

Rolle des Darm-Mikrobioms bei der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie, sowie beim kolorektalen Karzinom in Wechselwirkung mit Toll-Like Rezeptor 3

Anna Theresa Antonia Sichler

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Maximilian Reichert

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen
2. Priv.-Doz. Dr. Raquel Mejias-Luque, Ph.D.
3. Prof. Dr. Andreas Jung

Die Dissertation wurde am 09.09.2024 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 07.03.2025
angenommen.

Inhalt

Summary.....	I
Zusammenfassung.....	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Krebs als genetische Erkrankung mit globaler Relevanz	1
1.2 Das kolorektale Karzinom: Entstehung und Progression	2
1.3 Metastasierung im Fokus: Mechanismen und Behandlungsmöglichkeiten	5
1.4 Immunsystem und Krebsentwicklung: Eine vielschichtige Beziehung	7
1.5 Der Einfluss des Darm-Mikrobioms auf das kolorektale Karzinom	8
1.6 Mustererkennungsrezeptoren und deren Rolle in CRC	14
1.6.1 Toll-Like-Rezeptoren: Ein Überblick	14
1.6.2 TLR3 Signalweiterleitung	16
1.6.3 Der TLR3 Signalweg bei Darmkrebs	18
1.6.4 Die Wechselwirkung zwischen TLR und Mikrobiota.....	19
1.7 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1. Methoden	21
2.1.1. Molekularbiologische Methoden.....	21
2.1.2 Mikrobiologische Methoden	26
2.1.3 Zellbiologische Methoden	27
2.1.4 Färbungen.....	33
2.1.5 Tierversuche und in vivo Stimulationen	36
2.1.6 Patientendaten	38
2.1.7 Bioinformatische Methoden	39
2.2 Material	41
2.2.1 Oligonucleotide.....	41
2.2.2 Antikörper	43
2.2.3 Zelllinien	45
2.2.4 Kulturmedien	45
2.2.5 Puffer.....	46

2.2.6	Verbrauchsmaterialien.....	46
2.2.7	Geräte	50
2.2.8	Software	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Der innate Mustererkennungsrezeptor TLR3 als Tumorsuppressor beim kolorektal Karzinom und seine vermutete Wechselwirkung mit dem Darm-Mikrobiom	54
3.1.1	Die klinische Rolle von TLR3 als Tumorsuppressor bei verschiedenen soliden Krebsarten, sowie beim kolorektalen Karzinom	54
3.1.2	Molekulare Mechanismen der TLR3-vermittelten Tumorsuppression	57
3.1.3	TLR3 Expression ist nicht mit Mikrobiota-Modulationen verbunden	79
3.2	Die Rolle des Mikrobioms für die Leberregeneration	81
3.2.1	Leberregeneration ist nach Antibiose verringert	81
3.2.2	Leberregeneration im keimfreien Mausmodell und nach Wiederbesiedelung mit Minimalmikrobiota	90
3.2.3	Regulation des Lipidsyntheseenzym Scd1 und Auswirkung auf Hepatozytenwachstum	98
3.2.4	SCD1-Expression im menschlichem Lebergewebe steht in positivem Zusammenhang mit der Leberregeneration	101
4	Diskussion	103
4.1	Toll-Like-Rezeptor 3 im Tumorkontext.....	104
4.1.1	TLR3: ein Tumorsuppressor in vivo mit prognostischer Relevanz für Langzeitüberleben.....	105
4.1.2	Molekulare Mechanismen der TLR3 abhängigen Tumorsuppression	108
4.1.3	Darm-Mikrobiota zeigen keine Veränderung in Abhängigkeit von TLR3...118	
4.2	Mikrobiom und Leberregeneration nach chirurgischer Tumorentfernung: Lipidsynthese im Fokus	120
4.2.1	Antibiotika-induzierte Veränderung des Darm-Mikrobioms führt zur geringerer Leberregeneration und Proliferation von Hepatozyten.....	121
4.2.2	Antibiotika induzierte Dysbiose reduziert die Menge an kurzkettigen Fettsäuren und De-Novo-Lipidsynthese	124
4.2.3	Funktionale Rekapitulation der Leberregeneration und der hepatischen Lipidsynthese nach Kolonisierung keimfreier Mäuse mit minimaler Mikrobiota ...	126

4.2.4	Auswirkung von Acetat auf Hepatozyten-Organoiden und SCD1-Expression: SCD1 ist für die Proliferation muriner Hepatozyten förderlich und korreliert positiv mit der Leberregeneration bei Patienten	128
4.3	Gemeinsamkeiten und Unterschiede der mikrobiellen Einflüsse: TLR3 in der Tumorentstehung und SCD1 abhängige Lipidsynthese in der Leberregeneration.....	131
4.4	Kernergebnisse und Schlussfolgerungen	136
5	Referenzen.....	137
6	Anhang	161
6.1	Abbildungsverzeichnis	161
6.2	Tabellenverzeichnis	163
6.3	Zusätzliche Daten.....	164
7	Publikationsliste.....	179
8	Danksagung	181

Summary

This study explores the association of the gut microbiome with colorectal cancer (CRC) and Toll-like receptor 3 (TLR3) on the one hand, and liver regeneration after partial hepatectomy (PHx) on the other hand.

The role of the innate pattern recognition receptor TLR3 in cancer is controversially discussed. Both tumor-promoting and tumor-inhibiting mechanisms were proposed. Analysis of a TCGA dataset (n=3195) and a CRC patient collective of the Department of Surgery (n=115) showed that the expression of TLR3 is reduced in primary tumors and metastases. Its genetic loss or downregulation is significantly associated with reduced postoperative survival and nodal metastasis, suggesting a tumor suppressive function. RNAseq analysis of patient tissue showed that downregulation of TLR3 increased signaling pathways associated with proliferation and epithelial-mesenchymal-transition (EMT), while immune activation was reduced.

Experiments with human CRC cell lines DLD1 and HCT116, in which TLR3 deficiency was induced by CRISPR-Cas9, demonstrated that migration and invasion were opposingly influenced by TLR3. Cell migration capacity *in vitro* decreased with loss of TLR3, whereas invasiveness *in vitro* and *in vivo* increased significantly. Thus, the data consistently suggest that TLR3 inhibits invasiveness and negatively regulates a clinically relevant part of tumor progression. In a translational approach, new genetic mouse models with global deficiency in Tlr3 (Tlr3^{stop}) were established in the Apc^{1638N/+} background. The suspected tumor-inhibitory role of TLR3 was confirmed, as the loss of TLR3 strongly reduced survival. Re-expression of TLR3 in intestinal epithelial cells (Tlr3^{IEC}) led to significantly increased survival compared to global gene deficiency, with simultaneously larger tumors, indicating a complex cell type-specific effect of TLR3.

Analyses of expression profiles of murine tumors, as well as chip cytometry analyses of human tumors, showed accordingly that TLR3 positively correlates with a beneficial immune cell infiltration. No change in bacterial taxonomic composition based on 16S-rRNA sequencing was detected in mouse models or in a TCGA-based clinical dataset. In summary, TLR3 was shown to be a tumor suppressor with cell type-specific and complex effects on tumor progression. TLR3 deficiency promotes cell-autonomous invasiveness of tumor cells and inhibits immune cell infiltration.

While the microbiota appears to be independent of TLR3, it plays a causal role in liver regeneration after partial hepatectomy (PHx). In antibiotic-induced dysbiosis, as well as in germ-free mice, survival, liver regeneration and hepatocyte proliferation were drastically reduced after PHx. Antibiotics diminished the abundance of fermenting phyla, such as Bacteroidetes and Firmicutes, which was tested by 16S-rRNA sequencing and resulted in depletion of bacterial derived short-chain fatty acids (SCFA). ESI-MS/MS based lipid analysis demonstrated that SCFA are essential for hepatic de-novo-lipid-synthesis. The enzyme SCD1, which is part of the lipid synthesis machinery, was reduced at mRNA and protein level in the liver parenchyma of antibiotic-treated mice. Mice with

minimal microbiota (OMM12) showed largely restored liver regeneration in comparison to germ-free animals. Cell culture experiments and *in vivo* experiments, as well as analysis of hyperproliferative tissue in a human cohort after PHx showed that SCD1 expression was associated with increased growth and induced by acetate.

Liver regeneration after PHx is therefore positively influenced by fermenting bacteria and their short-chain fatty acids, which are essential for hepatic de-novo-lipid-synthesis and subsequent liver regeneration. SCD1 is also positively correlated with liver regeneration in humans and could potentially be used to improve regenerative capacity.

Zusammenfassung

In dieser Studie wird der Zusammenhang des Darm-Mikrobioms mit dem kolorektalen Karzinom (CRC) und dem Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3) einerseits, sowie andererseits bei der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx) untersucht. Die Rolle des innate Mustererkennungsrezeptors TLR3 bei Krebs und die zugrundeliegenden Mechanismen werden kontrovers diskutiert, so wurden tumorfördernde neben tumorhemmenden Effekten beschrieben. Analysen eines TCGA-Datensatzes (n=3195) und eines CRC-Patientenkollektivs der Chirurgischen Klinik der TUM (n=115) zeigten, dass die Ausprägung von TLR3 im Primärtumor und Metastasen reduziert war. Der Verlust von TLR3 war signifikant assoziiert mit verringertem postoperativem Überleben und der Lymphknotenmetastasierung, was eine tumorsuppressive Funktion nahelegt. RNA-Analysen von CRC-Gewebe zeigten, dass bei verringerter Ausprägung von TLR3 verstärkt Signalwege der Proliferation und der epithelial-mesenchymalen-Transition (EMT) aktiviert wurden, während die Immunaktivierung reduziert war.

Experimente an humanen CRC-Zelllinien (DLD1 und HCT116) mit durch CRISPR-Cas9 induzierter TLR3 Defizienz zeigten, dass Migration und Invasion durch TLR3 gegensätzlich beeinflusst wurden. Die Zell-Migrationsfähigkeit *in vitro* sank bei Verlust von TLR3, wohingegen die Invasivität *in vitro* und *in vivo* deutlich stieg. Somit sprechen die Daten des CAM-Assays, die RNA-Sequenzierungsanalyse und die an Patienten erhobenen Befunde übereinstimmend dafür, dass TLR3 die Invasivität hemmt und somit einen klinisch hochrelevanten Teil der Tumorprogression negativ reguliert. In einem translationalen Ansatz konnten in dieser Studie neue genetische Mausmodelle mit globaler Defizienz in Tlr3 (Tlr3^{stop}) im Apc^{1638N/+} Hintergrund etabliert werden. Die vermutete tumorhemmende Rolle von TLR3 konnte bestätigt werden, da der Verlust von TLR3 das Überleben stark verringerte. Eine Re-Expression von TLR3 in intestinalen Epithelzellen (Tlr3^{IEC}) führte im Vergleich zur globalen Gen-Defizienz zu besserem Überleben, bei gleichzeitig größeren Tumoren, was auf einen komplexen zelltypspezifischen Effekt von TLR3 hinweist.

Molekulare Analysen der mRNA-Expressionsprofile muriner Tumore und Chipzytometrie-Analysen humaner Tumore zeigen übereinstimmend, dass TLR3 positiv mit vorteilhafter Immunzellinfiltration korreliert. Sowohl in den untersuchten Mausmodellen als auch in einem TCGA basierten klinischen Datensatz, wurde keine Veränderung in der taxonomischen Zusammensetzung auf Grundlage von 16S-rRNA-Sequenzierungen festgestellt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass TLR3 ein Tumorsuppressor mit zelltypspezifischen, teils gegenläufigen Auswirkungen auf das Tumorgeschehen ist. Eine TLR3 Defizienz fördert zellautonom die Invasivität von Tumorzellen und hemmt die Immunzellinfiltration.

Während die Mikrobiota unabhängig von TLR3 zu sein scheint, spielt sie eine kausale Rolle bei Leberregeneration nach partieller Hepatektomie (PHx). Bei einer durch Antibiotika induzierten Dysbiose, sowie bei keimfreien Mäusen war das Überleben, die

Leberregeneration und die Hepatozytenproliferation nach PHx drastisch vermindert. Die Antibiose reduzierte die Abundanz fermentierender Phyla, wie Bacteroidetes und Firmicutes, was durch 16S-rRNA-Sequenzierung bestätigt wurde und zu einem Mangel an kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) im Dickdarm führte. Durch ESI-MS/MS basierte Lipid-Analysen wurde nachgewiesen, dass SCFA für die hepatische De-Novo-Lipid-Synthese essenziell sind. Das Enzym SCD1, das Teil der Lipidsynthese-Maschinerie ist, war im Leberparenchym von antibiotikabehandelten Mäusen auf mRNA- und Proteinebene reduziert. Mäuse mit minimaler Mikrobiota (OMM12) zeigten im Gegensatz zu keimfreien Tieren eine weitgehend wiederhergestellte Leberregeneration. Zellkulturversuche und *in vivo* Experimente, sowie Untersuchungen von hyperproliferativem Gewebe nach PHx in einer humanen Kohorte zeigten, dass die SCD1 Expression durch Acetat induziert und mit verstärktem Wachstum assoziiert war.

Die Leberregeneration nach PHx wird somit positiv von fermentierenden Bakterien und von ihnen produzierten kurzkettigen Fettsäuren beeinflusst, die für die hepatische De-Novo-Lipidsynthese und die anschließende Leberregeneration wesentlich sind. SCD1 ist positiv mit Leberregeneration beim Menschen korreliert und könnte potenziell zur Verbesserung der Regenerationskapazität genutzt werden.

Abkürzungsverzeichnis

ABX	Antibiotika / Antibiotikabehandelt
AKT	<i>V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1</i>
ALPPS	Associating Liver Partition with Portal vein ligation for Staged hepatectomy
APC	<i>Adenomatosis Polyposis Coli Tumor Suppressor</i>
ARG1	<i>Arginase 1</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CAM	Chorion und Allantois Membran
Cas9	<i>CRISPR-assoziierte Endonuclease 9</i>
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
cDNA	complementary DNA
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CT	Computertomografie
Ctrl	Control
CXCL	C-X-C Motiv Chemokin Ligand
DAMPs	danger associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
dsRNA	double stranded RNA
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELOVL6	<i>ELOVL Fatty Acid Elongase 6</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
	fCLIP-seq formaldehyde-mediated crosslinking and immunoprecipitation sequencing
FCS	Fetal Calf Serum
FASN	<i>Fatty Acid Synthase</i>
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
GATA3	<i>GATA Binding Protein 3</i>
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GF	Germ Free
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>

IEC	Intestinal epithelial cells
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF3	<i>Interferon Regulatory Factor 3</i>
JAM-A	<i>Junctional Adhesion Molecule A (F11 Receptor)</i>
KBTBD12	<i>Kelch Repeat And BTB Domain Containing 12</i>
LB	Lysogeny Broth
LGR5	<i>Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5</i>
LOH	Loss of Heterozygosity
LR	Leberregeneration
LSL	Lox-Stop-Lox
MAMPs	microbial associated molecular pattern
MAGE	<i>melanoma antigen gene</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MU PC	Mono-unsaturated phosphatidyl choline / Mono-desaturiertes Phosphatidyl-Cholin
MU PE	Mono-unsaturated phosphatidyl ethanolamine
MYC	<i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i>
NFKB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NGS	Next Generation Sequencing
OAS1	<i>2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 1</i>
OCLN	<i>Occludin</i>
OMM	Oligo-Maus-Mikrobiota
OTU	Organizational taxonomic Unit
p130Cas	<i>P130 Crk-Associated Substrate</i>
PBS(T)	Phosphate-Buffered Saline (with Tween 20)
PC	Phosphatidyl-Cholin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Daten Bank
PE	Phosphatidyl-Ethanolamin
PHX	Partielle Hepatektomie
PKR	<i>Protein Kinase R</i>
PKS	Polyketid-Synthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
Poly(I:C)	Polyinosinsäure:Polycytidylsäure
PVE	Portalvenenembolisation
RB	<i>Retinoblastom-Protein</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-Inducible Gene</i>
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer

RNA	Ribonucleic Acid
RORC	<i>RAR Related Orphan Receptor C</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Reverse Transcription quantitative real-time Polymerase Chain Reaction
SCD1	<i>Stearoyl-CoA Desaturase 1</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sgRNA	single guide RNA
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite Repression
SPF	Spezifiziert Pathogen Frei
SPP1	<i>Secreted Phosphoprotein 1</i>
SRC	<i>SRC Proto-Oncogene</i>
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TBET	<i>T-Box Transcription Factor 21 (TBX 21)</i>
TICAM1	<i>TIR domain containing adaptor molecule 1</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TP53	<i>Tumor Suppressor P53</i>
TRAF6	<i>TNF Receptor Associated Factor 6</i>
UICC	Union International Contre le Cancer
UPL	Universal Probe Library
VIM	<i>Vimentin</i>
WNT	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Krebs als genetische Erkrankung mit globaler Relevanz

Unter der Bezeichnung „Krebs“ wird eine Vielzahl komplexer und vielschichtiger Erkrankungen zusammengefasst, die sich durch unkontrolliertes Wachstum und Teilung genetisch veränderter Zellen auszeichnen, was zur Bildung bösartiger Tumore und Invasion in das umliegende gesunde Gewebe führen kann (Hanahan und Weinberg 2011). Obwohl die Forschung in den letzten Jahrzehnten bemerkenswerte Fortschritte erzielt hat, stellen uns auch im 21. Jahrhundert Krebserkrankungen noch vor große Herausforderungen. Mit jährlich 10 Millionen Todesfällen zählt Krebs zu den häufigsten Todesursachen weltweit (Sung et al. 2021). Diese Zahlen zeigen eindrücklich, dass es nach wie vor essenziell ist, die Krebsentstehung und -Progression besser zu verstehen und gleichzeitig die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten voranzutreiben.

