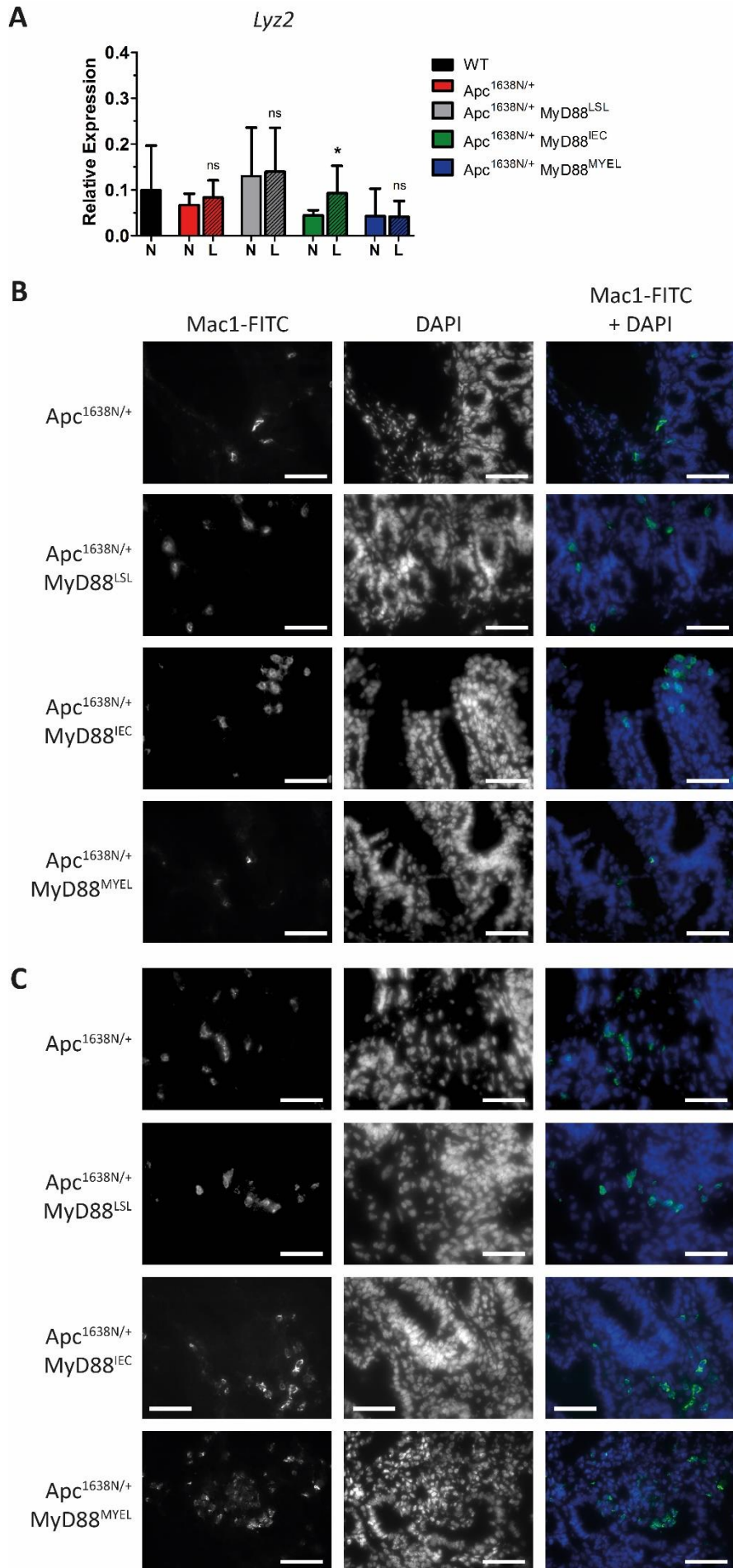


Abb. 31: Untersuchungen zur Anwesenheit von Makrophagen im gesunden Darm und in Läsionen mittels qPCR und Immuncytochemie. (A) Expression von Lyz2 (Lysozym M) als Marker für Makrophagen in gesundem Darmgewebe (N) und Läsionen (L). Als Referenz wurde die Expression von TF2D gemessen. Die Daten wurden in Relation zu Milzgewebe aus Wildtyp-Tieren gesetzt. $N \geq 5$ pro Mausmodell. (B und C) Auf Gewebeschnitten wurden Makrophagen mit einem anti-Mac1-Antikörper in Dünndarmgewebe aus Jejunum (B) und in Läsionen (C) angefärbt. Zellkerne sind mit DAPI angefärbt. Abgebildet ist für jedes Mausmodell jeweils eine repräsentative Färbung. Die Maßstabsbalken entsprechen 50 μm . Abk.: WT – Wildtyp.

4.4.6 Die Rolle von MyD88 bei der Infiltration von T-Zellen

In Labor-eigenen Vorarbeiten konnte mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass Darmläsionen aus $\text{Apc}^{1638\text{N}/+}$ -Tieren eine signifikant verminderte Anzahl an T-Zellen haben verglichen zu gesunder Darmmukosa (Audehm, 2012; Ochs, 2012). Um zu ermitteln, ob sich die Anzahl von infiltrierenden T-Zellen in Tumorgeweben in Abhängigkeit von MyD88 verändert, wurden zunächst Gewebeschnitte mit spezifischen Antikörpern gegen die T-Zell-Oberflächenmarker CD3 und CD4, bzw. CD3 und CD8 gefärbt (Abb. 32 A bzw. B). In den Gruppen $\text{Apc}^{1638\text{N}/+}$, $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{LSL}}$ und $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{MYEL}}$ wurden jeweils ≥ 3 Läsionen aus ≥ 2 Tieren analysiert. Aus der Linie $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{IEC}}$ konnte bis zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nur eine Läsion aus einem Tier untersucht werden. Die Gewebeschnitte und Färbungen wurden von Anja Conrad (AG Janssen) angefertigt und am Mikroskop aufgenommen. Es wurden von jedem Tumor 16 Einzelbilder aufgenommen und anschließend mit Hilfe des Programms AxioVision MosaiX von Zeiss zu einer Übersichtsaufnahme zusammengesetzt. Sowohl die $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ doppel-positiven T-Helferzellen, als auch die $\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$ doppel-positiven zytotoxischen Effektor-T-Zellen waren in den Läsionen deutlich nachweisbar, erschienen allerdings sehr heterogen verteilt. Die Anzahl $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ doppel-positiver T-Zellen in Läsionen aus $\text{Apc}^{1638\text{N}/+}$ -Mäusen erschien erhöht im Vergleich zu $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{LSL}}$ - und $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{IEC}}$ -Tieren, wobei eine Quantifizierung der Unterschiede zwischen den genetischen Modellen aufgrund der Tumorerheterogenität und von Schnittartefakten nur schwer möglich war (A). Bei $\text{CD3}^+ \text{CD8}^+$ doppel-positiven Effektor-T-Zellen konnte zwischen den vier Modellen kein deutlicher Unterschied ausgemacht werden (B). Um die Anzahl an T-Zellen in Läsionen präziser quantifizieren zu können, wurden daher quantitative RT-PCRs für $\text{CD3}\epsilon$, einer Untereinheit des T-Zell Co-Rezeptors CD3, durchgeführt. CD3 ist auf allen aktivierten T-Zellen zu finden, auf Proteinebene ist es zunächst im Zytoplasma unreifer T-Zellen lokalisiert und wird nach Aktivierung der T-Zellen an deren Zelloberfläche transportiert (Murphy *et al.*, 2011). Cd3e -Transkripte wurden in allen vier Modellen in gesunden Darmgeweben in vergleichbaren Mengen detektiert (Abb. 32 C). In den zugehörigen

Läsionen wurden verringerte Mengen der Transkripte detektiert, wobei in der parentalen, MyD88-profizienten Linie $Apc^{1638N/+}$, sowie bei Re-Expression von *Myd88* in Makrophagen ($Apc^{1638N/+}$ MyD88^{MYEL}) eine signifikant verminderte *Cd3e*-Expression ermittelt wurde. Global MyD88-defiziente Tiere, sowie Tiere mit spezifischer Re-Expression von *Myd88* in Darmepithelzellen zeigten eine deutlich verstärkte T-Zelldichte in Tumoren, der Unterschied zwischen Läsionen und Normalmukosa war hier nicht mehr signifikant ($Apc^{1638N/+}$ MyD88^{LSL} $p = 0,3857$; $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{IEC} $p = 0,1245$).

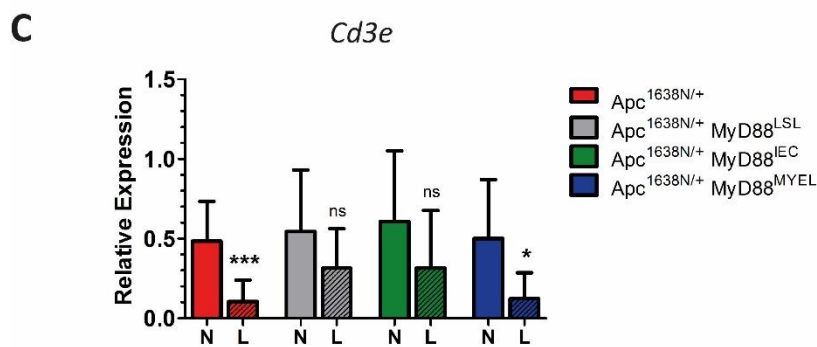
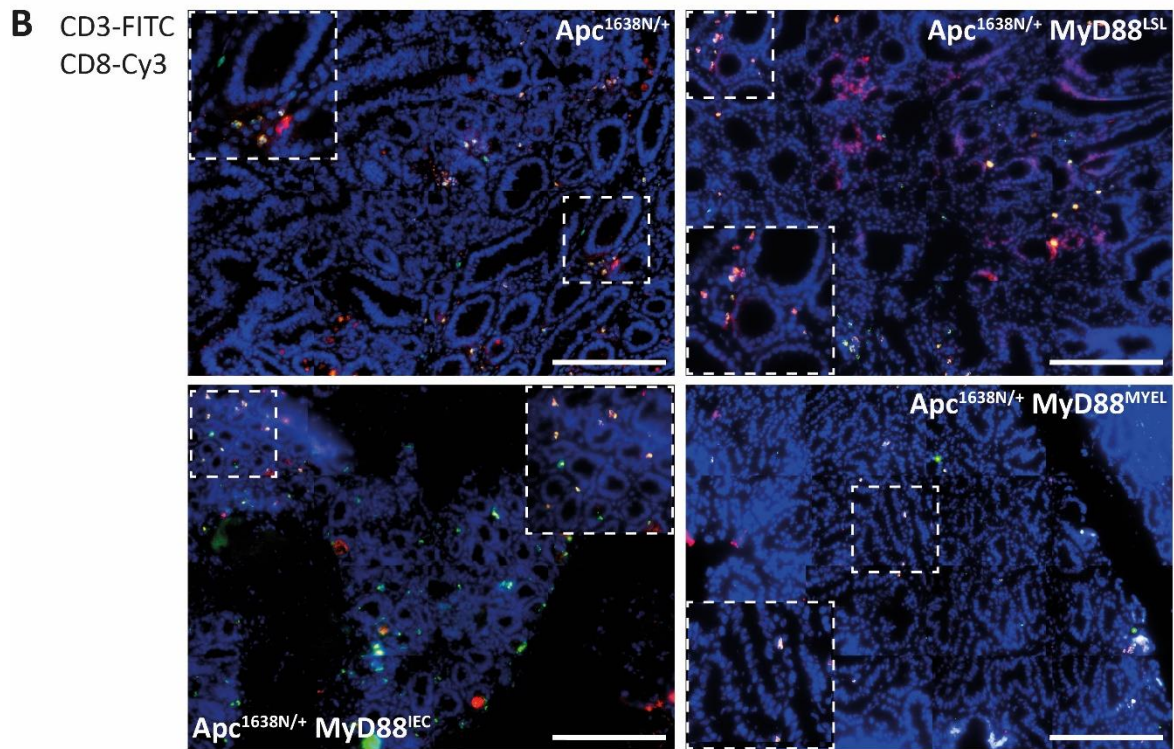
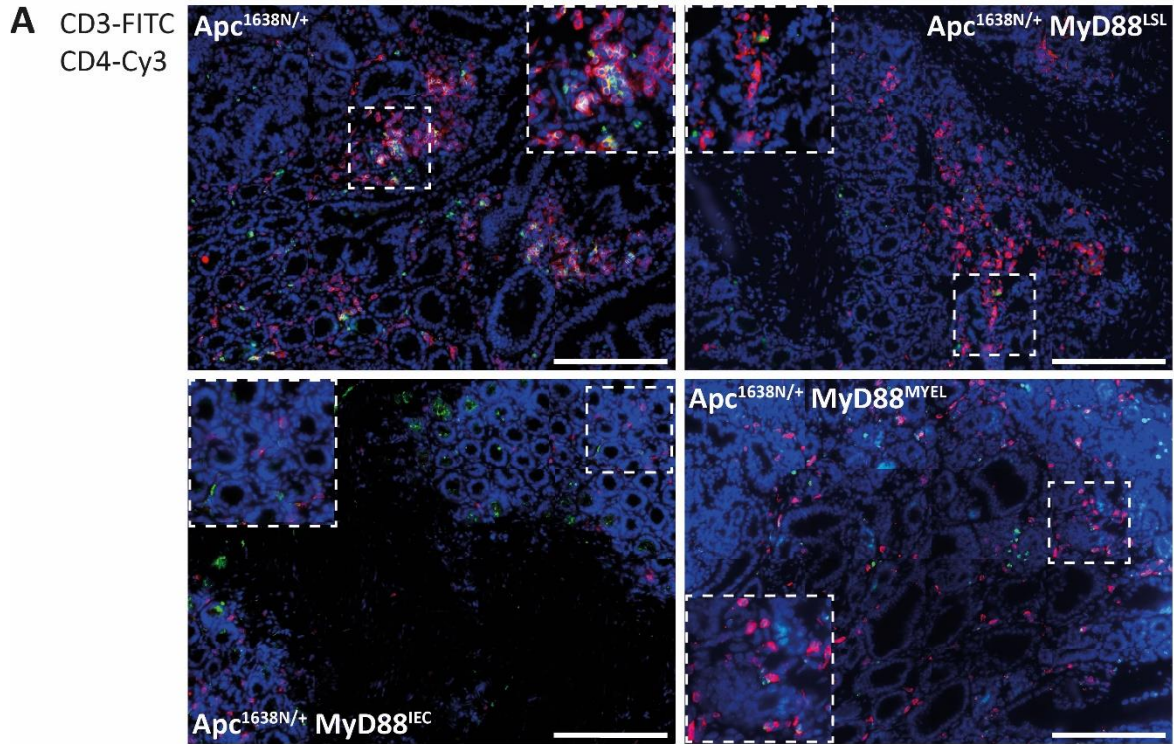


Abb. 32: Anwesenheit intratumoralen T-Zellen in Abhängigkeit von MyD88. Gewebeschnitte von Läsionen wurden gegen CD3 (FITC, grün) und CD4 (Cy3, rot) zur Darstellung von T-Helferzellen (A) bzw. gegen CD3 (FITC, grün) und CD8 (Cy3, rot) zur Darstellung von zytotoxischen T-Zellen (B) gefärbt. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Färbung. Die Maßstabsbalken entsprechen 200 μm . (C) Zur unabhängigen Quantifizierung von intratumoralen T-Zellen wurde die Expression von Cd3e (CD3 ϵ , CD3 Untereinheit epsilon) mit quantitativer RT-PCR gemessen (Referenztranskript TF2D). Die Messwerte sind relativ zur Milz von Wildtyp-Mäusen dargestellt.

Um den Phänotyp der infiltrierenden T-Zellen im Tumorgewebe genauer zu bestimmen, wurde die Expression von spezifischen Markern für verschiedene T-Zellpopulationen untersucht. Zunächst sollten durch die Messung von *Gata3*- und *Foxp3*-Transkripten die Anwesenheit von T_H2- (*Gata3*) (Evans and Jenner, 2013) und regulatorischer T-Zellen (*Foxp3*) (Mougiakakos *et al.*, 2010) analysiert werden. Abbildung 33 A zeigt die Expression von *Gata3* in Abhängigkeit der *Myd88*-Expression. *Gata3* ist in allen Mausmodellen in den Läsionen signifikant erhöht verglichen mit den jeweiligen Normalgeweben, somit scheint eine Infiltration von T_H2-Zellen in Tumoren unabhängig von MyD88 vorzuliegen. Die Expression von *Foxp3* als Marker für regulatorische T-Zellen ist unverändert (Abb. 33 B), es wurden keine signifikanten Unterschiede von *Foxp3*-Transkriptmengen zwischen Normal- und zugehörigen Tumorgeweben gemessen (*Apc*^{1638N/+} p = 0,6066; *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL} p = 0,5929; *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{IEC} p = 0,2028; *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{MYEL} p = 0,6137).

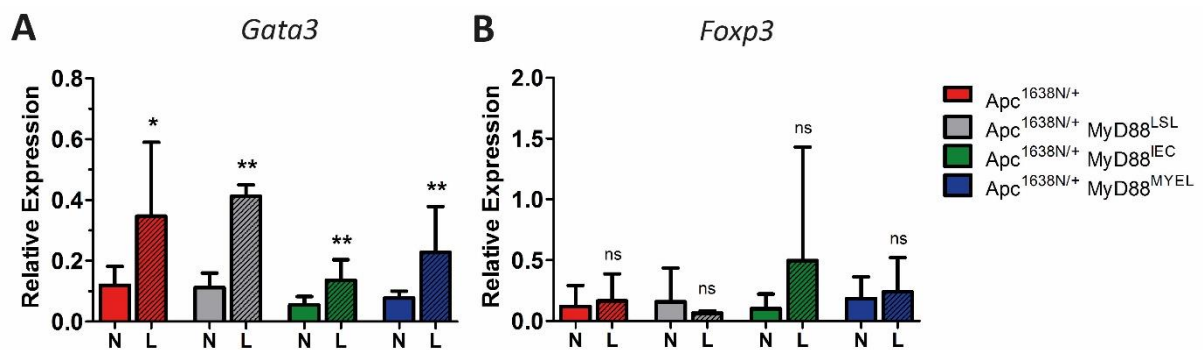


Abb. 33: Expression von *Gata3* (A) und *Foxp3* (B) in normaler Darmmukosa (N) und in Darmläsionen (L) in Abhängigkeit der *Myd88*-Expression. Die Expression von *Gata3* als Marker für T_H2-Zellen und *Foxp3* als Marker für regulatorische T-Zellen wurde mit quantitativer RT-PCR untersucht. Als Referenz diente TF2D. Die Messwerte sind relativ zur Expression in Milz Wildtyp-Mäusen dargestellt. N \geq 3 pro Mausmodell.

Anhand der *Tbx21*- und *Rorc*-Expressionen sollte das Vorhandensein von T_H1- und T_H17-Zellpopulationen bestimmt werden. Die Expression von *Tbx21* (T-bet, T_H1-Zellen) (Evans and Jenner, 2013) und *Rorc* (ROR γ T, T_H17-Zellen) (Bailey *et al.*, 2014) in *Apc*^{1638N/+}-Läsionen ist signifikant vermindert verglichen mit gesundem Darmgewebe (Abb. 34 A und B). Ebenso ist die Menge an *Tbx21*- und *Rorc*-Transkripten in *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{MYEL}-Läsionen signifikant reduziert im Vergleich zu zugehörigem Normalgewebe. Eine signifikante intratumorale

Reduktion von *Tbx21* oder *Rorc* konnte in global MyD88-defizienten Tieren (*Tbx21* $p = 0,7356$; *Rorc* $p = 0,0962$), sowie bei spezifischer Re-Expression von *Myd88* in Darmepithelzellen (*Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL} und *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{IEC}) hingegen nicht beobachtet werden (*Tbx21* $p = 0,4709$; *Rorc* $p = 0,7470$).

Granzyme B (*Gzmb*) ist eine Serinprotease, die von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen exprimiert wird (Afonina *et al.*, 2010). Granzyme B wird sezerniert und induziert Apoptose in Zielzellen. Im Tumorgewebe von *Apc*^{1638N/+}-, *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{IEC}- und *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{MYEL}-Mäusen ist die Expression von *Gzmb* signifikant reduziert verglichen mit gesundem Darmgewebe (Abb. 34 C). In *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL}-Tieren ist ebenfalls eine Reduktion von *Gzmb*-Transkripten im Tumorgewebe erkennbar, aufgrund der geringen Gruppengröße von $n = 2$ bei den Läsionen war aber keine statistische Analyse möglich.

Der Rezeptor für das Zytokin IL-23 (*Il23r*) ist auf T_H17-Zellen exprimiert, wo er deren Differenzierung induziert (McGeachy *et al.*, 2009). Die Expression von *Il23r* ist, wie schon bei *Rorc* zu verzeichnen war, in Läsionen von *Apc*^{1638N/+}- und *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{MYEL}-Mäusen signifikant reduziert. Keine signifikanten Unterschiede wurden in den Modellen *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL} ($p = 0,2355$) und *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{IEC} ($p = 0,4839$) detektiert (Abb. 34 D).

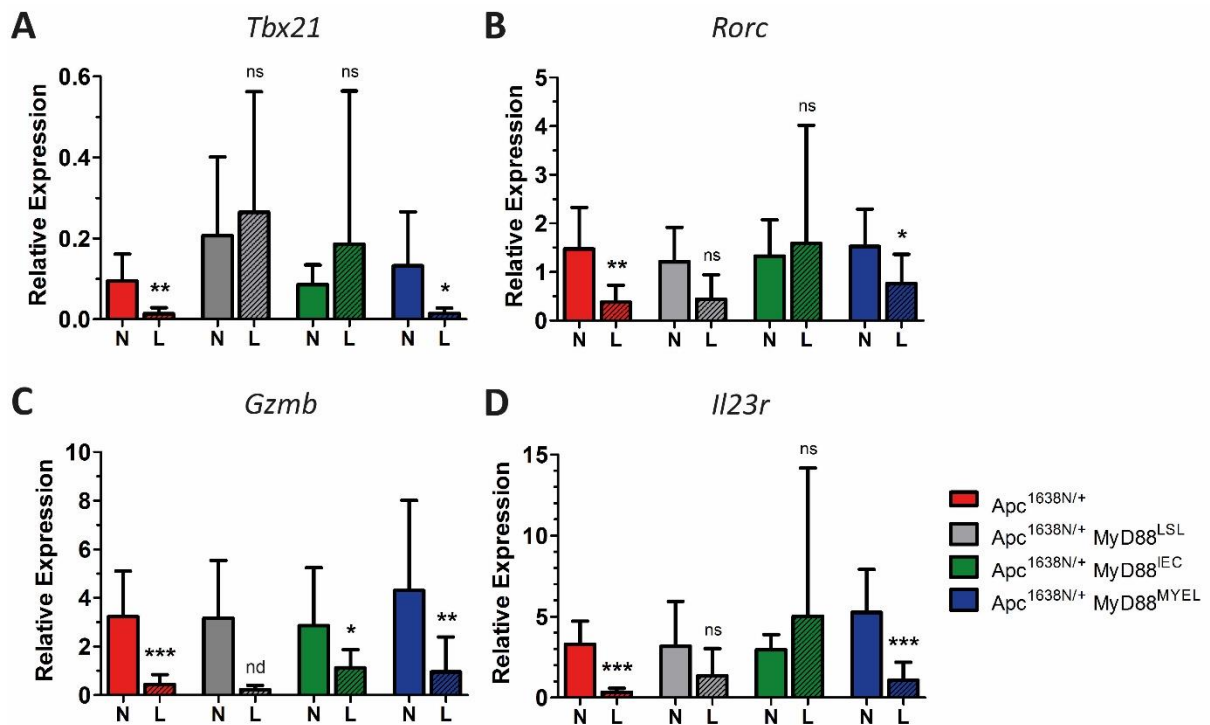


Abb. 34: Expression von *Tbx21* (A), *Rorc* (B), *Gzmb* (C) und *Il23r* (D) im gesunden Darmgewebe (N) und in Läsionen (L). (A) Expression von *Tbx21* (*T*-bet, Marker für T_H1 -Zellen), $n \geq 4$ pro Mausmodell. (B) *Rorc* (*Ror γ T*, Marker für T_H17 -Zellen), $n \geq 4$ pro Mausmodell. (C) *Gzmb* (Granzyme B, exprimiert von zytotoxischen T-Zellen), $n \geq 4$, bzw. $n = 2$ ($Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$ L). Die statistische Analyse wurde hier mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests durchgeführt. Eine statistische Analyse war bei der $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$ -Gruppe nicht möglich. (D) *Il23r* (*IL-23* Rezeptor, exprimiert auf T_H17 -Zellen), $n \geq 5$. Für alle untersuchten Gene diente *TF2D* als Referenztranskript. Die Messwerte sind relativ zu Wildtyp-Milz dargestellt. Abk.: nd – statistische Analyse nicht durchgeführt.

Zusammenfassend wurde eine erhöhte intratumorale Expression von *Gata3* detektiert, was auf erhöhte Anwesenheit von T_H2 -Zellen in Läsionen aus allen untersuchten genetischen Modellen schließen lässt. Die verminderte Expression von *Tbx21*, *Rorc* und *Il23r* in Läsionen von $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$ -Tieren lässt eine geringere intratumorale Anzahl von T_H1 - und T_H17 -Zellen vermuten. Bezüglich der *Foxp3*-Expression und daraus folgender Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen gesundem Darmepithel und Tumorgewebe beobachtet.

4.4.7 MyD88-abhängige Ausprägung von *Snai1* und *Snai2* in Läsionen

Neben den intratumoralen Immuninfiltraten sollte der Einfluss der MyD88-abhängigen Signaltransduktion auf die De-Differenzierung der Tumore untersucht werden, die häufig als „Epithelial-Mesenchymale Transition“ (EMT) bezeichnet wird (Hanahan and Weinberg, 2011). Die Transkriptionsfaktoren *Snai1* (Snail) und *Snai2* (Slug) sind wichtige Regulatoren der embryonalen Gewebeerwicklung: sie inhibieren die Expression von Adhäsionsmolekülen,

was in der Embryogenese dazu führt, dass sich Zellen zu mesenchymalen Geweben entwickeln (Micalizzi *et al.*, 2010). Es wurden außerdem Veränderungen der *Snai1*- und *Snai2*-Expression während der Tumorgenese von Läsionen epithelialen Ursprungs wie etwa Adenokarzinomen gezeigt, indem sie den Phänotyp von Tumorzellen vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp verändern und damit Tumorzellmigration und Metastasierung induzieren (Boyer *et al.*, 2000). Aufgrund der unterschiedlich starken Tumorprogression, die in den vier $Apc^{1638N/+}$ -basierten Modellen beobachtet wurden, wurde hier die Expression von *Snai1* und *Snai2* untersucht. Die relative Expression von *Snai1*-mRNA war in Läsionen von $Apc^{1638N/+}$ -Tieren hochsignifikant im Vergleich zum Normaldarm erhöht (Abb. 35 A). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Mengen der *Snai1* mRNA in den Linien $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ ($p = 0,8006$) und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ ($p = 0,9120$) nicht zwischen Normal- und Tumorgewebe. Bei einer Re-Expression von *Myd88* in myeloiden Zellen ($Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$) war in etwa eine Verdopplung der relativen Transkriptmenge in Läsionen verglichen zum Normalgewebe feststellbar, das Signifikanzniveau wurde hier nur knapp nicht erreicht ($p = 0,0898$). Die gemessenen Mengen an *Snai2*-mRNA waren in Läsionen aus $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Tieren hochsignifikant erhöht im Vergleich zu der jeweiligen gesunden Darmmukosa. Keine Unterschiede zwischen Normaldarm und Tumorgewebe wurden erneut in den Modellen mit globaler *MyD88*-Defizienz ($Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$, $p = 0,7254$), oder Re-Expression im Darmepithel ($Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$, $p = 0,9891$) detektiert. Für eine weitere Untersuchung wurden Gewebeschnitte von Läsionen der vier Modelle mit einem spezifischen Antikörper gegen Slug gefärbt. In den Gruppen $Apc^{1638N/+}$, $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ wurden jeweils ≥ 3 Läsionen aus ≥ 2 Tieren analysiert. Aus der Linie $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ konnte bis zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nur eine Läsion aus einem Tier untersucht werden. Die Färbungen und Aufnahmen am Mikroskop wurden von Anja Conrad (AG Janssen) angefertigt. In den in Abb. 35 B dargestellten repräsentativen Färbungen wurden vermehrt Slug-positive Zellkerne in $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Läsionen detektiert (Beispiele für Slug-positive Zellkerne sind durch Pfeile hervorgehoben). Die Slug-positiven Zellen waren meist in Gruppen anzutreffen und befanden sich durchweg in de-differenzierten Stromaarealen, die keine epitheliale Struktur oder Zellanordnung aufwiesen. In Tumoren aus $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ -Mäusen wurden hingegen nur ganz vereinzelt Slug-gefärbte Zellkerne gesehen.