Bei Krebs kommt es meist zu genetischen Mutationen in den somatischen Zellen (Hanahan und Weinberg 2000). In seltenen Fällen, den hereditären Tumorsyndromen, können diese Veränderungen auch in der Keimbahn vererbt werden (Nishisho et al. 1991, Hanahan und Weinberg 2000). Diese Mutationen können einzelne Basenpaare oder ganze Chromosomen betreffen und durch Fehler bei der normalen Vervielfältigung der DNA bei der Zellteilung, oder durch Umweltfaktoren, wie Strahlung, Tabakrauch, mutagene Chemikalien oder bestimmte mikrobielle Produkte oder Viren ausgelöst werden. Die Entstehung und das Fortschreiten von Krebs ist ein komplexer Vorgang, der die Ansammlung mehrerer Veränderungen im Erbgut voraussetzt (Hanahan und Weinberg 2000). Die Veränderungen führen zu einem Wachstumsvorteil der betroffenen Zellen und folglich zur unkontrollierten Teilung der Ursprungszelle (Hanahan und Weinberg 2011). Hierdurch entsteht mutmaßlich eine klonale Ansammlung von Zellen mit ähnlichen Mutationen (Vogelstein et al. 2013). Trotz des hypothetischen Ursprungs aus einer Zelle kann es durch erhöhte Mutationsraten und veränderte DNA-Reparaturmechanismen zur Ansammlung verschiedener Mutationen und somit zu einer bemerkenswerten klonalen Heterogenität innerhalb eines einzigen soliden Tumors führen (Hanahan und Weinberg 2011). Trotz ähnlicher Mechanismen der Krebsentstehung besteht eine große Heterogenität zwischen verschiedenen Tumorentitäten, die aus verschiedenen Ursprungsgeweben entstehen, wobei der Tumor aus embryonal unterschiedlich abgeleiteten Zelltypen hervorgeht und sich in einer vollkommen anderen Mikroumgebung befinden kann (Hanahan und Weinberg 2000). Wächst der Tumor lokal weiter und wird nicht durch das Immunsystem beseitigt oder durch limitierende Faktoren, wie zum Beispiel mangelnde Nährstoffversorgung am Wachstum gehindert, kann die Krankheit weiter voranschreiten, der Tumor dringt in umliegendes Gewebe ein und kann in andere Organe metastasieren, was schließlich zum Tod führen kann (Hanahan und Weinberg 2000).

1.2 Das kolorektale Karzinom: Entstehung und Progression

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem kolorektalen Adenokarzinom (colorectal carcinoma; CRC), der häufigsten bösartigen Krebserkrankung des Darmtraktes, weswegen sich im Folgenden die Bezeichnung „Darmkrebs“ ausschließlich auf diese Erkrankung bezieht. Kolorektale Karzinome entstehen in den meisten Fällen durch spontane, somatische Mutationen in Epithelzellen der Darmschleimhaut. In nur ungefähr 5-10 % der Fälle handelt es sich um eine genetische Disposition und dadurch um eine in der Keimbahn autosomal dominant vererbte Krankheit (Lynch und de la Chapelle 2003, Weitz et al. 2005, Yamagishi et al. 2016). Darmkrebs ist die dritthäufigste Krebsart und die zweithäufigste krebssbedingte Todesursache weltweit (Sung et al. 2021). Allein in Deutschland werden jedes Jahr ca. 60.000 Fälle diagnostiziert (Ronckers et al. 2023).

Der Krankheitsverlauf hängt maßgeblich vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose ab. Der aktuelle „Goldstandard“ zur klinischen Einteilung der Tumortypen ist die sogenannte TNM-Klassifizierung („tumor“, „node“, „metastasis“) der UICC (International Union Against cancer) und der AJCC (American Joint Committee on Cancer) (James D. Brierley (Editor) 2017). Das TNM-System beschreibt die Invasionstiefe des Primärtumors (T1-T4), die Tumordinfiltration in die Lymphknoten (N0-N2) und das Vorliegen von Fernmetastasen (M0/M1). Die Prognosen der Patienten ist abhängig vom Tumorstadium und prognostischen Faktoren und folglich variieren die Therapien und die Prognosen der erkrankten Personen stark.

Eine Klassifizierung entsprechend des Stadiums I (T1-T2 N0M0, 19 %) verspricht nach chirurgischer Intervention eine gute Prognose und sehr niedriges Rezidivrisiko. Tumore des Stadium I sind gut differenziert und zeigen keine Infiltration der Lymphgefäße (Nitsche et al. 2011). Bei ungefähr 30 % der Patienten wird das Tumorstadium II diagnostiziert. Der Primärtumor dringt hier tiefer in das umliegende Gewebe ein ohne, dass Lymphinfiltration oder Fernmetastasen entstanden wären (T3-4, N0 M0). Auch bei diesen erkrankten Personen ist eine Tumoresektion von Vorteil, jedoch schwanken Überlebensraten bei dieser Personengruppe drastisch (Nitsche et al. 2011). Das 5-Jahres Überleben variiert zwischen 96 % im frühen Stadium der UICC 1 Klassifizierung mit lokaler Begrenzung und 13 % bei fortgeschrittenem metastasierendem kolorektalem Adenokarzinom des Stadiums UICC IV (Nitsche et al. 2016). Dies zeigt den dringenden klinischen Bedarf, das Wissen im Zusammenhang mit der Metastasierung zu vertiefen, um sie bei fortgeschrittenen Stadien besser behandeln zu können oder ihre Entstehung zu verhindern.

Ein kolorektales Adenokarzinom entsteht nach dem bereits 1990 vorgeschlagenen „Adenom-Karzinom“ Modell (Fearon und Vogelstein 1990) aus einem gutartigen Adenom, welches mit der Zeit Mutationen in Tumorsuppressoren und Onkogenen ansammelt, die das Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod stören und so letztendlich zu einem bösartigen Adenokarzinom führen.

Pathogenese des Kolorektalkarzinoms

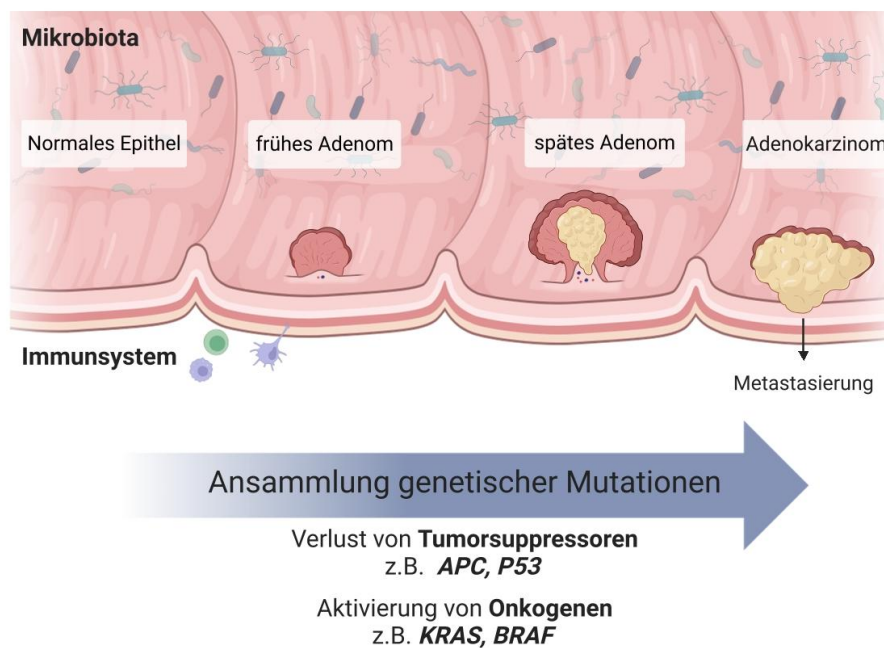


Abbildung 1.1: Modell der Progression von Darmkrebs

Von links nach rechts der Übergang von gesundem Darmepithel über das frühe und späte Adenom bis hin zum invasiven Adenokarzinom mit möglicher Metastasenbildung. Die Akkumulation genetischer Mutationen in Tumorsuppressoren und Onkogenen treibt unkontrolliertes Zellwachstum voran. Gleichzeitig beeinflusst das Immunsystem und die Mikrobiota die Tumorentstehung und Progression. Diese Grafik wurde mit BioRender erstellt. Abbildung ist verändert nach (Fearon und Vogelstein 1990).

Eine Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens führt zu einem verstärkten Zellwachstum und mutmaßlich zu einer schlechteren Prognose für den Patienten. Tumorsuppressoren kontrollieren das Wachstum, die Zellteilung und somit die Entwicklung oder das Fortschreiten von Krebs (Fre et al. 2008). Das wahrscheinlich bekannteste Beispiel eines Tumorsuppressors ist *TP53*. Bei *P53* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher durch Stress, wie sie zum Beispiel DNA-Schäden darstellen, aktiviert wird. Er induziert DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest oder Apoptose. Eine Inaktivierung der normalen *P53* Funktion, entweder durch Mutation von *TP53* selbst oder dessen Regulatoren, kann zum Verlust dieser Funktion führen und somit unkontrollierte Proliferation trotz geschädigter DNA unterstützen. (Liebl und Hofmann 2021). Mutationen in *TP53* ermöglichen das Umgehen der Wachstumshemmung, bzw. das Eintreten in die Seneszenz oder den kontrollierten Zelltod der entarteten Zellen durch Apoptose. Das mit Abstand am häufigsten mutierte Gen bei sporadisch auftretendem CRC ist das tumorsuppressive Gen adenomatöse Polyposis coli (*APC*), mehr als 80 % der spontan auftretenden kolorektalen Karzinome haben *APC* Mutationen (Grodin et al. 1991, Nishisho et al. 1991, Powell et al. 1992). Daneben sind Keimbahn-Mutationen in *APC* die Ursache des erblich bedingten FAP-Syndroms (familiäre adenomatöse Polyposis). Das

vom APC Gen kodierte Protein ist ein negativer Regulator von β -Catenin im kanonischen WNT-Signalweg. Eine Deregulation von β -Catenin, oder dessen direkte onkogene Mutation, die zur Stabilisierung und dem Eintritt in den Zellkern führt, löst Zellproliferation aus (Su et al. 1993). Auf molekularer Ebene ist intaktes APC Bestandteil des β -Catenin-Zerstörungs-Komplexes, der zur Phosphorylierung und letztlich zum proteasomalen Abbau des transkriptionellen Co-Aktivators β -Catenin und außerdem zur Lokalisation des Komplexes zur Membran führt (Parker und Neufeld 2020).

Auf der anderen Seite stehen Proto-Onkogene, wie KRAS, welches zur Familie der Guanosin Triphosphatasen (GTPase) gehört (Rajalingam et al. 2007) und das häufigste beim Menschen mutierte Onkogen darstellt (Bos et al. 1987). Bei Aktivierung durch eine Punktmutation kommt es zu einer verstärkten Signalweiterleitung des RAF-MEK-ERK und des PI3K-AKT Signalweges und letztendlich zur gesteigerten Proliferation der Zellen, die im Mausmodell zur Entstehung von Darmkrebs ausreicht (Janssen et al. 2002). Mutiertes RAS verbleibt im aktiven, GTP-gebundenen Zustand und die Zellteilung wird unkontrolliert induziert. Mutationen im KRAS-Lokus treten mit einer Häufigkeit von 30 % im 2. UICC Stadium bzw. in 36 % der an Darmkrebserkrankten Personen im 3. UICC Stadium auf (Nitsche et al. 2012, Sperlich et al. 2018). Neben weiteren Genen, die in der Regulation des RAS-Signalwegs eine Rolle spielen, kann auch der Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR mutieren, sodass eine dauerhafte Aktivierung des Signalwegs die Folge ist (Downward 2003). BRAF ist ein weiteres Proto-Onkogen des MAP-Kinase Signalwegs. Die Serin/Threonin spezifische Proteinkinase ist für die Signalweiterleitung innerhalb des Signalwegs zuständig. Bei Mutationen, die zur ständigen Aktivierung des Proteins führen, kommt es ebenfalls zur konstitutiven Aktivierung des Signalwegs und einer unkontrollierten Proliferation (Rad et al. 2013, Molina-Cerrillo et al. 2020). Diese können auch zur Entstehung von Darmkrebs führen, wie transgene Mausmodelle belegen. Mutationen in BRAF sind seltener als KRAS, scheinen sich aber gegenseitig auszuschließen und bei Darmkrebs mit einer Prävalenz von 10-15 % im 2. und 3. UICC Stadium aufzutreten (Nitsche et al. 2012, Sperlich et al. 2018). Gemein ist allen diesen Signalen, dass sie zur Erhaltung des proliferativen Signals führen.

Nach dem mittlerweile als klassisch eingestuften Modell der Darmkrebsentstehung (Fearon und Vogelstein 1990) kommt es bei Darmkrebs zu einer Ansammlung von Mutationen in den wichtigen Tumorsuppressoren, wie APC und TP53 oder Onkogenen, wie KRAS (siehe Abbildung 1.1). Es ist typisch, dass bestimmte Veränderungen progressiv in bestimmten Phasen auftreten, so wird eine APC Mutation im „klassischen“ Modell als eine mögliche Initiationsmutation gesehen, allerdings sind Mutationen nicht unbedingt nur auf die jeweilige Phase limitiert, und basierend auf umfangreichen DNA- und RNA-Sequenzierungsvorhaben wurden alternative Wege zur Entstehung von Darmkrebs vorgeschlagen, etwa bei entzündungsassoziierten Karzinomen, oder bei serratierten Adenomen (Leggett und Whitehall 2010, Zhou et al. 2023). Wie bereits aufgeführt, entsteht die große Mehrzahl der Darmkrebsfälle zwar sporadisch, jedoch spielen auch hereditäre Syndrome eine Rolle. Ein erbliches Syndrom, welches mit einem heterozygoten Verlust von APC in der Keimbahn einhergeht, ist die familiäre adenomatöse

Polyposis (FAP), bei der sich schon innerhalb der ersten 20 bis 30 Lebensjahre eine Vielzahl von Polypen im Kolorektum bilden. In der experimentellen Tumorforschung werden Mausmodelle mit einer heterozygoten Keimbahn-Mutation in *Apc* eingesetzt, die nach einem Heterozygotie-Verlust (LOH) zu einem Verlust des Apc Proteins und der Entstehung von Adenomen führen (Moser et al. 1990, Fodde et al. 1994, Zeineldin und Neufeld 2013, Washington und Zemper 2019).