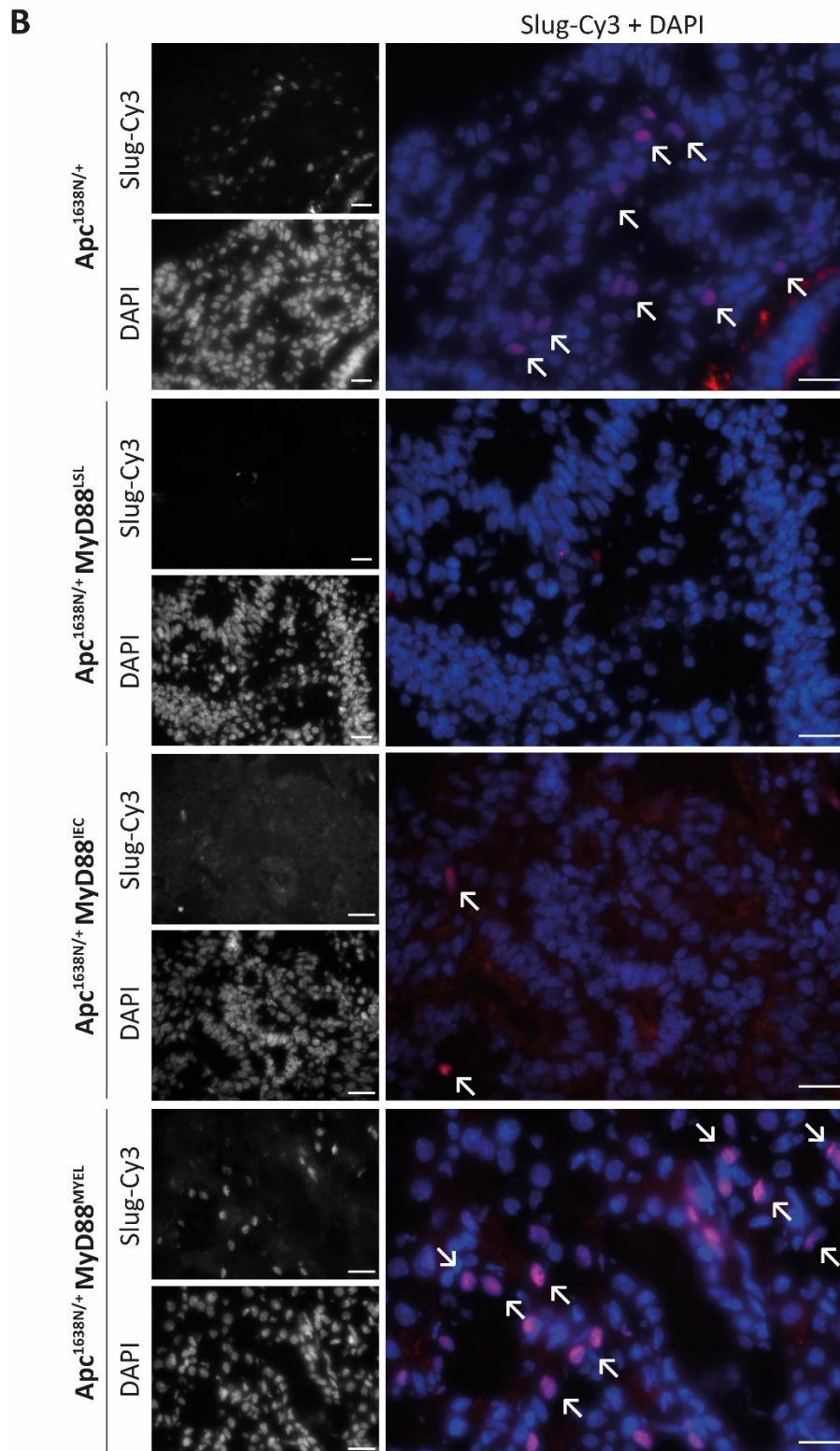
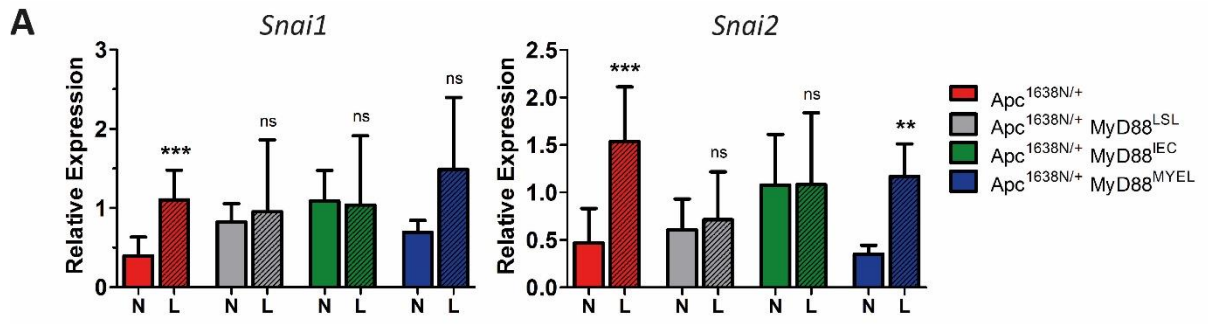


Abb. 35: Einfluss von MyD88 auf die Expression von Snai1 (Snail) und Snai2 (Slug) und die Ausprägung von Slug in Läsionen. (A) Die Expression von Snai1 und Snai2 wurde mit quantitativer RT-PCR in normalem Darmgewebe (N) und Läsionen (L) gemessen. $N \geq 4$ pro Mausmodell. TF2D wurde als Referenztranskript gemessen. Die Expressionswerte sind in Relation zu Wildtyp-Darmgewebe dargestellt. (B) Gewebeschnitten von Läsionen wurden gegen Slug (Cy3, rot) gefärbt. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Von jedem Mausmodell ist jeweils eine repräsentative Läsion abgebildet. Die Pfeile zeigen Beispiele Slug-positiver Zellkerne. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 μm .

Diese Ergebnisse zeigen, dass die EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren Snail und Slug in den Modellen $\text{Apc}^{1638\text{N}/+}$ und $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{MYEL}}$ sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene vermehrt exprimiert sind, und das deutlich mehr Slug-Protein in Zellkernen in $\text{Apc}^{1638\text{N}/+}$ und $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{MYEL}}$ -Läsionen vorhanden ist verglichen mit $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{LSL}}$ - und $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{IEC}}$ -Tumoren.

4.4.8 Expression verschiedener Stammzellfaktoren in Abhängigkeit von MyD88

Die intestinalen Stammzellen, die die Erneuerung des intestinalen Epithels gewährleisten, sind in den Krypten des Darmepithels lokalisiert. Intestinale Stammzellen sind durch die Expression verschiedener Faktoren charakterisiert, die wiederum auch in kolorektalen Karzinomen nachgewiesen wurden. Dazu zählen *achaete scute-like 2* (*Ascl2*), *Leucin-rich-repeat-containing G-protein coupled receptor 5* (*Lgr5*) und *sex-determining region Y box 9* (*Sox9*). Es sollte nachfolgend untersucht werden, ob diese Faktoren auch in Läsionen des $\text{Apc}^{1638\text{N}/+}$ -Modells dereguliert sind, und ob sich eine MyD88-Abhängigkeit feststellen lässt. *Ascl2* ist in allen untersuchten Läsionen von $\text{Apc}^{1638\text{N}/+}$ -Tieren signifikant hochreguliert verglichen zum gesunden Darmepithel (Abb. 36 A). Dieses Ergebnis wurde ebenfalls für Läsionen aus *Myd88*-defizienten Tieren ($\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{LSL}}$) ermittelt, sowie für die Modelle mit gewebespezifischer Expression von *Myd88* in intestinalen Epithelzellen ($\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{IEC}}$), bzw. in Makrophagen ($\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{MYEL}}$). *Lgr5* ist ebenfalls hochsignifikant überexprimiert in Läsionen von $\text{Apc}^{1638\text{N}/+}$ -Mäusen (Abb. 36 B). Eine signifikante Hochregulation von *Lgr5* ist außerdem in Tumoren aus $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{IEC}}$ - und $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{MYEL}}$ -Tieren gemessen worden. Im global *Myd88*-defizienten Modell $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{LSL}}$ wurde hingegen kein Unterschied zwischen gesunder Darmmukosa und Läsionen festgestellt. Die Expression von *Sox9* wurde in Läsionen aus $\text{Apc}^{1638\text{N}/+}$ -Tieren, sowie in vergleichbaren Mengen im $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{MYEL}}$ -Modell signifikant induziert (Abb. 36 C). In Läsionen aus $\text{Apc}^{1638\text{N}/+} \text{MyD88}^{\text{IEC}}$ -Mäusen wurde *Sox9* ebenfalls signifikant überexprimiert verglichen zum prämaligen Darmepithel. Nur in *Myd88*-defizienten $\text{Apc}^{1638\text{N}/+}$ -Tieren wurde kein signifikanter Unterschied zwischen gesundem Darmgewebe und Läsionen bezüglich der *Sox9*-Expression festgestellt.

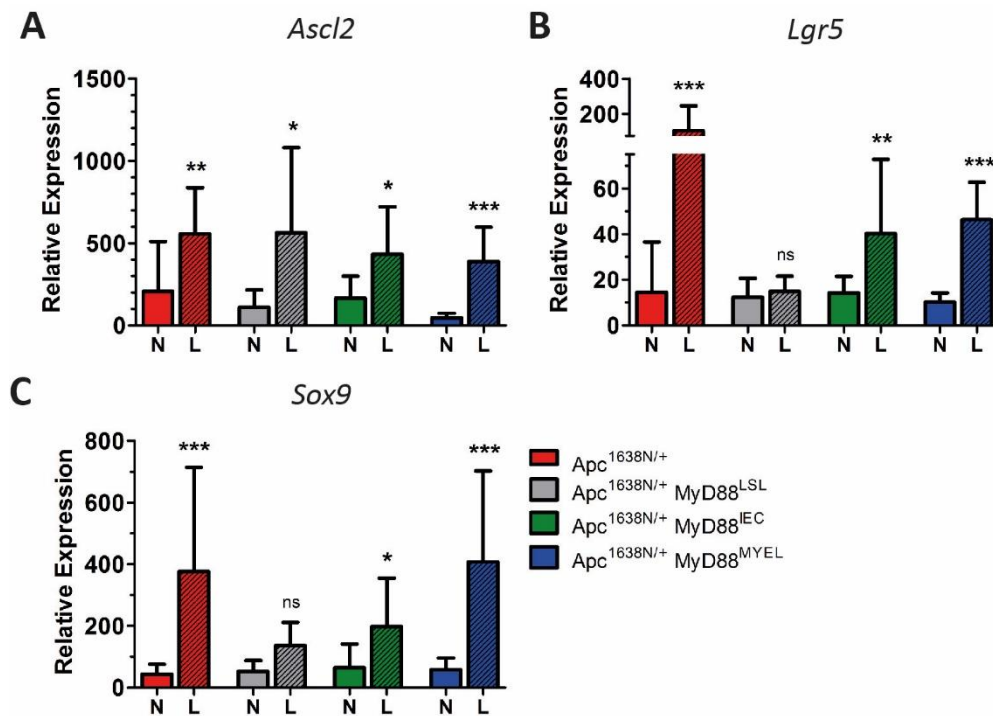


Abb. 36: Die Rolle von MyD88 bei der Expression verschiedener Stammzellfaktoren. (A) *Ascl2*-, (B) *Lgr5*- und (C) *Sox9*-Expression im prämaligen Darmepithel (N) und in Läsionen (L). $N \geq 5$ pro Gruppe. Als Referenz für alle Zieltranskripte wurde die Expression von *TF2D* gemessen. Die Daten wurden in Relation zur Expression in gesunder Darmmukosa von Wildtyp-Tieren gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test.

5 Diskussion

Die Entstehung und Progression von Darmkrebs, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, dienen in der Krebsforschung häufig als Modell für die Vorgänge in soliden Tumoren, da es sich eine der häufigsten Tumorentitäten weltweit handelt, die zudem vergleichsweise gut beforscht ist. Die „Adenom-Karzinom-Sequenz“ erklärt als eine der am weitesten verbreiteten Hypothesen zur Krebsentstehung die molekulargenetischen Veränderungen, die innerhalb von Darmepithel- und daraus abgeleiteten Tumorzellen stattfinden und die Tumorentstehung begründen (Fearon and Vogelstein, 1990). Dieses fast 25 Jahre alte Modell wurde allerdings mehrfach ergänzt und erweitert (Leggett and Whitehall, 2010; Marisa *et al.*, 2013), was unter anderem an seiner weitgehenden Beschränkung auf zellautonome Prozesse in Krebszellen liegt. Es wurden mittlerweile zahlreiche unabhängige Studien publiziert, die zeigen, dass Tumorgewebe nicht nur aus entarteten Epithelzellen, sondern zu großen Teilen aus Immun- und Bindegewebszellen besteht, was bereits seit langem bekannte Beobachtungen bestätigt (Dvorak, 1986). Die Vielfältigkeit dieser Zellen und die Bedeutung der durch sie ausgebildeten Tumor-Mikroumgebung sind in den vergangenen Jahren intensiv untersucht worden (Hanahan and Coussens, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011). Im zweiten Übersichtsartikel von Hanahan und Weinberg aus dem Jahr 2011 sind dementsprechend die neuen Erkenntnisse zur Bedeutung des Immunsystems während der Tumorgenese herausgearbeitet und die wechselseitige Beeinflussung von Immunreaktion und Tumor als neue *Hallmark of Cancer* (Hauptkennzeichen von Krebszellen) beschrieben worden. Die Rolle des Immunsystems im Tumor ist allerdings gegensätzlich: zum einen kann eine adaptive Immunreaktion tumorhemmend wirken (Lizee *et al.*, 2013; Pages *et al.*, 2010), wohingegen chronische Entzündungsreaktionen und pro-inflammatorische Signale als tumorfördernd beschrieben wurden (Elinav *et al.*, 2013; Hagerling *et al.*, 2015). Es scheint also entscheidend zu sein, welcher Teil des Immunsystems, bzw. auf welche Art das Immunsystem durch den Tumor aktiviert oder sogar inhibiert wird. In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus der Untersuchungen auf Entzündungsprozessen, die dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden.

An der Entstehung von Entzündungsreaktionen sind die Mustererkennungsrezeptoren der „Toll-like Rezeptor“-Familie (TLRs) maßgeblich beteiligt. TLRs werden durch exogene Signale

von Mikroorganismen ausgehend aktiviert, oder von endogenen, sogenannten „Gefahrensignalen“ aus körpereigenen Zellen, angeregt (Kawai and Akira, 2010; L. A. O'Neill *et al.*, 2013). Sie leiten daraufhin eine Immunreaktion ein, die – abhängig von der Art der Stimulation – pro-inflammatorische und proliferationsfördernde Auswirkungen hat, oder aber zur Apoptose von infizierten oder entarteten Zellen führt (Glavan and Pavelic, 2014; Moresco *et al.*, 2013). Dementsprechend könnte das Tumorstadium entweder positiv oder negativ beeinflusst werden. Die Bedeutung von Toll-like Rezeptoren in Tumoren wurde inzwischen mehrfach von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht, die bisher veröffentlichten Studien zeigen indes widersprüchliche Ergebnisse: je nach Tumorentität oder je nach untersuchtem TLR sind sowohl tumorfördernde als auch tumorhemmende Wirkungen beschrieben worden (Pradere *et al.*, 2014). Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten u. a. durch die Tatsache erklärt werden, dass TLRs in verschiedenen Geweben und Zelltypen, Immun- und Nicht-Immunzellen, in unterschiedlichem Ausmaß ausgeprägt sind, und verschiedene Funktionen erfüllen (McClure and Massari, 2014; Medvedev, 2013; Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2009), wie es unter anderem bereits für die poly-mikrobielle Sepsis gezeigt werden konnte (Weighardt *et al.*, 2006). Die Untersuchung der Rezeptoren und ihrer Signalwege *in vivo* wird zudem erschwert, da im Menschen zehn und in der Maus zwölf verschiedene TLRs exprimiert werden (Kumar *et al.*, 2011). Alle TLRs, bis auf TLR3, übermitteln Signale ins Zellinnere über das Adapterprotein *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) (Kawai and Akira, 2010). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse der MyD88-abhängigen TLRs und ihr gewebsspezifischer Einfluss auf die intestinale Karzinogenese in intestinalen Epithelzellen, daraus abgeleiteten Tumorzellen und in Makrophagen. MyD88-vermittelte Signale führen zur Aktivierung von MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*, MAPKs) und des Transkriptionsfaktors *nuclear factor κ B* (NF- κ B), was wiederum Zellproliferation und die Induktion pro-inflammatorischer Gene zur Folge hat (Deguine and Barton, 2014). Das „Ausschalten“ von *Myd88* auf molekulargenetischem Weg ermöglicht die gleichzeitige Inhibierung fast aller TLRs und der durch MyD88-induzierten Signalwege, sowie der durch IL-1 und IL-18 induzierten zellulären Antworten (Adachi *et al.*, 1998; Medzhitov *et al.*, 1998; Takeuchi and Akira, 2002). Um die Untersuchung der zelltypspezifischen Funktion der MyD88-abhängigen Signalwege *in vivo* zu ermöglichen, wurde in Vorarbeiten ein konditionelles *Switch-On* Mausmodell entwickelt, in dem eine in der genomischen DNA stabil integrierte *Intron-gene-trap* mit Transkriptions-Terminations-Signal die Expression von *Myd88*

verhindert (*Myd88* „*lox-stop-lox*“-Allel, *Myd88^{LSL}*) (Gais *et al.*, 2012). Dieses Modell ist, ebenso wie der „klassische *Myd88-Knock-out*“ (Kawai *et al.*, 1999), nicht in der Lage, auf TLR-Stimulantien wie LPS zu reagieren. LoxP-Motive, welche die *Intron-gene-trap* flankieren, ermöglichen das Ausschneiden dieser Sequenz vermittelt durch die Cre-Rekombinase, was zur Re-Expression von *Myd88* führt (vgl. Abschnitt 1.7 und Abb. 8). Die Expression der Cre unter der Kontrolle zelltypspezifischer Promotoren erlaubt die gezielte Re-Konstitution von *Myd88* in bestimmten Geweben. Durch Kombination dieser konditionalen *Knock-out*-Modelle mit einem genetischen Mausmodell für intestinale Karzinogenese konnte in der vorliegenden Arbeit die zelltypspezifische Funktion von TLRs bei der Darmkrebsentstehung untersucht werden.

Expressionsanalysen einzelner TLRs an isolierten Darmepithelzellen und Makrophagen aus Mäusen zeigten, dass TLRs je nach Zelltyp unterschiedlich ausgeprägt sind (vgl. Abschnitt 4.1.3 und Abb. 13). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse weisen auf, dass TLR2, -4 und -9 in Makrophagen in deutlich höheren Mengen exprimiert waren verglichen zu Darmepithelzellen, in denen die Transkripte nur in minimalen Mengen detektiert wurden. TLR3 scheint in den beiden Geweben in gleichen Mengen vorhanden zu sein. TLR5 dagegen ist im Darmepithel stärker exprimiert als in den Immunzellen, was mit publizierten Daten bezüglich der TLR5-Ausprägung in Darmepithelzellen und Makrophagen einhergeht (Uematsu *et al.*, 2008; Uematsu *et al.*, 2006). Das Expressionsmuster lässt eine zelltypspezifische Funktion einzelner Rezeptoren je nach Gewebe vermuten: so sind etwa TLR2 und TLR4 im Darm stark verringert ausgeprägt, um dort eine Überreaktion und daraus folgend eine chronische Entzündung zu verhindern, die durch kommensale Bakterien hervorgerufen werden könnte (McClure and Massari, 2014). Neben der physiologisch unterschiedlichen Ausprägung in verschiedenen Zelltypen zeigen TLRs auch in Tumoren wiederum ein verändertes Expressionsmuster im Vergleich zum Normalgewebe. Mehrere Studien zeigten bereits, dass humane kolorektale Krebszellen verschiedene TLRs exprimieren (Sato *et al.*, 2009). Eine tumorfördernde Rolle von TLRs während der intestinalen Karzinogenese wird aufgrund von klinischen Daten angenommen, die zeigen, dass TLR4 oder MyD88 in Kolonkarzinomen deutlich überexprimiert sind verglichen zu normaler Kolonmukosa, und mit einer schlechteren Prognose für betroffene Patienten einhergehen (Li *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2010). Auch in Labor-eigenen Vorarbeiten wurde gezeigt, dass MyD88-abhängige TLRs in

kolorektalen Tumoren verändert exprimiert sind gegenüber gesunder Darmmukosa (Gros, 2014). Ebenso konnte in eigenen Vorarbeiten an murinen Darmtumoren ein Anstieg der Transkripte von den MyD88-abhängigen TLRs 2, 4 und 5 detektiert werden, wobei die Unterschiede zwischen Dünndarmmukosa und Läsionen bezüglich TLR5 nur gering ausfielen, bei TLR2 und TLR4 hingegen signifikant waren. TLR9, sowie TLR3 als einziger MyD88-unabhängiger Rezeptor, hingegen sind in humanen Tumoren und im *Apc*^{1638N/+}-Mausmodell in geringeren Mengen im Vergleich zur gesunden Darmmukosa exprimiert (Friederichs *et al.*, 2005) (vgl. Anhang, Abb. 40). Diese Daten haben zwar deskriptiven Charakter, sie stützen aber die These, dass die pro-inflammatorischen MyD88-abhängige Signalwege tumorfördernde Eigenschaften besitzen (Banerjee *et al.*, 2014; Peek *et al.*, 2015).

5.1 Das neuartige Mausmodell ermöglicht die zelltypspezifische Expression von *Myd88*

Globale *Myd88*-Defizienz und die gezielte Re-Expression von *Myd88* in intestinalen Epithelzellen (IECs) oder in Makrophagen im Mausmodell war Grundlage für die vorliegende Arbeit, um die aufgestellte Hypothese zur Rolle der TLR/MyD88-abhängigen Signalwege bei Darmtumoren analysieren zu können. Daher sollte zunächst experimentell nachgewiesen werden, ob das zuvor generierte neuartige Mausmodell die Anforderungen zur gewebespezifischen Ausprägung erfüllt. Für die zelltypspezifische Re-Expression des Adapterproteins wurden *Myd88*^{LSL}-Tiere mit *p villin-Cre*- (el Marjou *et al.*, 2004) bzw. *LysMCre*-Tieren (Clausen *et al.*, 1999) verpaart (vgl. Abschnitt 4.1 und Abb. 10 A). Transgene *p villin-Cre*-Tiere exprimieren die Cre-Rekombinase unter Aktivität einer regulatorischen 9kb Region des Darmepithel-spezifischen Villin-Gens, was das Ausschneiden der *Intron-gene-trap* aus der genomischen DNA und darauffolgend die Re-Expression von *Myd88* in IECs gewährleistet (*Myd88*^{IEC}). Die Kombination von *Myd88*^{LSL}-Mäusen mit *LysMCre*-Tieren führt zur Re-Expression spezifisch in myeloiden Zellen, wie Makrophagen (*Myd88*^{MYEL}). Die Expression von *Myd88* wurde sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene untersucht. Die Oligonukleotid-Primer zum Nachweis von *Myd88*-mRNA bzw. cDNA über quantitative RT-PCR binden in Exon 1 (forward) und Exon 2 (reverse). Dadurch wurde sichergestellt, ausschließlich *Myd88*-Transkripte in der PCR zu amplifizieren und falsch-positive Ergebnisse durch mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden. *Myd88*-Transkripte wurden in Wildtyp- (WT) Tieren in den untersuchten Darmepithelien und Knochenmarks-abgeleiteten

Makrophagen, sowie im als Kontrolle verwendeten Gehirngewebe nachgewiesen (Abb. 10 B). Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit publizierten Daten bezüglich der *Myd88*-Expression in verschiedenen Geweben von Mäusen (Bonnert *et al.*, 1997; Burns *et al.*, 1998; Janssens *et al.*, 2002; Lord *et al.*, 1990). Analog dazu wurde das Vorhandensein des MyD88-Proteins mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Antikörpers untersucht (Delgado *et al.*, 2008; Pakala *et al.*, 2010). Entsprechend den Transkriptdaten wurde MyD88-Protein in Darmepithelzellen, Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen und im Gehirn nachgewiesen (Abb. 10 C). Im MyD88^{LSL}-Modell wurden weder Transkripte noch Protein in den untersuchten Zellen bzw. Geweben detektiert. MyD88^{LSL}-Tiere entsprechen somit phänotypisch dem *Myd88*^{-/-}-Modell, welches von der Arbeitsgruppe Akira generiert wurde (Adachi *et al.*, 1998). Im MyD88^{IEC}-Modell sollte *Myd88*-cDNA und Protein ausschließlich in Zellen des Darmepithels nachzuweisen sein. Transkripte und Protein wurden in IECs in der Tat in vergleichbaren Mengen wie in Wildtyp-Geweben nachgewiesen. Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen aus MyD88^{IEC}-Tieren waren dagegen MyD88-defizient. Im Gehirn dieser Tiere wurden minimale Mengen an *Myd88*-cDNA gemessen, Protein wurde aber nicht detektiert. Im MyD88^{MYEL}-Modell konnte cDNA und Protein in ähnlichen Mengen wie in Wildtyp-Makrophagen detektiert werden. Transkripte wurden in diesem Modell auch in geringen Mengen in Darmepithelzellen und im Gehirn gemessen, was auf Proteinebene aber nicht bestätigt wurde. Vermutlich ist die nachgewiesene *Myd88*-mRNA in den aufgereinigten Darmepithelzellen auf das Vorhandensein intestinaler Makrophagen im Darm zurückzuführen, die als Kontamination zusammen mit den eigentlichen IECs aus dem Darmgewebe isoliert wurden. Die nachgewiesenen Transkripte im Gehirn stammen womöglich aus Mikroglia-Zellen, die ca. 10 – 15% der gesamten Zellmasse des murinen Gehirns ausmachen (Lawson *et al.*, 1992), was auch ungefähr der *Myd88*-Transkriptmenge der MyD88^{MYEL}-Gehirne im Vergleich zu Wildtyp-Gehirn entspricht.

Neben der Ausprägung von *Myd88* sollte die Funktionalität der von diesem Adapterprotein abhängigen Signalwege *ex vivo* überprüft werden. Nach Stimulation mit dem TLR4-Ligand Lipopolysaccharid (LPS), der sowohl den MyD88- als auch den Trif-abhängigen intrazellulären Signalweg induziert, konnte in Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen aus Wildtyp- und MyD88^{MYEL}-Tieren bereits nach 5 min eine Phosphorylierung des Proteins *inhibitor of κ B subunit α* (I κ B α) im Western Blot nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.1.2.2 und Abb. 12 A). Phosphorylierung des I κ B Proteins hat dessen Abbau zur Folge, wodurch der dimere

Transkriptionsfaktor NF- κ B frei wird, in den Nukleus transloziert und die Expression von Zielgenen induziert. Nach etwa 10 bis 30 min war entsprechend eine Abnahme an Gesamt-I κ B α -Protein zu verzeichnen. In MyD88^{LSL}-Makrophagen ist dagegen nach 5 min keine Zunahme an phosphoryliertem I κ B α -Protein zu erkennen. In allen drei untersuchten Makrophagen-Isolaten aus den unterschiedlichen genetischen Linien ist nach 60 min (erneut) eine Zunahme an p-I κ B α zu erkennen, was durch eine zweite, zeitlich verzögerte Induktion von NF- κ B über das zweite TLR4-Adapterprotein Trif zu erklären ist (Kawai and Akira, 2010). Nach 24-stündiger Stimulation Knochenmarks-abgeleiteter Makrophagen mit dem TLR2-Agonisten Pam3Cys (P₃C) konnte außerdem eine deutliche Erhöhung von IL-6 im Zellüberstand gemessen werden. Makrophagen aus MyD88^{LSL}- und MyD88^{IEC}-Mäusen, die kein *Myd88* ausprägen, zeigten dagegen keine Änderung der IL-6-Sekretion nach TLR2-Stimulation (vgl. Abb. 12 B). Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor publizierten Daten bezüglich der *Myd88*-Expression, bzw. der Vollständigkeit der funktionellen *Myd88*-Defizienz im MyD88^{LSL}- und MyD88^{MYEL}-Modell (Gais *et al.*, 2012).

Die Untersuchung der Wiederherstellung MyD88-abhängiger Signalwege im Darmepithel wurde an isolierten Darmepithelzellen *ex vivo* durchgeführt. Nach Separation der IECs vom Darmgewebe gehen die Zellen rasch in Apoptose, wodurch die funktionelle Untersuchung intrazellulärer Signalwege erschwert wird, und weshalb nach wie vor Anstrengungen unternommen werden, Methoden zur Kultivierung primärer intestinaler Epithelzellen zu entwickeln (Hahn *et al.*, 1987; Macartney *et al.*, 2000; Schwerk *et al.*, 2013; Yamada *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen mit P₃C für eine Stunde stimuliert und anschließend die Expression von Zielgenen auf Transkriptebene untersucht. Es wurde die Expression der Zytokine IL-6 und TNF α und der Chemokine CXCL1 und CXCL2, die in Arbeitsgruppen-eigenen Vorarbeiten an humanen Zelllinien epithelialen Ursprungs als TLR-Zielgene beschrieben wurden (Gros, 2014), untersucht. Dabei konnten im Rahmen dieser Arbeit keine Transkripte von IL-6, CXCL1 und CXCL2 nach Stimulation nachgewiesen werden. Transkripte von TNF α wurden in der RT-PCR amplifiziert, wobei erhöhte Mengen in IECs aus Wildtyp- und MyD88^{IEC}-Tieren detektiert wurden, wohingegen in IECs aus MyD88^{LSL}- und MyD88^{MYEL}-Mäusen keine veränderte Mengen von TNF α -cDNA gemessen wurde (im Vergleich zu Wildtyp- und MyD88^{IEC}-Zellen war dieser Unterschied signifikant) (vgl. Abschnitt 4.1.2.1 und Abb. 11). Die Ergebnisse belegen, dass die zelltypspezifische *Myd88*-Re-Expression analog zum MyD88^{MYEL}-Modell auch im neuartigen MyD88^{IEC}-Modell funktioniert. Die vorliegende Arbeit

ist die erste, die ein genetisches Modell für die zelltypspezifische Expression von *Myd88* im Darmepithel beschreibt. Es sind bereits Modelle mit Darmepithelzell-spezifischer Deletion von *Myd88* beschrieben worden, auf deren Effekte in der intestinalen Homöostase und Tumorentstehung nachfolgend in Abschnitt 5.3 eingegangen werden soll.

Globale Defizienz bzw. –Re-Expression von *Myd88* hatte während der gesamten Untersuchungszeit während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf den Allgemeinzustand der Versuchstiere mit dem genetischen Standard-Hintergrund C57Bl/6N. Unter den „spezifiziert opportunistisch- und pathogen-freien“ (SOPF) Zucht- und Haltungsbedingungen im Zentrum für präklinische Forschung (ZPF) am Klinikum rechts der Isar der TU München wurden bei den untersuchten Linien keine Unterschiede bezüglich der Fertilität und Fortpflanzungsrate beobachtet. Anhand übereinstimmender Körpergewichte und der durchschnittlichen Lebensdauer war kein Einfluss von MyD88 auf das Wachstum und die Entwicklung zu erkennen. Die stichprobenartige Blutuntersuchung einzelner Tiere ergab keine Auffälligkeiten, die auf einen Immundefekt rückschließen ließe. Vor allem im Darm konnten weder makroskopische noch mikroskopische Besonderheiten festgestellt werden, sodass ein Einfluss von MyD88 auf die Entwicklung des gesunden Darms und dessen Histologie ausgeschlossen werden kann. In Übereinstimmung mit Veröffentlichungen bezüglich des Kolons (Frantz *et al.*, 2012) wurden im hier beschriebenen Mausmodell keine Anzeichen für intestinale Entzündungen oder Immuneinfiltrate, weder im Dünndarm noch im Kolon, festgestellt.

5.2 *Myd88*-Ausprägung in intestinalen Epithelzellen und in Makrophagen fördert die intestinale Tumorgenese

Die Rolle von MyD88 während der intestinalen Karzinogenese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit im *Apc*^{1638N/+}-Mausmodell untersucht. *Apc*^{1638N/+}-Tiere tragen eine Mutation in Exon 15 des *Apc*-Gens (Fodde *et al.*, 1994), welche nach spontanem Verlust des Wildtyp-Allels (*loss of heterozygosity*, LOH) zur Ausbildung multipler intestinaler Läsionen führt (vgl. Abschnitt 1.7). Unter SOPF-Zuchtbedingungen erreichen *Apc*^{1638N/+}-Mäuse ein Durchschnittsalter von ca. 12 Monaten. Im Alter von 11 – 12 Monaten war bei diesen Tieren eine Verschlechterung des Gesundheitszustands zu beobachten, welches sich durch Gewichtsabnahme, Blässe an Pfoten und Ohren, sowie Vernachlässigung der Fellpflege äußerte. Tiere, die nach eigener Beobachtung oder den Hinweisen der Tierpfleger die

entsprechenden Krankheitszeichen aufwiesen, wurden daraufhin aus ethischen Gründen umgehend erlöst. Im MyD88-defizienten $Apc^{1638N/+}$ -Modell ($Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$) wurden diese Veränderungen deutlich seltener beobachtet. Um vergleichbare und standardisierte Ergebnisse zu erhalten, wurden die Tiere durchschnittlich im Alter von 12 Monaten geopfert. In den beiden generierten gewebespezifischen Modellen, $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$, waren mutmaßlich tumorbedingte Veränderungen des Allgemeinzustandes wie beim parentalen $Apc^{1638N/+}$ -Tier zu beobachten. Bei allen vier Modellen wurden signifikant verringerte Körpergewichte gemessen verglichen zu Wildtyp-Tieren (vgl. Abschnitt 4.2.1 und Abb. 16 A). Gleichzeitig wurde eine Splenomegalie in betroffenen Tieren beobachtet, wobei nur $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$ -Tiere keine signifikanten Unterschiede im Milzgewicht zu gleichaltrigen Wildtyp-Tieren aufwiesen (Abb. 16 B). Bei $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$ - und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$ -Mäusen wurde hierbei ein intermediäres Ergebnis beobachtet, die Milzen waren zwar signifikant vergrößert verglichen zu Wildtyp-Tieren, aber nicht im gleichen Ausmaß wie bei $Apc^{1638N/+}$ -Mäusen. Eine Vergrößerung der Milz ist auf Blutverlust durch intestinale Läsionen und extramedulläre Blutbildung im Mausmodell begründet (Janssen *et al.*, 2006). Dies entspricht dem klinischen Bild, die häufig auftretende Anämie bei Darmkrebspatienten ist den okkulten Blutungen durch fortschreitende Tumorprogression geschuldet, wobei die extramedulläre Blutbildung den Blutmangel zu kompensieren versucht (Tarantino *et al.*, 2011). Aufgrund dieser Beobachtungen bezüglich des Allgemeinzustands der Tiere und der mutmaßlich tumorbedingten Morbidität wurde ein milderer Krankheitsverlauf in MyD88-defizienten Tieren und eine mäßige Tumorlast in $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$ - und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$ -Tieren im Vergleich zum $Apc^{1638N/+}$ -Modell erwartet. Im $Apc^{Min/+}$ -Modell sind verringerte Hämatokrit-Werte im Vergleich zu Wildtyp-Tieren beschrieben worden (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007). Labor-eigene Vorarbeiten zeigten, dass im $Apc^{1638N/+}$ -Modell ebenfalls verringerte Hämatokrit-Werte, sowie Erythrozyten- und Hämoglobin-Werte zu beobachten sind, was durch die tumorassoziierte Anämie zu erklären ist (Ochs, 2012). In MyD88-defizienten $Apc^{Min/+}$ -Tieren wiederum sind signifikant höhere Hämatokrit-Werte im Vergleich zum parentalen $Apc^{Min/+}$ -Modell beschrieben worden (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007). Stichprobenartige Blutuntersuchungen der Modelle $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$, $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$ zeigten keine Unterschiede untereinander und im Vergleich zu $Apc^{1638N/+}$ -Tieren bezüglich des blutbildenden Systems. Demnach sollten hier weitere vertiefte Blutuntersuchungen durchgeführt werden, um den Einfluss von MyD88 auf

verschiedene Blutwerte zu untersuchen, die durch die Tumorerkrankung verändert sind, da Splenomegalie und Anämie mit der Tumormasse korrelieren (Janssen *et al.*, 2006).

Die Tumorzinzenz lag in der $Apc^{1638N/+}$ -Gruppe mit unveränderter Ausprägung von MyD88 bei 100% (vgl. Abschnitt 4.2.2 und Tabelle 14). Die Anzahl der makroskopisch sichtbaren Läsionen lag zwischen 1 bis 9 Tumoren pro Tier [durchschnittlich 3,4 (\pm 1,9) Läsionen pro Maus] (vgl. Abschnitt 4.2.3 und Abb. 17). Die Ergebnisse stimmen mit früher publizierten Daten der Arbeitsgruppe über das $Apc^{1638N/+}$ -Modell gut überein (Janssen *et al.*, 2006). Globale MyD88-Defizienz führte zu einer signifikanten Reduktion der Tumorzinzenz auf nur 50% der Mäuse. Die Hälfte der untersuchten Tiere wies selbst nach einem Lebensjahr keine nachweisbaren Läsionen im Darmtrakt auf, obwohl das mutierte Apc -Allel in Genotypisierungs-PCRs eindeutig nachweisbar war. Die Anzahl beobachteter Läsionen in der gesamten $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL-}$ -Gruppe lag bei 0,7 (\pm 0,8) pro Maus und war damit um die Hälfte reduziert verglichen zu gleichaltrigen $Apc^{1638N/+}$ -Tieren. Demnach schützt eine vollständige MyD88-Defizienz vor der Entstehung intestinaler Läsionen, die durch aberrante Aktivierung des WNT-Signalwegs ausgelöst werden. Dies bestätigt zum einen Arbeitsgruppen-eigene Vorarbeiten mit dem $Apc^{1638N/+}$ -Modell in Kombination mit dem „klassischen *Myd88-Knock-out*“-Modell ($Myd88^{-/-}$) (Dr. M. Martini, unveröffentlichte Daten), in denen ebenfalls eine deutliche Abnahme in der Anzahl intestinaler Läsionen festgestellt wurde, sowie die Ergebnisse aus Arbeiten an anderen Apc -mutierten Mausmodellen (Grivennikov *et al.*, 2012; S. H. Lee *et al.*, 2010). Desweiteren wurde in einer aktuellen Studie gezeigt, dass die therapeutische Inhibierung von MyD88 in einem Modell für Colitis-assoziierte Karzinogenese (hervorgerufen durch AOM/DSS-Behandlung) ebenfalls zur drastischen Reduktion von Darmläsionen und dem damit verbundenen Gewichtsverlust und Mortalität führt (Xie *et al.*, 2016). Im Zusammenhang mit dem hier beobachteten verbesserten Allgemeinzustand der MyD88-defizienten Tiere ist von einer deutlich geringeren Morbidität auszugehen, die bereits für das $Apc^{Min/+}$ $MyD88^{-/-}$ -Modell beschrieben wurde, das allerdings im Gegensatz zum hier beschriebenen Modell lediglich gutartige Adenome ausbildet (S. H. Lee *et al.*, 2010; Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007). In den tumortragenden $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL-}$ -Tieren ($n = 5$ von insgesamt 10 Tieren) lag die Tumormasse bei durchschnittlich 1,4 (\pm 0,5), was nach wie vor signifikant weniger Läsionen sind verglichen mit $Apc^{1638N/+}$ -Tieren. Die zelltypspezifische Re-Expression von *Myd88* im Darmepithel reichte aus, um im $Apc^{1638N/+}$ -mutierten Hintergrund erneut zu einer Tumorzinzenz von 100% zu führen. Die Anzahl der entstandenen Läsionen im Darm lag in

diesem Modell allerdings nur bei 1,6 (\pm 0,5) Tumoren pro Tier. Die Tumoranzahl der untersuchten Tiere aus dieser Gruppe ist damit signifikant erhöht verglichen zur Gesamtgruppe des global defizienten $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ -Modells, gleichzeitig aber signifikant verringert im Vergleich zum $Apc^{1638N/+}$ -Modell. Dementsprechend fördert $MyD88$ in Darmepithelzellen, aus denen sich die Tumorzellen bilden, die Tumorentstehung, aber nicht in dem Ausmaß, um den parental Phänotyp der $Apc^{1638N/+}$ -Tiere herzustellen. Im $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Modell mit Re-Expression in Makrophagen, für die ebenfalls eine bedeutsame Rolle in der Tumorentstehung diskutiert wird (Alahari *et al.*, 2015; Balkwill and Mantovani, 2012), wurde ebenfalls eine Tumorzinidenz von 100% festgestellt. Die Anzahl an Tumoren pro Tier lag in dieser Gruppe bei 2,3 (\pm 1,1) pro Tier, was erneut einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur gesamten Gruppe der völlig defizienten $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ -Tiere bedeutet. Gleichzeitig waren, wie schon bei der $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ -Gruppe, deutlich weniger Läsionen verglichen zu $Apc^{1638N/+}$ -Tieren zu verzeichnen. Signifikante Unterschiede bezüglich der Tumorgöße wurden nicht beobachtet, worauf nachfolgend in Abschnitt 5.4 eingegangen wird. Demnach fördert $Myd88$ -Expression in Makrophagen ebenfalls die Tumorentstehung im Darmtrakt, ist aber erneut nicht ausreichend um den $Apc^{1638N/+}$ -Phänotyp in vollem Umfang wiederherzustellen. Ein Unterschied zwischen den Modellen $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ war zwar festzustellen, er erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau. Lee und Kollegen untersuchten kürzlich den Einfluss von $MyD88$ in Knochenmarks-abgeleiteten Immunzellen auf die Entstehung von Darmtumoren im $Apc^{Min/+}$ -Modell. Dafür wurden den Tieren nach einer Bestrahlung, die das endogene blutbildende System zerstört, Knochenmarkszellen aus Wildtyp- und $MyD88^{-/-}$ -Tieren intravenös transplantiert. Bezüglich der Tumoranzahl wurden keine Unterschiede festgestellt zwischen $Apc^{Min/+}$ $MyD88^{-/-}$ -Tieren, denen Knochenmarkszellen aus Wildtyp-Tieren transplantiert wurden, oder Knochenmark aus $MyD88$ -defizienten Tieren (S. H. Lee *et al.*, 2010). Die Rekonstitution der Knochenmarkszellen erfolgte in dieser Studie aus technischen Gründen im Alter von 6 – 10 Wochen. Die Tumorentstehung im $Apc^{Min/+}$ -Modell erfolgt sehr rasch, hauptsächlich bereits im Alter von 4 – 5 Wochen (A. Moser *et al.*, 1990). Somit kann davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Knochenmarks-Rekonstitution bereits kleine Tumore vorhanden waren. Daher lassen sich aufgrund der Ergebnisse von Lee und Kollegen keine Aussagen bezüglich der Rolle von $MyD88$ in Knochenmarkszellen auf die frühen Stadien der Tumorentstehung treffen. Das in der vorliegenden Arbeit präsentierte genetische Mausmodell erlaubt im Gegensatz dazu die

Analyse von MyD88 bereits während der ersten Phasen der Tumorentstehung. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass MyD88 und die davon abhängigen Signalwege, sowohl im Darmepithel als auch in Makrophagen, einen tumorfördernden Einfluss ausüben. In einem Modell für Kolitis-assoziierte Karzinogenese (*colitis associated carcinogenesis, CAC*) wurde gezeigt, dass eine IEC-spezifische Deletion der Kinase IKK- β und damit die Hemmung von NF- κ B (vergleichbar mit den Linien MyD88^{LSL} und MyD88^{MYEL}) die Anzahl intestinaler Läsionen deutlich verringert (Greten *et al.*, 2004). Auch beim Menschen stellen chronisch entzündliche Darmerkrankungen einen Risikofaktor für das Auftreten von Karzinomen im Kolon dar (Eaden *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang konnte eine Korrelation zwischen Polymorphismen in den Genen TLR1 und TLR2 und der Entwicklung einer Pancolitis bei Patienten mit *Colitis ulcerosa* nachgewiesen werden (De Jager *et al.*, 2007; Pierik *et al.*, 2006). Die aktuellen Konzepte zur Pathogenese der *Colitis ulcerosa* gehen davon aus, dass die Krankheitsprozesse auf Störungen der Epithelbarriere, bzw. einer Fehlregulation des mukosalen Immunsystems beruhen (Cho, 2008; Frosali *et al.*, 2015). Somit sind die Mustererkennungsrezeptoren der TLR-Familie wichtig, um die Toleranz des mukosalen Immunsystems gegen kommensale Bakterien, sowie die Integrität der intestinalen Barriere zu gewährleisten (Fukata *et al.*, 2005; Min and Rhee, 2015; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

Diese Daten stimmen mit den hier präsentierten Ergebnissen bezüglich der tumorfördernden Eigenschaften von MyD88 im Darmepithel überein. Eine zelltypspezifische Deletion von IKK- β in myeloiden Zellen im CAC-Modell führte ebenfalls zur Reduktion von intestinalen Läsionen (Greten *et al.*, 2004). Die Daten aus den Modellen MyD88^{LSL} und MyD88^{IEC}, in denen *Myd88* jeweils nicht in myeloiden Zellen exprimiert ist, bestätigen diese Ergebnisse. Daraus lässt sich schließen, dass die hier beobachteten MyD88-abhängigen tumorfördernden Mechanismen, zumindest zum Teil, über eine Aktivierung des nachgeschalteten pro-inflammatorischen NF- κ B Signalwegs vermittelt werden. Jedoch ist die Aktivierung von NF- κ B bzw. die Expression von *Myd88* in nur einem der beiden untersuchten Zelltypen allein nicht ausreichend, um den in Wildtyp- bzw. *Apc*^{1638N/+}-Tieren beobachteten Phänotyp auszuprägen. Das Modell *Apc*^{1638N/+} MyD88^{LSL} zeigt eindrücklich, dass Makrophagen, sowie Epithelzellen und daraus abgeleitete Tumorzellen in Kombination die Tumorinitiation unterstützen. Ein kombiniertes Modell, in dem *Myd88* sowohl in den Darmepithel- und daraus abgeleiteten Tumorzellen, sowie den Makrophagen gleichzeitig re-exprimiert wird, würde Aufschluss über die Frage geben, ob diese beiden Zelltypen allein für die Tumorinitiation und Progression verantwortlich sind, wie

sie im parentalen $Apc^{1638N/+}$ -Modell festgestellt wurden, oder ob in diesem Modell dennoch ein anderer Phänotyp als im parentalen Modell zu beobachten wäre. Solange kann aufgrund der hier präsentierten Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, dass MyD88-vermittelte Signale in anderen Zellen ebenfalls zur Tumorentstehung beitragen. Auf eine mögliche Funktion von MyD88-induzierten Signalwegen in anderen Zelltypen soll nachfolgend noch eingegangen werden (vgl. Abschnitt 5.6 Ausblick).

5.3 MyD88-abhängige Signalwege sowohl in Darmepithelzellen, als auch in Makrophagen, sind an der Tumorentstehung beteiligt und fördern diese über unterschiedliche Mechanismen

Im Kontext der Tumorentstehung wurde bislang, neben den eigentlichen Tumorzellen, eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen beschrieben, die im Tumorstroma eine wichtige Rolle für den Krankheitsverlauf spielen können. Während die Krebsvorläuferzellen und die daraus abgeleiteten Läsionen häufig Mutationen tragen, die zu veränderter Signaltransduktion und zur Krebsentstehung führen, weisen die Immunzellen und Nicht-Immunzellen des Stromas die gleichen Mutationen in der Regel nicht auf. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Beobachtungen bezüglich der Tumorzinzidenz und Tumorzanzahl in den vier Modellen mit mutierten $Apc^{1638N/+}$ -Allelen zeigen allerdings, dass neben dem veränderten WNT-Signalweg auch MyD88-abhängige Signalwege sowohl im Darmepithel, aber auch in Makrophagen, entscheidend an der Tumorentstehung beteiligt sind (L. A. J. O'Neill, 2008). Der Einfluss von MyD88 in Darmepithelzellen oder Makrophagen allein ist aber nicht ausreichend, um den in $Apc^{1638N/+}$ -Tieren beobachteten Phänotyp zu rekapitulieren. MyD88 und MyD88-abhängige TLRs sind in IECs, aus denen sich Darmkrebszellen ausbilden, und in Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, in unterschiedlichen Mengen und Zellkompartimenten ausgeprägt (vgl. Abschnitt 4.1.3 und Abb. 13). Dementsprechend erfüllen sie jeweils andere Funktionen. MyD88-abhängige TLRs, sowie auch IL-1/IL-18R, auf Makrophagen induzieren nach Ligandbindung den Transkriptionsfaktor NF- κ B, woraufhin pro-inflammatorische Zytokine in großen Mengen sezerniert werden (Cohen, 2014). Unsere Expressionsanalysen zeigten aber keine Unterschiede in der Ausprägung verschiedener Zytokine in Abhängigkeit von MyD88, vergleicht man nur die Daten der nicht pathologisch veränderten Darmgewebe miteinander (vgl. Abschnitt 4.4.4). Die spezifische Funktion von TLR-Signalen im Darmepithel erscheint vielseitiger und ist in Abb. 20 zusammengefasst (Abschnitt 4.3) (Cario *et al.*, 2007;

Fukata *et al.*, 2006; J. Lee *et al.*, 2006). *In vivo* Studien ließen einen positiven Einfluss von MyD88 auf die Proliferation von IECs vermuten, indem MyD88-abhängige Signalwege innerhalb der Darmepithelzellen die Phosphorylierung von ERK1/2 fördert (S. H. Lee *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten übereinstimmend Unterschiede in der Phosphorylierung von ERK1/2 in Bezug zur *Myd88*-Expression ermittelt werden, die allerdings vergleichsweise gering ausfielen. Fehlende *Myd88*-Expression in IECs (in den Modellen $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$) führte zu reduzierten Mengen an phospho-ERK1/2 verglichen zu den Modellen, in denen *Myd88* in IECs ausgeprägt wurde ($Apc^{1638N/+}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$) (vgl. Abschnitt 4.3.1). Der ERK-Signalweg kann neben dem TLR/MyD88-Signalweg durch zahlreiche extrazelluläre Signale von Wachstumsfaktoren- oder G-Proteingekoppelten Rezeptoren aktiviert werden. Das MAPK-Modul des ERK-Signalwegs wird durch drei Proteinkinasen gebildet, die nacheinander durch Phosphorylierung aktiv werden (Chang and Karin, 2001; Coulombe and Meloche, 2007; Turjanski *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung von ERK1/2 führt, abhängig von Stärke und Dauer der Aktivierung, zur Phosphorylierung zahlreicher zytosolischer und intranukleärer Substrate, darunter dem Zellzyklusregulator CyclinD1, Kinasen und Phosphatasen, Zytoskelettproteinen und Transkriptionsfaktoren wie Fos, Jun und Myc (Yoon and Seger, 2006). MAP-Kinasen, insbesondere das klassische ERK-abhängige Modul, regulieren viele Prozesse, die für die Tumorentstehung von zentraler Bedeutung sind, darunter die Zellproliferation. Man geht davon aus, dass MAP-Kinasen in etwa ein Drittel aller humanen Tumore aberrant aktiviert sind (Keyse, 2008). Übereinstimmend mit diesen Daten konnten erhöhte Proliferationsraten der nicht pathologisch veränderten Darmepithelzellen in den Modellen $Apc^{1638N/+}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$ ermittelt werden (vgl. Abschnitt 4.3.2). Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor publizierten Daten bezüglich des Einflusses von TLR/MyD88-Signalwegen im Darmepithel auf die Aktivierung von ERK1/2 und die daraus resultierende erhöhte Proliferation der Epithelzellen. Die generierten Daten stimmen desweiteren mit kürzlich publizierten Daten überein, in denen die Aktivierung von MyD88-abhängigen Signalwegen im Darmgewebe durch AOM/DSS-Behandlung hervorgerufen wurde. Auch hier wurden nach therapeutischer Inhibierung von MyD88 deutlich weniger proliferierende Zellen im Darm beobachtet (Xie *et al.*, 2016). Eine weitere beschriebene Rolle von TLR-Signalen, bzw. des nachgeschaltet aktivierten NF- κ B-Signalwegs im Darmepithel betrifft dessen Apoptose. So wurde gezeigt, dass ein IEC-spezifischer *Knock-out* von Komponenten des NF- κ B-Signalwegs und daraus

resultierender Inhibierung von NF- κ B die Apoptose der Epithelzellen erhöht (Zaph *et al.*, 2007). Auch die globale Defizienz von *Myd88* im Mausmodell und die chemische Inhibierung von MyD88 *in vivo* führte zur erhöhter IEC-Apoptoserate (S. H. Lee *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2016). Das Anfärben apoptotischer Zellen im prämaligen Darm mit einem Antikörper gegen die gesplattene Form der Caspase-3 führte zur Detektion vereinzelter apoptotischer Zellen, wobei keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien gefunden wurden. Vermutlich werden tote Zellen des intestinalen Epithels rasch ins Darmlumen abgegeben und ausgeschieden. Somit ließ sich keine Aussage über den Einfluss von MyD88 auf das Überleben von IECs ableiten. Das Gen *Birc5*, welches das Protein Survivin codiert und die Caspase-3-Aktivität und somit die Apoptose inhibiert, wurde als TLR-Zielgen beschrieben (Nomi *et al.*, 2010). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Expressionsanalysen zeigten, dass die Ausprägung von *Birc5* im Darmepithel in der Tat von MyD88 abhängig ist, da sowohl in *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL-}, als auch in *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{MYEL-}-Gewebe, signifikant weniger *Birc5*-Transkripte nachgewiesen wurden als in Gewebe aus *Apc*^{1638N/+}- und *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{IEC-}-Tieren (vgl. Abschnitt 4.3.3). Eine daraus resultierende Inhibierung der Apoptose muss mit weiterführenden Experimenten nachgewiesen werden, allerdings legen die hier erzielten Ergebnisse eine Bestätigung der publizierten Daten nahe. MyD88 im physiologischen Darmepithel ist wichtig für die Etablierung der intestinalen Barriere: es wurde gezeigt, dass eine MyD88-Defizienz im Darmepithel die Anzahl an Bakterien erhöht, die aus dem Darmlumen in mesenteriale Lymphknoten einwanderten (Vaishnavaa *et al.*, 2008). Die Aktivierung von MyD88-abhängigen TLRs in IECs führt zur Expression und Sekretion von antimikrobiellen Peptiden (Marques and Boneca, 2011). Die Abhängigkeit der Gene Mucin-2 (*Muc2*) und poly-Immunglobulin Rezeptor (*Pigr*), die als MyD88-Zielgene speziell im Darmepithel beschrieben wurden (Frantz *et al.*, 2012), konnten in dem hier vorgestellten Modell dagegen nicht bestätigt werden. Beide Gene wurden unabhängig von MyD88 in allen untersuchten Modellen in vergleichbaren Mengen exprimiert (vgl. Abschnitt 4.3.4). Andere Studien zeigten, dass Aktivierung von TLR2 und TLR4 die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen intestinaler lymphatischer Gewebe induzieren kann (Sawa *et al.*, 2008a; Sawa *et al.*, 2008b). An der Minimierung intestinaler Permeabilität und am Aufbau einer physikalischen Barriere durch interepitheliale *Tight Junctions* ist das Protein JAM-A von großer Bedeutung (Laukoetter *et al.*, 2007; Monteiro *et al.*, 2013). Die Ausprägung des Gens *F11r*, welches JAM-A codiert, ist vermutlich nicht nur von der Ausprägung von MyD88 im

Darmepithel, sondern auch von MyD88 in Makrophagen abhängig. $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC-}$ und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL-}$ -Mäuse zeigten eine signifikant verringerte Expression von *F11r*, im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, bzw. $Apc^{1638N/+}$ -Tieren und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL-}$ -Mäusen. Möglich wäre, dass MyD88-abhängige Signalwege in beiden Zelltypen, IECs und Makrophagen, an der Expression von *F11r* beteiligt sind: die Erkennung von ins Gewebe eindringenden Bakterien aus dem Darmlumen erfolgt durch Makrophagen, die wiederum Signale zur Expression von *F11r* an IECs ausschütten. Diese Signale könnten innerhalb der IECs aufgrund fehlenden MyD88-Proteins nicht verarbeitet werden. MyD88-defiziente Tiere exprimieren ein Basislevel an *F11r* vergleichbar mit dem Darmepithel aus Wildtyp-Tieren. Alle erhaltenen Ergebnisse zur Rolle von MyD88 im physiologischen bzw. prämaligen Darmepithel sind in Abb. 37 schematisch zusammengefasst.

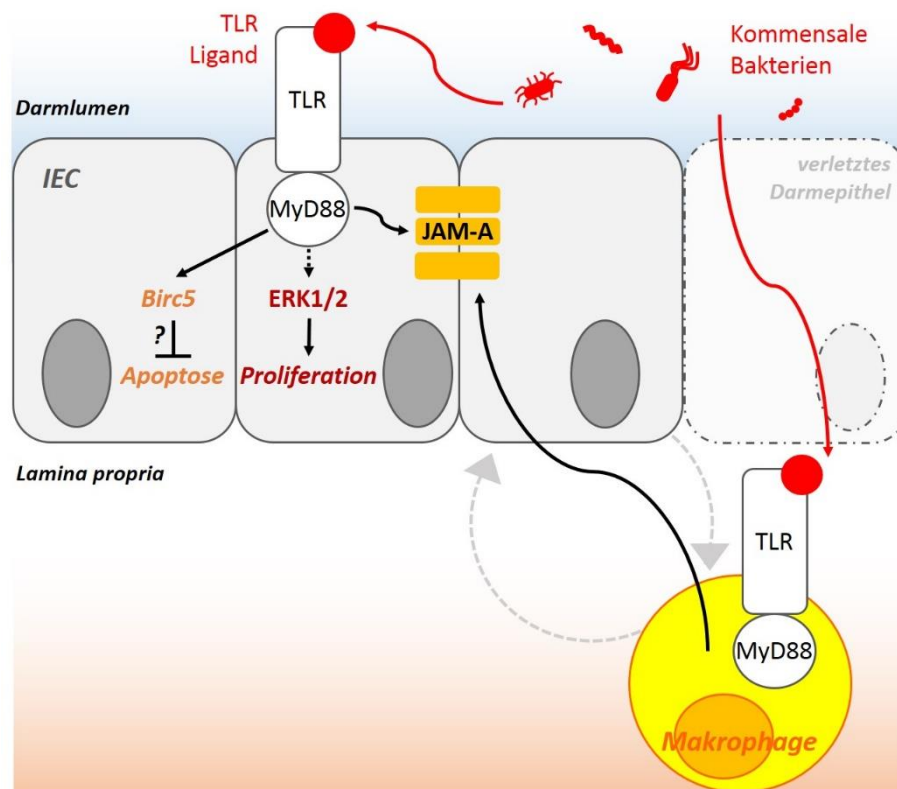


Abb. 37: Schematische Darstellung zur Rolle von MyD88 im physiologischen bzw. prämaligen Darmepithel, und dessen potentielle Funktion während der Tumorentstehung. MyD88-Expression in Zellen des Darmepithels (IECs) ist erforderlich zur Aufrechterhaltung der homöostatischen Proliferationsrate, vermittelt über die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2. MyD88-Defizienz in IECs führt zur verminderten Expression von Birc5, MyD88 fördert demzufolge die Ausprägung des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Survivin. MyD88 muss sowohl im Darmepithel, als auch in Makrophagen ausgeprägt werden, um das physiologische Niveau an F11r (JAM-A) zu exprimieren. Möglich wäre hier ein Zusammenspiel von IECs und Makrophagen, um die "normale" Menge an F11r zu exprimieren und damit die natürliche intestinale Barriere aufrechtzuerhalten, bzw. um die intestinale Barriere nach Verletzungen wiederherzustellen. Die Expression von Muc2 und Pigr erfolgt – zumindest in diesem Modell – unabhängig von MyD88. IEC – intestinale Epithelzelle; TLR – Toll-like Rezeptor; MyD88 – myeloid differentiation primary response gene 88.