Nach Weinberg und Hanahan sind Veränderungen in Genen, welche die Proliferation, das Umgehen von suppressiven Faktoren, Resistenz gegen Apoptose und Seneszenz essenziell für die Krebsentstehung. Weitere Faktoren der krebszell-intrinsischen Tumorentstehung und Progression sind die Deregulation des Metabolismus, das Erreichen der replikativen Immortalität, Invasion und Metastasierung der Zellen und genomische Instabilität (Hanahan und Weinberg 2011, Hanahan 2022). Jedoch verändern sich nicht nur die Krebszellen selbst. Sie induzieren auch Veränderungen der sogenannten Mikroumgebung. So werden die Bildung neuer Blutgefäße, die Aktivität von Immunzellen und Entzündung, sowie die extrazelluläre Matrix modifiziert, damit der Tumor überleben kann. Außerdem scheinen die Epigenetik, die zur klonalen Plastizität in der Tumورprogression führt und Modulationen durch Mikrobiota, auf die später noch im Detail in der vorliegenden Arbeit eingegangen wird, eine wichtige Rolle zu spielen (Hanahan 2022).

In dieser Arbeit wird vor allem die Invasivität und Metastasierung, die Proliferation, die Resistenz gegen Zelltod, die differenzielle Aktivierung des Immunsystems und die Rolle des Mikrobioms von Bedeutung sein.

1.3 Metastasierung im Fokus: Mechanismen und Behandlungsmöglichkeiten

In 90 % der Krebs-assoziierten Todesfälle ist bei soliden Tumoren nicht die Primärläsion für die Letalität der Krankheit verantwortlich, sondern die Metastasen (Lambert et al. 2017). Der Prozess der Invasions-Metastasierungs-Kaskade beschreibt den komplexen und mehrstufigen Vorgang, bei dem sich Tumorzellen aus dem Primärtumor lösen und anschließend in entferntem Gewebe ansiedeln, um letztlich Tumorkolonien auszubilden (Friedl und Wolf 2003, Gupta und Massague 2006, Valastyan und Weinberg 2011). Generell kann man den Prozess in drei Hauptteile untergliedern: die Verbreitung, die Ruhephase und die Kolonisierung (Gerstberger et al. 2023). Gliedert man die einzelnen Bestandteile dieser Kaskade weiter, kann man in der Verteilung die lokale Invasion von Zellen in das tumorumgebende Gewebe, die Intravasation der Zellen in den Blutkreislauf oder das lymphatische System, das Überleben der Zellen im Blutkreislauf und die Extravasation der Tumorzellen durch die Blutgefäße in tumorfernes Gewebe aufteilen. Die Ruhephase der Zellen beschreibt das Überleben mikrometastatischer Tumorzellen oder Zellcluster im Gewebe oder Kapillaren. Die Proliferation dieser Mikrometastasen hin zu

makroskopisch und klinisch sichtbaren metastatischen Läsionen umfasst die Kolonisierung (Lambert et al. 2017, Dongre und Weinberg 2019, Gerstberger et al. 2023).

Invasions-Metastasierungs-Kaskade

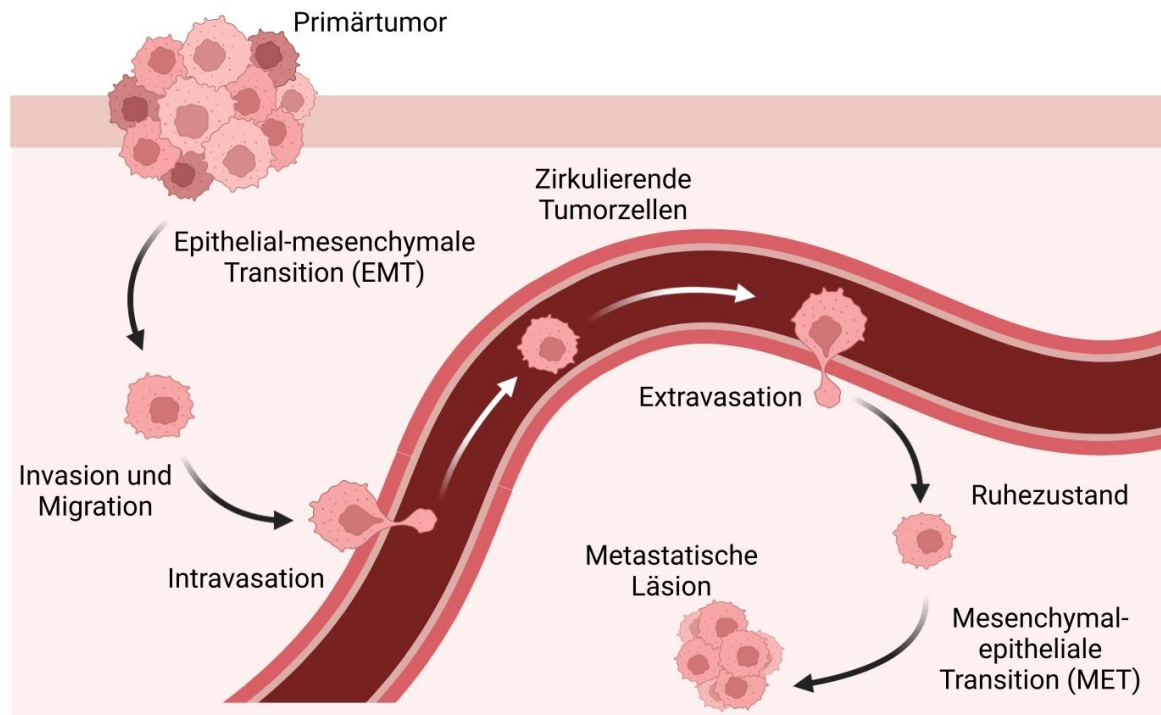


Abbildung 1.2: Die Entstehung von Metastasen ausgehend vom Primärtumor

Invasions-Metastasierungs-Kaskade ausgehend vom primären Tumor; die Verbreitung der Tumorzellen in umliegendes Gewebe, die Intravasation in Blutgefäße und Verteilung im Körper über den Blutstrom und die Extravasation in entferntes Gewebe. Nachfolgend treten die Tumorzellen entweder in eine Ruhephase ein oder proliferieren und bilden Metastasen, was als Kolonisierung bezeichnet wird. Abbildung wurde mittels BioRender nach (Gerstberger et al. 2023) erstellt.

In den ersten Schritten der Verteilung von Tumorzellen epithelialen Ursprungs findet eine epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) statt, welche auch in der normalen Embryogenese eine wichtige Rolle spielt, etwa bei der Gastrulation. Dieser Prozess geht mit erhöhter Motilität und Invasivität der Zellen und mit der Fähigkeit einher extrazelluläre Matrix (ECM) abzubauen. Obwohl EMT häufig als binärer Prozess dargestellt wird, ist die biologische Realität dahinter komplexer. Die Aktivierung bestimmter EMT-Programme führt dazu, dass manche phänotypische Eigenschaften der Zellen „mesenchymaler“ werden, wohingegen andere weiterhin „epithelial“ bleiben und es somit in Realität zu einem gemischten epithelial/mesenchymalen Phänotyp kommt (Lambert et al. 2017). Tumorzellen können entweder als einzelne Zellen oder im Zellverbund wandern (Friedl und Wolf 2003), was wiederum zu einem komplexen epithelial/mesenchymalen Mischphänotyp führen kann. Sobald die Tumorzellen das Lymph- oder Blutsystem

erreicht haben und mittels Intravasation in das Gefäßsystem gelangt sind, können sie sich potenziell im Körper verteilen. Eine erhöhte intratumorale Neo-Vaskularisierung mit Blut- oder Lymphgefäßen erhöht hier die Wahrscheinlichkeit, dass Krebszellen in die Zirkulation eintreten (Tien et al. 2001, Yamamura et al. 2001).

Aufgrund der direkten anatomischen Verbindung der Leber mit dem Darm über die Portalvene, gelangen zirkulierende Tumorzellen beim CRC sehr häufig in die Leber, können sich dort in den Kapillaren festsetzen, in das Leberparenchym eindringen und Metastasen ausbilden (Gerstberger et al. 2023). Eine mögliche Behandlungsmaßnahme ist, neben systemischen Ansätzen wie der Chemotherapie, die komplette chirurgische Entfernung der Lebermetastasen, die sogenannte partielle Hepatektomie (PHx) (Keck et al. 2022). Dieses Verfahren wird vor allem bei erkrankten Personen mit kolorektalen Lebermetastasen, aber auch bei primären Lebertumoren oder parasitären Zysten angewendet. Nach der Entfernung des erkrankten Gewebes ist es essenziell, die Leberfunktion so schnell wie möglich wiederherzustellen, um ein optimales Überleben zu erreichen. Interessanterweise reduziert das Fehlen mikrobieller Faktoren diese Regenerationsprozesse drastisch (Cornell et al. 1990, Zheng und Wang 2021). Die molekularen Mechanismen dahinter sind jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Nachdem Metastasierung die häufigste krebsbezogene Todesursache ist, ist es wichtig, die krebszellautonomen biologischen Prozesse, aber auch mögliche Einflüsse des Darm-Mikrobioms auf Metastasierung und Leberregeneration nach Resektion besser zu verstehen. Außerdem ist es aus klinischer Sicht notwendig, die chirurgische Behandelbarkeit der Metastasen zu erhöhen, indem etwa die Regenerationsfähigkeit des gesunden Leberparenchyms gesteigert wird.

1.4 Immunsystem und Krebsentwicklung: Eine vielschichtige Beziehung

Das Immunsystem erkennt und entfernt körperfremde Organismen oder beschädigte körpereigene Zellen (Murphy 2011). So entfernt es auch entartete Zellen und verhindert somit die Krebsentstehung. Das Immunsystem spielt jedoch eine sehr komplexe Rolle bei der Karzinogenese. Es bekämpft einerseits die Krebszellen und tötet sie ab, andererseits wirkt es sich tumorfördernd durch Entzündungsprozesse auf die Krebszellen aus. Die tumorfördernde Rolle des Immunsystems, insbesondere bei chronischen Entzündungsprozessen, wurde in der Vergangenheit mit einer „Wunde, die nicht heilt“ verglichen (Dvorak 1986). Dabei schüttet das Immunsystem gleichzeitig wachstumsfördernde, pro-inflammatorische und anti-apoptotische Signale aus. Diese begünstigen folglich die Krebsentstehung und Progression. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen das Krebsrisiko der erkrankten Personen 30 Jahren nach Erkrankung um 18 % ansteigt (Eaden 2004).

Dunn und Kollegen stellen die These auf, dass das Immunsystem eine weitaus vielfältigere Rolle in der Entwicklung des Tumors spielt. In der „Immunsurveillance“ Theorie kommt es zu einer evolutionären „Editierung“ der Krebszellen, wobei ein Teil der Zellen abgetötet wird. Kommt es dabei zur Abtötung aller Krebszellen, wird der entstehende Krebs eliminiert. Werden jedoch einige aberrante Zellen nicht getötet, bildet sich ein Gleichgewicht zwischen der zytotoxischen Aktivität des Immunsystems und neuen Mutationen in den Krebszellen, die es ihnen ermöglichen, der Erkennung durch das adaptive Immunsystem zu entkommen („Immune Escape“) (Dunn et al. 2002). Immunsupprimierte Menschen, etwa Organtransplantierte, haben eine höhere Wahrscheinlichkeit, an Krebs zu erkranken und auch im Mausmodell wurde gezeigt, dass Mäuse mit immunologischer Dysfunktion häufiger Tumore entwickeln, bzw. implantierte Tumore sich aggressiver ausbilden können (Kim et al. 2007, Teng et al. 2008). Außerdem hat die Anzahl bestimmter Immunzell-Populationen im Tumor, wie zum Beispiel zytotoxische T Lymphozyten (CTL, CD3+CD8+) oder Natürliche Killerzellen (NK), positive Auswirkungen auf die Prognose, was sich im sogenannten „Immunoscore“ widerspiegelt, der auf der Dichte tumorinfiltrierender T-Zellen basiert und das konventionelle TNM-Staging-System an prognostischer Genauigkeit übertrifft (Galon et al. 2006, Nelson 2008, Pages et al. 2010, Bruni et al. 2020). Jedoch können verschiedene Untergruppen von Immunzellen auch das Tumorwachstum begünstigen, wie regulatorische T-Zellen oder M2-Makrophagen, oder einen kontextabhängigen tumorsuppressiven oder tumorfördernden Effekt zeigen (Venkatesh et al. 2023). Das Immunsystem ist also ein zweischneidiges Schwert, durch das in Abhängigkeit der Mikroumgebung die Entstehung und Progression von Krebs verhindert, aber auch gefördert werden kann.

1.5 Der Einfluss des Darm-Mikrobioms auf das kolorektale Karzinom

In den letzten Jahren ist die Aufmerksamkeit und das Interesse für den Einfluss des Mikrobioms auf den Menschen beträchtlich gestiegen. Das Mikrobiom ist die Gesamtheit einer interaktiven und dynamischen mikrobiellen Gemeinschaft mit all ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, einschließlich aller Mikroorganismen und deren Aktivitäten in einer definierten ökologischen Nische (Berg et al. 2020). Hier liegt der Fokus im speziellen auf der dynamischen Natur dieser Gemeinschaft und ihrer Aktivitäten. Mikrobiota ist ein Begriff, der Mikroorganismen aller Domänen des Lebens zusammen mit ihren Strukturen, Metaboliten, genetischen Elementen und DNA beinhaltet in einem Habitat beschreibt. Im Kontrast zum Mikrobiom liegt bei dem Begriff Mikrobiota der Fokus mehr auf den vertretenen Mikroorganismen und Komponenten und weniger auf den dynamischen Interaktionen unter den Organismen oder der Umwelt (Berg et al. 2020).

Die humane Mikrobiota enthält Mikroorganismen aus allen Domänen des Lebens, wie Bakterien, Pilze, eukaryotische Einzeller, Viren und teils auch Archaeen (Hou, Wu, et al. 2022). In unserem Körper befinden sich ungefähr genauso viele Mikroorganismen, wie eigene Körperzellen (Sender et al. 2016, Walker und Hoyles 2023), wobei sich die meisten davon im Darm befinden (Sender et al. 2016). Hierbei steigt die Dichte an Mikroorganismen von Magen, Duodenum, Jejunum über das Ileum bis hin zum Kolorektum, mit einer maximalen Anzahl von ungefähr 10^{11} Bakterien pro Gramm an Nassgewicht des Darminhalts (Sender et al. 2016).

Die mikrobielle Gemeinschaft im menschlichen Körper interagiert an jeder Oberflächenstruktur wie der Haut oder dem Darmtrakt mit dem Wirt und erfüllt dabei wichtige Funktionen. Die mikrobielle Diversität wurde hier als wichtiger Parameter etabliert, welcher mit dem Auftreten von Krankheiten, wie Darmkrebs, korreliert wurden (Thomas et al. 2019). Es existieren Korrelationen zwischen Krankheiten und bestimmten mikrobiellen Signaturen und ein kausaler Zusammenhang zwischen Mikrobiota und Krankheitsentstehung oder Progression bei zum Beispiel Magen-, Darmkrebs oder entzündlichen Darmerkrankungen ist sehr wahrscheinlich. Jedoch ist die Mikrobiota zwischen verschiedenen Individuen sehr variabel und eine bestimmte mikrobielle Signatur muss nicht unbedingt eine Erkrankung zur Folge haben. Im Darm herrscht demnach sowohl bei erkrankten als auch bei gesunden Personen eine sehr hohe Variabilität und es kann nicht unbedingt eindeutig festgestellt werden, dass bestimmte Bakterien oder deren Abwesenheit zu einer Krankheit führen. So können bekannte Krankheitserreger, wie *Clostridium difficile* lange im Darm vorhanden sein, lösen aber nur unter bestimmten weiteren Voraussetzungen, wie in älteren, immunsupprimierten Personen nach Antibiotikagabe eine gefährliche Infektion aus (Walker und Hoyles 2023). Außerdem spielt die Lokalisation der Mikroben eine Rolle. So sind *Escherichia coli* im Darmtrakt häufig vorhanden, können aber Harnwegsinfekte auslösen, wenn sie in die Harnröhre gelangen (Walker und Hoyles 2023). Ein bestimmtes Mikrobiom kann bei einer Person keine Krankheit hervorrufen und bei einer anderen mit unterschiedlichen genetischen- und Umwelt-einflüssen sehr wohl. Aus diesem Grund ist es nach wie vor schwierig ein „gesundes“ Mikrobiom zu definieren.

Häufig werden deskriptive Parameter, wie die Diversität, also die Anzahl und Verteilung verschiedener mikrobieller Spezies, verwendet, um den Vergleich von Individuen zu vereinfachen und generelle Parameter trotz der hohen Heterogenität auf Speziesebene abzubilden. Obwohl die Unterschiede zwischen Menschen bezüglich der Bakterien auf Spezies Ebene enorm sind, setzt sich das Darm-Mikrobiom zum Großteil aus Bakterien der vier Phyla Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria und Proteobacteria zusammen. Hiervon machen Bacteroidetes und Firmicutes im Regelfall ungefähr 90 % des Mikrobioms aus und Actinobacteria, sowie Proteobacteria treten nur in geringer Abundanz auf (Kim et al. 2017). Bacteroidetes sind sowohl anaerobe, als auch aerobe Bakterien, die keine Sporen formen und bekannt dafür sind komplexe Kohlenhydrate zu fermentieren und daraus kurzkettige Fettsäuren, wie Acetat, Propionat und Butyrat herzustellen (Kim et al. 2017). Firmicutes sind obligat oder fakultativ anaerobe gram-

positive Bakterien, die teilweise Sporen ausbilden können und meist gram positiv sind. Einige Bakterien der Unterklasse Clostridia sind ebenfalls bekannte Fermentierer und stellen somit ebenfalls im Darmlumen kurzkettige Fettsäuren her. Mehrere Mitglieder dieser Klasse fördern die Immunhomöostase durch Aktivierung regulatorischer T-Zellen (Lopetuso et al. 2013). Das Phylum der Actinobacteria beinhaltet Mikroben, welche anaerob und aerob wachsen, einen hohen GC-Gehalt in der DNA aufweisen und gram positiv sind. Diverse Mitglieder dieses Phylums sind durch ihre immunmodulatorischen positiven Effekte aufgefallen, welche sie zum Beispiel durch Festsetzen im Mukus oder an intestinale Epithelzellen ausüben können (Picard et al. 2005). Bakterien aus dem Phylum der Proteobacteria sind gram negative fakultativ aerobe Mikroben, was bedeutet, dass sie auch unter sauerstoffhaltigen Bedingungen prosperieren. Normalerweise sind sie nur in geringer relativer Häufigkeit im Intestinaltrakt vorhanden, können aber bei einer auftretenden Dysbiose auch überwuchern und wurden aus diesem Grund als potenzielle diagnostische Signatur von Dysbiose und Krankheitsrisiko vorgeschlagen (Taur und Pamer 2013, Shin et al. 2015).

An jeder Oberflächenschicht des Körpers befindet sich eine Barriere, die das Eindringen von Bakterien und Viren verhindert. Es wird ein gesundes Gleichgewicht zwischen dem Wirt mit seiner schützenden Epithelschicht und dem Immunsystem gegenüber den Mikroorganismen und den vorhandenen Stimuli aus der Umwelt geschaffen. Zum Schutz des Wirts gibt es einige Barrieren, wie zum Beispiel die fest miteinander verbundenen Epithelzellen, die trennende Mukusschicht, welche den Darminhalt von der Schleimhaut fernhält und die Abwehrmechanismen des Immunsystems. Eine genaue räumliche Ordnung dient der Erhaltung der Abgrenzung und der Schutzmechanismen vor fremden oder pathogenen Organismen. Es gibt verschiedene Verteidigungslinien des Körpers gegen Pathogene. Neben der Tatsache, dass der Mukus physische Distanz zwischen den Epithelzellen und den Bakterien bringt, befinden sich in ihm Moleküle zur Abwehr von Bakterien wie Defensine, Cryptidine und Antikörper wie IgA, die ein Vorankommen der Bakterien durch den Mukus erschweren sollen oder Virulenzfaktoren neutralisieren (Pabst und Slack 2020, Fu et al. 2023). Neben den bereits beschriebenen physikalisch-biochemischen Barrieren gibt es Mechanismen des adaptiven und vor allem des innate Immunsystems, darunter Mustererkennungsrezeptoren, welche konservierte mikrobielle „Gefahrensignale“ aus der Umwelt wahrnehmen, um dementsprechend rasch reagieren zu können und eine Entzündungsreaktion hervorzurufen.

Bei der Tumorentstehung entlang der zuvor beschriebenen Adenom-Karzinom-Sequenz kommt es zu einem graduellen Verlust der epithelialen Ordnung und der physikalischen Barriere(n) (Grivennikov et al. 2012), wodurch Mikroben aus dem Darmlumen mit den Zellen des Wirtes in der Tumor-Mikroumgebung gelangen, also mit Epithelzellen in der Nachbarschaft, mit Fibroblasten, Immunzellen oder auch den aberranten Tumorzellen selbst interagieren. Einige Bakterien oder Viren wurden gehäuft bei CRC-Patienten gefunden, darunter *Fusobacterium nucleatum*, wobei auch konservierte bakterielle Funktionen beschrieben wurden (Cremonesi et al. 2018, Iftekhar und Sigal 2018, Thomas et al. 2019, Wirbel et al. 2019, Zepeda-Rivera et al. 2024). *F. nucleatum* ist aber kein

klassisches pathogenes Bakterium, da es auch Bestandteil der normalen oralen Mikrobiota ist und möglicherweise vor Allergien schützt (Brennan und Garrett 2019, Zepeda-Rivera et al. 2024). Der Einfluss des *humanen Papillomavirus* (HPV) oder des Bakteriums *Helicobacter pylori* auf die Entstehung von Zervixkarzinomen, bzw. Magenkrebs ist bekannt und gut dokumentiert. Ähnliche Effekte könnten andere Erreger im Darm zeigen. Von besonderem Interesse ist deshalb, ob neben bekannten Pathogenen auch opportunistische „Pathobionten“, oder auch nicht-pathogene Bakterien und Viren als Bestandteil eines eubiotischen oder dysbiotischen Mikrobioms mit dem Wirt interagieren. Bislang wurden einige molekulare Mechanismen beschrieben, wie Bakterien die Entstehung und Progression von Krebs beeinflussen können.

Die Expression von Virulenzfaktoren in pathogenen Bakterien ist ein potenziell tumorfördernder Mechanismus. Beispiele für Virulenzfaktoren sind FadA von *F. nucleatum*, bzw. CagA von *H. pylori* oder das „spritzenähnliche“ Sekretionssystem Typ IV, mit dessen Hilfe bakterielle Faktoren in eukaryotische Wirtszellen injiziert werden.

Im Fall von *H. pylori*, der von der WHO als Magenkrebs-erregend eingestuft wurde, gibt es verschiedene, gut erforschte Mechanismen, die die Pathogenität, die direkte Interaktion mit dem Epithel oder indirekte Mechanismen über das Immunsystem beschreiben (Amieva und El-Omar 2008, Mejías-Luque und Gerhard 2017, Ralser et al. 2023). *H. pylori* kann sich durch seine Flagellen freischwimmend im Mukus bewegen, um diese natürliche Barriere zu überwinden und sich an das Magenepithel anheften (Sigal et al. 2015). Zudem wird die chemische Barriere des niedrigen pHs im Magen dadurch umgangen, dass ein Protonen-Pumpen-System die schädliche Wirkung des niedrigen pHs ausgleicht. Außerdem gibt es, wie beschrieben, einige Virulenzfaktoren, die über das Sekretionssystem Typ IV direkt in die Wirtszelle eingeschleust werden. Der Virulenzfaktor CagA verursacht hierdurch Zell-Polaritätsveränderungen (Amieva und Peek 2016), sowie Proliferations- und Migrationsveränderungen (Bagnoli et al. 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass andere Virulenzfaktoren den Stammzellphänotyp der Zellen beeinflussen (Sigal et al. 2015), die Immunantwort blockieren (Morey et al. 2018) und DNA-Doppelstrangbrüche begünstigen können (Koeppel et al. 2015). Ein weiteres Beispiel für ein Bakterium, das direkt mit dem Epithel interagiert, ist *F. nucleatum*. Als opportunistischer Teil der Mikrobiota ist es symbiontischer Bestandteil des oralen Mikrobioms und kann jedoch auch Infektionen zum Beispiel in Gastrointestinal- oder Urogenitaltrakt auslösen (Rubinstein et al. 2013, Brennan und Garrett 2019, Zepeda-Rivera et al. 2024). Mithilfe des Virulenzfaktors FadA heftet es sich an das Epithel. Hierbei beeinflusst FadA die β -Catenin Aktivierung und das Tumorwachstum in CRC-Zelllinien. FadA bindet E-Cadherin und stimuliert Zellproliferation, wenn bereits eine Mutation in *Catenin Beta 1* oder *APC* vorhanden ist (Rubinstein et al. 2013).

Mikrobielle Einflussfaktoren

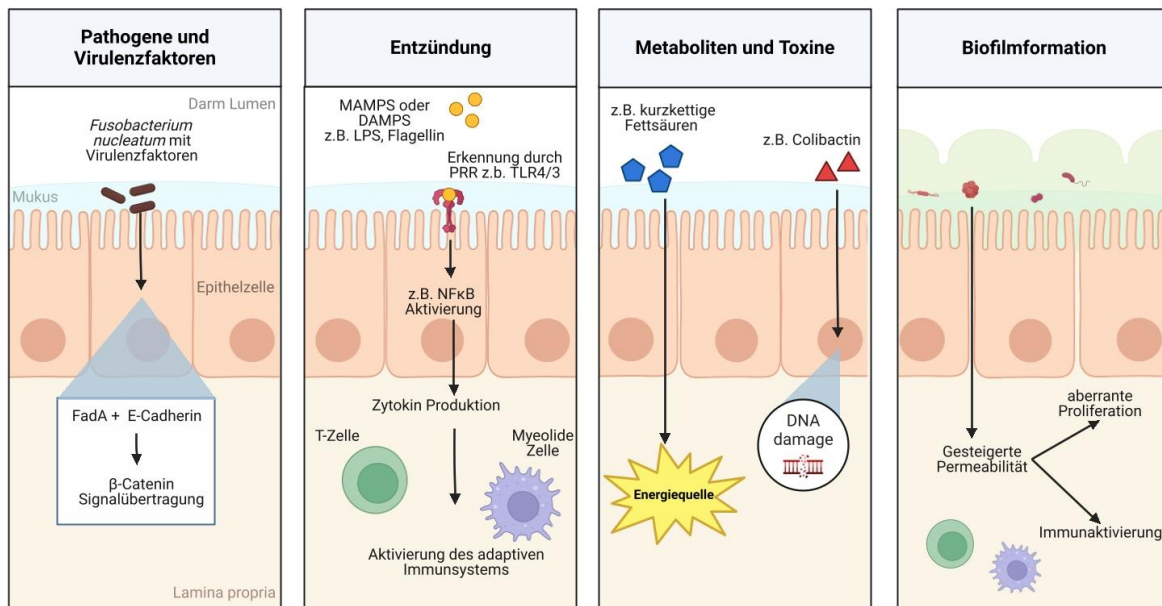


Abbildung 1.3: Mikrobielle Einflussfaktoren auf die Entwicklung von CRC

Die Abbildung veranschaulicht diverse Wirkmechanismen, durch welche die Mikrobiota das Darmepithel beeinflusst. Hierzu zählen Virulenzfaktoren, Entzündung, Genotoxine, Metabolite und die Bildung von Biofilmen. Die Faktoren können das Darmepithel und seine Homöostase, sowie Initiation und Progression des kolorektalen Karzinoms (CRC) positiv oder negativ beeinflussen. Die Erforschung dieser Mechanismen ist von großer Bedeutung für das Verständnis der Interaktionen zwischen Mikrobiota und Wirt und der kausalen Zusammenhänge. Diese Grafik wurde mit BioRender mit Ergänzungen nach (Iftekhar und Sigal 2018) erstellt.

Zu weiteren Virulenzfaktoren von Pathogenen zählen Genotoxine, die Bakterien produzieren und so auf direktem oder indirektem Wege Mutationen in der DNA hervorrufen können. Colibaktin ist ein Beispiel für ein Toxin von Polyketid-Synthase (PKS) positiven *Escherichia coli* Stämmen, wird aber teils auch bei anderen Bakterien der Familie Enterobacteriaceae gefunden. In Fäkalproben von gesunden Menschen aus Ländern mit hohem Einkommen ist bei 30 - 50 % der Stämme die PKS-Pathogenitätsinsel zu finden, die für das Toxin codiert (Cuevas-Ramos et al. 2010). Colibaktin ist ein Komplex aus einem Polyketid mit einem nicht-ribosomalem Protein. Es führt zur Vergrößerung der Wirtszelle, induziert durch direkte DNA-Bindung Doppelstrangbrüche und führt zum Zellzyklusarrest (Cuevas-Ramos et al. 2010, Secher et al. 2013, Coughnoux et al. 2014). Außerdem kann *E. coli*, welcher die PKS-Pathogenitätsinsel besitzt, die Tumorentwicklung in einem entzündungsgetriebenen Milieu fördern (Arthur et al. 2014). Die Untersuchung weiterer neuer Polyketide und Nicht-Ribosomaler-Proteine und deren Wirkung auf Krebszellen ist Bestandteil aktueller wissenschaftlicher Untersuchung (Hohmann et al. 2024).

Neben direkten Virulenzfaktoren beeinflussen auch mikrobielle Metaboliten die Wirtszellen. Dies kann auf positive und negative Weise geschehen. So entstehen, wie

bereits oben kurz aufgeführt, beispielweise durch Fermentation von komplexen Kohlenhydraten kurzkettige Fettsäuren, wie Acetat, Butyrat und Propionat als häufigste Fermentationsprodukte im menschlichen Verdauungstrakt (den Besten et al. 2013, Louis et al. 2014). Butyrat ist die Hauptenergiequelle der Kolonzellen und beeinflusst das mukosale Immunsystem, führt zur Reduktion proinflammatorischer Zytokine und zur Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (Fung et al. 2012, Furusawa et al. 2013). Allerdings stellen einige Bakterien auch schädliche Metabolite her, wie zum Beispiel N-Nitrosoverbindungen, sekundäre Gallensäuren oder Schwefelwasserstoff, die zu Alkylierung und Schäden der genomischen DNA führen (O'Keefe 2016, Cheng et al. 2020). Einen wichtigen Einflussfaktor auf Metaboliten stellt die Ernährung da, die direkt die taxonomische Zusammensetzung und Diversität der Darmbakterien beeinflusst (Cheng et al. 2020).