Ein Zusammenspiel der in Abb. 37 dargestellten Mechanismen könnte bei einer Deregulation die Tumorinitiation fördern. Die Ausprägung von MyD88 im Darmepithel ist zum einen erforderlich, um die Selbsterneuerung von IECs durch Zellteilung aufrechtzuerhalten und eventuelle Verletzungen des Epithels auszuheilen, was bei gesteigerter Proliferation aber zur Anhäufung von Mutationen innerhalb einer Zelle führen könnte. Die gleichzeitige Expression von *Birc5* verhindert, dass entartete Zellen Apoptose einleiten. MyD88 ist vermutlich in beiden Zelltypen zugleich – IECs und Makrophagen – für die Aufrechterhaltung der Barriere durch die Ausbildung von *Tight Junctions* zwischen benachbarten Epithelzellen wichtig. Eine Störung der intestinalen Barriere könnte zur verstärkten Translokation von Bakterien in die Lamina propria führen, die dort wiederum Entzündungsreaktionen auslösen und die Sekretion wachstumsfördernder Signale induzieren, was erneut die Teilungsrate von IECs erhöht und die Tumorinitiation begünstigen könnte.

Die Tumorinitiation im $Apc^{1638N/+}$ -Modell erfolgt durch eine aberrante Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalwegs ausgelöst durch einen Heterozygotie-Verlust (LOH) des *Apc*-Wildtyp-Allels. Eine indirekte Beeinflussung des β -Catenin-Signalwegs durch MyD88, vermittelt über ERK1/2, ist bereits vermutet worden (S. H. Lee *et al.*, 2010). Experimentelle *in vitro* Studien zeigten, dass TLR4-Stimulation über den Liganden LPS die nukleäre Lokalisation von β -Catenin in Darmepithelzellen induziert (Santaolalla *et al.*, 2013). Diese Ergebnisse könnten erklären, warum MyD88-Defizienz in Zellen des Darmepithels (im $MyD88^{LSL}$ - und $MyD88^{MYEL}$ -Modell) zu verminderter Tumorzinzidenz und verringerter Anzahl an Tumoren im $Apc^{1638N/+}$ -Modell führt. Die hier erhobenen biochemischen Befunde zur Stabilität von β -Catenin zeigten jedoch, dass in allen untersuchten Modellen und damit unabhängig von der *Myd88*-Expression β -Catenin im physiologischen Darmgewebe in gleichem Ausmaß instabil ist und proteolytisch abgebaut wird, in Läsionen hingegen stabilisiert ist (vgl. Abschnitt 4.4.1 und Abb. 25 A). In Übereinstimmung damit ist das β -Catenin Zielgen Osteopontin (*Spp1*) (F. Rohde *et al.*, 2007) in gesunden Darmgeweben in niedrigen Mengen exprimiert, und in Läsionen aus allen Mauslinien durchschnittlich um das bis zu 100-Fache hochreguliert (Abb. 25 B), was bereits für verschiedene humane Tumorentitäten belegt ist (El-Tanani *et al.*, 2006). Demzufolge hat MyD88 vermutlich *in vivo* keinen nachweisbar direkten Einfluss auf den WNT/ β -Catenin-Signalweg und die dadurch hervorgerufene Tumorinitiation. Entsprechend vermittelt MyD88

den beobachteten tumorfördernden Effekt im vorgestellten Modell vermutlich über die zuvor beschriebenen Mechanismen.

5.4 MyD88 in Tumorzellen und Makrophagen ist nicht erforderlich für das Tumorwachstum, jedoch für die Tumorprogression

Im Gegensatz zum $Apc^{Min/+}$ -Modell, in dem die intestinalen Läsionen als gutartige Polypen und Adenome beschrieben sind (A. Moser *et al.*, 1990), erlaubt das $Apc^{1638N/+}$ -Modell die Untersuchung der Tumormalignität, da hier neben Adenomen auch invasive Karzinome im Verhältnis 1:1 diagnostiziert werden (Fodde *et al.*, 1994; Janssen *et al.*, 2006). Zunächst wurden in der vorliegenden Arbeit die makroskopisch sichtbaren Läsionen in Bezug auf ihre Größe untersucht. Wie bereits aufgeführt, konnten keine Unterschiede zwischen den vier Modellen $Apc^{1638N/+}$, $Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}$, $Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}$ und $Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}$ festgestellt werden (vgl. Abschnitt 4.2.4 und Abb. 18). Diese Ergebnisse bestätigen zum Teil vorangegangene Untersuchungen, in denen eine IEC-spezifische Deletion von IKK- β im CAC-Mausmodell keinen Einfluss auf die Tumorgröße hatte (Greten *et al.*, 2004). Diese Studie beschreibt aber gleichzeitig, dass das Ausschalten von IKK- β in myeloiden Zellen mit einer signifikanten Verringerung der Tumorgröße einhergeht. Somit erscheint die Aktivierung des Signalwegs MyD88-NF- κ B in Makrophagen erforderlich für das Tumorwachstum zu sein, was in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass Immunzellen im Entzündungs-induzierten Modell eine weitaus größere Rolle beim Tumorwachstum spielen könnten, als im spontan und genetisch bedingten Tumormodell. Eine globale *Myd88*-Defizienz hatte aber auch im $Apc^{Min/+}$ -Modell, also im genetisch-bedingten Tumormodell, ebenfalls eine deutlich verminderte Tumorgröße zur Folge (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007). In der zweiten genannten Studie wurde die verminderte Tumorgröße mit vermehrter Tumorzellapoptose bei Abwesenheit von MyD88 erklärt. Um einen Einfluss von MyD88 auf den programmierten Zelltod zu überprüfen, wurde die Expression von *Birc5* und *Fasl* (Fas Ligand) untersucht. Die Mengen an *Birc5*-Transkripten in den Läsionen spiegeln die zuvor durchgeführten Messungen aus den Normalgeweben wieder, die Menge an *Birc5*-mRNA in Läsionen war leicht erhöht verglichen zu den zugehörigen Normalgeweben, diese Unterschiede erreichten allerdings in keinem Fall das Signifikanzniveau (vgl. Abschnitt 4.4.2 und Abb. 26 B). Demnach scheint die Expression von *Birc5*, und damit verbunden, der zellautonome Schutz vor Apoptose vor allem von MyD88 in

IECs bzw. daraus abgeleiteten Tumorzellen abhängig zu sein. Eine Studie, die diese These unterstützt, zeigte, dass MyD88-profiziente Tumorzelllinien nach chemotherapeutisch-induzierter Apoptose die Expression anti-apoptotisch wirkender Faktoren in diesen Zellen induziert und die Zellen damit vor Apoptose schützt (Kelly *et al.*, 2006). Dies ließe also ebenfalls auf eine tumorzellautonome Funktion MyD88-abhängiger Signalwege beim Schutz vor der Apoptose schließen. Als Gegenspieler zu *Birc5* induziert der Fas Ligand über Caspase-vermittelte Signalwege die Apoptose in Zellen, die CD95 (Fas Rezeptor) auf ihrer Zelloberfläche tragen (Peter *et al.*, 2015). CD95 ist ubiquitär ausgeprägt, der Ligand (*FasI*) hingegen wird hauptsächlich von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) ausgeprägt (Nagata, 1997). *FasI* ist in Tumoren von MyD88-profizienten $Apc^{1638N/+}$ -Tieren und $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{MYEL}-Mäusen drastisch herabreguliert (vgl. Abb. 26 C). Im Gegensatz dazu ist in Tumoren aus $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{LSL}- und $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{IEC}-Tieren die Expression von *FasI* höher im Vergleich zur entsprechenden gesunden Darmmukosa. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass in den beiden zuletzt genannten Modellen deutlich mehr *FasI*-exprimierende Immunzellen (CTLs und NK-Zellen) in den Tumoren vorhanden sind, im Gegensatz zu den Läsionen aus $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{MYEL}-Tieren, und somit in Abhängigkeit von MyD88 spezifisch in Makrophagen. Diese These wird unterstützt von den Expressionsdaten bezüglich des T-Zellmarkers *CD3e*, sowie dem CTL-Marker *Gmzb*, die ebenfalls in Tumoren aus $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{MYEL}-Mäusen signifikant herabreguliert sind (vgl. Abschnitt 4.4.7, Abb. 32 und Abb. 34). Die Apoptoserate von Tumorzellen könnte demzufolge in $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{MYEL}-Läsionen verringert sein, unabhängig von einer zellautonomen Funktion von MyD88 in IECs und daraus abgeleiteten Tumorzellen. Diese Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass MyD88-hervorgerufene Signale in Makrophagen dazu führen, dass CTLs und NK-Zellen aus dem Tumor ferngehalten werden, beispielsweise durch ein verändertes Chemokinmilieu, und dadurch die zytotoxische Bekämpfung von Tumorzellen unterdrückt wird. Inwiefern MyD88 die Tumorzell-Apoptose, also tumorzellautonom oder indirekt über Makrophagen, müssen zukünftig weiterführende Experimente klären.

Die Ausprägung von *Ccnd1*, welches den Zellzyklus-Regulator Cyclin D1 codiert und die Zellproliferation in der G₁-Phase fördert, wurde als Surrogatmarker für die Teilungsaktivität der Tumorzellen gemessen. *Ccnd1* wurde in allen vier Modellen in Läsionen in deutlich größeren Mengen verglichen zu den entsprechenden gesunden Geweben detektiert, was die

beschriebene Überexpression von *Ccnd1* in Darmtumoren bestätigt (Greten *et al.*, 2004; Zeestraten *et al.*, 2012). In allen Modellen wurden signifikante Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe detektiert, außer in der global MyD88-defizienten *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL}-Linie. Tatsächlich wurde bereits gezeigt, dass *Ccnd1* in Abhängigkeit von NF-κB induziert wird (Pahl, 1999). Sollte die verminderte *Ccnd1*-Transkription mit verringerter Tumorzellproliferation in dem MyD88-defizienten Modell einhergehen, würde dies mit den unabhängig erzielten Ergebnissen zur verringerten Proliferationsrate im normalen Darmepithel übereinstimmen (vgl. Abschnitt 4.3.2, Abb. 22). Bisher wurde die Teilungsrate von Tumorzellen als unabhängig von NF-κB (Greten *et al.*, 2004) bzw. von *Myd88* beschrieben (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007). Ob in den Tumoren der verschiedenen Modelle, basierend auf den Befunden zur *Ccnd1*-Expression, eine unterschiedlich starke Tumorzellproliferation vorliegt, die auf die Ausprägung von *Myd88* angewiesen ist, sollte daher durch weiterführende unabhängige Experimente geklärt werden.

Tumorentstehung in einem weiteren Mausmodell für kolorektale Karzinogenese, dem *Cdx2-Cre Apc*^{F/wt}-Modell (CPC-Apc), geht mit Defekten in der intestinalen Barriere einher, welche durch verminderte Produktion von Mucin 2, dem Hauptbestandteil des vom Darmepithel sekretierten Mukus, sowie verringerter Expression der Adhäsionsproteine JAM-A und JAM-B, und der Translokation bakterieller Produkte aus dem Darm ins Gewebe nachgewiesen wurde (Grivennikov *et al.*, 2012). Eine andere Studie an *Apc*^{Min/+}- und *Apc*^{1638N/+}-Modellen zeigte, dass Mucin 2-Defizienz die Tumorentstehung im Darm beschleunigt (Yang *et al.*, 2008). Somit ist nicht nur ein Barrieredefekt in den Läsionen zu beobachten, sondern dass ein Barrieredefekt durch Deregulation der intestinalen Barriere die Darmtumorentstehung im prämaligmen Darmepithel fördert. In einem Mausmodell mit Darmepithelzell-spezifischer Deletion von *Myd88* wurde gezeigt, dass Gene herabreguliert sind, die am Aufbau der intestinalen Barriere beteiligt sind (Frantz *et al.*, 2012). Daraus lässt sich folgern, dass MyD88 im Darmepithel die Expression von verschiedenen Genen, darunter Mucin 2, fördert und damit die Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere, und schließlich die Darmtumorentstehung hemmt. In dem hier präsentierten Modell konnte eine deutliche Reduktion von Mucin 2 in Läsionen in allen vier untersuchten *Apc*^{1638N/+}-Modellen bestätigt werden, allerdings wurde keine Abhängigkeit von MyD88 festgestellt (vgl. Abschnitt 4.4.3 und Abb. 27). Ebenso ist die Menge an *Pigr*-Transkripten in Läsionen reduziert verglichen zur gesunden Darmmukosa, aber nicht an die *Myd88*-Expression gebunden. Eine quantitative Änderung von JAM-A-

Transkripten zwischen Normal- und Tumorgewebe konnte im $Apc^{1638N/+}$ -Modell allerdings nicht bestätigt werden. Ein Barrieredefekt und die Translokation von Bakterien bzw. mikrobiellen Produkten und somit potentiellen TLR-Liganden ins Gewebe hätte Entzündungsreaktionen zur Folge, worauf nachfolgend genauer eingegangen wird.

Aufgrund der hier erzielten Ergebnisse kann keine direkte Aussage zur Teilungsaktivität und Apoptose von Tumorzellen getroffen werden. In Bezug auf die Übereinstimmung zwischen allen untersuchten Modellen, was die intratumorale Expression von *Ccnd1* und *Birc5*, sowie vor allem auch die makroskopische Tumorgröße betrifft, liegt es jedoch nahe, dass MyD88 keinen oder nur einen geringen Einfluss auf das Tumorwachstum ausübt.

Nachdem der Tumorphänotyp in Bezug auf die Initiation und die Wachstumsrate der Läsionen besprochen wurde, soll nachfolgend auf die Malignität der Läsionen eingegangen werden. Dabei soll besonders die Rolle von MyD88 bei der Entartung (De-Differenzierung) des Tumorgewebes, sowie die Invasion und Metastasierung diskutiert werden.

Um als nächsten Aspekt die Malignität der Läsionen zu beurteilen, wurden gefärbte Gewebeschnitte am Institut für Pathologie der TU München histopathologisch untersucht. In allen Läsionen aus $Apc^{1638N/+}$ -Tieren wurden dysplastische Veränderungen des Gewebes (intraepitheliale Neoplasien, IEN) diagnostiziert, welche unter anderem mit einer irregulären Anordnung von Zellkernen und Verlust der normalen Gewebestruktur einhergeht (vgl. Abschnitt 4.2.5, Tabelle 15 und Abb. 19). Das Verhältnis von Adenomen zu Karzinomen in $Apc^{1638N/+}$ -Tieren lag in vorangegangenen Studien bei 1:1, wobei sich diese Daten auf ein Alter von 3,5 Monaten der Versuchstiere bezieht (Janssen *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden Läsionen aus 12 Monate alten Tieren begutachtet, die aufgrund des höheren Lebensalters weit fortgeschrittene Läsionen präsentierten, was die maligne Transformation in allen untersuchten Läsionen erklärt. Zwei Drittel der Tumore zeigten hochgradige De-Differenzierungsgrade, sodass von einer erhöhten Tumorprogression auszugehen ist. In $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{LSL}-Mäusen sind hingegen nur 60% der Läsionen als intraepitheliale Neoplasien beurteilt worden, 40% zeigten lediglich hyperproliferative Wucherungen der Darmmukosa. Somit schützt eine MyD88-Defizienz neben der Tumorumitiation auch vor beschleunigter Tumorprogression. Auch hier hat MyD88 in beiden untersuchten Zelltypen, den Tumorzellen selbst und den Makrophagen, einen fördernden Einfluss auf die Malignität, da in den Modellen $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{EC} und $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{MYEL}, wie schon in parentalen

Apc^{1638N/+}-Tieren, alle analysierten Läsionen als IEN anzusehen sind. Allerdings konnte in nur einer Läsion eines Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}-Tieres hochgradige De-Differenzierungen festgestellt werden, sodass MyD88 in Tumorzellen bzw. in Makrophagen die Tumorprogression zwar fördert, aber allein nicht ausreicht um die Malignität von parentalen Apc^{1638N/+}-Tumoren zu erreichen.

5.4.1 Einfluss von MyD88 auf das intratumorale Immunmilieu: Zellen und lösliche Faktoren des innate Immunsystems

Dass pro-inflammatorische Zytokine bei Entzündungsreaktionen im Darm abhängig von MyD88 gebildet und sezerniert werden, wurde kürzlich *in vivo* durch die chemische Inhibierung des Adapterproteins gezeigt (Xie *et al.*, 2016). Hier wurden signifikant verringerte Mengen an TNF- α , IL-6, IL-11, IL-17A, IL-22, and IL-23 im Serum und im Kolongewebe nach AOM/DSS-Behandlung nachgewiesen, wenn die Tiere zeitgleich mit einem MyD88-Inhibitor therapiert wurden. Die Expression pro-inflammatorischer Zytokine auch in Darmtumoren wurde bereits mehrfach als TLR/NF- κ B abhängig beschrieben (Pradere *et al.*, 2014). Die Inaktivierung von NF- κ B durch genetisch induzierte MyD88-Defizienz führte zu signifikant verminderten Mengen verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine in intestinalen Tumoren, unter anderem von IL-1 β , IL-6, IL-23 und TNF α (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007), wobei dies vor allem auf MyD88 in myeloiden Zellen zurückzuführen ist (Greten *et al.*, 2004; Grivennikov *et al.*, 2012). Im Apc^{1638N/+}-Modell, im MyD88-defizienten Modell Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}, sowie auch in den Linien Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC} und Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL} mit Gewebespezifischer *Myd88*-Expression, konnte die Induktion von IL-23 und TNF α in Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe prinzipiell bestätigt werden (vgl. Abschnitt 4.4.4 und Abb. 28). Allerdings trifft dies auf alle untersuchten Modelle zu, sodass davon ausgegangen werden kann, dass weder eine globale *Myd88*-Defizienz, noch eine gewebespezifische Re-Expression einen Einfluss auf die Ausprägung dieser Zytokine ausübt. Lediglich die Zytokine IL-1 β und IL-6 werden in Abhängigkeit von MyD88 im Tumor exprimiert, wobei MyD88 in Makrophagen allein ausreicht, um ein Expressionsniveau wie im parentalen Apc^{1638N/+}-Modell zu erreichen (Abb. 29). IL-1 β wird vor allem von Blutmonozyten und Makrophagen exprimiert und reguliert, und ist hauptsächlich an der Entstehung von systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt, da der Interleukin-1-Rezeptor auf nahezu allen Zellen exprimiert ist (Dinarello and van der Meer, 2013). Im Tumorkontext wurden verschiedene genetische Varianten von *Il1b* mit einem

erhöhten Risiko für solide Tumore beschrieben, z. Bsp. bei Prostatakarzinomen (H. Xu *et al.*, 2014) und Zervixkarzinomen (J. Xu *et al.*, 2013), wobei dieselbe Studie ein verringertes Risiko dieser Varianten für hepatozelluläre Karzinome beschreibt (J. Xu *et al.*, 2013). In experimentelle Studien, in denen der IL-1-Signalweg inhibiert wurde, zeigten bisher jedoch keinen Einfluss von IL-1 β auf die Entstehung kolorektaler Karzinome (Rakoff-Nahoum and Medzhitov, 2007; Wilson *et al.*, 2015). Insgesamt wird die Rolle von IL-1 β in der Krebsentstehung und Progression, sowie in der Krebstherapie kontrovers diskutiert (Drexler and Yazdi, 2013; Zitvogel *et al.*, 2012). IL-6 hingegen wurde mehrfach in humanen Tumorproben, sowie anhand experimenteller Studien einstimmig als tumorfördernd beschrieben (Ancrile *et al.*, 2007; Fertig *et al.*, 2015; Patel and Gooderham, 2015; Polytarchou *et al.*, 2015). IL-6 wird grundsätzlich von Zellen des innate Immunsystems nach deren Aktivierung durch Pathogene sezerniert, aber auch von Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten oder Tumorzellen (Yao *et al.*, 2014), und ist neben der Abwehr von Pathogenen in Zellwachstum und Differenzierung involviert (Guo *et al.*, 2012). Die hier erhobenen Daten weisen eine IL-6-Ausprägung in Abhängigkeit von MyD88 in Makrophagen auf. Unterstützt wird dieses Ergebnis von kürzlich veröffentlichten Daten, die zeigen, dass aus Darmgewebe isolierte Makrophagen signifikant verringerte Mengen an IL-6 mRNA aufweisen, wenn die Tiere zuvor mit einem MyD88-Inhibitor behandelt wurden (Xie *et al.*, 2016). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die Ausprägung von IL-1 β und IL-6 in Abhängigkeit von der *Myd88*-Expression (hauptsächlich in Makrophagen) einhergeht, und mit der Malignität der Tumore korreliert.

Die Mitglieder der IL-10 Zytokinfamilie, IL-10 und IL-22, sind in allen Tumoren unabhängig von MyD88 herabreguliert (Abb. 28 und 30). Aufgrund der gemeinsamen Rezeptoruntereinheit IL-10R2, welche sowohl Bestandteil des IL-10-, als auch des IL-22-Rezeptors ist, induzieren beide Zytokine den Jak/STAT-Signalweg (Ouyang *et al.*, 2011). IL-10 wirkt hauptsächlich auf Leukozyten und ruft anti-inflammatorische Reaktionen hervor. Experimentelle Studien in *IL10*^{-/-}-Mäuse zeigten, dass IL-10-Defizienz zur Ausbildung spontaner Kolitis, hervorgerufen durch kommensale Bakterien, führt (Keubler *et al.*, 2015; R. Kuhn *et al.*, 1993). Die beobachtete Herabregulation von IL-10 in den Läsionen der vier untersuchten *Apc*^{1638N/+}-Modelle geht dementsprechend mit dem pro-inflammatorischen Milieu, hervorgerufen durch IL-1 β und IL-6, einher. IL-22 hingegen wirkt hauptsächlich auf Epithelzellen, und es wurden sowohl anti- als auch pro-inflammatorische Funktionen beschrieben (Ouyang *et al.*, 2011). Im Tumorkontext

konnte IL-22 als hemmend auf das Tumorwachstum beschrieben werden (Weber *et al.*, 2006), was die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Reduktion von IL22-Transkripten in Tumoren erklärt. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass in Tumoren aus *Apc*^{1638N/+}-Tieren pro-inflammatorisches Milieu vorherrscht und anti-inflammatorische Faktoren unterdrückt werden. Dabei werden die entzündungsfördernden Faktoren IL-1 β und IL-6 hauptsächlich durch MyD88-induzierte Signale in Makrophagen hervorgerufen, wie es für IL-6 zuvor beschrieben wurde (Greten *et al.*, 2004). Möglich wäre auch, dass MyD88 in Abhängigkeit vom Zelltyp die Rekrutierung von Immunzellen in den Tumor beeinflusst, welche dann wiederum lösliche Faktoren sekretieren, und somit MyD88 indirekt das pro-inflammatorische Tumormilieu induziert. So wurde gezeigt, dass nach AOM/DSS-Behandlung die Entzündungsreaktion im Darm drastisch reduziert ist, wenn die Tiere gleichzeitig mit einem MyD88-Inhibitor behandelt wurden, was mutmaßlich durch signifikant verringerten Mengen an CD68⁺ und F4/80⁺ CD11b⁺ Makrophagen im Kolon hervorgerufen wurde (Xie *et al.*, 2016). NF- κ B induziert eine Reihe von Chemokinen, die wiederum für die chemotaktische „Anlockung“ diverser Immunzellen nötig sind, dazu zählen CXCL10, CXCL11, KC (homolog zum humanen IL-8) und MCP-1 (Pahl, 1999). Arbeitsgruppen-eigene Arbeiten zeigten bereits, dass Stimulation von MyD88-abhängigen Signalwegen auf Kolonkarzinomzelllinien die Expression von IL-8 induziert (Doll *et al.*, 2010; Gros, 2014). Zunächst sollte in der vorliegenden Arbeit die Anzahl von Makrophagen in den Läsionen untersucht werden. Das Anfärben von Makrophagen auf Schnitten von Dünndarmgewebe und Läsionen zeigte keine wesentlichen Unterschiede in der Anzahl *Macrophage-1-antigen* (Mac1, CD11b)-positiv gefärbter Zellen (vgl. Abschnitt 4.4.6 und Abb. 31). Auch die Messung von Lysozym M-Transkripten, die in myeloiden Zellen exprimiert werden (Cross *et al.*, 1988), zeigte keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Normal- und Tumorgeweben, außer im *Apc*^{1638N/+} MyD88^{IEC}-Modell, in dem deutlich mehr *Lyz2*-Transkripte in Tumoren als im korrespondierenden Normalgewebe detektiert wurden (Abb. 31 A). Allerdings entsprachen die gemessenen Mengen von *Lyz2*-mRNA in den Tumoren aus dem *Apc*^{1638N/+} MyD88^{IEC}-Modell weitgehend den anderen Modellen, sodass aufgrund dieser Ergebnisse und im Gegensatz zu den publizierten Daten aus dem AOM/DSS-Modell davon ausgegangen werden kann, dass MyD88 keinen nennenswerten Einfluss auf die Infiltration von Makrophagen ins Tumorgewebe ausübt.

Neben der quantitativen Analyse der intratumoralen Makrophagen spielt auch deren funktionelle Polarisierung in unterschiedlichen Subpopulationen eine wichtige Rolle.

Allerdings kann anhand der durchgeführten Mac1-Färbung keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Makrophagen-Subpopulationen M1 und M2 in unterschiedlichen Mengen vorhanden sind. M1-Polarisation kann unter anderem durch TLR-Signale induziert werden und ist charakterisiert durch die hohe Expression pro-inflammatorischer Faktoren wie IL-1 β und IL-6, M2-Makrophagen werden durch Signale von T_H2-Zellen polarisiert und zeigen z. Bsp. IL-10-Produktion (Alahari *et al.*, 2015; Das *et al.*, 2015). In Verbindung mit den hier erhobenen Daten zur Expression verschiedener Zytokine ist daher eine Mehrheit von M1-Makrophagen in den Läsionen naheliegend, vor allem in Apc^{1638N/+}- und Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL}-Tumoren. Weiterer Experimente, z. Bsp. Immunfluoreszenz-Färbungen von Gewebeschnitten gegen spezifische M1/M2-Marker, oder die „Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung“ (FACS) von Zellsuspensionen aus Tumoren, würden zur Klärung dieser Frage beitragen.