Außerdem wurde beschrieben, dass das Darmkrebsrisiko bei der Bildung von bakteriellen Biofilmen erhöht ist. Ein möglicher vorgeschlagener Mechanismus ist die Erhöhung der Permeabilität der Darmschleimhaut und die daraus folgende Translokation von mikrobiellen Molekülen, sogenannten MAMPs (microbial associated molecular pattern), mit folgender Aktivierung des innate Immunsystems und gleichzeitig gesteigerter Proliferation der Epithelzellen (Dejea et al. 2014).

Die Modulation des Immunsystems stellt einen großen Faktor in der Wechselwirkung zwischen Wirt und Mikrobiota dar und spielt auch im Zusammenhang mit der Krebsentstehung eine wichtige Rolle. So kann das Immunsystem direkt über Virulenzfaktoren durch Bakterien manipuliert werden. *F. nucleatum* kann über die Interaktion von Fap2 mit dem Immunzellrezeptor TIGIT direkt Immunzell- Aktivitäten inhibieren (Gur et al. 2015, Casasanta et al. 2020), jedoch auch über die Rekrutierung von Immunzellen ein proinflammatorisches Milieu erschaffen, welches das Fortschreiten kolorektaler Neoplasien begünstigt (Kostic et al. 2013). Hierbei können Tumorzellen bestimmte Zytokine durch Exposition mit Bakterien produzieren, welche folglich zur Rekrutierung spezifischer Immunsubpopulationen führen. Beispielsweise fördert ein Milieu bestehend aus CCL5, CXCL9 und CXCL10 Immunsignaturen bestehend aus zytotoxischen T-Lymphozyten und T-Helfer (T_{H1}) Zellen (Cremonesi et al. 2018). Zudem wurde gezeigt, dass eine Infektion mit *H. pylori* über Veränderungen der Immunsignatur mittels der Reduktion von regulatorischen T-Zellen und proinflammatorischen T-Zellen die Tumorentwicklung in Darmkrebs-Mausmodellen vorantreibt (Ralser et al. 2023). Abgesehen von der gezielten Manipulation des Immunsystems durch Virulenzfaktoren erkennt das Immunsystem über Mustererkennungs-Rezeptoren (pattern-recognition receptors; PRRs) mikrobielle (MAMPS) oder endogene Gefahrensignale (DAMPS, danger associated molecular patterns) und generiert eine Immunantwort (Rubartelli und Lotze 2007, Kumar et al. 2011). Es wurde beschrieben, dass Mustererkennungsrezeptoren und deren Adapterproteine eine Rolle in der Krebsentwicklung spielen. So konnte gezeigt werden, dass MyD88, das Adapterprotein, welches die Signalübertragung von allen Toll-like-rezeptoren (TLR) außer TLR3 einleitet, der onkogene Eigenschaften aufweist (Rakoff-Nahoum und Medzhitov 2007, Holtorf et al. 2018).

Sowohl einzelne bakterielle Spezies als auch das Vorhandensein von Mitgliedern bestimmter bakterieller Phyla können den Wirt beeinflussen und die Tumorentstehung oder Entwicklung über verschiedene Methoden manipulieren. Aus diesem Grund besteht die Hoffnung, dass Mikrobiom-Veränderungen als Screeningmethode zur Früherkennung und Diagnose zukünftig eingesetzt werden könnte (Zeller et al. 2014).

Mögliche Parameter zur Beschreibung der Mikrobiota, neben der Analyse einzelner Taxa, sind α -Diversität und β -Diversität. Die α -Diversität oder auch Punktdiversität beschreibt die Artenvielfalt innerhalb einer Gruppe, also wie viele verschiedene Organismen in einem Lebensraum vorhanden sind. Hierbei fokussiert sich die *effektive Richness* lediglich darauf, wie viele verschiedene Taxa vorhanden sind. Dahingegen gehen weitere Indizes, wie *Simpson effective* oder *Shannon effective*, zusätzlich auf die relative Verteilung der verschiedenen Taxa ein. Zudem wird die β -Diversität betrachtet, welche zwei Gruppen mit zum Beispiel unterschiedlicher Behandlung oder unterschiedlicher Ausprägung eines Markers, wie TLR3, miteinander vergleicht und deren Varianz voneinander untersucht.

Auch für den Behandlungserfolg spielt die Mikrobiota eine Rolle, da durch Chemotherapeutika ein Eindringen der Bakterien zur Aktivierung einer anti-tumoralen Immunantwort durch bestimmte T-Helfer Lymphozyten führt (Viaud et al. 2013) oder sich die Verwendung von Antibiotika auf den Therapieerfolg auswirkt (Derosa et al. 2021). Demnach spielt das Mikrobiom sowohl bei der Entstehung und Progression von Darmkrebs als auch bei der Diagnostik und den diversen Behandlungsmöglichkeiten eine Rolle.

1.6 Mustererkennungsrezeptoren und deren Rolle in CRC

1.6.1 Toll-Like-Rezeptoren: Ein Überblick

Die Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind eine Untergruppe der Mustererkennungsrezeptoren. Sie erkennen Gefahrensignale und aktivieren Entzündungsmechanismen zur Bekämpfung unerwünschter Eindringlinge. TLRs befinden sich als Transmembranproteine entweder auf der Plasmamembran, wie TLR4 oder TLR5, oder in Membranen der Endosomen, wie die Nukleinsäuren-erkennenden Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9. Diverse Zelltypen exprimieren TLRs, darunter natürlich innate Immunzellen, aber auch Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen. Speziell TLR3 ist in myeloiden Immunzellen vorhanden, wie Makrophagen oder Dendritische Zellen, aber auch in Neuronen und anderen Zellen des Zentralen Nervensystems, sowie in Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen (Town et al. 2006, Matsumoto und Seya 2008, Sivori et al. 2014, Muresan et al. 2020, Tavora et al. 2020). In myeloid-dendritischen Zellen ist TLR3 ausschließlich intrazellulär vorhanden (Matsumoto et al. 2003); wohingegen in Fibroblasten, Makrophagen und Epithelzelllinien sowohl oberflächliche als auch intrazelluläre Lokalisation von TLR3 beschrieben wurde (Matsumoto et al. 2002,

Muresan et al. 2020). In Krebszellen wurde TLR3 auch schon auf der Oberfläche nachgewiesen und eine veränderte Lokalisation der TLRs kann zu geänderter Signalaktivierung und Weiterleitung führen (Leifer und Medvedev 2016).

TLR Signalübertragung

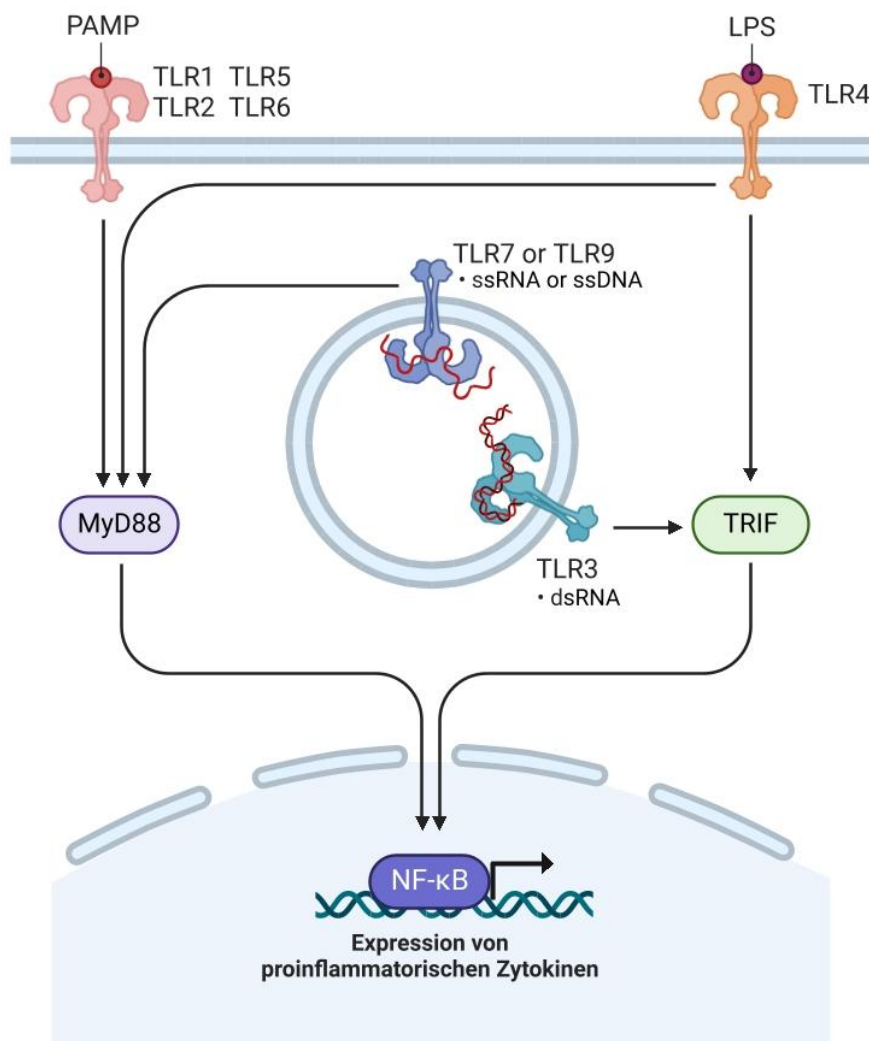


Abbildung 1.4: Toll-like Rezeptor Signalübertragung

Die Signalübertragung von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) wird nach Stimulation mit Pathogen-assoziierten-Molekülen sogenannten PAMPs (pathogen-associated-molecular-pattern), wie zum Beispiel Lipopolysaccharid (LPS), Flagellin oder die Stimulation von TLRs durch einzelsträngige (ss) oder doppelsträngige (ds) Nukleinsäuren ausgelöst. Sie führt zur Aktivierung der Signalweiterleitungs-Moleküle MyD88 und/oder TRIF. Alle TLRs außer TLR3 verwenden MyD88 als Adapterprotein. TLR4 benutzt sowohl MyD88 als auch TRIF. Die Aktivierung der TLR-Signalwege führt zur Translokation von Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel „nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“ (NFκB) oder „interferon regulatory factors“ (IRFs) (hier zur Vereinfachung weggelassen). Die Transkriptionsfaktoren führen zur Expression von Interferonen oder pro-Inflammatorischen Zytokinen, welche eine Abwehrreaktion gegen das jeweilige Gefahrensignal auslösen. Diese Grafik wurde mit einer BioRender Vorlage vereinfacht nach (Kawai und Akira 2006, Leifer und Medvedev 2016) erstellt.

Die Lokalisation von TLR1, 2 4 und 5 in der Darmschleimhaut wurde vor allem in Intestinalen Epithelzellen (IEC) des proximalen Kolons beschrieben, wohingegen TLR3 gleichermaßen in Dünn- und Dickdarm vorhanden ist (Price et al. 2018). In IEC ist TLR3 auf der dem Darmlumen abgewandten Seite, also basolateral polarisiert (Stanifer et al. 2020).

Die Bindung von MAMPS oder DAMPS wie Lipopolysaccharid (LPS), DNA oder Nukleinsäuren findet über Ekto-Domänen mit multiplen Leucin-reichen Sequenz-Wiederholungen (Leucin-rich-repeats; LRR) statt, welche eine hufeisenförmige Schleifen-Struktur bilden (Leifer und Medvedev 2016); Diese Domäne bindet Liganden, wie im Fall von TLR3 doppelsträngige RNA, bei TLR4 LPS oder bei TLR5 Flagellin. Im Falle von TLR3 findet die Erkennung von dsRNA an zwei Stellen der konkaven Dimerisierungsoberfläche von zwei TLR3 Molekülen statt. Neben der Erkennungs- und Transmembrandomäne beinhaltet jeder TLR auch die intrazelluläre Toll-interleukin-Rezeptor (TIR) Signalweiterleitungsdomäne (Bell et al. 2006). Die TIR-Domäne bindet intrazellulär an Adaptermoleküle, um das Signal weiterzuleiten. Alle TLRs, außer TLR3, sind hier von MyD88 in Kombination mit anderen Molekülen wie TRAM, TIRAP abhängig. TLR3 Signalübertragung ist allein von Trif (TICAM1) abhängig (Kawai 2006). In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass MYD88 abhängige TLR-Aktivierung, durch Erhöhung der epithelialen Erneuerung und erhöhte Aktivierung des Immunsystems, sowie einem stärkeren stammzellartigen Charakter der Tumorzellen, einen zelltyp-abhängigen tumorfördernden Effekt aufweist (Holtorf et al. 2018). Der Effekt von Trif abhängiger TLR3 Aktivierung wird momentan jedoch kontrovers diskutiert. Aus diesem Grund richtet sich der Fokus dieser Arbeit auf die Rolle des TLR3 in der Krebsentstehung und Progression.

1.6.2 TLR3 Signalweiterleitung

TLR3 aktiviert die Transkriptionsfaktoren IRF3, NFκB und AP-1, wodurch eine Immunreaktion ausgelöst wird und folglich Typ-I-interferone wie IFNβ, und inflammatorische Zytokine und Chemokine exprimiert werden. Ausgelöst wird die Aktivierung durch Bindung von dsRNA mit einer Mindestlänge von 40 bp (Leonard et al. 2008). Hierdurch kommt es zu einer Homodimerisierung des Rezeptors und zur Phosphorylierung der Aminosäurereste Tyr759 und Tyr858 (Sarkar et al. 2004), welche sich in der Signalweiterleitungsdomäne TIR befinden. Infolgedessen bindet das Adapterprotein Trif und rekrutiert den Tumor-Nekrose-Faktor (TNFR)-assoziierten Faktor 3 (TRAF3), über den wiederum die Kinasen TBK1 (TANK binding kinase 1) und PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) zur Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 und zur Produktion von Interferonen führen. Alternativ kann durch Phosphorylierung von Y759 der TNFR-assoziierte Faktor 6 (TRAF6) aktiviert werden. TRAF6 interagiert mit dem Rezeptor Interagierendem Protein 1 (RIP1) und führt zur Aktivierung von NFκB und zur Produktion inflammatorischer Zytokine. TLR3 kann

demnach über die Nutzung beider nachgeschalteter Signalwege, sowohl *NFκB*-Gentranskription als auch Typ-1-Interferone induzieren. TLR3 selbst wird teilweise proteolytisch gespalten, es ist jedoch umstritten, ob die Spaltung für die Signalübertragung oder Erkennung verschiedener dsRNA notwendig ist (Ewald et al. 2011, Garcia-Cattaneo et al. 2012, Toscano et al. 2013, Fitzgerald und Kagan 2020).

TLR3 Signalübertragung

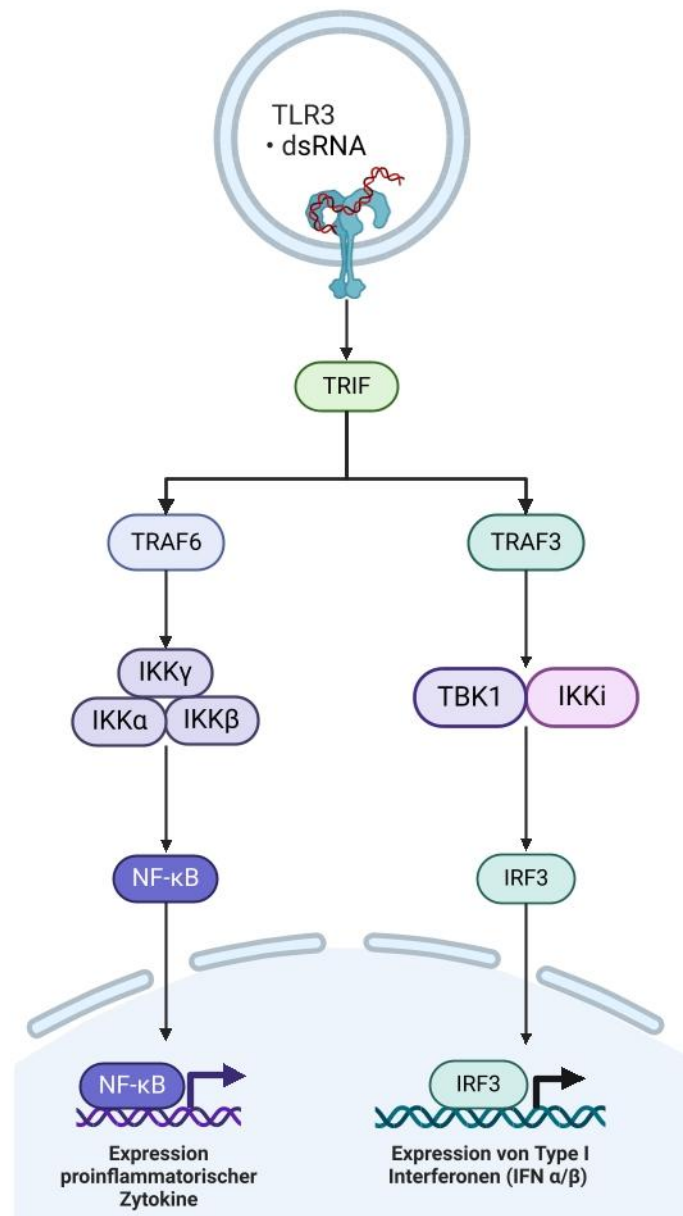


Abbildung 1.5: Signalweiterleitung des TLR3 Signalwegs

Die Aktivierung von TLR3 durch doppelsträngige (ds) RNA führt zur Signalweiterleitung über das Adapterprotein TRIF zu zwei möglichen Signalwegen. Entweder wird TRAF3 aktiviert, was zu einer TBK1 abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 und zur Expression von Interferonen des Typs I führt oder TRIF assoziiert mit TRAF6 und aktiviert den *NFκB*-Signalweg und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Diese Grafik wurde mit BioRender vereinfacht nach (Kawai und Akira 2006, Leifer und Medvedev 2016) erstellt.

1.6.3 Der TLR3 Signalweg bei Darmkrebs

Wie zuvor erwähnt, wird die Rolle von Myd88 als Signaladapterprotein der TLRs in der Literatur übereinstimmend als tumorfördernd eingestuft. Die Rolle von TLR3, der allein von Trif-Signalweiterleitung abhängig ist, wird jedoch noch durchaus kontrovers diskutiert. Die Expression von TLR3 in verschiedenen Krebsarten wurde sowohl als prognostisch gut als auch als schlecht beschrieben (Muresan et al. 2020). So wurde gezeigt, dass TLR3 zur Aktivierung von Onkogenen führen kann (Scatozza et al. 2020, Matissek et al. 2022, Matissek et al. 2023). Gleichzeitig wurde aber auch in Leber, Brust- und nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom TLR3 als Tumorsuppressor beschrieben (Yuan et al. 2015, Fan et al. 2019, Bianchi et al. 2020).

Als Mechanismen, durch welche eine den Tumor -fördernde oder -hemmende Wirkung von TLR3 ausgelöst wird, wurden laut Muresan und Kollegen die Aktivierung von Apoptose, Veränderungen in der Differenzierung, Metastasierung und Immunstimulation vorgeschlagen, sowie Effekte auf das Therapieansprechen postuliert (Muresan et al. 2020).

Nicht maligne transformierte intestinale epitheliale Zellen zeigen eine Caspase-3 und -8 abhängige Apoptose (McAllister et al. 2013) nach Stimulation mit TLR3 Liganden. Übereinstimmend damit zeigen *in vivo* Experimente mit knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen eine Caspase-8 abhängige Induktion von Apoptose durch TLR3 Stimulation (Hidalgo-Sastre et al. 2021). Betrachtet man entartete Zellen verschiedener Tumorentitäten, sieht man allerdings ein komplexeres Bild. So konnte in Brust-, Lungen- und Prostatakrebszelllinien gezeigt werden, dass TLR3 die Expression von pro-apoptotischen Zytokinen auslöst und zum Absterben der Zellen führt (Salaun et al. 2006, Harashima et al. 2012, Bianchi et al. 2020). Dagegen war bei Darmkrebs-Zelllinien die Viabilität durch Stimulation von TLR3 nicht oder nur gering beeinträchtigt (Bugge et al. 2017). In Proben von an Leberkarzinom erkrankten Personen konnte eine positive Korrelation von TLR3 mit der Expression von Caspase 3, 8 und 9, sowie mit Apoptose festgestellt werden (Yuan et al. 2015). Im Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse von Yoneda und Kollegen, die keinen direkten Effekt von TLR3 Stimulation auf die Viabilität der Zellen des hepatozellulären Karzinom feststellen konnten, jedoch eine Immunaktivierung nahelegten (Yoneda et al. 2008). Fraglich bei den genannten Korrelationen, die durch histologische Analysen durchgeführt wurden, ist allerdings, ob es sich um einen direkten Effekt von TLR3 in Krebszellen handelt, oder um einen Krebszell-unabhängigen Effekt, der beispielsweise über Immunaktivierung wirkt. Eine TLR3-abhängige Immunaktivierung und Produktion von Zytokinen wurde in diversen Zelllinien beschrieben und wird teils schon in der Therapie angewendet (Bugge et al. 2017, De Waele et al. 2018). Folglich ist die Rolle von TLR3 uneindeutig und sollte vor allem zelltypspezifisch betrachtet werden.

1.6.4 Die Wechselwirkung zwischen TLR und Mikrobiota

Die Auswirkung von TLR3 scheinen divers, gewebsspezifisch und abhängig von verschiedenen Zelltypen zu sein. Es wurde interessanterweise gezeigt, dass die Art der Stimulation von TLR3 in Geweben durch unterschiedliche Liganden eine Rolle spielen könnte. So wurde beschrieben, dass TLR3 sowohl von endogener dsRNA aus endogenen, im humanen Genom integrierten retroviralen Viren (ERV) als auch durch exogene dsRNA des Mikrobioms, zum Beispiel durch *Laktobazillen*, stimuliert werden können (Kawashima et al. 2018, Tavora et al. 2020, Krenz et al. 2021). Tavora und Kollegen beschreiben, dass in metastasierenden Zelllinien mehr dsRNA vorhanden ist, möglicherweise durch eine stärkere Aktivierung der ERVs. Außerdem ist es naheliegend, dass Tumore mit starker Exposition zur Mikrobiota, wie es bei Darmtumoren der Fall ist, stärker durch dsRNA von Bakterien stimuliert werden könnten. Für andere TLRs wurde bereits gezeigt, dass sie wichtig für die Erhaltung der Homöostase zwischen Bakterien und Wirt sind. Generell ermöglicht der Kontakt von mikrobiellen Faktoren und TLRs eine lokale Immunantwort. So wird die Sekretion antimikrobieller Faktoren beeinflusst und Epithelzellen, speziell Paneth Zellen, können so über eine Aktivierung von TLR2 die Produktion antimikrobieller Defensine regulieren (Kaur und Ali 2022). Außerdem können TLRs die Expression von „tight junction“ Molekülen und somit die intestinale Barriere und Gewebsintegrität schützen (Kaur und Ali 2022). Auch die Proliferation von Intestinalen Epithelialen Zellen (IEC) wird durch TLR Signalwege und die Mikrobiota beeinflusst. Myd88 defiziente IEC zeigen verstärkte Proliferation (Rakoff-Nahoum et al. 2004) und keimfreie Mäuse, bei denen die Stimulation durch bakterielle Mikrobiota komplett fehlt, zeigen eine reduzierte Proliferation der IECs, wie bereits in einer klassischen Arbeit beobachtet wurde (Abrams et al. 1963). Zudem stellen TLRs eine Verbindung des innaten mit dem adaptiven Arm der Immunantwort dar. So werden zum Beispiel durch Überexpression von TLR4 die Anzahl der IgA produzierenden Zellen in der Lamina Propria des Darms erhöht. Dadurch werden mehr antimikrobielle Immunglobuline produziert (Shang et al. 2008). Neben B- Zellen ist auch die Proliferation und Differenzierung von regulatorischen T-Zellen durch das Mikrobiom beeinflusst (Kaur und Ali 2022).

Der Verlust von TLRs, etwa durch somatische Mutationen oder Herabregulation im Tumorkontext, kann demnach möglicherweise die vorhandene mikrobielle Komposition beeinflussen, welche sich möglicherweise in veränderten Wechselwirkungen zwischen der Mikrobiota, den Epithelzellen und der lokale Immunaktivierung niederschlagen. Diese Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit mit neuartigen, genetisch definierten Mausmodellen in vivo überprüft werden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit wird zum einen das komplexe Zusammenspiel zwischen dem Darm-Mikrobiom, dem kolorektalen Karzinom und dem Mustererkennungsrezeptor TLR3 erörtert. Zum anderen wird der Einfluss des Darm-Mikrobioms bei der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie beleuchtet.

Im ersten Teil wird zunächst das Augenmerk auf die Rolle von TLR3 bei Darmkrebs gelegt und der vermutete tumorsuppressive Effekt von TLR3 anhand mehrerer unabhängiger Versuchsansätze untersucht. Zum Einsatz kommen zellbasierte, humane in vitro Modelle, genetische Mauslinien und Patientengewebe. Folgend wird es um die mechanistische Aufklärung der zelltyp-spezifischen anti-tumorigenen Rolle von TLR3 gehen und letztlich werden die Einflüsse von TLR3 auf das Darm-Mikrobiom betrachtet, um eventuelle prognostische oder interventionelle Möglichkeiten abhängig von der TLR3 Ausprägung zu erforschen.

Das Ziel des zweiten Teiles dieser Arbeit liegt darin, die mutmaßliche Bedeutung der Darm-Mikrobiota nach partieller Hepatektomie zu erforschen. Im Besonderen liegt hier das Augenmerk auf der Leberregeneration nach einem chirurgischen Eingriff und dem Einfluss der Mikrobiota auf den Lipidstoffwechsel der Leberzellen. Hier wird untersucht, wie von der Mikrobiota produzierte Metaboliten vom Wirt genutzt werden können, um letztlich das postoperative Überleben und die Genesung nach partieller Hepatektomie zur Entfernung von Metastasen im klinischen Kontext verbessern zu können.

2 Material und Methoden

2.1. Methoden

2.1.1. Molekularbiologische Methoden

2.1.1.1 RNA-Isolation

RNA wurde mithilfe des Qiagen RNeasy Mini Kits nach Angaben des Herstellers isoliert. Zu gefrorenem Gewebe wurde 750 μl TriReagent und eine Metallkugel hinzugegeben und bei einer Frequenz von 30 s^{-1} bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 3 Minuten homogenisiert. Anschließend wurden 200 μl Chloroform hinzugegeben und die Proben gevortext, bis denaturierte Proteine als weißes Präzipitat ausfielen. Die Suspension wurde bei 13523 g für 15 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 350 μl 70 % Ethanol gemischt. Zellen wurden zuerst mit PBS gewaschen und mittels auf und ab pipettieren und Zugabe von RLT-Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol lysiert. Zelllysate wurden 1:1 mit 70 % Ethanol gemischt. Das Zelllysate- oder Gewebe-Ethanol-Gemisch wurde auf eine RNeasy Säule geladen und bei 9391 g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 350 μl RW1 Puffer gewaschen. DNA wurde durch 15-minütige Inkubation mit DNase in 70 μl RDD Puffer verdaut. Anschließend wurden 350 RW1 Puffer hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Verbleibende Abbauprodukte wurden durch zweifaches Waschen mit 500 μl RPE-Puffer entfernt. Anschließend wurden die Säulchen für eine Minute bei 18407 g leer zentrifugiert, um Pufferreste zu entfernen. Die isolierte RNA wurde mit 30 μl $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen RNAase freiem Wasser für eine Minute inkubiert und durch einminütige Zentrifugation bei 18407 g eluiert. RNA-Konzentration und Reinheit wurde mittels Nanodrop (Nanodrop Technologies, USA) Messung bestimmt. Proben wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.1.1.2 Reverse Transkription und quantitative real time PCR (RT-qPCR)

Zur Analyse der relativen Ausprägung von Genen auf mRNA-Ebene wurde mRNA revers-transkribiert. Hierzu wurde 1 μg RNA mit einer Mischung aus Random-Hexamer-Primer und Oligo(dT)-Primern für 10 Minuten bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch kurz auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und Puffer der reversen Transkriptase, dNTPS, RNase-Inhibitoren, sowie die reverse Transkriptase hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend bei $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 60 Minuten inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 Minuten inaktiviert. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsgemisches ist in Tabelle 2.1 angegeben. cDNA-Proben wurden kurzzeitig auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und langfristig bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 2.1: Pipettierschema der Reversen Transkription

Reagenzien	Konzentration	Volumen [μl]
RNA	100 ng/ml	10
Random Hexamer Primer	1,33 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,5
Oligo(dT) Primer	5 μM	0,5

Reverse Transcription Buffer	5 X	4
dNTPs	10 mM	1
RiboLock RNase Inhibitor	40 U/μl	0,5
RevertAid H Minus MMLV Reverse Transcriptase	200U/μl	1
ddH ₂ O		2,5

Zur Ausprägungsanalyse wurde eine RT-qPCR mithilfe des Biozym Blue Probe qPCR Kits (SYBR) oder des LightCycler 480 Probes Master von Roche mit der Universal Probe Library (UPL) durchgeführt. Die Pipettierschemata und Programme für die verschiedenen Anwendungen sind in Tabelle 2.2 und Tabelle 2.3 dargestellt. Primer mit Spezifikation der Anwendung sind in Tabelle 2.9 eingetragen. Duplikate aller Proben wurden im LighCycler480 gemessen und auf eine Housekeeping Kontrolle normalisiert.

Tabelle 2.2: Pipettierschema der RT-qPCR

Reagenz	Volumen [μl]
SYBR RTqPCR	
Biozym Blue Probe qPCR Master Mix	10
Primer forward (20μM)	0,4
Primer revers (20μM)	0,4
H ₂ O	5,2
cDNA-Probe	4
UPL RTqPCR	
LightCycler 480 Probes Master Mix	10
Primer forward (20μM)	0,2
Primer revers (20μM)	0,2
H ₂ O	4,4
UPL-Sonde	0,2
cDNA-Probe	5

Tabelle 2.3: Zyklen des RT-qPCR Programms

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anstiegsrate [°C/s]	Wiederholungen
SYBR RTqPCR			
95	300	4,4	1 X
95	10	4,4	45 X
60	10	2,2	
72	10	4,4	
95	5	4,4	1 X
65	60	2,2	1 X

97	Bis 97 °C erreicht	1,1	1 X
40	30	2,2	1 X
UPL RTqPCR			
95	600	4,4	1 X
95	10	4,4	45 X
60	30	2,2	
72	1	4,4	
40	30	2,2	1 X

2.1.1.3 RNA-Sequenzierung

Zökuminhalt für 16S-rRNA-Sequenzierung wurde wie beschrieben aufbereitet und analysiert (Reitmeier et al. 2020). Hierzu wurden DNA-Stabilisator zu gefrorenem Zökum zugegeben und die Proben wurden aufgetaut und homogenisiert. Zu 600 µl der Probe wurden 250 µl 4 M Guanidiniumthiocyanat und 5 %-N-Lauroylsarcosin hinzugegeben. Anschließend wurde die Suspension für 60 Minuten bei 70 °C und 700 rpm inkubiert. Der mechanische Aufschluss der Zellen erfolgte mithilfe von Precellys Tissue Homogenizing CKMix Tubes (Bertin Technologies, Frankreich) für zweimal 30 Sekunden bei einer Frequenz von 5 s⁻¹. Phenole wurden durch Zugabe von 15 mg Polyvenylpyrrolidone abgefangen. RNA wurde mit Ribonukleasen entfernt. Hierfür wurde die Mischung 20 Minuten bei 37 °C und 99 µg/ml RNase A (Thermo Fisher, USA) bei 700 rpm inkubiert. Zur Aufreinigung der DNA wurde das NucleoSpin gDNA Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Deutschland) verwendet. Hierbei wurde das Volumen des Bindungspuffers verdoppelt, um ein Verstopfen des Säulchens zu verhindern. Die genomische DNA-Konzentration wurde mit einem Spektralphotometer (Nanodrop Technologies, USA) quantifiziert. Die Schritte der Amplifizierung für die 16S-rRNA-Sequenzierung wurden in der Mikrobiom Sequenzierungs-Corefacility in Freising durchgeführt. In diesen Schritten wurde eine Amplikonbibliothek durch PCR auf Basis der V3-V4-Region der genomischen 16S-rRNA erstellt, gefolgt von Amplikonaufreinigung, Verdünnung und Sequenzierung durch Illumina MiSeq. Die Datenanalyse erfolgte durch integrierte mikrobielle „next-generation“ Sequenzierung (IMNGS) und Rhea.