5.4.2 Einfluss von MyD88 auf das intratumorale Immunmilieu: Zellen des adaptiven Immunsystems

Neben Makrophagen nehmen verschiedene Zellpopulationen des adaptiven Immunsystems, darunter maßgeblich T-Zellen, entscheidend auf den Verlauf von Krebserkrankungen Einfluss: grundsätzlich stellt die intratumorale Anwesenheit von CD4⁺ T-Helferzellen mit T_H2-Phänotyp, sowie von regulatorischen T-Zellen (T_{regs}, FoxP3⁺) eine negative Prognose für den Krankheitsverlauf vieler solider Tumore dar, darunter Ovarial- und Kolonkarzinome (Galon *et al.*, 2006). Die Anwesenheit von CD4⁺ T_H1-Zellen und CD8⁺ zytotoxischer T-Effektorzellen (CTLs) im Tumor geht dagegen mit einer guten Prognose einher, was für Kolorektalkarzinome eindrucksvoll nachgewiesen wurde (Fridman *et al.*, 2012; Galon *et al.*, 2006; Galon *et al.*, 2014). Die Rolle von CD4⁺ T_H17-Zellen im Tumor ist bisher umstritten, hier werden zurzeit pro- und anti-tumorale Wirkungen diskutiert (Bailey *et al.*, 2014). In Tumoren von Apc^{1638N/+}-Mäusen konnten zunächst sowohl CD3⁺ CD4⁺ und CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.4.7 und Abb. 32). Dies traf auch für Läsionen aus den Modellen Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL}, Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC} und Apc^{1638N/+} MyD88^{MYEL} zu. Eine zuverlässige und repräsentative Quantifizierung der doppelt-positiven Zellen anhand von Gefrierschnitten war allerdings technisch nur schwer möglich, da eine große intratumorale Heterogenität des Immuninfiltrats festgestellt wurde. Daher wurden die Transkripte der CD3-Untereinheit epsilon (CD3 ϵ) gemessen, an mRNA-Isolaten aus komplett resezierten Tumoren, um eine repräsentative Aussage über das Vorhandensein von T-Zellen treffen zu können. Eine

verminderte Menge von T-Zellen in $Apc^{1638N/+}$ -Tumoren im Vergleich zu den Normalgeweben wurde in Arbeitsgruppen-internen Vorarbeiten mittels Quantifizierung der *Cd3e*-Expression, sowie unabhängig durch Durchflusszytometrie bestätigt (Audehm, 2012; Ochs, 2012). In guter Übereinstimmung zu diesen Vorbefunden war die *Cd3e*-Transkription in Läsionen aller vier untersuchten Mauslinien in den Tumoren deutlich herunterreguliert, verglichen mit dem zugehörigen gesunden Gewebe (Abb. 32 C). *Cd3e*-Transkripte waren in $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Tumoren signifikant verringert, was für $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ -Tiere aber nicht zutrif. Zur genaueren Charakterisierung der Verteilung der T-Zell-Subpopulationen wurde die Expression verschiedener Leit-Transkripte analysiert (Evans and Jenner, 2013). Anhand der *Gata3*-Expression lässt sich feststellen, dass T_H2 -Zellen in allen Läsionen in signifikant höheren Mengen vorhanden sind, ohne dass eine Abhängigkeit von *MyD88* zu erkennen ist (Abb. 33 A). Die Mengen an *Foxp3*-mRNA als Marker für T_{regs} sind in gesunder Darmmukosa und Läsionen unverändert (Abb. 33 B). Die Infiltration mit tumorfördernden T-Zell-Subpopulation erfolgt demnach vermutlich anhand von Signalen, die unabhängig von der *Myd88*-Expression ausgeschüttet werden. *Tbx21*, welches den Transkriptionsfaktor T-bet codiert und spezifisch in T_H1 -Zellen exprimiert ist, ist in $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Tumoren signifikant reduziert (Abb. 34 A). In den Modellen, in denen *Myd88* nicht in Makrophagen exprimiert ist ($Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$), wurden hingegen keine signifikanten Unterschiede bezüglich *Tbx21* detektiert. Ebenso ist ROR γ T, Transkriptionsfaktor in T_H17 -Zellen, in $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Tumoren stark herabreguliert, nicht aber in $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ -Läsionen (Abb. 34 B). Das gleiche Expressionsmuster konnte für den IL-23-Rezeptor (*Il23r*) gezeigt werden (Abb. 34 D), der ebenfalls auf T_H17 -Zellen ausgeprägt ist, da IL-23 die Reifung von T_H17 -Zellen anregt und die Aufrechterhaltung des T_H17 -Phänotyps kontrolliert (Stritesky *et al.*, 2008). Die Expression von *Gzmb* (Granzym B) zeigt ein ähnliches Bild: zwar ist *Gzmb* in allen Läsionen herunterreguliert, jedoch konnten erneut nur in $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Tieren signifikante Unterschiede ermittelt werden (Abb. 34 C). Analog zum Fas Ligand, für den ein ähnliches Expressionsmuster gezeigt wurde, wird *Gzmb* von CTLs und NK-Zellen exprimiert (Hiebert and Granville, 2012). Die Ergebnisse sind nochmals nachfolgend in Tabelle 16 zusammengefasst.

Marker	T-Zell Subpopulation	Vermutete Funktion (pro-/anti-tumoral)	Expression in Tumoren verglichen zum prämaligen Darmepithel			
			<i>Apc</i> ^{1638N/+}	<i>Apc</i> ^{1638N/+} <i>MyD88</i> ^{LSL}	<i>Apc</i> ^{1638N/+} <i>MyD88</i> ^{IEC}	<i>Apc</i> ^{1638N/+} <i>MyD88</i> ^{MYEL}
Gata3	T _{H2}	pro	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
FoxP3	T _{regs}	pro	≈	≈	≈	≈
RORγT IL23R	T _{H17}	pro/anti	↓↓↓	≈ (↓)	≈	↓↓↓
T-bet	T _{H1}	anti	↓↓↓	≈ (↑)	≈ (↑)	↓↓↓
Granzym B Fas Ligand	CTLs	anti	↓↓↓	(↓)	↓↓↓	↓↓↓
			↓↓↓	≈ (↑)	≈ (↑)	↓↓↓

Table 16: Zusammenfassendes Expressionsprofil verschiedener T-Zell-Marker in Tumoren. Legende: ↓↓↓ - signifikant herabreguliert in Tumoren verglichen zum gesunden Darmgewebe; (↓) – herabreguliert im Tumor verglichen zum gesunden Darmgewebe, nicht signifikant; ≈ - Expression im Tumor ist unverändert; ↑↑↑ - signifikant hochreguliert im Tumor verglichen zum gesunden Darmgewebe; (↑) – hochreguliert im Tumor verglichen zum gesunden Darmgewebe, nicht signifikant.

Zusammenfassend können die Befunde zu intratumoralen T-Zell-Populationen wie folgt dargestellt werden: generell herrscht in *Apc*^{1638N}-induzierten Darmtumoren ein tumorförderndes Milieu, mit einer Reduktion an tumorhemmenden T_{H1}-Zellen und CTLs, sowie T_{H17}-Zellen, während gleichzeitig tumorfördernde T_{H2}-Zellen erhöht sind. Die T-Zellpopulationen im Tumor scheinen unterschiedlich auf MyD88-abhängige Signale zu reagieren. Bei globaler Defizienz von MyD88 sind T_{H1}-, T_{H17}-Zellen und CTLs häufiger im Tumor anzutreffen, während T_{regs} und T_{H2}-Zellen unverändert sind im Vergleich zu Tumoren aus MyD88-profizienten Tieren. Diese Effekte auf die mutmaßlich tumorhemmenden T-Zellpopulationen lassen sich durch Re-Expression von *Myd88* in Makrophagen nahezu vollständig wiederherstellen. Es scheint somit, als würden anti-tumoral wirkende T_{H1}- (und T_{H17}-) Zellen durch die Aktivität von MyD88 in Makrophagen gezielt aus Tumoren „ferngehalten“ zu werden, oder in ihrer Aktivität stark inhibiert zu werden. Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Makrophagen in Abhängigkeit von MyD88 lösliche Signale aussenden, die entweder aktiv das Fernbleiben von CTLs und NK-Zellen aus dem Tumor bewirken, oder aber die MyD88-abhängige Signaltransduktion die Produktion von chemotaktischen Signalen blockiert, die normalerweise im *Apc*^{1638N/+}-Tumormodell vorhanden sind und T-Zellen anlocken. Dass die Inhibierung von MyD88 prinzipiell die T-Zell-Infiltration in Darmgewebe beeinflusst, wurde in einer vor kurzem veröffentlichten Publikation gezeigt (Xie *et al.*, 2016). Die Infiltration von T-Zellen in Tumorgewebe wird vor allem durch Chemokine hervorgerufen und reguliert. Für die Chemokine IL-8, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sind signifikante Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgeweben gezeigt worden, wobei die erhöhte Expression dieser Chemokine in Tumoren mit einer besseren

Prognose für Kolonkarzinom-Patienten einhergeht (Doll *et al.*, 2010; Kistner, 2014). CXCL9, CXCL10 und CXCL11 werden durch Interferon-gamma induziert, und binden an den Rezeptor CXCR3, welcher auf T_H1-Zellen und CTLs präsent ist (Groom and Luster, 2011). Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, dass die Expression des TLR5-Liganden Flagellin in T-Zellen zu erhöhter T-Zell-Infiltration in einem Melanom-Modell führt und mit erhöhter CXCR3-Expression auf T-Zellen einhergeht (Geng *et al.*, 2015). In dieser Studie ruft die Bindung von Flagellin an TLR5 auf den Tumorzellen den Rückgang der Tumore sowie ein verändertes Zytokinprofil hervor. Für TLR5 ist zuvor bereits in einem Xenotransplant-Modell ein tumorhemmender Effekt gezeigt worden (Rhee *et al.*, 2008): diese Studie beschreibt den Rückgang von Tumoren nach der Aktivierung von TLR5 auf den Tumorzellen durch Flagellin, was aber auf die tumorzellautonome Rolle von TLR5 hinweist. TLR5-Transkripte wurden Darmepithelzellen in dieser Arbeit in deutlich höheren Mengen als in Makrophagen nachgewiesen, was analog zur zuvor genannten Publikation für eine bedeutendere Rolle von TLR5 auf intestinalen Epithelzellen spricht. TLR5 ist in dem hier beschriebenen Mausmodell unverändert in Tumoren, verglichen zum physiologischen Darmepithel exprimiert (vgl. Abb. 40), sodass dieser Rezeptor hier als Ausnahmen von den MyD88-abhängigen TLRs und den daraus resultierenden tumorfördernden Signalen anzusehen ist, und TLR5 keinen Effekt auf die Tumorentstehung hat, oder sogar ein tumorhemmender Effekt möglich ist. Ob oder inwiefern MyD88-hervorgerufene Signale aus Makrophagen die Expression oder Sekretion von CXCL9, -10 und -11 beeinflussen, wäre also ein vielversprechender Ansatz für weiterführende Experimente. Eine weitere Möglichkeit, inwiefern TLR-induzierte Signale die T-Zell-Infiltration beeinflussen könnten, zeigt die aktuelle Veröffentlichung von Chung und Kollegen. Es wird darin beschrieben, dass eine TLR-Stimulation die Adhäsion von Leukozyten hervorruft und damit die Infiltration von Leukozyten auf direkten Weg in entzündetes Gewebe auslösen können (Chung *et al.*, 2014). Dieser Aspekt stellt also einen weiteren experimentell überprüfbaren Ansatzpunkt dar, um die Rolle von TLR/MyD88 in T-Zellen bzw. auf T-Zellen zu analysieren.

5.4.3 Die Rolle von MyD88 bei der epithelial-mesenchymalen Transition und der Ausprägung von Stammzellfaktoren

Während der Tumorprogression, Invasion und Metastasierung von Adenokarzinomen durchlaufen die ursprünglich aus dem Epithel hervorgegangen Tumorzellen phänotypische

Veränderungen, die ihnen in zunehmendem Ausmaß das Loslösen vom umliegenden Gewebe und die zelluläre Migration erlauben. Dieser Prozess wird als *epithelial-mesenchymale Transition*, oder EMT, bezeichnet, da die Tumorzellen zunehmend Eigenschaften typischer Bindegewebszellen erwerben. Diese Fähigkeit zählt zu den klassischen *Hallmarks of Cancer* (Hanahan and Weinberg, 2011). EMT ist charakterisiert durch den Verlust der Zellpolarität und von Zell-Zell-Kontakten, was häufig mit dem Verlust des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin einhergeht (Berx and van Roy, 2009). Gleichzeitig sind Transkripte, die eine Rolle bei der Zellmigration und beim Umbau der extrazellulären Matrix spielen, als hochreguliert beschrieben (Cavallaro and Christofori, 2004). Die Transkriptionsfaktoren Snail und Slug (codiert durch *Snai1* und *Snai2*) sind entscheidend an der EMT beteiligt. Sie binden in der Promoterregion des E-Cadherin Gens und unterbinden dessen Expression (Villarejo *et al.*, 2014). Daten aus humanen Tumorproben zeigten, dass eine erhöhte *Myd88*-Expression mit dem Auftreten von Lebermetastasen und einer schlechten Prognose in CRC-Patienten korreliert (Szajnik *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010), und verstärkte Progression von Ovarialkarzinomen zur Folge hat (Kelly *et al.*, 2006). In Zelllinien aus hepatozellulären Karzinomen wurde gezeigt, dass MyD88 die Expression von *Snai1* und *Snai2* induziert, was gleichzeitig mit der Inhibition von *Cdh1* (E-Cadherin) und der Induktion von *Cdh2* (N-Cadherin) einhergeht (Jia *et al.*, 2014). In Anbetracht der Tatsache, dass MyD88 einen fördernden Einfluss auf die Malignität von Tumoren im hier untersuchten $Apc^{1638N/+}$ -Modell ausübt, wurde die Expression von *Snai1* und *Snai2* untersucht. Sowohl *Snai1* als *Snai2* sind in $Apc^{1638N/+}$ -Tumoren signifikant gegenüber dem Normalgewebe induziert (vgl. Abschnitt 4.4.8 und Abb. 35 A). Analog dazu konnte in $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Läsionen eine deutliche Induktion beider Gene detektiert werden, wobei bei *Snai2* ebenfalls signifikante Unterschiede ermittelt wurden. In den Linien $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ konnte hingegen keine Induktion im Tumor gegenüber gesunder Darmmukosa festgestellt werden. Die Untersuchung von Slug im Western Blot zeigte an einer kleinen Probenzahl, dass das Protein in gesunder Darmmukosa kaum oder gar nicht detektiert werden kann, in Läsionen von $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{LSL}$ $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{IEC}$ -Tieren schwach ausgeprägt ist, in $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL}$ -Tumoren dagegen in deutlich größeren Mengen vorhanden ist (vgl. Abb. 35 B). Slug wurde in Normal- und Tumorgewebe des untersuchten $Apc^{1638N/+}$ -Tieres nicht detektiert, sodass hier keine Aussage getroffen werden kann. Immunfluoreszenzfärbungen von Läsionen aus allen vier Modellen zeigten jedoch deutlich, dass zahlreiche Zellkerne in $Apc^{1638N/+}$ - und $Apc^{1638N/+}$

MyD88^{MYEL}-Tieren Slug-positiv sind, die jeweils in Zellen detektiert wurden, die keine Anordnung in epithelialer Drüsenstruktur aufwiesen. In Apc^{1638N/+} MyD88^{LSL-} und Apc^{1638N/+} MyD88^{IEC}-Tumoren wurden hingegen nur vereinzelt Slug-positive Nuklei detektiert (vgl. Abb. 35 C). Somit konnte nachgewiesen werden, dass *Snai2* nicht nur auf Transkriptionsebene hochreguliert ist, sondern auch im Zellkern auf funktioneller Proteinebene verstärkt vorliegt. Den Ergebnissen nach ist MyD88 in Makrophagen entscheidend an der Expression von *Snai1* und *Snai2* beteiligt. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher jedoch unklar. Es wurde eine indirekte Induktion der EMT in kolorektalen Karzinomzellen über IL-6 und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) beschrieben (Rokavec *et al.*, 2014). Im Zusammenhang mit der erhöhten IL-6-Expression, die hier in Abhängigkeit von MyD88 in Makrophagen nachgewiesen wurde, stellt dies eine mögliche Erklärung für die Beobachtungen und einen Ansatzpunkt für weiterführende Experimente dar. Neben den in der vorliegenden Arbeit untersuchten und besprochenen Faktoren wurde *transforming growth factor-β* (TGFβ) als EMT-Induzierer beschrieben (Papageorgis, 2015). TGFβ ist in eine Reihe biologischer Prozesse involviert, wie Embryonalentwicklung, Gewebemorphogenese und Organhomöostase, auf zellulärer Ebene kontrolliert das Zytokin die Proliferation von Epithel- und anderen Zellen (Morrison *et al.*, 2013). Die drei Isoformen TGFβ1, TGFβ2 und TGFβ3 werden ubiquitär exprimiert (Papageorgis, 2015). In der Tumorentstehung hat TGFβ zunächst tumorsupprimierende Funktionen, indem es den Zellzyklusarrest und Zellapoptose auslösen kann. Das Zytokin wurde in intestinalen Epithelzellen oder Fibroblasten von IBD-Patienten detektiert (Lawrance *et al.*, 2001; Stadnicki *et al.*, 2009), und es wurden erhöhte Expressionswerte von TGFβ in verschiedenen soliden Tumoren detektiert, sodass auch ein tumorfördernder Einfluss während der Tumorprogression, vor allem auf die EMT, diskutiert wird (Morrison *et al.*, 2013). So wurde beschrieben, dass TGFβ die Transkriptionsfaktoren Snail und Slug, sowie ZEB1 und ZEB2 induziert (Papageorgis, 2015). Die Aktivität von TGFβ wird durch verschiedene Faktoren bestimmt, unter anderem durch das Integrin α_vβ₆, welches in Entzündungsreaktionen hochreguliert ist (Munger *et al.*, 1999), oder durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Barcellos-Hoff *et al.*, 1994). So wäre es möglich, dass durch das MyD88-hervorgerufene proinflammatorische Milieu im Tumor die Expression und Aktivierung von TGFβ induziert wird, welches wiederum die EMT vorantreibt.

Aufgrund der Möglichkeit zur Verbreitung im Gewebe und zur Ausbildung von Fernmetastasen werden manchen Krebszellen auch Stammzeleigenschaften zugesprochen. Diese Population von Krebszellen werden Krebsstammzellen (*cancer stem cells*, CSC) genannt, und wurden ursprünglich definiert aufgrund ihrer Fähigkeit, nach ihrer Transplantation Tumore in Empfängermäusen auszubilden (Hanahan and Weinberg, 2011). CSCs exprimieren häufig Stammzellfaktoren, die in Stammzellen des Ursprungsgewebes nachgewiesen wurden (Al-Hajj *et al.*, 2003). Im Darmepithel sind verschiedene WNT/ β -Catenin-Zielgene als potentielle Stammzellmarker beschrieben worden: so wurde für das SRY (*sex-determining region Y*)-box 9 (*Sox9*)-Gen gezeigt, dass dessen Expression die Differenzierung von Zellen in Krypten des Kolons inhibiert (Blache *et al.*, 2004). *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5* (*Lgr5*) wird ebenfalls als Stammzellmarker angesehen, da *Lgr5*-positive Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen, Apoptose-resistent sind, und zu allen intestinalen Epithelzellen differenzieren können (Barker *et al.*, 2007). Außerdem zeigte die Arbeitsgruppe von Hans Clevers, dass die Expression von *Achaete-scute complex homolog 2* (*Ascl2*) zur Ausbildung von Krypt-Hyperplasien führt, wohingegen die Deletion von *Ascl2* zum Verlust von *Lgr5*-positiven Zellen führt (van der Flier *et al.*, 2009). An humanen Proben wurde gezeigt, dass *Ascl2* in Metastasen von kolorektalen Karzinomen deutlich hochreguliert ist (Friederichs *et al.*, 2005). Zudem wurde in experimentellen Studien gezeigt, dass *Ascl2*-Inhibierung in Zelllinien aus kolorektalen Karzinomen zum Wachstumsstillstand von Tumor-Xenotransplantaten führt (Zhu *et al.*, 2012). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Ergebnisse zeigten übereinstimmend mit den zuvor aufgeführten Publikationen eine signifikante Überexpression von *Ascl2* in Läsionen der vier untersuchten Mausmodelle, wobei keine Abhängigkeit von *MyD88* festzustellen war (vgl. Abb. 36 A, Abschnitt 4.4.8). Für *Sox9* konnte ebenfalls eine signifikante Überexpression in kolorektalen Tumoren verglichen mit gesunder Kolonmukosa gezeigt werden, und eine deutliche Überexpression war zudem mit einer geringeren Fünf-Jahres-Überlebensrate assoziiert (Lu *et al.*, 2008). Auch im *Apc*^{1638N/+}-Mausmodell wurden in Läsionen signifikant erhöhte Expressionslevel für *Sox9* detektiert (vgl. Abb. 36 C). Auch in Läsionen aus den beiden Modellen mit zelltypspezifischer Expression von *Myd88*, *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{IEC} und *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{MYEL}, waren *Sox9*-Transkripte signifikant erhöht. In *Myd88*-defizienten Tieren wurde hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen prämaligmem Darmepithel und Läsionen beobachtet. Ebenso konnten für *Lgr5*-Transkripte in *Apc*^{1638N/+} *MyD88*^{LSL}-Tieren keine Unterschiede zwischen gesunder Darmmukosa und Läsionen festgestellt werden,

wohingegen in sowohl $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{EC-}$ und $Apc^{1638N/+}$ $MyD88^{MYEL-}$ -Tieren, als auch im parentalen $Apc^{1638N/+}$ -Modell eine signifikante Erhöhung der *Lgr5*-Expression verzeichnet wurde (vgl. Abb. 37 B). Zusammenfassend wurde in Läsionen aus $Apc^{1638N/+}$ -Mäusen signifikant erhöhte Mengen aller hier untersuchten mutmaßlichen Stammzellfaktoren detektiert. Ebenso waren diese Faktoren in den Modellen mit zelltypspezifischer Expression von *Myd88* im Darmepithel oder in Makrophagen signifikant erhöht. Lediglich in global *Myd88*-defizienten $Apc^{1638N/+}$ -Tieren war die Ausprägung von *Lgr5* und *Sox9* nicht verändert. Demnach könnten *MyD88*-vermittelte Signale einen Einfluss auf die Expression von Stammzellfaktoren und der Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften und Tumorzellen ausüben. Es wurde bereits gezeigt, dass TLR2-induzierte Signale auf mesenchymalen Stammzellen zur Aufrechterhaltung ihrer Stammzeleigenschaften *in vitro* nötig sind (Pevsner-Fischer *et al.*, 2007), und in Ovarialkarzinomen nach chirurgischer und chemotherapeutischer Verletzung des Tumorgewebes *MyD88*-positive Krebszellen sich selbst und damit auch das Tumorgewebe erneuern (Chefetz *et al.*, 2013). Auf intestinalen *Lgr5*-positiven Stammzellen wurde die Expression von TLR4 nachgewiesen (Neal *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu den zuvor genannten Studien wurde hier jedoch gezeigt, dass die Aktivierung von TLR4 auf intestinalen Stammzellen deren Apoptose einleitet. Jedoch waren diese Beobachtungen abhängig von TLR4-induzierten Signalen vermittelt über das Adapterprotein *Trif*, und unabhängig von *MyD88*. Somit ist es möglich, dass *MyD88*-vermittelte Signale die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften in Stammzellen bzw. die Induktion von Stammzeleigenschaften CSCs induzieren.

Einer Theorie von Thomas Brabletz nach findet EMT vor allem in Krebs-Stammzellen statt. Das Modell der migrierenden Krebs-Stammzellen (*migrating cancer stem cells*, MCS Zellen) ist auf die Beobachtung begründet, dass Zellen im Inneren des Tumors häufig differenziert sind, wohingegen Krebszellen in der Invasionsfront von Tumoren einen eher undifferenzierten Phänotyp aufweisen, und durch hohe Levels an nukleären β -Catenin und dem Verlust von E-Cadherin charakterisiert sind. Die Krebszellen in Fernmetastasen ähneln phänotypisch hingegen wieder den differenzierten Zellen im Inneren des Primärtumors, mit E-Cadherin-Expression und vergleichsweise geringen Mengen an β -Catenin im Zellkern. Die migrierenden Krebs-Stammzellen kombinieren nun die beiden Eigenschaften, die für die Ausbildung von Fernmetastasen nötig sind: die Möglichkeit, sich vom Primärtumor zu lösen und durch das Gewebe zu migrieren, und sich in einer anderen Umgebung niederzulassen und dort erneut zu proliferieren und differenzieren (Brabletz *et al.*, 2009). Ein direkter Zusammenhang

zwischen Stammzeleigenschaften und EMT wurde 2002 gezeigt, als nachgewiesen wurde, dass *Sox9* die Expression von *Snai2* in der Neuralleiste induziert (Spokony *et al.*, 2002). Erste Daten aus *Apc*^{1638N/+}- und *pvillin-KRas*^{V12G}-Mäusen, sowie dem kombinierten Modell *KRas*^{V12G}/*Apc*^{1638N/+} (Janssen *et al.*, 2006) zeigen zum einen, dass die Stammzellmarker *Ascl2*, *Sox9* und *Lgr5* in Läsionen dieser drei Modelle deutlich überexprimiert sind verglichen zur gesunden Darmmukosa (unpublizierte Daten). Außerdem werden sie, wie in Brabletz' Modell beschrieben, deutlich stärker exprimiert in Läsionen, die durch Deregulation des WNT/ β -Catenin-Signalwegs hervorgerufen werden: in Läsionen der *Apc*^{1638N/+}- und *KRas*^{V12G}/*Apc*^{1638N/+}-Modelle sind diese Faktoren um das durchschnittlich 10- bis 15-Fache ausgeprägt verglichen zum gesunden Darm, wohingegen in *KRas*^{V12G}-Läsionen lediglich eine Verdopplung der Expressionslevels beobachtet wurde (vorläufige, unpublizierte Daten). Bezüglich der Befunde zur Malignität der Läsionen, der Menge bzw. Verteilung Slug-positiver Zellkerne in den Läsionen, der Ausprägung verschiedener Stammzellfaktoren, sowie in Kombination mit Brabletz' Modell ist es möglich, dass die Expression der Stammzellfaktoren, ebenso wie die Snail- und Slug-Expression in Abhängigkeit von MyD88 erfolgt. In diesem Fall hätte MyD88 nicht nur Einfluss auf die Malignität des Tumors, sondern auch auf die Ausbildung von Fernmetastasen. Somit könnte eine globale *Myd88*-Defizienz sowohl vor Tumorprogression, als auch vor der Ausbildung von Metastasen schützen.

Alle erarbeiteten Ergebnisse, die die potentielle Rolle von MyD88 im Tumorgewebe beschreiben, sind in Abb. 38 schematisch und vereinfacht in graphischer Form zusammengefasst.

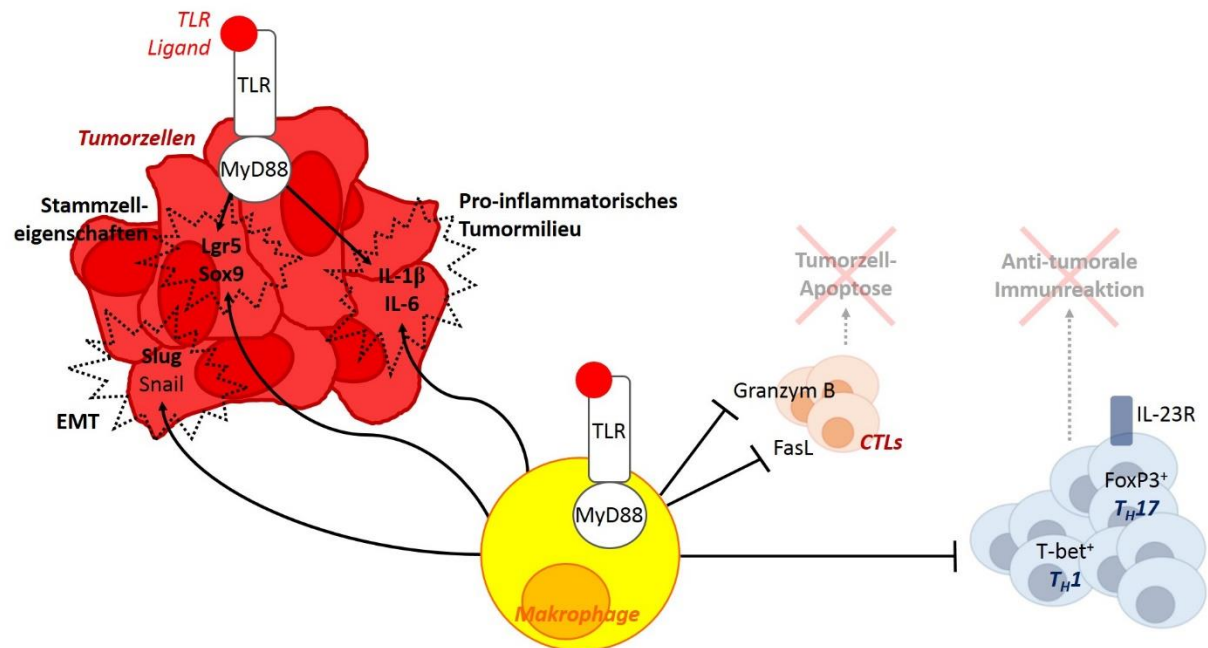


Abb. 38: Zellspezifische Funktionen von MyD88 in Tumorzellen und Tumor-infiltrierenden Makrophagen. Innerhalb von Tumorzellen führt die MyD88-Expression zu einer leichten Erhöhung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6. Hauptsächlich werden IL-1 β und IL-6, und damit ein pro-inflammatorische Milieu im Tumor aber von MyD88-abhängigen Signalwegen in Makrophagen induziert. MyD88 in Makrophagen ist außerdem erforderlich für eine Induktion der Transkriptionsfaktoren Snail und Slug, welche EMT in Tumorzellen fördern. Makrophagen sind vermutlich auch an der Hemmung von anti-tumoralen Immunreaktionen des adaptiven Immunsystems beteiligt, vermittelt über T-Helferzellen des Typs T_H1 und T_H17, sowie zytotoxischen Effektor-T-Zellen (CTLs). Die CTLs produzieren die Apoptose-induzierenden Faktoren Fas Ligand und Granzym B, und werden MyD88-vermittelt aus dem Tumor ferngehalten. TLR – Toll-like Rezeptor; MyD88 – myeloid differentiation primary response gene 88; EMT – epithelial-mesenchymal transition; CTLs – zytotoxische T-Zellen; T_H1 – T-Helferzellen Subtyp 1; T_H17 – T-Helferzellen Subtyp 17.

5.5 Zusammenfassung – Hypothese zur zellspezifischen Rolle von MyD88 während der intestinalen Tumorgenese

Die Beobachtungen aus dem Apc^{1638N/+}-Mausmodell mit MyD88-Defizienz bzw. zellspezifischer Re-Expression zeigen, dass MyD88 die intestinalen Tumorgenese auf zwei Wegen fördert: zum einen trägt MyD88 entscheidend zur Tumoringenese bei, gleichzeitig unterstützt es die Tumoringenese. Zur Tumoringenese ist sowohl MyD88 in intestinalen Epithelzellen als auch in Makrophagen erforderlich, wobei die Expression von *Myd88* in beiden Zelltypen zugleich einen additiven Effekt auf die Tumoringenese hat. Innerhalb des prä-malignen Darmepithels erhöht MyD88 die Zellteilungsrate, wodurch die Wahrscheinlichkeit für genetische Veränderungen in den Zellen, wie etwa der Verlust des Wildtyp-*Apc*-Allels im Apc^{1638N/+}-Modell, erhöht wird. Gleichzeitig fördert MyD88 die Ausprägung des anti-apoptotisch wirkenden *Birc5*, wodurch bereits transformierte Epithelzellen potentiell vor Apoptose geschützt sind. Eine spezielle Rolle von MyD88 in

Makrophagen im prämaligen Darmepithel konnte dagegen nicht ermittelt werden. Somit senkt MyD88 in Epithelzellen, über erhöhte Proliferation und reduzierte Apoptoserate, die geschwindigkeitsbestimmende Barriere zur Tumorentstehung. Im bereits ausgebildeten Tumor ist das Adapterprotein sowohl in Darmepithelzellen, aber vor allem in Makrophagen, an der Ausbildung eines pro-inflammatorischen Milieus beteiligt. Im Tumorgewebe sind MyD88-übermittelte Signale in Makrophagen entscheidend, anti-tumorale Reaktionen des adaptiven Immunsystems zu unterdrücken und die Progression der Tumore direkt zu beschleunigen, indem EMT von Tumorzellen gefördert wird (Abb. 39).

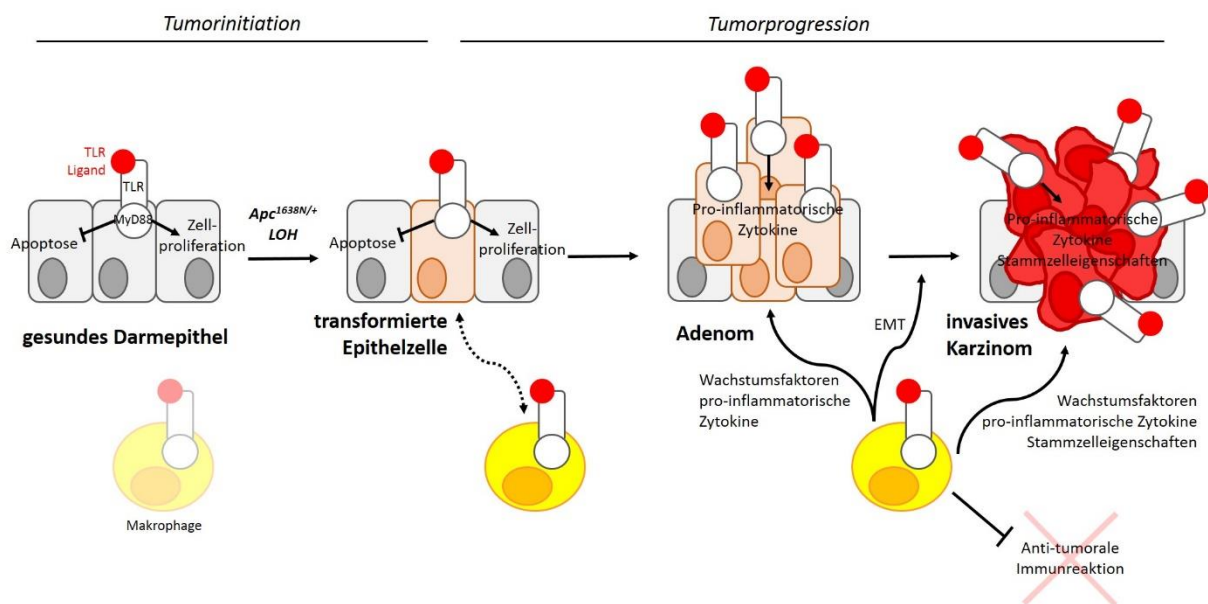


Abb. 39: MyD88 fördert die Tumorentstehung im Darmtrakt in zwei geschwindigkeitsbestimmenden Schritten: Tumorentstehung und Tumorentwicklung. TLR – Toll-like Rezeptor; MyD88 – myeloid differentiation primary response gene 88; LOH – loss of heterozygosity; EMT – epithelial-mesenchymal transition.

Eine mögliche Erklärung für die reduzierte Tumorentstehung im MyD88-defizienten $Apc^{1638N/+}$ -Modell liefern Arbeiten an einem weiteren $Apc^{1638N/+}$ -Modell, indem der zweite TLR-Signalweg über das Adapterprotein Trif ausgeschaltet ist. Im Rahmen einer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Tumorentstehung im $Apc^{1638N/+}$ Trif^{Lps2/Lps2}-Modell signifikant erhöht und die Tumorentgröße gleichzeitig deutlich reduziert ist (G. Kuhn, 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass TLR3/Trif-induzierte Signale im Darmepithel die Apoptose dieser Zellen einleitet. Außerdem werden *in vivo* die Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 nach TLR3/Trif-Stimulation im Darmgewebe induziert, die wiederum mit einer anti-tumoralen adaptiven Immunantwort assoziiert sind (Kistner, 2014). Die erhöhte Tumorentstehung im $Apc^{1638N/+}$ Trif^{Lps2/Lps2}-Modell könnte somit auf die tumorfördernde Wirkung

des MyD88-abhängigen Signalwegs zurückzuführen sein, wohingegen der deutliche Schutz vor Tumorentstehung, der im global MyD88-defizienten $Apc^{1638N/+}$ MyD88^{LSL}-Modell beobachtet wurde, vermutlich über den Trif-abhängigen Signalweg vermittelt wird. Wir postulieren somit eine Rolle von TLR-induzierten Signalwegen während der intestinalen Karzinogenese, die abhängig vom Adapterprotein tumorfördernde (MyD88) oder tumorhemmende (Trif) Eigenschaften hervorrufen: durch die MyD88-vermittelte Aktivierung des pro-inflammatorischen NF- κ B-Signalwegs im Tumorstroma und der tumorzellautonomen verstärkten Aktivierung von MAP-Kinasen wird ein tumorfördernder Effekt initiiert. Hingegen schaffen die durch Trif-Signale induzierten Chemokine vermutlich ein Immunmilieu, welches sich tumorhemmend auswirkt, und Trif zudem tumorzellautonom Apoptose hervorruft. Da der MyD88-induzierte intrazelluläre Signalweg durch verschiedenen Rezeptoren, und somit durch diverse Liganden, ausgelöst wird, lässt sich nicht sagen, welcher Ligand oder welche Liganden im Speziellen die tumorfördernden Eigenschaften hervorrufen.

5.6 Ausblick

Das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Mausmodell mit zelltypspezifischer Ausprägung von *Myd88* entweder im Darmepithel und den daraus abgeleiteten Tumorzellen, oder in Makrophagen, bietet erstmals die Möglichkeit, die Funktion des Immun-Adapterproteins sowohl bei der Tumorentstehung als auch in der Tumorentwicklung *in vivo* zu untersuchen. Was dieses Modell allerdings nicht berücksichtigt, ist der Einfluss weiterer Zellen, auf denen TLRs ausgeprägt sind und die mit der intestinalen Tumorentstehung in Zusammenhang stehen könnten. Besonders in T-Zellen und hier wiederum für deren anti-tumorale Wirkung könnten TLRs von Bedeutung sein: TLR2/MyD88-Stimulation auf murinen CD8⁺ T-Zellen erhöht deren zytotoxische Aktivität *in vitro* und *in vivo*, und führt zum Rückgang von Tumoren in einem Mausmodell für Melanome (Aspordites *et al.*, 2008; Geng *et al.*, 2010). Ebenfalls wurde durch Stimulation von TLR2/6 ein Angiogenese-fördernder Effekt beschrieben (Grote *et al.*, 2010). Die Ausbildung von Blutgefäßen im Tumor, eine weitere *Hallmark of Cancer*, fördert das Tumorentstehung und die Progression, indem der Tumor dadurch mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt wird (Hanahan and Weinberg, 2011). Der Transkriptionsfaktor *High-mobility group box-1* (HMGB1), welcher als endogener Ligand und zelluläres „Gefahrensignal“ an TLR2 und TLR4 binden kann, fördert zum einen die Expression des *vascular endothelial growth factors* (VEGF) in Makrophagen, zum anderen induziert die direkte Stimulation von

Endothelzellen mit HMBG1 deren Proliferation und Chemotaxis *in vitro* (van Beijnum *et al.*, 2008). Die Bedeutung von MyD88-abhängigen Signalen in Endothelzellen während der Tumorgenese stellt demnach einen vielversprechenden Ansatz für weitere Analysen dar. Der Einfluss von MyD88-induzierten Signalen während der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) von Tumorzellen beruht aufgrund der vorliegenden Ergebnisse vermutlich auf nicht-zellautonomen Signalen, die durch Makrophagen vermittelt werden. Erste *in vitro* Experimente in der Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass die Induktion von TLRs/MyD88 auf kolorektalen Karzinomzellen keinen Einfluss auf Gene hat, die während der EMT dereguliert sind (vorläufige Daten). Damit wären die Beobachtungen aus dem *Apc*^{1638N/+} MyD88-Mausmodell bestätigt, wonach es sich bei der EMT um einen indirekten Effekt handelt, der über Makrophagen vermittelt wird. Dementsprechend wären weitere Experimente hilfreich, um die Faktoren zu ermitteln, welche von Makrophagen sekretiert werden und die EMT in Tumorzellen induzieren. Um den Effekt von MyD88 auf die intestinale Tumorgenese zu vollständiger zu ermitteln, wäre die Analyse eines weiteren genetischen Mausmodells für kolorektale Karzinome hilfreich, das andere molekulargenetische Veränderungen rekapituliert, die zur Tumorbildung führen. Erste Untersuchungen eines kombinierten Modells der MyD88^{LSL}-Linie mit *pvillin-KRAS*^{V12G}-Tieren wurden bereits durchgeführt. Transgene *pvillin-KRAS*^{V12G}-Mäuse exprimieren das humane Onkogen *KRAS*^{V12G}-Allel im Darmepithel (Janssen *et al.*, 2002). 80% dieser Tiere im Alter von > 9 Monaten entwickeln Läsionen im Darm, die frei von *Apc*-Mutationen sind, dagegen häufig spontan Mutationen in dem Tumorsuppressor p53 tragen (Janssen *et al.*, 2002). Das Proto-Onkogen K-Ras ist der MAP-Kinase Signalkaskade vorgelagert und induziert ERK1/2 (Coulombe and Meloche, 2007). Die Expression des *KRAS*^{V12G}-Allels im murinen Darmepithel geht mit robuster Aktivierung des MAPK-Signalwegs über ERK1/2 einher (Janssen *et al.*, 2002). Aufgrund der erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 durch MyD88 im Darmepithel, wie es im *Apc*^{1638N/+}-Modell beobachtet wurde, ist ein synergistischer Effekt von *KRAS*^{V12G} und MyD88 denkbar. In dem Fall würde MyD88-Defizienz im *KRAS*^{V12G}-Modell zu einer Verminderung von ERK1/2-Phosphorylierung führen und möglicherweise zu einer erniedrigten Tumorinzidenz. In der großen Mehrzahl der *pvillin-KRAS*^{V12G}-Tiere wurde eine benigne Hypertrophie des Darms beobachtet, die sich durch Längen- und Gewichtszunahme des Darmgewebes im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen äußert (Daten nicht publiziert). Vorläufige Daten aus dem kombinierten Modell *pvillin-KRAS*^{V12G} MyD88^{LSL} lassen vermuten, dass diese Vergrößerung des

Darms bei MyD88-Defizienz reduziert ist. Ein zugrundeliegender Mechanismus wäre eine direkte Interaktion von MyD88 mit ERK, was die Inaktivierung dieser MAPK verhindert, was bereits *in vitro* Studien gezeigt haben (Coste *et al.*, 2010).

Die Arbeit mit MyD88-defizienten Modellen ermöglicht es, mehrere Signalwege gleichzeitig zu untersuchen. Nachdem in der vorliegenden Arbeit tumorfördernde Effekte von MyD88 beobachtet wurden, bleibt es im nächsten Schritt auch zu klären, welcher der MyD88-abhängigen Rezeptoren, und daraus folgend, welche Liganden/Faktoren im Einzelnen die Tumorentstehung induzieren. Diese Faktoren hätten als mögliche therapeutische Zielstruktur auch klinisch eine hohe Bedeutung. Bisherige Studien zeigten widersprüchliche Ergebnisse zu einzelnen TLRs: TLR5 schützt vor der Tumorentstehung in einem Xenotransplantat-Modell für kolorektale Karzinome (Rhee *et al.*, 2008). *In vitro* und in transgenen Mausmodellen sind für TLR4 tumorfördernde Eigenschaften beschrieben worden (Santaolalla *et al.*, 2013; H. Xu *et al.*, 2011). Eine andere Studie zeigte, dass TLR4-Defizienz keinen Einfluss auf das Tumorwachstum nach Strahlentherapie in Xenotransplantat-Modellen ausübt, eine TLR9-Defizienz hingegen das Tumorwachstum deutlich verlangsamt (Gao *et al.*, 2013). Abgesehen von TLRs bindet MyD88 auch an die IL-1- und IL-18-Rezeptoren und ist an deren Signalweiterleitung beteiligt (Deguine and Barton, 2014), wodurch MyD88-defiziente Tiere neben TLR-Stimulationen auch nicht auf IL-1- und IL-18-Stimulation ansprechen (Adachi *et al.*, 1998). Es bleibt also in weitergehenden Untersuchungen zu klären, ob die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Effekte durch TLR-Liganden vermittelt werden, oder vielleicht eine Deregulation von IL-1- und IL-18-Signalen die Tumorgenese beeinflussen. Dass IL-1 vermutlich keinen Einfluss auf die intestinale Karzinogenese ausübt, zeigte eine Studie, in der im kombinierten Modell $Apc^{Min/+} // I1r^{-/-}$ keine Unterschiede bezüglich der Polypenanzahl im Darm zu beobachten war, was durch die pharmakologische Inhibierung des IL-1-Rezeptors mit dem therapeutischen Rezeptor-Antagonisten Anakinra bestätigt werden konnte (S. H. Lee *et al.*, 2010). Eine andere Studie hingegen zeigte, dass IL-18 einen hemmenden Einfluss auf die Tumorentstehung nimmt: in einem Modell für Kolitis-assoziierte Krebsentstehung konnte kein Einfluss von TLR2 und IL-1R auf die Entstehung von Polypen nach AOM/DSS-Administration festgestellt werden, hingegen waren IL-18^{-/-} und IL-18R^{-/-}-Tiere anfälliger für Läsionen (Salcedo *et al.*, 2010). Aufschluss darüber, ob nun TLR-vermittelte Signale induziert durch PAMPs oder DAMPs, oder die Zytokine IL-1/IL-18 eine Rolle bei der Tumorgenese spielen, könnten auch Untersuchungen

mit kürzlich beschriebenen „TLR-defizienten“ Tiere geben, die keine Reaktionen auf TLR-Stimulationen zeigen, jedoch auf IL-1- und IL-18-Stimulation ansprechen (Sivick *et al.*, 2014).

Insgesamt ist der Einfluss von MyD88 und der MyD88-induzierten Signalwegen während der intestinalen Karzinogenese unbestritten. Es bedarf weitere Studien, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu erörtern, und somit Möglichkeiten für die Prävention zu ermitteln sowie neuartige Therapiestrategien zu entwickeln.

6 Zusammenfassung

Die Entstehung kolorektaler Karzinome ist maßgeblich auf genetische Veränderungen in Zellen des Darmepithels begründet, die über die Keimbahn vererbt werden oder spontan auftreten. Eine große Bedeutung wird aber auch dem Immunsystem zugeschrieben, da chronische Entzündungskrankheiten des Darms die Entstehung von Darmtumoren nachweislich begünstigen. Die Interaktion des Immunsystems mit entarteten Zellen ist komplex, es kann sowohl tumorfördernd als auch tumorhemmend wirken. Dies gilt in besonderem Maß für Toll-like Rezeptoren (TLRs), die als Teil des angeborenen Immunsystems entscheidend an der Initiation einer Immunreaktion beteiligt sind.

In der Linie *Apc*^{1638N/+}, einem Mausmodell für spontane intestinale Karzinogenese, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das genetisch vermittelte Ausschalten pro-inflammatorisch wirkender TLR-Signale, die über das Adapterprotein MyD88 weitergeleitet werden, vor Tumorentstehung schützt. Über das Cre/loxP-System wurde *Myd88* im Darmepithel und den daraus abgeleiteten Tumorzellen zellspezifisch ausgeprägt, was eine Zunahme von Darmtumoren im Vergleich zur völligen MyD88-Defizienz zur Folge hatte. Auch die Wiederherstellung der MyD88-abhängigen Signalwege in Makrophagen förderte die Tumorentstehung. Allerdings war die Ausprägung von *Myd88* in beiden Zelltypen zugleich erforderlich, um den Phänotyp parentaler Tiere hervorzurufen, was die Anzahl und die Malignität der Tumore betrifft. MyD88-vermittelte Signale fördern demnach sowohl die Tumorentstehung als auch die Tumorprogression. MyD88 im Darmepithel förderte die Proliferation von intestinalen Epithelzellen, indem es den MAPK-Signalweg induzierte. Durch Makrophagen wurden MyD88-abhängig die tumorfördernden Zytokine IL-1 β und IL-6 induziert, zudem die Infiltration anti-tumoral wirkender T_H1- (und T_H17-) Zellen inhibiert, was vermutlich die durch zytotoxische T-Zellen induzierte Apoptose von Tumorzellen hemmt, und schließlich die De-Differenzierung von Tumorzellen durch Induktion der EMT-Transkriptionsfaktoren Snail und Slug und verschiedener Stammzellfaktoren gefördert. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass MyD88-vermittelte Signale im Darmepithel, sowie in Makrophagen die Tumorgenese über unterschiedliche Mechanismen fördert. Dies zeigt, welchen komplexen Einfluss das Immunsystem auf die Entstehung kolorektaler Karzinome

ausübt. Gleichzeitig bieten die erhaltenen Ergebnisse zur tumorfördernden Rolle von MyD88 Ansatzpunkte für neue Präventions- und Therapiemöglichkeiten.

7 Summary

Development of colorectal cancer largely depends on spontaneous or hereditary genetic alterations within intestinal epithelial cells. However, a strong influence has been attributed to the immune system, since chronic inflammatory bowel diseases were shown to promote the development cancer. The interaction between tumour cells and the immune system is complex, it can have tumour-promoting as well as tumour-repressive effects. This is especially true for Toll-like receptors (TLRs), representing a pivotal part of innate immunity with importance for the initiation of immune responses.

In the *Apc*^{1638N/+} mouse, a model for spontaneous digestive tumorigenesis, the present work could demonstrate that an inhibition of pro-inflammatory TLR signalling pathways, mediated through deficiency of the adapter protein MyD88, protects mice from tumour formation. Expression of *Myd88* was reconstituted specifically *via* the Cre/loxP system in intestinal epithelial cells and derived tumour cells, which resulted in an increase of intestinal tumours as compared to globally *Myd88*-deficient mice. Restoration of MyD88-mediated signalling pathways exclusively in macrophages promoted tumour development as well. However, it could be shown that expression and activity of MyD88 in only one of the cell types was not sufficient to recapitulate the parental phenotype, regarding tumour multiplicity and malignancy. Hence, MyD88-mediated signalling promotes both tumour initiation and progression. MyD88 induced proliferation of intestinal epithelial cells, mediated *via* activation of the MAP-Kinase cascade. In macrophages, MyD88 induced the tumour-promoting cytokines IL-1 β and IL-6, it inhibited the infiltration of antitumoural T_H1- (and T_H17-) like T cells, likely blocking tumour cell apoptosis induced through cytotoxic effector T-cells, and lastly, MyD88 induced the EMT transcription factors Snail and Slug and stem cell factors, thereby accelerating tumour cell de-differentiation. These results demonstrate that MyD88-mediated signalling in intestinal epithelia and myeloid cells promote tumorigenesis, albeit by different mechanisms. Furthermore, they highlight the complexity of the influence of the immune system on colorectal cancers. Moreover, the results on the cell-type specific tumour-promoting role of MyD88 might provide new possibilities for cancer prevention and therapy.

8 Literaturverzeichnis

- Abrams, G. D., Bauer, H., and Sprinz, H. (1963).** Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Lab Invest*, 12, 355-364.
- Abreu, M. T. (2010).** Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*, 10(2), 131-144. doi: 10.1038/nri2707
- Abreu, M. T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L. S., Arnold, E. T., and Arditi, M. (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(3), 1609-1616. doi: 10.4049/jimmunol.167.3.1609
- Achyut, B. R., Ghoshal, U. C., Moorchung, N., and Mittal, B. (2007).** Association of Toll-like receptor-4 (Asp299Gly and Thr399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions. *Hum Immunol*, 68(11), 901-907. doi: 10.1016/j.humimm.2007.10.006
- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998).** Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*, 9(1), 143-150.
- Afonina, I. S., Cullen, S. P., and Martin, S. J. (2010).** Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. *Immunol Rev*, 235(1), 105-116. doi: 10.1111/j.0105-2896.2010.00908.x
- Akira, S., and Takeda, K. (2004).** Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4(7), 499-511. doi: 10.1038/nri1391
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006).** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003).** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 3983-3988. doi: 10.1073/pnas.0530291100
- Alahari, S. V., Dong, S., and Alahari, S. K. (2015).** Are macrophages in tumors good targets for novel therapeutic approaches? *Mol Cells*, 38(2), 95-104. doi: 10.14348/molcells.2015.2298
- Ankrile, B., Lim, K. H., and Counter, C. M. (2007).** Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev*, 21(14), 1714-1719. doi: 10.1101/gad.1549407
- Asprodites, N., Zheng, L., Geng, D., Velasco-Gonzalez, C., Sanchez-Perez, L., and Davila, E. (2008).** Engagement of Toll-like receptor-2 on cytotoxic T-lymphocytes occurs in vivo and augments antitumor activity. *FASEB J*, 22(10), 3628-3637. doi: 10.1096/fj.08-108274
- Audehm, S. (2012).** *Immunmodulation der Tumorentstehung: Rolle der T-Zell-vermittelten Immunantwort bei Darmkrebs.* (M.Sc.), Technische Universität München, München.
- Bailey, S. R., Nelson, M. H., Himes, R. A., Li, Z., Mehrotra, S., and Paulos, C. M. (2014).** Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Front Immunol*, 5(276), 276. doi: 10.3389/fimmu.2014.00276
- Balkwill, F. R., and Mantovani, A. (2012).** Cancer-related inflammation: common themes and therapeutic opportunities. *Semin Cancer Biol*, 22(1), 33-40. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.12.005

- Bambou, J. C., Giraud, A., Menard, S., Begue, B., Rakotobe, S., Heyman, M., Taddei, F., Cerf-Bensussan, N., and Gaboriau-Routhiau, V. (2004).** In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. *Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42984-42992. doi: 10.1074/jbc.M405410200
- Banerjee, A., Thamphiwatana, S., Carmona, E. M., Rickman, B., Doran, K. S., and Obonyo, M. (2014).** Deficiency of the myeloid differentiation primary response molecule MyD88 leads to an early and rapid development of *Helicobacter*-induced gastric malignancy. *Infect Immun*, 82(1), 356-363. doi: 10.1128/IAI.01344-13
- Barcellos-Hoff, M. H., Derynck, R., Tsang, M. L., and Weatherbee, J. A. (1994).** Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest*, 93(2), 892-899. doi: 10.1172/JCI117045
- Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J., and Clevers, H. (2007).** Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature*, 449(7165), 1003-1007. doi: 10.1038/nature06196
- Berx, G., and van Roy, F. (2009).** Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6), a003129. doi: 10.1101/cshperspect.a003129
- Biswas, A., Wilmanski, J., Forsman, H., Hrcir, T., Hao, L., Tlaskalova-Hogenova, H., and Kobayashi, K. S. (2011).** Negative regulation of Toll-like receptor signaling plays an essential role in homeostasis of the intestine. *Eur J Immunol*, 41(1), 182-194. doi: 10.1002/eji.201040479
- Blache, P., van de Wetering, M., Duluc, I., Domon, C., Berta, P., Freund, J. N., Clevers, H., and Jay, P. (2004).** SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol*, 166(1), 37-47. doi: 10.1083/jcb.200311021
- Bonnert, T. P., Garka, K. E., Parnet, P., Sonoda, G., Testa, J. R., and Sims, J. E. (1997).** The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Lett*, 402(1), 81-84.
- Bos, J. L., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J. H., van der Eb, A. J., and Vogelstein, B. (1987).** Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 327(6120), 293-297. doi: 10.1038/327293a0
- Boyer, B., Valles, A. M., and Edme, N. (2000).** Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions. *Biochem Pharmacol*, 60(8), 1091-1099.
- Brabletz, S., Schmalhofer, O., and Brabletz, T. (2009).** Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *J Pathol*, 217(2), 307-317. doi: 10.1002/path.2475
- Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J. L., Di Marco, F., French, L., and Tschopp, J. (1998).** MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 273(20), 12203-12209.
- Cario, E. (2010).** Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis*, 16(9), 1583-1597. doi: 10.1002/ibd.21282
- Cario, E., Gerken, G., and Podolsky, D. K. (2007).** Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology*, 132(4), 1359-1374. doi: 10.1053/j.gastro.2007.02.056
- Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004).** Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(2), 118-132. doi: 10.1038/nrc1276

- Chang, L., and Karin, M. (2001).** Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37-40. doi: 10.1038/35065000
- Chapman, J. R., Webster, A. C., and Wong, G. (2013).** Cancer in the transplant recipient. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(7). doi: 10.1101/cshperspect.a015677
- Chefetz, I., Alvero, A. B., Holmberg, J. C., Lebowitz, N., Craveiro, V., Yang-Hartwich, Y., Yin, G., Squillace, L., Gurrea Soteras, M., Aldo, P., and Mor, G. (2013).** TLR2 enhances ovarian cancer stem cell self-renewal and promotes tumor repair and recurrence. *Cell Cycle*, 12(3), 511-521. doi: 10.4161/cc.23406
- Cho, J. H. (2008).** The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 8(6), 458-466. doi: 10.1038/nri2340
- Chung, K.-J., Mitroulis, I., Wiessner, J. R., Zheng, Y. Y., Siegert, G., Sperandio, M., and Chavakis, T. (2014).** A novel pathway of rapid TLR-triggered activation of integrin-dependent leukocyte adhesion that requires Rap1 GTPase. *Molecular biology of the cell*, 25, 2948-2955.
- Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Förster, I. (1999).** Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Research*, 8(4), 265-277.
- Cohen, P. (2014).** The TLR and IL-1 signalling network at a glance. *J Cell Sci*, 127(Pt 11), 2383-2390. doi: 10.1242/jcs.149831
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009).** Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073-1081. doi: 10.1093/carcin/bgp127
- Coste, I., Le Corf, K., Kfoury, A., Hmitou, I., Druillennec, S., Hainaut, P., Eychene, A., Lebecque, S., and Renno, T. (2010).** Dual function of MyD88 in RAS signaling and inflammation, leading to mouse and human cell transformation. *J Clin Invest*, 120(10), 3663-3667. doi: 10.1172/JCI42771
- Coulombe, P., and Meloche, S. (2007).** Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta*, 1773(8), 1376-1387. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.11.001
- Cross, M., Mangelsdorf, I., Wedel, A., and Renkawitz, R. (1988).** Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(17), 6232-6236.
- Das, A., Sinha, M., Datta, S., Abas, M., Chaffee, S., Sen, C. K., and Roy, S. (2015).** Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. *Am J Pathol*. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.06.001
- De Jager, P. L., Franchimont, D., Waliszewska, A., Bitton, A., Cohen, A., Langelier, D., Belaiche, J., Vermeire, S., Farwell, L., Goris, A., Libioulle, C., Jani, N., Dassopoulos, T., Bromfield, G. P., Dubois, B., Cho, J. H., Brant, S. R., Duerr, R. H., Yang, H., Rotter, J. I., Silverberg, M. S., Steinhart, A. H., Daly, M. J., Podolsky, D. K., Louis, E., Hafler, D. A., Rioux, J. D., Quebec, I. B. D. G. C., and Consortium, N. I. G. (2007).** The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun*, 8(5), 387-397. doi: 10.1038/sj.gene.6364398
- De Robertis, M., Massi, E., Poeta, M. L., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., Signori, E., and Fazio, V. M. (2011).** The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog*, 10, 9. doi: 10.4103/1477-3163.78279
- Deguine, J., and Barton, G. M. (2014).** MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep*, 6, 97. doi: 10.12703/P6-97

- Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G., and Deretic, V. (2008).** Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J*, 27(7), 1110-1121. doi: 10.1038/emboj.2008.31
- Dinarello, C. A. (2011).** Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117(14), 3720-3732. doi: 10.1182/blood-2010-07-273417
- Dinarello, C. A., Simon, A., and van der Meer, J. W. (2012).** Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 11(8), 633-652. doi: 10.1038/nrd3800
- Dinarello, C. A., and van der Meer, J. W. (2013).** Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol*, 25(6), 469-484. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.008
- Doll, D., Keller, L., Maak, M., Boulesteix, A. L., Siewert, J. R., Holzmann, B., and Janssen, K. P. (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(5), 573-581. doi: 10.1007/s00384-010-0901-1
- Drexler, S. K., and Yazdi, A. S. (2013).** Complex roles of inflammasomes in carcinogenesis. *Cancer J*, 19(6), 468-472. doi: 10.1097/PPO.0000000000000004
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002).** Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3(11), 991-998. doi: 10.1038/ni1102-991
- Dvorak, H. F. (1986).** Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 315(26), 1650-1659. doi: 10.1056/NEJM198612253152606
- Eaden, J. A., Abrams, K. R., and Mayberry, J. F. (2001).** The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 48(4), 526-535. doi: 10.1136/gut.48.4.526
- Ehrlich, P. (1909).** Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd*, 5, 273-290.
- El-Tanani, M. K., Campbell, F. C., Kurisetty, V., Jin, D., McCann, M., and Rudland, P. S. (2006).** The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(6), 463-474. doi: 10.1016/j.cytogfr.2006.09.010
- el Marjou, F., Janssen, K. P., Chang, B. H., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., and Robine, S. (2004).** Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis*, 39(3), 186-193. doi: 10.1002/gene.20042
- Elinav, E., Nowarski, R., Thaiss, C. A., Hu, B., Jin, C., and Flavell, R. A. (2013).** Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*, 13(11), 759-771. doi: 10.1038/nrc3611
- Evans, C. M., and Jenner, R. G. (2013).** Transcription factor interplay in T helper cell differentiation. *Brief Funct Genomics*, 12(6), 499-511. doi: 10.1093/bfgp/elt025
- Falguieres, T., Maak, M., von Weyhern, C., Sarr, M., Sastre, X., Poupon, M. F., Robine, S., Johannes, L., and Janssen, K. P. (2008).** Human colorectal tumors and metastases express Gb3 and can be targeted by an intestinal pathogen-based delivery tool. *Mol Cancer Ther*, 7(8), 2498-2508. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0430
- Feagins, L. A., Souza, R. F., and Spechler, S. J. (2009).** Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 6(5), 297-305. doi: 10.1038/nrgastro.2009.44
- Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990).** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767. doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-I