RNA Sequenzierung wurde, wie in Abschnitt RNA-Isolation beschrieben, isoliert und Qualitätskontrolle für bulk-RNA-Sequenzierung wurde mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Die Sequenzierung und weitere Qualitätskontrollen wurden von Eurofins durchgeführt.

2.1.1.4 Isolation genomischer DNA und DNA-Gelelektrophorese

Genomische DNA wurde mithilfe des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Kurz zusammengefasst wurden die Proben zunächst mit Proteinase K lysiert und anschließend auf die Säulchen zur Aufreinigung geladen. Nach mehrmaligem waschen wurde die DNA mit destilliertem Wasser eluiert

und die Konzentration mittels Nanodrop gemessen. Die DNA-Integrität wurde über Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurde ein 0,7 -1,5 %iges Agarose Gel in TAE-Puffer hergestellt. Dem Gel wurden 4 µl auf 100 ml Ethidiumbromid zugegeben, um eine Detektion der Banden zu ermöglichen. Die Auftrennung fand bei 80 – 120 V für 20 bis 40 Minuten statt. Banden wurden im UVP GelSolo (Analytik Jena, Deutschland) visualisiert.

2.1.1.5 Proteinisolation und Immunoblot

Zellen wurden kultiviert, wie in Zellkulturmethoden beschrieben, und vor der Proteinernte mit PBS gewaschen, um tote Zellen und Proteine aus dem Medium zu entfernen. Die Zellen wurden mit 150 - 300 µl SDS und Protease-inhibitor-haltigem RIPA-Puffer lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Schaber von der Petrischale abgelöst. Gewebeproben wurden zunächst auf Trockeneis abgewogen. Zu 30 – 50 µg Gewebe wurde 300 µl Protease-inhibitor-haltigem RIPA-Puffer zugefügt und mit einer Metallkugel für 3 Minuten in einem Tissue Lyser bei einer Frequenz von 30 s⁻¹ homogenisiert. DNA und verbleibende Membranen wurden 5 Minuten bei 4 °C mit Ultraschall aufgebrochen. Zelltrümmer wurden durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 21130 g und 4 °C sedimentiert und das Proteinlysate wurde durch vorsichtiges Abnehmen des Überstands entfernt. Lämmli-Puffer wurde hinzugefügt und die Proteine für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Proteinmenge wurde mittels Pierce BCA Protein Assay Kit analysiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Proteine wurden nach Größe mithilfe von Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Es wurde ein System mit unterbrochener SDS-PAGE verwendet, das aus einem Sammel- und einem Trenngel besteht. Die genaue Zusammensetzung der beiden Gele ist in Tabelle 2.4 dargestellt. Die Proben wurden bei einer Spannung von 80 V aufkonzentriert bis sie den Übergang zum Trenngel erreicht hatten, anschließend wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

Tabelle 2.4: SDS-PAGE Gel Zusammensetzung

Reagenz	Volumen [ml]
Trenngel 10 % 20 ml	
Acrylamid	6,7
Tris 1,5 M (pH = 8,8)	5,0
H ₂ O	7,9
SDS	0,2
TEMED	0,008
APS	0,2
Sammelgel 8 ml	
Acrylamid	1,3
Tris M pH	1,0
H ₂ O	5,5
SDS	0,08
TEMED	0,008
APS	0,08

Zur Analyse spezifischer Proteine mittels eines Immunoblots wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurde das in Transferpuffer getränkte SDS-PAGE-Gel und Nitrocellulosemembran zwischen Filterpapier gelegt. Die Proteine wurden mit einer halbtrockenen Transferzelle bei 120 mA für 1,5 Stunden übertragen. Anschließend wurde die Membran eine Stunde mit 5 %-iger Milch in PBS-T blockiert, um unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Zur Detektion des Zielproteins wurde die Membran mit primärem Antikörper gegen das jeweilige Zielprotein in 5 %-iger Milch in PBS-T oder 5 %-igem BSA in PBST bei 4 °C über Nacht inkubiert (Antikörper Tabelle 2.10). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T für je mindestens 10 Minuten wurde die Membran in einer 1:4000-Verdünnung des sekundären Antikörpers, welcher an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, in 5 % Milch in PBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Nach drei abschließenden Waschschritten mit PBS-T für jeweils 10 Minuten wurde das Pierce ECL Western Blotting Substrat auf die Membran gegeben, und die Chemilumineszenz mit dem mit dem UVP Chemstudio Imaging System touch 815 (Analytic Jena, Deutschland) detektiert.

2.1.1.6 Lipidom Analysen

Lipidommessungen und Analysen wurden von Josef Ecker und Johannes Plagge durchgeführt, wie im Detail in der Publikation beschrieben (Yin und Sichler et al. 2023). Die Extraktion der Lipide erfolgte in Gegenwart nicht-natürlich-vorkommender Lipidspezies als interne Standards nach dem Protokoll von Bligh und Dyer (Bligh und Dyer 1959). Zur Quantifizierung wurde eine Fließinjektionsanalyse mit Elektrospray-Ionisierung Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) im positiven-Ionen-Modus angewendet. Stabiles-isotopengelabeltes [D9]-Cholin und [D4]-Ethanolamin wurden in 0,2 ml steriler NaCl-Lösung (0,9 %) mittels i.p. Injektion zwei Stunden vor der Probenentnahme verabreicht. Isotopenüberlappung der Lipidspezies wurde mittels selbstprogrammierten Excel-Makros korrigiert und die Quantifizierung wurde mit Hilfe von Kalibrierungslinien durchgeführt. Bei Glycerophospho-Arten wurden die Annahme getroffen, dass nur geradzahlige Kohlenstoffketten vorhanden sind. Eine Homogenisierung des Dickdarminhalts in 70 %-igem Isopropanol mittels Bead Beating (Precellys, Bertin, Frankreich) gewährleistete eine gleichmäßige Verteilung der kurzkettigen Fettsäuren für die Analyse. Zur Quantifizierung der kurzkettigen Fettsäuren wurde eine Flüssigchromatographie mit Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) verwendet.

2.1.2 Mikrobiologische Methoden

2.1.2.1 Kultivierung von Bakterien

Zur Bestimmung der Bakterienanzahl nach Antibiotikabehandlung wurden Bakterien aus dem Zökuminhalt unter aeroben Bedingungen kultiviert. Hierzu wurde ein Drittel des Zökums abgewogen und in 3 ml steriles PBS mit einer autoklavierten Metallkugel gegeben und für 15 Sekunden gevortext. Anschließend wurde eine serielle Verdünnung bis 10^{-7} erstellt und jeweils 10 µl der Suspension nebeneinander auf Blutagarplatten ausplattiert. Platten wurden bei 37 °C für 24 und 48 Stunden bebrütet. Kolonien wurden mithilfe von ImageJ gezählt und die Anzahl der Koloniebildenden Einheiten pro Gram feuchten Darminhalts wurde berechnet.

2.1.2.2 Transformation

Zur Vervielfältigung von Plasmid DNA wurde das Plasmid in chemisch kompetente *Escherichia coli* TOP10 (Thermo Fisher) transfiziert. Hierzu wurde die Bakteriensuspension zunächst 15 Minuten auf Eis aufgetaut und anschließend 4 µg oder 4 µl des zu vervielfältigenden Plasmids hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 30 Minuten auf 4 °C inkubiert und anschließend für 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt. Danach folgte ein Kälteschock der Bakterien durch Inkubation für 2 Minuten auf Eis. Anschließend wurden zu der Bakteriensuspension 400 µl SOC Medium hinzugefügt und für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln bei 300 U/min inkubiert. Danach wurden verschiedene Mengen der Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz ausplattiert. Die Plasmide wurden im Folgenden mittels des Plasmid Kits (Qiagen, Deutschland) aufgereinigt und zur Validierung sequenziert.

2.1.3 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen unter einem Laminar-Flow durchgeführt. Humane Zelllinien wurden alle drei Monate auf Mykoplasma Kontamination getestet.

2.1.3.1 Organoid Kultur

Isolierte primäre murine Hepatozyten wurden von Emely Scherer (AG Wohlleber) bezogen. Das Protokoll zur Organoidkultivierung von primären murinen Hepatozyten wurde von Dr. Ludwig Kübelsbeck (AG Holzmann) zur Verfügung gestellt. Die isolierten Hepatozyten wurden in 60 µl Matrigel pro Kuppel resuspendiert und für bis zu einer Woche in Hepatozyten-Organoid-Medium (Hu et al. 2018) kultiviert. Anschließend wurden die Hepatozyten-Organoiden gesplittet. Hierzu wurden die Matrigelkuppel zuerst mit kaltem Advanced DMEM mit 10 % BSA abgelöst und durch auf und abpipettieren mechanisch dissoziiert. Anschließend wurden die Organoiden bei 150 rpm 4 °C für 4 Minuten zentrifugiert, wobei die Abbremsgeschwindigkeit auf 6 reduziert wurde. Anschließend folgte waschen der Organoiden mit 10 ml Advanced DMEM mit 10 % BSA erneutes zentrifugieren und resuspendieren in Matrigel. Es wurden 60 µl Matrigel in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte gegeben und nach 15 Minuten bei 37 °C wurde 650 µl Hepatozyten-Organoid-Medium hinzugegeben.

Organoiden wurden direkt nach dem Teilen für 24 oder 48 Stunden mit 10 mM Acetat oder 100 nM SCD1-Inhibitor behandelt. Als Kontrolle diente reines Medium bzw. Medium versetzt mit DMSO. Es wurden immer mindestens zwei technische Replikate analysiert. Auswertung der Organoidgröße erfolgte durch Analyse des größten Durchmessers mithilfe von ImageJ. Zur Analyse und späteren Einbettung der Organoiden in OCT Tissue TEK wurden die Kuppeln mit PBS für 5 Minuten auf RT gewaschen, 30 Minuten mit 4 %igem PFA bei 37 °C fixiert und anschließend zweimal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Kuppeln kurzzeitig in 4 °C in PBS gelagert oder aus der Vertiefung gelöst und in Tissue Tek eingebettet und bei -80 °C gelagert.

RNA-Isolation erfolgte mittels Isolation aus den Organoiden von mindestens drei Matrigelkuppeln. Hierzu wurden zuerst die Organoiden aus dem Matrigel gelöst. Anschließend wurden sie in RLT-Puffer resuspendiert und wie im Protokoll für RNA-Isolation analog zu Zellen aus der Zellkultur beschrieben isoliert. Die Ausbeute betrug meist weniger als 1 µg RNA, aus diesem Grund wurde die komplett vorhandene RNA für RT-qPCR Analysen in cDNA umgeschrieben.

2.1.3.2 Zellkulturmethoden

2.1.3.2.1 Standardzellkulturmethoden

DLD1, HCT116 und HEK293 Zelllinien wurden in Standard-Zellkulturmedium kultiviert. AML12 Zellen wurden in AML-Kulturmedium und primäre murine Hepatozyten in speziellem Hepatozyten Medium gezüchtet. Zusammensetzung der Medien ist im

Abschnitt Kulturmedien aufgeführt. Das Auftauen der Zellen fand möglichst rasch durch Zugabe von 4 ml angewärmten Medium statt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 570 g für 5 Minuten zentrifugiert, um Reste des DMSO zu entfernen. Anschließend wurden Zellen in dem jeweiligen Kulturmedium resuspendiert und in entsprechender Zellzahl ausgesät. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Kammer bestimmt. Zur Aufteilung der Zellen wurden sie zuerst mit PBS gewaschen, anschließend mit 1 ml Trypsin pro 10 cm Petrischale bei 37 °C inkubiert. DLD1 und HCT116 wurden 10 Minuten inkubiert, wohingegen HEK293 nur 5 Minuten inkubiert wurden. Durch Zugabe von 4 ml Standard-Zellkulturmedium wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden Krebszelllinien DLD1 und HCT116 unmittelbar vor dem Abstoppen der Reaktion mit einer 1 ml Pipette durch sorgfältiges Pipettieren vereinzelt. Bei empfindlicheren Zellen, wie AML12 oder HEK293 wurde dies nach abstoppen der Trypsinierung und in geringerem Maße durchgeführt. Zellen wurden standardmäßig bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Zellen wurden in Einfriermedium eingefroren. Hierzu wurden die Zellen von der Zellkulturschale abgelöst und in Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurden sie sehr langsam auf – 80 °C gekühlt und in flüssigen Stickstoff transferiert.

2.1.3.2.2 Stimulation von Zelllinien

CRC Zelllinien wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Poly(I:C) stimuliert. Standardkonzentrationen hierfür waren 2,5 µg/ml, 25 µg/ml, 250 µg/ml. Für anschließende Proteinisolation und Transkriptionsanalyse wurde eine Konzentration von 25 µg/ml Poly(I:C) verwendet. AML12 Zelllinien wurden mit 2 mM und 10 mM Acetat für 4 und 24 Stunden stimuliert. Zudem wurden die Zellen für dieselben Zeiträume mit 100 µM Palmitat (16:0) oder einer 100 µM Fettsäuren-Mischung (FS Mix) aus Octadeca-9-ensäure (C 18:1n-9), Palmitoleinsäure (C 16:1) und Octadeca-11-ensäure (18:1n-11) im Verhältnis 3:1:1 stimuliert. Anschließend wurde RNA isoliert und Proteinlysate analog der Abschnitte RNA-Isolation bzw. Proteinisolation und Immunoblot erstellt, um die Ausprägung von Enzymen der Fettsäuresynthesewege zu analysieren. Primäre murine Hepatozyten wurden von Emely Scherer (AG Wohlleber) isoliert, mit 10 mM Acetat für 24 und 48 Stunden stimuliert und anschließend Öl-Rot-O gefärbt.

2.1.3.2.3 Transfektion

Zur Transfektion wurden Zellen in einer Dichte von 1x10⁵ Zellen pro Vertiefung in einer 6-Well-Platte am Tag vor der Transfektion ausgesät. HEK293 Zellen wurden mittels Kalziumphosphat und DLD1 sowie HCT116 Zellen wurden mit FuGene HD Transfection Reagent transfiziert. Vor der Transfektion wurde frisches vorgewärmtes Zellkulturmedium zu den Zellen gegeben. Bei der Kalziumphosphatmethode wurden 5 µg der zu transfizierenden DNA und 15 µl einer 2,5 M CaCl₂-Lösung in 135 µl destilliertes Wasser

gegeben. Zu dem DNA-CaCl₂-Gemisch wurde 150 µl BES tropfenweise unter ständigem vortexen hinzugegeben. Zur Transfektion mit FuGene HD wurden 2 µg DNA in 100 µl Opti-MEM gegeben und 8 µl FuGene HD tröpfchenweise unter vortexen in die Lösung gegeben. Die Mischung wurde weitere 4 Sekunden gevortext. Bei beiden Verfahren wurde die Mischung für 10 Minuten bei RT inkubiert und tropfenweise unter ständigem Schütteln der Platte zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden unter Standard-Zellkulturbedingungen über Nacht inkubiert. Am folgenden Morgen wurde das Medium gewechselt und Zellen konnten vor der Selektion einen Tag in Standard-Zellkulturmedium wachsen. Die Selektion wurde abhängig vom transfizierten Plasmid gewählt. Bei CRISPR-Cas9 Standardplasmiden wurde für die Selektion eine Konzentration von 3 µg/ml, 4 µg/ml und 5 µg/ml Puromycin für HEK293, HCT116 und DLD1 Zellen in dieser Reihenfolge gewählt.