- Fehlner, K. (2014).** *Die Aktivitätsregulation von ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) – Proteinen und ihre Bedeutung für die LFA-1 vermittelte T-Zellmigration.* (Dr. rer. nat.), Technische Universität München, München.
- Fertig, E. J., Lee, E., Pandey, N. B., and Popel, A. S. (2015).** Analysis of gene expression of secreted factors associated with breast cancer metastases in breast cancer subtypes. *Sci Rep*, 5, 12133. doi: 10.1038/srep12133
- Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., McMurray, D., Smith, D. E., Sims, J. E., Bird, T. A., and O'Neill, L. A. J. (2001).** Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, 413.
- Flanagan, D. J., Pheesse, T. J., Barker, N., Schwab, R. H., Amin, N., Malaterre, J., Stange, D. E., Nowell, C. J., Currie, S. A., Saw, J. T., Beuchert, E., Ramsay, R. G., Sansom, O. J., Ernst, M., Clevers, H., and Vincan, E. (2015).** Frizzled7 functions as a Wnt receptor in intestinal epithelial Lgr5(+) stem cells. *Stem Cell Reports*, 4(5), 759-767. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.03.003
- Fodde, R., Edelmann, W., Yang, K., van Leeuwen, C., Carlson, C., Renault, B., Breukel, C., Alt, E., Lipkin, M., Khan, P. M., and et al. (1994).** A targeted chain-termination mutation in the mouse Apc gene results in multiple intestinal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(19), 8969-8973.
- Frantz, A. L., Rogier, E. W., Weber, C. R., Shen, L., Cohen, D. A., Fenton, L. A., Bruno, M. E., and Kaetzel, C. S. (2012).** Targeted deletion of MyD88 in intestinal epithelial cells results in compromised antibacterial immunity associated with downregulation of polymeric immunoglobulin receptor, mucin-2, and antibacterial peptides. *Mucosal Immunol*, 5(5), 501-512. doi: 10.1038/mi.2012.23
- Fre, S., Vignjevic, D., Schoumacher, M., Duffy, S. L., Janssen, K.-P., Robine, S., and Louvard, D. (2008).** Epithelial Morphogenesis and Intestinal Cancer: New Insights in Signaling Mechanisms. In F. V. W. George & K. George (Eds.), *Advances in Cancer Research* (Vol. Volume 100, pp. 85-111): Academic Press.
- Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., and Galon, J. (2012).** The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 298-306. doi: 10.1038/nrc3245
- Friederichs, J., Rosenberg, R., Mages, J., Janssen, K. P., Maeckl, C., Nekarda, H., Holzmann, B., and Siewert, J. R. (2005).** Gene expression profiles of different clinical stages of colorectal carcinoma: toward a molecular genetic understanding of tumor progression. *Int J Colorectal Dis*, 20(5), 391-402. doi: 10.1007/s00384-004-0722-1
- Frosali, S., Pagliari, D., Gambassi, G., Landolfi, R., Pandolfi, F., and Cianci, R. (2015).** How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology. *J Immunol Res*, 2015, 489821. doi: 10.1155/2015/489821
- Fukata, M., Chen, A., Klepper, A., Krishnareddy, S., Vamadevan, A. S., Thomas, L. S., Xu, R., Inoue, H., Arditi, M., Dannenberg, A. J., and Abreu, M. T. (2006).** Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*, 131(3), 862-877. doi: 10.1053/j.gastro.2006.06.017
- Fukata, M., Michelsen, K. S., Eri, R., Thomas, L. S., Hu, B., Lukasek, K., Nast, C. C., Lechago, J., Xu, R., Naiki, Y., Soliman, A., Arditi, M., and Abreu, M. T. (2005).** Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288(5), G1055-1065. doi: 10.1152/ajpgi.00328.2004

- Fusunyan, R. D., Nanthakumar, N. N., Baldeon, M. E., and Walker, W. A. (2001).** Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: toll-like receptors on fetal enterocytes. *Pediatr Res*, 49(4), 589-593. doi: 10.1203/00006450-200105000-00006
- Gais, P., Reim, D., Jusek, G., Rossmann-Bloeck, T., Weighardt, H., Pfeffer, K., Altmayr, F., Janssen, K. P., and Holzmann, B. (2012).** Cutting edge: Divergent cell-specific functions of MyD88 for inflammatory responses and organ injury in septic peritonitis. *J Immunol*, 188(12), 5833-5837. doi: 10.4049/jimmunol.1200038
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoue, F., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., and Pages, F. (2006).** Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313(5795), 1960-1964. doi: 10.1126/science.1129139
- Galon, J., Mlecnik, B., Bindea, G., Angell, H. K., Berger, A., Lagorce, C., Lugli, A., Zlobec, I., Hartmann, A., Bifulco, C., Nagtegaal, I. D., Palmqvist, R., Masucci, G. V., Botti, G., Tatangelo, F., Delrio, P., Maio, M., Laghi, L., Grizzi, F., Asslaber, M., D'Arrigo, C., Vidal-Vanaclocha, F., Zavadova, E., Chouchane, L., Ohashi, P. S., Hafezi-Bakhtiari, S., Wouters, B. G., Roehrl, M., Nguyen, L., Kawakami, Y., Hazama, S., Okuno, K., Ogino, S., Gibbs, P., Waring, P., Sato, N., Torigoe, T., Itoh, K., Patel, P. S., Shukla, S. N., Wang, Y., Kopetz, S., Sinicrope, F. A., Scipicariu, V., Ascierto, P. A., Marincola, F. M., Fox, B. A., and Pages, F. (2014).** Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol*, 232(2), 199-209. doi: 10.1002/path.4287
- Gao, C., Kozłowska, A., Nechaev, S., Li, H., Zhang, Q., Hossain, D. M., Kowolik, C. M., Chu, P., Swiderski, P., Diamond, D. J., Pal, S. K., Raubitschek, A., and Kortylewski, M. (2013).** TLR9 signaling in the tumor microenvironment initiates cancer recurrence after radiotherapy. *Cancer Res*, 73(24), 7211-7221. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1314
- Geng, D., Kaczanowska, S., Tsai, A., Younger, K., Ochoa, A., Rapoport, A. P., Ostrand-Rosenberg, S., and Davila, E. (2015).** TLR5 Ligand-Secreting T Cells Reshape the Tumor Microenvironment and Enhance Antitumor Activity. *Cancer Res*, 75(10), 1959-1971. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2467
- Geng, D., Zheng, L., Srivastava, R., Velasco-Gonzalez, C., Riker, A., Markovic, S. N., and Davila, E. (2010).** Amplifying TLR-MyD88 signals within tumor-specific T cells enhances antitumor activity to suboptimal levels of weakly immunogenic tumor antigens. *Cancer Res*, 70(19), 7442-7454. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0247
- Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., and Madara, J. L. (2001).** Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*, 167(4), 1882-1885. doi: 10.4049/jimmunol.167.4.1882
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Helwig, U., Venturi, A., Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Poggioli, G., Miglioli, M., and Campieri, M. (2003).** Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 124(5), 1202-1209.
- Glavan, T. M., and Pavelic, J. (2014).** The exploitation of Toll-like receptor 3 signaling in cancer therapy. *Curr Pharm Des*, 20(42), 6555-6564. doi: 10.2174/1381612820666140826153347
- Goren, I., Allmann, N., Yogev, N., Schurmann, C., Linke, A., Holdener, M., Waisman, A., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2009).** A transgenic mouse model of inducible macrophage depletion: effects of diphtheria toxin-driven lysozyme M-specific cell

- lineage ablation on wound inflammatory, angiogenic, and contractive processes. *Am J Pathol*, 175(1), 132-147. doi: 10.2353/ajpath.2009.081002
- Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F., and Karin, M. (2004).** IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, 118(3), 285-296. doi: 10.1016/j.cell.2004.07.013
- Grivennikov, S. I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C. A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G. Y., Osterreicher, C. H., Hung, K. E., Datz, C., Feng, Y., Fearon, E. R., Oukka, M., Tessarollo, L., Coppola, V., Yarovinsky, F., Cheroutre, H., Eckmann, L., Trinchieri, G., and Karin, M. (2012).** Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature*, 491(7423), 254-258. doi: 10.1038/nature11465
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., and et al. (1991).** Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66(3), 589-600.
- Groom, J. R., and Luster, A. D. (2011).** CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*, 317(5), 620-631. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.12.017
- Gros, N. (2014).** *Immunomodulation der Tumorentstehung: die Rolle von Toll-like Rezeptoren und ihrem Adaptermolekül MyD88 bei der kolorektale Karzinogenese.* (Dr. med.), Technische Universität München, München.
- Grote, K., Schuett, H., Salguero, G., Grothusen, C., Jagielska, J., Drexler, H., Muhlradt, P. F., and Schieffer, B. (2010).** Toll-like receptor 2/6 stimulation promotes angiogenesis via GM-CSF as a potential strategy for immune defense and tissue regeneration. *Blood*, 115(12), 2543-2552. doi: 10.1182/blood-2009-05-224402
- Guani-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O., and Teran, L. M. (2010).** Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol*, 135(1), 1-11. doi: 10.1016/j.clim.2009.12.004
- Guo, Y., Xu, F., Lu, T., Duan, Z., and Zhang, Z. (2012).** Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev*, 38(7), 904-910. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.04.007
- Hagerling, C., Casbon, A. J., and Werb, Z. (2015).** Balancing the innate immune system in tumor development. *Trends Cell Biol*, 25(4), 214-220. doi: 10.1016/j.tcb.2014.11.001
- Hahn, U., Cho, A., Schuppan, D., Hahn, E. G., Merker, H. J., and Riecken, E. O. (1987).** Intestinal epithelial cells preferentially attach to a biomatrix derived from human intestinal mucosa. *Gut*, 28 Suppl(Suppl), 153-158.
- Hanahan, D., and Coussens, L. M. (2012).** Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000).** The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011).** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hart, I. R., and Fidler, I. J. (1980).** Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res*, 40(7), 2281-2287.
- Hiebert, P. R., and Granville, D. J. (2012).** Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol Med*, 18(12), 732-741. doi: 10.1016/j.molmed.2012.09.009
- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J., and Beutler, B. (2003).** Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*, 424(6950), 743-748. doi: 10.1038/nature01889

- Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., and Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291(5505), 881-884. doi: 10.1126/science.291.5505.881
- Hornef, M. W., Frisan, T., Vandewalle, A., Normark, S., and Richter-Dahlfors, A. (2002). Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med*, 195(5), 559-570.
- Janssen, K. P., Alberici, P., Fsihi, H., Gaspar, C., Breukel, C., Franken, P., Rosty, C., Abal, M., El Marjou, F., Smits, R., Louvard, D., Fodde, R., and Robine, S. (2006). APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology*, 131(4), 1096-1109. doi: 10.1053/j.gastro.2006.08.011
- Janssen, K. P., el-Marjou, F., Pinto, D., Sastre, X., Rouillard, D., Fouquet, C., Soussi, T., Louvard, D., and Robine, S. (2002). Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology*, 123(2), 492-504.
- Janssens, S., Burns, K., Tschopp, J., and Beyaert, R. (2002). Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol*, 12(6), 467-471.
- Jia, R. J., Cao, L., Zhang, L., Jing, W., Chen, R., Zhu, M. H., Guo, S. W., Wu, G. B., Fan, X. Y., Wang, H., Zhang, Y. Y., Zhou, X. Y., Zhao, J., and Guo, Y. J. (2014). Enhanced myeloid differentiation factor 88 promotes tumor metastasis via induction of epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis*, 5, e1103. doi: 10.1038/cddis.2014.71
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, 11(1), 115-122.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11(5), 373-384. doi: 10.1038/ni.1863
- Kelly, M. G., Alvero, A. B., Chen, R., Silasi, D. A., Abrahams, V. M., Chan, S., Visintin, I., Rutherford, T., and Mor, G. (2006). TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res*, 66(7), 3859-3868. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3948
- Keubler, L. M., Buettner, M., Hager, C., and Bleich, A. (2015). A Multihit Model: Colitis Lessons from the Interleukin-10-deficient Mouse. *Inflamm Bowel Dis*, 21(8), 1967-1975. doi: 10.1097/MIB.0000000000000468
- Keyse, S. M. (2008). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27(2), 253-261. doi: 10.1007/s10555-008-9123-1
- Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1-14. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x
- Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87(2), 159-170.
- Kistner, L. (2014). *Immunmodulation durch CXC-Chemokine beim kolorektalen Karzinom*. (Dr. rer. nat.), Technische Universität München, München.
- Koch-Institut, R., and Deutschland, G. d. e. K. i. (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010 [Press release]
- Kuhn, G. (2014). *Einfluss des TLR3/Trif-Signalwegs auf die Entstehung von Darmkrebs: Analyse eines Trif-defizienten Mausmodells*. (M.Sc.), Technische Universität München, München.

- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., and Muller, W. (1993).** Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75(2), 263-274. doi: 10.1016/0092-8674(93)80068-P
- Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011).** Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 30(1), 16-34. doi: 10.3109/08830185.2010.529976
- Lakatos, P. L., and Lakatos, L. (2008).** Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol*, 14(25), 3937-3947. doi: 10.3748/wjg.14.3937
- Laukoetter, M. G., Nava, P., Lee, W. Y., Severson, E. A., Capaldo, C. T., Babbitt, B. A., Williams, I. R., Koval, M., Peatman, E., Campbell, J. A., Dermody, T. S., Nusrat, A., and Parkos, C. A. (2007).** JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med*, 204(13), 3067-3076. doi: 10.1084/jem.20071416
- Lawrance, I., Maxwell, L., and Doe, W. (2001).** Inflammation Location, But Not Type, Determines the Increase in TGF- β 1 and IGF-1 Expression and Collagen Deposition in IBD Intestine. *Inflamm Bowel Dis*, 7(1), 16-26.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., and Gordon, S. (1992).** Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 48(2), 405-415.
- Lee, J., Mo, J. H., Katakura, K., Alkalay, I., Rucker, A. N., Liu, Y. T., Lee, H. K., Shen, C., Cojocaru, G., Shenouda, S., Kagnoff, M., Eckmann, L., Ben-Neriah, Y., and Raz, E. (2006).** Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol*, 8(12), 1327-1336. doi: 10.1038/ncb1500
- Lee, S. H. (2015).** Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res*, 13(1), 11-18. doi: 10.5217/ir.2015.13.1.11
- Lee, S. H., Hu, L. L., Gonzalez-Navajas, J., Seo, G. S., Shen, C., Brick, J., Herdman, S., Varki, N., Corr, M., Lee, J., and Raz, E. (2010).** ERK activation drives intestinal tumorigenesis in *Apc*(min/+) mice. *Nat Med*, 16(6), 665-670. doi: 10.1038/nm.2143
- Leggett, B., and Whitehall, V. (2010).** Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 138(6), 2088-2100. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.066
- Li, W. L., Xiao, M. S., Zhang, D. F., Yu, D., Yang, R. X., Li, X. Y., and Yao, Y. G. (2014).** Mutation and expression analysis of the IDH1, IDH2, DNMT3A, and MYD88 genes in colorectal cancer. *Gene*, 546(2), 263-270. doi: 10.1016/j.gene.2014.05.070
- Lizee, G., Overwijk, W. W., Radvanyi, L., Gao, J., Sharma, P., and Hwu, P. (2013).** Harnessing the power of the immune system to target cancer. *Annu Rev Med*, 64(1), 71-90. doi: 10.1146/annurev-med-112311-083918
- Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B., and Liebermann, D. A. (1990).** Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene*, 5(7), 1095-1097.
- Lu, B., Fang, Y., Xu, J., Wang, L., Xu, F., Xu, E., Huang, Q., and Lai, M. (2008).** Analysis of SOX9 expression in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*, 130(6), 897-904. doi: 10.1309/AJCPW1W8GJBQGCNI
- Macartney, K. K., Baumgart, D. C., Carding, S. R., Brubaker, J. O., and Offit, P. A. (2000).** Primary murine small intestinal epithelial cells, maintained in long-term culture, are susceptible to rotavirus infection. *J Virol*, 74(12), 5597-5603.
- Macpherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F. E., and Brandtzaeg, P. (2008).** The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol*, 1(1), 11-22. doi: 10.1038/mi.2007.6

- Marisa, L., de Reynies, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M. P., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, M. C., Schiappa, R., Guenot, D., Ayadi, M., Kirzin, S., Chazal, M., Flejou, J. F., Benchimol, D., Berger, A., Lagarde, A., Pencreach, E., Piard, F., Elias, D., Parc, Y., Olschwang, S., Milano, G., Laurent-Puig, P., and Boige, V. (2013). Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med*, 10(5), e1001453. doi: 10.1371/journal.pmed.1001453
- Marques, R., and Boneca, I. G. (2011). Expression and functional importance of innate immune receptors by intestinal epithelial cells. *Cell Mol Life Sci*, 68(22), 3661-3673. doi: 10.1007/s00018-011-0829-9
- McClure, R., and Massari, P. (2014). TLR-Dependent Human Mucosal Epithelial Cell Responses to Microbial Pathogens. *Front Immunol*, 5, 386. doi: 10.3389/fimmu.2014.00386
- McGeachy, M. J., Chen, Y., Tato, C. M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W. M., McClanahan, T. K., O'Shea, J. J., and Cua, D. J. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol*, 10(3), 314-324. doi: 10.1038/ni.1698
- Medvedev, A. E. (2013). Toll-like receptor polymorphisms, inflammatory and infectious diseases, allergies, and cancer. *J Interferon Cytokine Res*, 33(9), 467-484. doi: 10.1089/jir.2012.0140
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C. A. (1998). MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways. *Molecular Cell*, 2(2), 253-258. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80136-7
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., and Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15(2), 117-134. doi: 10.1007/s10911-010-9178-9
- Min, Y. W., and Rhee, P. L. (2015). The Role of Microbiota on the Gut Immunology. *Clin Ther*, 37(5), 968-975. doi: 10.1016/j.clinthera.2015.03.009
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destrée, O., and Clevers, H. (1996). XTcf-3 Transcription Factor Mediates b-Catenin-Induced Axis Formation in *Xenopus* Embryos. *Cell*, 86, 391-399.
- Monteiro, A. C., Sumagin, R., Rankin, C. R., Leoni, G., Mina, M. J., Reiter, D. M., Stehle, T., Dermody, T. S., Schaefer, S. A., Hall, R. A., Nusrat, A., and Parkos, C. A. (2013). JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function. *Mol Biol Cell*, 24(18), 2849-2860. doi: 10.1091/mbc.E13-06-0298
- Moran, A. P., Gupta, A., and Joshi, L. (2011). Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut*, 60(10), 1412-1425. doi: 10.1136/gut.2010.212704
- Moresco, E. V. Y., LaVine, D., and Beutler, B. (2013). Toll-like receptors. *Current Biology*, 21(13), R488-R493.
- Morrison, C. D., Parvani, J. G., and Schiemann, W. P. (2013). The relevance of the TGF-beta Paradox to EMT-MET programs. *Cancer Lett*, 341(1), 30-40. doi: 10.1016/j.canlet.2013.02.048
- Moser, A., Pitot, H., and Dove, W. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science*, 247(4940), 322-324. doi: 10.1126/science.2296722
- Moser, A. R., Mattes, E. M., Dove, W. F., Lindstrom, M. J., Haag, J. D., and Gould, M. N. (1993). ApcMin, a mutation in the murine Apc gene, predisposes to mammary carcinomas and focal alveolar hyperplasias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(19), 8977-8981.

- Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R., and Johansson, C. C. (2010).** Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res*, 107, 57-117. doi: 10.1016/S0065-230X(10)07003-X
- Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J. D., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J.-F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M. A., Rifkin, D. B., and Sheppard, D. (1999).** A Mechanism for Regulating Pulmonary Inflammation and Fibrosis: The Integrin $\alpha\beta6$ Binds and Activates Latent TGF $\beta1$. *Cell*, 96(3), 319-328. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80545-0
- Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2011).** Janeway's Immunobiology (8th edition ed., pp. 868): Garland Science, Taylor & Francis Ltd.
- Nagata, S. (1997).** Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3), 355-365.
- Neal, M. D., Sodhi, C. P., Jia, H., Dyer, M., Egan, C. E., Yazji, I., Good, M., Afrazi, A., Marino, R., Slagle, D., Ma, C., Branca, M. F., Prindle, T., Jr., Grant, Z., Ozolek, J., and Hackam, D. J. (2012).** Toll-like receptor 4 is expressed on intestinal stem cells and regulates their proliferation and apoptosis via the p53 up-regulated modulator of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(44), 37296-37308. doi: 10.1074/jbc.M112.375881
- Nelson, B. H. (2008).** The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev*, 222, 101-116. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00614.x
- Nenci, A., Becker, C., Wullaert, A., Gareus, R., van Loo, G., Danese, S., Huth, M., Nikolaev, A., Neufert, C., Madison, B., Gumucio, D., Neurath, M. F., and Pasparakis, M. (2007).** Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*, 446(7135), 557-561. doi: 10.1038/nature05698
- Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., and Hedge, P. (1991).** Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253(5020), 665-669.
- Nomi, N., Kodama, S., and Suzuki, M. (2010).** Toll-like receptor 3 signaling induces apoptosis in human head and neck cancer via survivin associated pathway. *Oncol Rep*, 24(1), 225-231. doi: 10.3892/or_00000850
- O'Neill, L. A., Golenbock, D., and Bowie, A. G. (2013).** The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(6), 453-460. doi: 10.1038/nri3446
- O'Neill, L. A. J. (2008).** Toll-like receptors in cancer. *Oncogene*, 27(2), 158-160.
- Ochs, C. (2012).** *Immunmodulation der Tumorentstehung im Darmtrakt: Chemokin-abhängige Rekrutierung von T-Lymphozyten.* (M.Sc.), Technische Universität München, München.
- Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M., and Seya, T. (2003).** TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 49751-49762. doi: 10.1074/jbc.M305820200
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., and Hymowitz, S. G. (2011).** Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*, 29, 71-109. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101312
- Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M. C., Tartour, E., Sautes-Fridman, C., and Fridman, W. H. (2010).** Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, 29(8), 1093-1102. doi: 10.1038/onc.2009.416
- Paget, S. (1889).** The Distribution of Secondary Growths in Cancer of the Breast. *The Lancet*, 133(3421), 571-573. doi: 10.1016/s0140-6736(00)49915-0
- Pahl, H. L. (1999).** Activators and target genes of Rel/NF-kB transcription factors. *Oncogene*, 18, 6853-6866.

- Pakala, S. B., Reddy, S. D., Bui-Nguyen, T. M., Rangparia, S. S., Bommana, A., and Kumar, R. (2010).** MTA1 coregulator regulates LPS response via MyD88-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 32787-32792. doi: 10.1074/jbc.M110.151340
- Papageorgis, P. (2015).** TGFbeta Signaling in Tumor Initiation, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, and Metastasis. *J Oncol*, 2015, 587193. doi: 10.1155/2015/587193
- Patel, S. A., and Gooderham, N. J. (2015).** IL6 mediates immune and colorectal cancer cell crosstalk via miR-21 and miR-29b. *Mol Cancer Res*. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0147
- Peek, E. M., Song, W., Zhang, H., Huang, J., and Chin, A. I. (2015).** Loss of MyD88 leads to more aggressive TRAMP prostate cancer and influences tumor infiltrating lymphocytes. *Prostate*, 75(5), 463-473. doi: 10.1002/pros.22932
- Peter, M. E., Hadji, A., Murmann, A. E., Brockway, S., Putzbach, W., Pattanayak, A., and Ceppi, P. (2015).** The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death Differ*, 22(4), 549-559. doi: 10.1038/cdd.2015.3
- Pevsner-Fischer, M., Morad, V., Cohen-Sfady, M., Rousso-Noori, L., Zanin-Zhorov, A., Cohen, S., Cohen, I. R., and Zipori, D. (2007).** Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*, 109(4), 1422-1432. doi: 10.1182/blood-2006-06-028704
- Pierik, M., Joossens, S., Van Steen, K., Van Schuerbeek, N., Vlietinck, R., Rutgeerts, P., and Vermeire, S. (2006).** Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 12(1), 1-8. doi: 10.1097/01.MIB.0000195389.11645.ab
- Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., and Ben-Neriah, Y. (2004).** NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 431(7007), 461-466. doi: 10.1038/nature02924
- Podolsky, D. K., Gerken, G., Eysing, A., and Cario, E. (2009).** Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency. *Gastroenterology*, 137(1), 209-220. doi: 10.1053/j.gastro.2009.03.007
- Polytarchou, C., Hommes, D. W., Palumbo, T., Hatzia Apostolou, M., Koutsoumpa, M., Koukos, G., van der Meulen-de Jong, A. E., Oikonomopoulos, A., van Deen, W. K., Vorvis, C., Serebrennikova, O. B., Birli, E., Choi, J., Chang, L., Anton, P. A., Tsihli, P. N., Pothoulakis, C., Verspaget, H. W., and Iliopoulos, D. (2015).** MicroRNA214 Is Associated With Progression of Ulcerative Colitis, and Inhibition Reduces Development of Colitis and Colitis-Associated Cancer in Mice. *Gastroenterology*. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.057
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1992).** APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 359(6392), 235-237. doi: 10.1038/359235a0
- Pradere, J. P., Dapito, D. H., and Schwabe, R. F. (2014).** The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene*, 33(27), 3485-3495. doi: 10.1038/onc.2013.302
- Pull, S. L., Doherty, J. M., Mills, J. C., Gordon, J. I., and Stappenbeck, T. S. (2005).** Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(1), 99-104. doi: 10.1073/pnas.0405979102
- Radtke, F., and Clevers, H. (2005).** Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*, 307(5717), 1904-1909. doi: 10.1126/science.1104815

- Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2007).** Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science*, 317(5834), 124-127. doi: 10.1126/science.1140488
- Rakoff-Nahoum, S., and Medzhitov, R. (2009).** Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*, 9(1), 57-63. doi: 10.1038/nrc2541
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., and Medzhitov, R. (2004).** Recognition of Commensal Microflora by Toll-Like Receptors Is Required for Intestinal Homeostasis. *Cell*, 118, 229-241.
- Rhee, S. H., Im, E., and Pothoulakis, C. (2008).** Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology*, 135(2), 518-528. doi: 10.1053/j.gastro.2008.04.022
- Rhee, S. H., Im, E., Riegler, M., Kokkotou, E., O'Brien, M., and Pothoulakis, C. (2005).** Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(38), 13610-13615. doi: 10.1073/pnas.0502174102
- Rohde, F. (2008).** *Die Rolle von onkogenem Beta-Catenin bei der Entstehung von Kolorektalkarzinomen: Analyse genetisch definierter Mausmodelle.* (Dr. rer. nat.), Technische Universität München, München.
- Rohde, F., Rimkus, C., Friederichs, J., Rosenberg, R., Marthen, C., Doll, D., Holzmann, B., Siewert, J. R., and Janssen, K. P. (2007).** Expression of osteopontin, a target gene of de-regulated Wnt signaling, predicts survival in colon cancer. *Int J Cancer*, 121(8), 1717-1723. doi: 10.1002/ijc.22868
- Rokavec, M., Oner, M. G., Li, H., Jackstadt, R., Jiang, L., Lodygin, D., Kaller, M., Horst, D., Ziegler, P. K., Schwitalla, S., Slotta-Huspenina, J., Bader, F. G., Greten, F. R., and Hermeking, H. (2014).** IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J Clin Invest*, 124(4), 1853-1867. doi: 10.1172/JCI73531
- Rubartelli, A., and Lotze, M. T. (2007).** Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol*, 28(10), 429-436. doi: 10.1016/j.it.2007.08.004
- Salcedo, R., Worschech, A., Cardone, M., Jones, Y., Gyulai, Z., Dai, R. M., Wang, E., Ma, W., Haines, D., O'Huigin, C., Marincola, F. M., and Trinchieri, G. (2010).** MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med*, 207(8), 1625-1636. doi: 10.1084/jem.20100199
- Saleh, M., and Trinchieri, G. (2011).** Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat Rev Immunol*, 11(1), 9-20. doi: 10.1038/nri2891
- Santaolalla, R., Sussman, D. A., Ruiz, J. R., Davies, J. M., Pastorini, C., Espana, C. L., Sotolongo, J., Burlingame, O., Bejarano, P. A., Philip, S., Ahmed, M. M., Ko, J., Dirisina, R., Barrett, T. A., Shang, L., Lira, S. A., Fukata, M., and Abreu, M. T. (2013).** TLR4 activates the beta-catenin pathway to cause intestinal neoplasia. *PLoS ONE*, 8(5), e63298. doi: 10.1371/journal.pone.0063298
- Saraiva, M., and O'Garra, A. (2010).** The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*, 10(3), 170-181. doi: 10.1038/nri2711
- Sato, Y., Goto, Y., Narita, N., and Hoon, D. S. (2009).** Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*, 2 Suppl 1(Suppl 1), 205-214. doi: 10.1007/s12307-009-0022-y
- Sawa, Y., Tsuruga, E., Iwasawa, K., Ishikawa, H., and Yoshida, S. (2008a).** Leukocyte adhesion molecule and chemokine production through lipoteichoic acid recognition by toll-like

- receptor 2 in cultured human lymphatic endothelium. *Cell Tissue Res*, 333(2), 237-252. doi: 10.1007/s00441-008-0625-5
- Sawa, Y., Ueki, T., Hata, M., Iwasawa, K., Tsuruga, E., Kojima, H., Ishikawa, H., and Yoshida, S. (2008b).** LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human lymphatic endothelium. *J Histochem Cytochem*, 56(2), 97-109. doi: 10.1369/jhc.7A7299.2007
- Schafer, M., and Werner, S. (2008).** Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(8), 628-638. doi: 10.1038/nrm2455
- Schwerk, J., Koster, M., Hauser, H., Rohde, M., Fulde, M., Hornef, M. W., and May, T. (2013).** Generation of mouse small intestinal epithelial cell lines that allow the analysis of specific innate immune functions. *PLoS ONE*, 8(8), e72700. doi: 10.1371/journal.pone.0072700
- Shang, L., Fukata, M., Thirunarayanan, N., Martin, A. P., Arnaboldi, P., Maussang, D., Berin, C., Unkeless, J. C., Mayer, L., Abreu, M. T., and Lira, S. A. (2008).** Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology*, 135(2), 529-538. doi: 10.1053/j.gastro.2008.04.020
- Sivick, K. E., Arpaia, N., Reiner, G. L., Lee, B. L., Russell, B. R., and Barton, G. M. (2014).** Toll-like receptor-deficient mice reveal how innate immune signaling influences Salmonella virulence strategies. *Cell Host Microbe*, 15(2), 203-213. doi: 10.1016/j.chom.2014.01.013
- Smits, R., van der Houven van Oordt, W., Luz, A., Zurcher, C., Jagmohan-Changur, S., Breukel, C., Khan, P. M., and Fodde, R. (1998).** Apc1638N: a mouse model for familial adenomatous polyposis-associated desmoid tumors and cutaneous cysts. *Gastroenterology*, 114(2), 275-283.
- Spokony, R. F., Aoki, Y., Saint-Germain, N., Magner-Fink, E., and Saint-Jeannet, J.-P. (2002).** The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in *Xenopus*. *Development*, 129(2), 421-432.
- Stadnicki, A., Machnik, G., Klimacka-Nawrot, E., Wolanska-Karut, A., and Labuzek, K. (2009).** Transforming growth factor-beta1 and its receptors in patients with ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol*, 9(6), 761-766. doi: 10.1016/j.intimp.2009.02.014
- Stritesky, G. L., Yeh, N., and Kaplan, M. H. (2008).** IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol*, 181(9), 5948-5955.
- Su, L. K., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1993).** Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*, 262(5140), 1734-1737.
- Sutherland, L., Singleton, J., Sessions, J., Hanauer, S., Krawitt, E., Rankin, G., Summers, R., Mekhjian, H., Greenberger, N., Kelly, M., and et al. (1991).** Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut*, 32(9), 1071-1075.
- Szajnik, M., Szczepanski, M. J., Czystowska, M., Elishaev, E., Mandapathil, M., Nowak-Markwitz, E., Spaczynski, M., and Whiteside, T. L. (2009).** TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene*, 28(49), 4353-4363. doi: 10.1038/onc.2009.289
- Tahara, T., Arisawa, T., Wang, F., Shibata, T., Nakamura, M., Sakata, M., Hirata, I., and Nakano, H. (2007).** Toll-like receptor 2 -196 to 174del polymorphism influences the susceptibility of Japanese people to gastric cancer. *Cancer Sci*, 98(11), 1790-1794. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00590.x
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2002).** MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*, 270, 155-167.

- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J. C. (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, 58(23), 5315-5320.
- Tarantino, G., Savastano, S., Capone, D., and Colao, A. (2011). Spleen: A new role for an old player? *World J Gastroenterol*, 17(33), 3776-3784. doi: 10.3748/wjg.v17.i33.3776
- Teng, M. W., Swann, J. B., Koebel, C. M., Schreiber, R. D., and Smyth, M. J. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol*, 84(4), 988-993. doi: 10.1189/jlb.1107774
- Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101-2114 e2105. doi: 10.1053/j.gastro.2010.01.058
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398(6726), 422-426. doi: 10.1038/18884
- Turjanski, A. G., Vaque, J. P., and Gutkind, J. S. (2007). MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*, 26(22), 3240-3253. doi: 10.1038/sj.onc.1210415
- Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B. G., Jung, Y. J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K. J., and Akira, S. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol*, 9(7), 769-776. doi: 10.1038/ni.1622
- Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., and Akira, S. (2006). Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol*, 7(8), 868-874. doi: 10.1038/ni1362
- Vaishnavaa, S., Behrendta, C. L., Ismaila, A. S., Eckmann, L., and Hooper, L. V. (2008). Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(52), 20858-20863. doi: 10.1073/pnas.0808723105
- van Beijnum, J. R., Buurman, W. A., and Griffioen, A. W. (2008). Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis*, 11(1), 91-99. doi: 10.1007/s10456-008-9093-5
- van der Flier, L. G., van Gijn, M. E., Hatzis, P., Kujala, P., Haegebarth, A., Stange, D. E., Begthel, H., van den Born, M., Guryev, V., Oving, I., van Es, J. H., Barker, N., Peters, P. J., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2009). Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate. *Cell*, 136(5), 903-912. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.031
- Van der Sluis, M., De Koning, B. A., De Bruijn, A. C., Velcich, A., Meijerink, J. P., Van Goudoever, J. B., Buller, H. A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I. B., and Einerhand, A. W. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 131(1), 117-129. doi: 10.1053/j.gastro.2006.04.020
- Villarejo, A., Cortes-Cabrera, A., Molina-Ortiz, P., Portillo, F., and Cano, A. (2014). Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, 289(2), 930-941. doi: 10.1074/jbc.M113.528026
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., and Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during

- colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319(9), 525-532. doi: 10.1056/NEJM198809013190901
- Wang, E. L., Qian, Z. R., Nakasono, M., Tanahashi, T., Yoshimoto, K., Bando, Y., Kudo, E., Shimada, M., and Sano, T. (2010).** High expression of Toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88 signals correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 102(5), 908-915. doi: 10.1038/sj.bjc.6605558
- Weber, G. F., Gaertner, F. C., Erl, W., Janssen, K. P., Blechert, B., Holzmann, B., Weighardt, H., and Essler, M. (2006).** IL-22-mediated tumor growth reduction correlates with inhibition of ERK1/2 and AKT phosphorylation and induction of cell cycle arrest in the G2-M phase. *J Immunol*, 177(11), 8266-8272. doi: 10.4049/jimmunol.177.11.8266
- Weighardt, H., Mages, J., Jusek, G., Kaiser-Moore, S., Lang, R., and Holzmann, B. (2006).** Organ-specific role of MyD88 for gene regulation during polymicrobial peritonitis. *Infect Immun*, 74(6), 3618-3632. doi: 10.1128/IAI.01681-05
- Willert, K., and Nusse, R. (1998).** Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 8(1), 95-102. doi: 10.1016/s0959-437x(98)80068-3
- Wilson, J. E., Petrucelli, A. S., Chen, L., Koblansky, A. A., Truax, A. D., Oyama, Y., Rogers, A. B., Brickey, W. J., Wang, Y., Schneider, M., Muhlbauer, M., Chou, W. C., Barker, B. R., Jobin, C., Allbritton, N. L., Ramsden, D. A., Davis, B. K., and Ting, J. P. (2015).** Inflammasome-independent role of AIM2 in suppressing colon tumorigenesis via DNA-PK and Akt. *Nat Med*, 21(8), 906-913. doi: 10.1038/nm.3908
- Xavier, R. J., and Podolsky, D. K. (2007).** Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 448(7152), 427-434. doi: 10.1038/nature06005
- Xie, L., Jiang, F. C., Zhang, L. M., He, W. T., Liu, J. H., Li, M. Q., Zhang, X., Xing, S., Guo, H., and Zhou, P. (2016).** Targeting of MyD88 Homodimerization by Novel Synthetic Inhibitor TJ-M2010-5 in Preventing Colitis-Associated Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 108(4), djv364. doi: 10.1093/jnci/djv364
- Xu, H., Ding, Q., and Jiang, H. W. (2014).** Genetic polymorphism of interleukin-1A (IL-1A), IL-1B, and IL-1 receptor antagonist (IL-1RN) and prostate cancer risk. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(20), 8741-8747.
- Xu, H., Wu, Q., Dang, S., Jin, M., Xu, J., Cheng, Y., Pan, M., Wu, Y., Zhang, C., and Zhang, Y. (2011).** Alteration of CXCR7 expression mediated by TLR4 promotes tumor cell proliferation and migration in human colorectal carcinoma. *PLoS ONE*, 6(12), e27399. doi: 10.1371/journal.pone.0027399
- Xu, J., Yin, Z., Cao, S., Gao, W., Liu, L., Yin, Y., Liu, P., and Shu, Y. (2013).** Systematic review and meta-analysis on the association between IL-1B polymorphisms and cancer risk. *PLoS ONE*, 8(5), e63654. doi: 10.1371/journal.pone.0063654
- Yamada, K., Sato, K., Morishita, S., Kaminogawa, S., and Totsuka, M. (2009).** Establishment of a primary culture method for mouse intestinal epithelial cells by organ culture of fetal small intestine. *Biosci Biotechnol Biochem*, 73(8), 1849-1855. doi: 10.1271/bbb.90246
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. (2003).** Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301(5633), 640-643. doi: 10.1126/science.1087262
- Yang, K., Popova, N. V., Yang, W. C., Lozonschi, I., Tadesse, S., Kent, S., Bancroft, L., Matisse, I., Cormier, R. T., Scherer, S. J., Edelmann, W., Lipkin, M., Augenlicht, L., and Velcich, A. (2008).** Interaction of Muc2 and Apc on Wnt signaling and in intestinal

- tumorigenesis: potential role of chronic inflammation. *Cancer Res*, 68(18), 7313-7322. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0598
- Yao, X., Huang, J., Zhong, H., Shen, N., Faggioni, R., Fung, M., and Yao, Y. (2014).** Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther*, 141(2), 125-139. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.09.004
- Yoon, S., and Seger, R. (2006).** The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, 24(1), 21-44. doi: 10.1080/02699050500284218
- Zaph, C., Troy, A. E., Taylor, B. C., Berman-Booty, L. D., Guild, K. J., Du, Y., Yost, E. A., Gruber, A. D., May, M. J., Greten, F. R., Eckmann, L., Karin, M., and Artis, D. (2007).** Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. *Nature*, 446(7135), 552-556. doi: 10.1038/nature05590
- Zeestraten, E. C., Maak, M., Shibayama, M., Schuster, T., Nitsche, U., Matsushima, T., Nakayama, S., Gohda, K., Friess, H., van de Velde, C. J., Ishihara, H., Rosenberg, R., Kuppen, P. J., and Janssen, K. P. (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(1), 133-140. doi: 10.1038/bjc.2011.504
- Zhu, R., Yang, Y., Tian, Y., Bai, J., Zhang, X., Li, X., Peng, Z., He, Y., Chen, L., Pan, Q., Fang, D., Chen, W., Qian, C., Bian, X., and Wang, R. (2012).** Ascl2 knockdown results in tumor growth arrest by miRNA-302b-related inhibition of colon cancer progenitor cells. *PLoS ONE*, 7(2), e32170. doi: 10.1371/journal.pone.0032170
- Zitvogel, L., Kepp, O., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2012).** Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat Immunol*, 13(4), 343-351. doi: 10.1038/ni.2224

9 Anhang

9.1 Ergänzende Abbildung

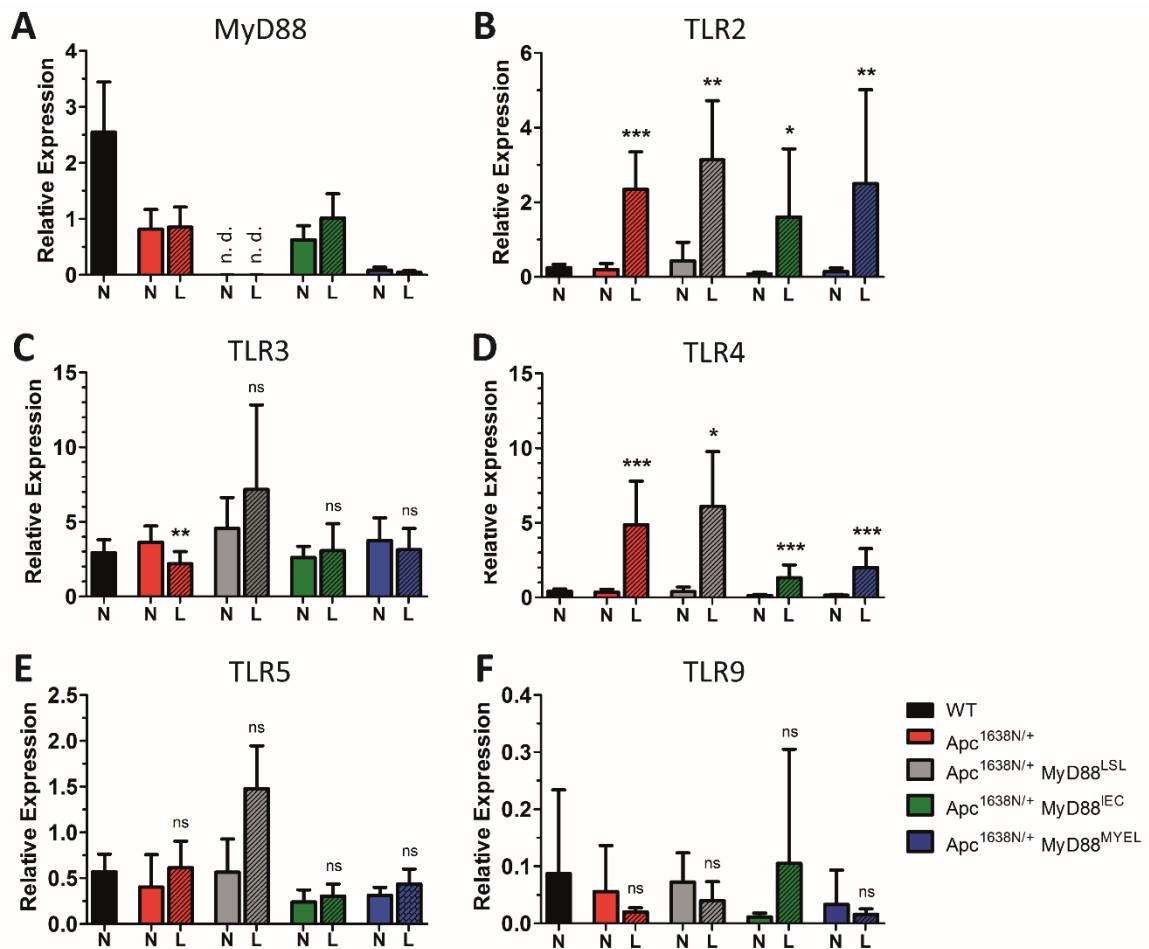


Abb. 40: Expression von Myd88 und verschiedener TLRs im gesunden Darmgewebe (N) und Läsionen (L) in Abhängigkeit von MyD88. Die Quantifizierung von MyD88- und TLR-Transkripten erfolgte mit quantitativer RT-PCR. Transkripte wurden aus Gesamt-Darmgewebe isoliert. Als Referenzgen wurde TF2D amplifiziert. Die Expressionsdaten wurden in Relation zu WT-Milz gesetzt ($n \geq 3$ pro Gruppe, Mittelwerte \pm SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$; ns = nicht signifikant; n.d. = nicht detektiert).

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung der Adenom-Karzinom-Sequenz nach Fearon und Vogelstein.	3
Abb. 2: Vereinfachte Darstellung zur Theorie der Überwachung von Tumoren durch das Immunsystem.	6
Abb. 3: Übersicht über die zelluläre Lokalisation der TLRs und ihrer Liganden in Säugetieren.	9
Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung zu den TLR-Signalwegen, die durch die intrazellulären Adapterproteine MyD88 (A) bzw. TRIF (B) induziert werden.	12
Abb. 5: Komponenten der intestinalen Barriere.	14
Abb. 6: Polarisierter Expression von TLRs im Darmepithel.	15
Abb. 7: Arbeitshypothese – vereinfachte schematische Darstellung zur Rolle von TLRs/MyD88 in intestinalen Epithelzellen, Tumorzellen und Makrophagen.	21
Abb. 8: Strategie der „switch-on“ Mutagenese von <i>Myd88</i>	23
Abb. 9: Schematisch dargestellte Vorgehensweise zur Generierung von global <i>Myd88</i> -defizienten Tieren, bzw. zur zelltypspezifischen <i>Myd88</i> -Expression im <i>Apc</i> ^{1638N/+} -Tumormodell.	24
Abb. 10: Generierung eines Mausmodells zur zelltypspezifischen <i>Myd88</i> -Expression.	52
Abb. 11: <i>Tnf</i> -Expression in isolierten intestinalen Epithelzellen nach TLR2-Stimulation.	55
Abb. 12: Wiederherstellung MyD88-abhängiger Signalwege in Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen.	57
Abb. 13: Expression von <i>Myd88</i> und verschiedenen TLRs in Abhängigkeit vom Zelltyp.	59
Abb. 14: Einfluss von MyD88 auf die Dünndarm-Histologie.	61
Abb. 15: Schematische Darstellung zur Generierung von Mauslinien mit globaler <i>Myd88</i> -Defizienz (<i>MyD88</i> ^{LSL}) bzw. zelltypspezifischer Re-Expression von <i>Myd88</i> (<i>MyD88</i> ^{IEC} und <i>MyD88</i> ^{MYEL}) im Tumormodell <i>Apc</i> ^{1638N/+}	62
Abb. 16: Körpergewicht und Milzgewicht der Versuchstiere.	64
Abb. 17: Anzahl von Läsionen im Darmtrakt der Mäuse.	68
Abb. 18: Größe der Läsionen.	69
Abb. 19: Hämatoxylin-Eosin-Färbungen von repräsentativen Läsionen aus den vier Mausmodellen <i>Apc</i> ^{1638N/+} , <i>Apc</i> ^{1638N/+} <i>MyD88</i> ^{LSL} , <i>Apc</i> ^{1638N/+} <i>MyD88</i> ^{IEC} und <i>Apc</i> ^{1638N/+} <i>MyD88</i> ^{MYEL}	72
Abb. 20: Vereinfachte schematische Darstellung zu den möglichen, bislang publizierten Funktionen von MyD88 in gesundem Darmepithel, die in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollten.	74
Abb. 21: ERK1/2-Phosphorylierung in Abhängigkeit der <i>Myd88</i> -Expression im prämaligen Darmgewebe.	76
Abb. 22: Proliferation intestinaler Epithelzellen im prämaligen Darmepithel in Abhängigkeit von MyD88.	78
Abb. 23: Expression von <i>Birc5</i> (Survivin) im gesunden Darmgewebe.	80
Abb. 24: Expression verschiedener Transkripte im Darmgewebe, die im Zusammenhang mit der intestinalen Barrierefunktion stehen und von denen eine Abhängigkeit von der <i>Myd88</i> -Expression beschrieben wurde.	81
Abb. 25: Einfluss von MyD88 auf den WNT-Signalweg.	83
Abb. 26: MyD88-Abhängigkeit der Expression von Genen, die die Proliferation und Apoptose von Tumorzellen beeinflussen im Normal- (N) und Tumorgewebe (L).	85
Abb. 27: Expression von Genen, die die intestinale Barrierefunktion beeinflussen, in Abhängigkeit von MyD88 in Normal- (N) und Tumorgewebe (L).	87
Abb. 28: Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-22 (<i>Il22</i>), IL-23 (<i>Il23</i>) und TNF α (<i>Tnf</i>) im Normal- (N) und Tumorgewebe (L) in Abhängigkeit der <i>Myd88</i> -Expression.	89

Abb. 29: Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1beta (<i>Il1b</i>) und IL-6 (<i>Il6</i>) im Normal- (N) und Tumorgewebe (L) in Abhängigkeit der <i>Myd88</i> -Expression.	90
Abb. 30: Expression von <i>Il10</i> (IL-10) im Normal- (N) und Tumorgewebe (L) in Abhängigkeit der <i>Myd88</i> -Expression.	91
Abb. 31: Untersuchungen zur Anwesenheit von Makrophagen im gesunden Darm und in Läsionen mittels qPCR und Immuncytochemie.	94
Abb. 32: Anwesenheit intratumoraler T-Zellen in Abhängigkeit von MyD88.	97
Abb. 33: Expression von Gata3 (A) und Foxp3 (B) in normaler Darmmukosa (N) und in Darmläsionen (L) in Abhängigkeit der <i>Myd88</i> -Expression.	97
Abb. 34: Expression von <i>Tbx21</i> (A), <i>Rorc</i> (B), <i>Gzmb</i> (C) und <i>Il23r</i> (D) im gesunden Darmgewebe (N) und in Läsionen (L).	99
Abb. 35: Einfluss von MyD88 auf die Expression von <i>Snai1</i> (Snail) und <i>Snai2</i> (Slug) und die Ausprägung von Slug in Läsionen.	102
Abb. 36: Die Rolle von MyD88 bei der Expression verschiedener Stammzellfaktoren.	103
Abb. 37: Schematische Darstellung zur Rolle von MyD88 im physiologischen bzw. prämaligen Darmepithel, und dessen potentielle Funktion während der Tumorinitiation.	118
Abb. 38: Zelltypspezifische Funktionen von MyD88 in Tumorzellen und Tumor-infiltrierenden Makrophagen.	136
Abb. 39: MyD88 fördert die Tumorgenese im Darmtrakt in zwei geschwindigkeitsbestimmenden Schritten: Tumorinitiation und Tumorprogression.	137
Abb. 40: Expression von <i>Myd88</i> und verschiedener TLRs im gesunden Darmgewebe (N) und Läsionen (L) in Abhängigkeit von MyD88.	162

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des konditionierten Mediums für Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen.	30
Tabelle 2: Zusammensetzung des Mediums für isolierte murine intestinale Epithelzellen.	30
Tabelle 3: In der vorliegenden Arbeit verwendete Primärantikörper, deren Bezugsquelle mit Bestell- bzw. Katalognummer sowie ihre Anwendung und die eingesetzte bzw. verwendete Endkonzentration.	34
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete konjugierte Sekundärantikörper, deren Bezugsquelle mit Bestell- bzw. Katalognummer sowie ihre Anwendung und die eingesetzte Endkonzentration.	34
Tabelle 5: Die in dieser Arbeit verwendeten Primer zur Genotypisierung der Versuchstiere.	35
Tabelle 6: Verwendete Primer für die quantitative RT-PCR basierend auf dem UPL real-time qPCR-System von Roche, Mannheim.	37
Tabelle 7: Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausmodellen, deren genetischer Hintergrund und die jeweilige Bezugsquelle.	37
Tabelle 8: Menge der mRNA, oligo-dT-Primer und Random-Hexamer-Primer für die reverse Transkription.	42
Tabelle 9: Menge an RT-Puffer, dNTPs, RNase-Inhibitor und reverser Transkriptase für einen Ansatz.	42
Tabelle 10: PCR-Ansatz für Genotypisierungen.	43
Tabelle 11: Zusammensetzung für einen Ansatz für die quantitative RT-PCR.	44
Tabelle 12: Programm für die quantitative RT-PCR im LightCycler 480 II.	45
Tabelle 13: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele.	46
Tabelle 14: Übersicht über die Tumorinzidenz im Darmtrakt der Versuchstiere in Abhängigkeit der <i>Myd88</i> -Expression.	66

Tabelle 15: Zusammenfassung der histo-pathologischen Befunde der Läsionen. 70
Tabelle 16: Zusammenfassendes Expressionsprofil verschiedener T-Zell-Marker in Tumoren. 129

Publikationen

Artikel

Holtorf A., Conrad A., Holzmann B., Janssen K.-P. *MyD88 signaling in both intestinal epithelial and myeloid cells promotes intestinal tumor progression via induction of EMT and stemness.* submitted (Manuskript-ID NMED-A81524)

Geyer P. E., Maak M., Nitsche U., Perl M., Novotny A., Slotta-Huspenina J., Dransart E., Holtorf A., Johannes L., Janssen K.-P. *Gastric adenocarcinomas express the glycosphingolipid Gb3/CD77: Targeting of gastric cancer cells with Shiga toxin B-subunit.* Mol Cancer Ther (2016) pii: molcanther.0633.2015. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0633.

Publizierte Kongressbeiträge

Holtorf A., Conrad A., Holzmann B., Janssen K.-P. *Cell-type specific functions for the immune adapter protein MyD88 in colorectal carcinogenesis.* Eur J Cancer 50, Suppl. 5 (2014) S23–S242.

Holtorf A., Holzmann B., Janssen K.-P. *A New Genetic Mouse Model to Identify the Role of the Immune Adapter Protein MyD88 in Colorectal Cancer.* Eur J Cancer 48, Suppl. 5 (2012) S25–S288.

Übersichtsartikel

Holtorf A., Kistner L., Nitsche U., Späth C., Maak M., Janssen K.-P. *Prognoseabschätzung und Einfluss des Immunsystems auf die Tumorentstehung.* Journal Onkologie (2012)7: 184-188.

Vortrag

Holtorf A., Janssen K.-P. *A genetic mouse model to identify the tissue-specific role for the immune adapter protein MyD88 in colon cancer.* 17th international AEK Cancer Congress, 20.-22.03.2013, Heidelberg, Deutschland.

Posterpräsentationen

Holtorf A., Kuhn G., Conrad A., Slotta-Huspenina J., Holzmann B., Janssen K.-P. *Toll-like receptors have opposing roles in colorectal cancer development.* 18th international AEK Cancer Congress, 18.-20.03.2015, Heidelberg, Deutschland. (ausgezeichnet als beste Posterpräsentation)

Holtorf A., Conrad A., Holzmann B., Janssen K.-P. *Cell-type specific functions for the immune adapter protein MyD88 in colorectal carcinogenesis.* 23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 05.-08.07.2014, München, Deutschland.

Holtorf A., Holzmann B., Janssen K.-P. *A genetic mouse model to identify the role of the immune adapter protein MyD88 in colorectal cancer.* 1st Immunotherapy of Cancer Conference, 12.-14.03.2014, München, Deutschland.

Holtorf A., Holzmann B., Janssen K.-P. *A New Genetic Mouse Model to Identify the Role of the Immune Adapter Protein MyD88 in Colorectal Cancer.* 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 07.-10.07.2012, Barcelona, Spanien.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich in jeglicher Art und Weise bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Der größte Dank geht zweifelsfrei an Herrn Prof. Klaus-Peter Janssen. Klaus, ich danke Dir dafür, dass Du mir die Möglichkeit gegeben hast, in Deiner Forschungsgruppe arbeiten zu dürfen. Du standest mir mit deinem Fachwissen, und mit der Beantwortung unzähliger Fragen und regelmäßigen Diskussionen stets hilfreich zur Seite. Vielmehr noch hat Deine Begeisterung für das Projekt mich immer wieder angesteckt und damit die Arbeit vorangetrieben. Neben dem Fachlichen habe ich in dieser Zeit auch persönlich viel gelernt. Dafür danke ich Dir vielmals!

Ich danke Frau Prof. Angelika Schnieke für Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit von Seiten des Wissenschaftszentrums Weihenstephan.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Prof. Bernhard Holzmann, der mir als Ansprechpartner und Mentor für diese Arbeit stets zur Seite stand und durch sein Interesse an dem Projekt und die fachlichen Diskussionen zu dieser Arbeit beigetragen hat. Außerdem danke ich Frau Dr. Melanie Laschinger für die vielen Denkanstöße und Diskussionen, und für die Motivation, die sie immer wieder – vor allem in den letzten Monaten beim Anfertigen der Arbeit – in mir geweckt hat.

In den vergangenen Jahren waren die Kollegen im Labor in jeglicher Hinsicht immer für mich da, ob bei der Organisation des Laboralltags oder den unzähligen und sehr lustigen Mittagspausen. Anja danke ich besonders für die Unterstützung bei der Anfertigung von Schnitten und Färbungen, und Widya und Sabine für die Zeit und Arbeit, die sie im ZPF verbracht haben. Gabi und Feli, Karin und Tanja, AK, Anja, Widya, Alex, Uli und Sabine, sowie Euch ehemaligen Larissa, Tanja R., Nici, sowie Jorge, vielen Dank für die wundervolle und unvergessliche Zeit! Auch die Masterstudenten haben immer wieder neuen Schwung ins Labor gebracht. Besonders bedanken möchte ich mir hier bei Gabor für die zwei grauen Haare, und vor allem die sehr witzige Zusammenarbeit.

Uli, Sabine und Tanja, so sind sie! So!

Mama und Papa, ich danke Euch von ganzem Herzen, dass Ihr mir diese Arbeit und wunderschöne Zeit überhaupt erst ermöglicht habt, mich bei einfach Allem unterstützt und immer hinter mir steht! Ich hab Euch lieb!