2.1.3.2.4 CRISPR-Cas9 induzierte TLR3 Defizienz in kolorektalen Karzinom Zelllinien

TLR3 defiziente Zelllinien wurden mittels CRISPR-Cas9 medierter Mutagenese nach dem Protokoll von Ran et al. (Ran et al. 2013) durchgeführt. Zur Erstellung der single-guide-RNA (sgRNA) wurden die online verfügbaren Design Werkzeuge E-CRISP (Heigwer et al. 2014), CHOPCHOP (Labun et al. 2016) und die vom im Protokoll von Ran et al. empfohlene Software CRISPR Design Tool (Ran et al. 2013) verwendet. Im speziellen wurden hier Sequenzen ausgewählt, die am Exon 2 des humanen *TLR3* Gens binden und bei denen keine off-target Effekte vorhergesagt wurden. Zudem wurden immer zwei verschiedene Sequenzen verwendet, um später klonale und off-target Effekte ausschließen zu können.

Kurz zusammen gefasst wurden zunächst die Sequenzen der sgRNA in das pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) Plasmid kloniert. Zunächst wurden hierzu die Oligonukleotide bei 37 °C für 30 Minuten phosphoryliert und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und mittels sinkender Temperatur (-5 °C min⁻¹) bei 25 °C aneinandergelagert. Die Reaktionsmischung für diesen Schritt ist in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.5: Phosphorylierung CRISPR-Cas9 Mutagenese

Reagenzien	Volumen [µl]
guide RNA (forward; 100 µM)	1
guide RNA (backward; 100 µM)	1
T4 Ligation Puffer (10x)	1
T4 Polynucleotid Kinase	1
ddH ₂ O	6

Anschließend wurden die Oligonukleotide mittels eines kombinierten Ansatzes von Restriktion und Ligation in das pSpCas9(BB)-2A-Puro Vektor Plasmid kloniert. Hierzu wurden die Reaktionsmischung in einem Thermocycler innerhalb von 6 Zyklen für 5

Minuten bei 37 °C und 5 Minuten bei 21 °C inkubiert. Die notwendigen Komponenten und Konzentrationen sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6: Ligationsansatz CRISPR-Cas9 Mutagenese

Reagenzien	Volumen [μ l]
pSpCas9(BB)-2A-Puro Plasmid [100 ng/ μ l]	1
Nucleotide (Verdünnung 1:200)	2
Tango Puffer (10X)	2
DTT (10 mM)	1
ATP (10 mM)	1
Fast Digest Bbsl	1
T7 Ligase	0,5
ddH ₂ O	11,5

Nicht ligierte DNA wurde mittels einer Endonuclease für 30 Minuten auf 37 °C und anschließend 30 Minuten auf 70 °C verdaut (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: DNA Verdau CRISPR-Cas9 Mutagenese

Reagenzien	Volumen [μ l]
Ligationsansatz	11
Plasmid Safe Puffer (10X)	1.5
ATP (10 mM)	1.5
PlasmidSafe Endonuclease	1

4 μ l des Reaktionsgemisches wurden für eine Transformationsreaktion analog des Abschnitts Transformation genutzt. Anschließend wurden die Plasmide sequenziert (Eurofins) und in HCT116 und DLD1 parentale Zellen transfiziert, wie in Abschnitt Transfektion beschreiben. Transfizierte Zellen wurden für 5 Tage mit Puromycin selektiert und anschließend trypsiniert und in sehr geringen Konzentrationen in 10 cm Platten ausgesät. Nach ungefähr 3 Wochen waren einzelne Klone sichtbar, die selektiert und kultiviert wurden und mittels qPCR und Immunoblot auf TLR3 Defizienz überprüft wurden. Nach finaler Selektion von mehreren Klonen pro sgRNA wurde genomische DNA der Klone isoliert und der mutierte Abschnitt sequenziert. Die Ergebnisse wurden mittels Synthego Software mit den parental Linien verglichen.

2.1.3.2.5 Klonogenes Überleben

Zur Analyse des klonogenen Überlebens nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von Poly(I:C) wurden 1×10^4 DLD1 Zellen bzw. 5×10^4 HCT116 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgebracht. Die Zellen wurden über Nacht ohne zusätzliche

Stimulation in Kulturmedium kultiviert und anschließend mit steigenden Konzentrationen von Poly(I:C) für 120 Stunden stimuliert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und für 5 Minuten mit 3 % PFA auf Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und mit 0,1 %-igem Kristallviolett (Sigma V5265) für 30 Minuten gefärbt. Die Färbelösung wurde zuvor filtriert, um etwaige Kristalle zu entfernen. Die Zellen wurden vorsichtig mit Leitungswasser gewaschen, bis sich keine Farbe mehr löste und anschließend getrocknet.

Zur Quantifizierung wurde eine Methanolextraktion des Kristallviolets durchgeführt. Hierzu wurde zu jedem Well 2 ml Methanol hinzugegeben und 20 Minuten unter ständigem Schütteln inkubiert, sodass sich der Kristallviolette Farbstoff löst. Der extrahierte Farbstoff wurde dann in einem Spektrometer bei einer Wellenlänge von 540 nm in Duplikaten gemessen.

2.1.3.2.6 Proliferationsanalyse

Die metabolische Aktivität und Extrapolation der Proliferation von DLD1 Zellen mit und ohne TLR3 Defizienz wurde mittels des XTT Zellproliferationskit II (Roche, Schweiz) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 1×10^3 Zellen pro Well in eine 96-Well Platte ausgesät. Die Zellen konnten über Nacht adhären. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und 100 µl DMEM mit 10 % FCS mit verschiedenen Konzentrationen an Poly(I:C) (0; 2,5; 25; 250 µg/ml) hinzugegeben. Am Tag der Messung wurden zusätzlich 50 µl der Arbeitslösung des XTT-Reagenzes hinzugegeben und zu den Zeitpunkten 0, 4 und 8 Stunden wurde nach Zugabe des Reagenzes mittels Photometer die Absorption bei 450 nm gemessen. Zur Analyse wurde die Zunahme der Absorption verwendet und demnach die Absorption zum 0 Stundenzeitpunkt von den 4 und 8 Stunden abgezogen.

2.1.3.2.7 Migration und Invasion Assays

2.1.3.2.7.1 2D-Wundheilungs-Experimente

Zur Evaluierung der Migrationsfähigkeit von CRC-Zelllinien wurde ein 2D-Wundheilungs-Experiment durchgeführt. Hierzu wurden Zellen zunächst in einer 10 cm Kulturschale ausgesät und über Nacht kultiviert. 2,5 Stunden bevor die Zellen trypsinisiert und in die Migrationskammern ausgesät wurden, wurde 0,625 g/ml Mitomycin C zum Kulturmedium hinzugefügt, um die Proliferation der Zellen zu blockieren und somit lediglich die Migrationsfähigkeit zu analysieren. Die zwei Zellkammern der 35 mm IBIDI Kulturschalen, welche einen Einsatz beinhalten, wurden mittels Kulturmedium mit 10 % FCS oder alternativ 0,1 % Gelatine in PBS für 2 bis 3 Stunden beschichtet. Anschließend wurde das Kulturmedium oder die 0,1 %ige Gelatinelösung abgesaugt und 1×10^5 Zellen pro Kammer ausgesät. Sobald die Zellen adhären waren, wurden die Kammern entfernt, die Zellen mit Medium mit 0 % FCS gewaschen und anschließend unter der jeweiligen Stimulation in Kulturmedium mit 10 % FCS kultiviert. Zur Analyse der Migrationsgeschwindigkeit wurden

jeweils drei Bilder des Abstands zwischen den Zellen zum 0 Stundenzeitpunkt und nach 15 Stunden bei HCT116 und nach 19 Stunden bei DLD1 Zellen aufgenommen. Der Abstand zwischen den Fronten wurde mit ImageJ Software analysiert.

2.1.3.2.7.2 Einzelzell-Migration und Invasion

Zudem wurde die Einzelzell-Migrations- und Invasions-Fähigkeit von DLD1 und HCT116 Zellen in einem „Trans-Well-Migrations-Assay“ untersucht. Transwell Permeable Supports Migrationskammern (Corning, USA) oder Matrigel Invasion Chamber Invasionskammern (Corning, USA) mit einem Porendurchmesser von 8 μm wurden verwendet. Zunächst wurden die Kammern für 2 Stunden bei 37 °C mit DMEM mit 10 % FCS inkubiert. Zur Analyse wie viele Zellen innerhalb von 24 Stunden durch die Poren migrieren oder wie viele Zellen innerhalb von 48 Stunden durch die Invasionskammern gelangen und folglich an der Unterseite der Membran vorhanden sind wurden zunächst 1×10^6 Zellen der CRC-Zelllinien in 15 ml Reaktionsgefäß abgefüllt. Diese wurden mit PBS gewaschen und bei 570 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml DMEM mit 0 % FCS resuspendiert. In der Zwischenzeit wurden die zuvor mit Medium mit 10 % FCS inkubierten Kammern einer 12-Well-Platte und Einsätze gründlich mit PBS gewaschen und 600 μl von Kulturmedium mit 10 % FCS in die Vertiefungen der Platte vorgelegt. Um 1×10^5 Zellen in die obere Kammer auszusähen wurden 100 μl der erstellten Zellsuspension in ein Insert gegeben und dieses sofort und vorsichtig in ein Well mit vorgelegten 600 μl des Kulturmediums mit 10 % FCS gesetzt. Anschließend wurden die Zellen des Migrationsversuchs für 24 Stunden und die des Invasionsversuchs für 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Einsätze zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden auf der Membran für 20 Minuten mit 3 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Einsätze erneut zweimal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 20 Minuten mit 0,1 %-igem Kristallviolett gefärbt und anschließend erneut zweimal in PBS gewaschen. Zellen an der oberen Seite der Membran wurden mithilfe von Wattestäbchen entfernt, sodass lediglich an der unteren Seite der Membran Zellen verblieben. Die Zellen wurden für 10 Minuten mittels 0,5 % Triton-X100 in PBS bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend dreimal in PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für 10 Minuten unter Ausschluss von Licht mit DAPI (Thermo Fisher) (1:5000) in PBS gefärbt und anschließend einmal in PBS gewaschen. Von der Membran wurden fünf repräsentative Bilder der 20X Vergrößerung des Zeiss Observer Z1-Mikroskops mithilfe von ImageJ ausgewertet.

2.1.4 Färbungen

Es wurden entweder Zellen oder Gewebsschnitte gefärbt. Zur Fixierung von Gewebe wurden verschiedene Verfahren angewendet. Zum einen die Formalinfixierung und anschließend Paraffineinbettung (FFPE) und zum anderen Cryofixierung in einem Tissue Tek O.C.T. Einbettungsmedium mit Einfrieren und Lagerung bei -80 °C. Für FFPE-Fixierung wurde das Gewebe in gepuffertem Formalin oder 4 % PFA für zunächst für 24 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend bis zu 6 weitere Tage auf 4 °C fixiert. Dann wurde das Gewebe bis zu einer Woche in PBS bei 4 °C gelagert, bis es mittels einer Histo Core PEARL (Leica, Deutschland) entsprechend der Zeiten in Tabelle 2.8 entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet wurde.

Tabelle 2.8 Entwässerungszyklen Histo Core PEARL

Schritt	Reagenz	Dauer [min]	Temperatur [°C]
1	Ethanol 70 %	45	-
2	Ethanol 80 %	45	-
3	Ethanol 96 %	60	-
4	Ethanol 96 %	60	-
5	Ethanol 100 %	60	-
6	Ethanol 100 %	60	-
7	Ethanol 100 %	60	-
8	Roticlear	45	-
9	Roticlear	60	-
10	Roticlear	75	-
11	Paraffin	60	62
12	Paraffin	60	62
13	Paraffin	60	62

2.1.4.1 Hämatoxylin & Eosin Färbung

H&E Färbung wurden an humanen oder murinen Gewebsschnitten oder CAM-Membranen durchgeführt. FFPE-Schnitte mussten zunächst rehydriert werden. Hierzu wurden sie dreimal für 10 Minuten in Roticlear inkubiert und anschließend für je zwei Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe von 100 %, 95 %, 70 % und 50 % inkubiert. Cryoschnitte wurden zunächst mit gepuffertem 4 % Formalin fixiert. Die Schnitte wurden zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, dann für 30 – 120 Sekunden in Hämalan Lösung gefärbt und anschließend mit warmen Leitungswasser für mindestens 2- 5 Minuten gebläut. Anschließend wurden sie erneut zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und für 5 – 10 Sekunden mit Eosin gefärbt. Daraufhin wurden die Schnitte kurz mit 70 % Ethanol gewaschen, für 30 Sekunden in 90 % Ethanol und anschließend dreimal für 2 Minuten in 100 % Ethanol inkubiert. Die Dehydration des Gewebes wurde durch dreimalige Inkubation für 10 Minuten in Roticlear abgeschlossen. Abschließend wurden

die Gewebsschnitte mit einer 1:10 Verdünnung von Eukitt mit Xylol und einem Deckglas versiegelt. Bilder wurden mittels eines Axiolab Mikroskops aufgenommen.

2.1.4.2 Ölrot-O Färbung

Für die Färbung von neutral Lipiden musste zunächst eine Öl-Rot-O Färbelösung angesetzt werden. Hierzu wurde von einer Stammlösung aus 300 mg Ölrot-O Pulver, welche zuvor in 100 ml 99 % Isopropanol aufgelöst wurde, eine Arbeitslösung hergestellt. Hierzu wurden drei Teile der Stammlösung mit zwei Teilen destilliertem Wasser gemischt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur gemischt und anschließend durch einen 0,2 µm Filter filtriert. Diese Arbeitslösung konnte anschließend für maximal zwei Stunden verwendet werden. Zellen wurden zunächst vorsichtig mit warmen PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 4 % PFA für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und mit destilliertem Wasser gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 60 %-igem Isopropanol für 5 Minuten auf Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit der Ölrot-O Arbeitslösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Dann wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Hämalaun für 30 – 120 Sekunden gegengefärbt. Die Aufnahme von Bildern wurde mit einem Axiolab Mikroskop von Zeiss durchgeführt.

2.1.4.3 Immunfluoreszenz Färbung

Für Immunfluoreszenz wurden ausschließlich Cryoschnitte oder Zellen verwendet. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet. Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen ausgebracht, welche zuvor mit Gelatine, Kulturmedium oder Fibronectin überschichtet wurden. Die Zellen wurden einmal mit warmen PBS gewaschen. Sowohl Zellen als auch Gewebe wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 3 % warmen PFA fixiert. Anschließend folgten drei Waschschrte mit PBS. Restliches PFA wurde durch 50 mM NH₄Cl für mindestens 20 Minuten abreagiert, gefolgt von erneutem dreimaligem Waschen mit PBS. Gewebe und Zellen wurden mit 0,1 % Triton X100 in PBS für genau 3 Minuten permeabilisiert, erneut dreimal gewaschen und mit 2 % BSA in PBS für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur und maximal über Nacht bei 4 °C geblockt. Der Primärantikörper wurde in 2 % BSA in PBS gelöst und abhängig vom Antikörper jedoch meist über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde viermal mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in 2 % BSA in PBS gegeben, mit DAPI (1:50000) versetzt und bei Raumtemperatur für eine Stunde im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen oder das Gewebe dreimal mit PBS gewaschen und mit Glycerol-Gelatine eingedeckelt. Um Austrocknen der Zellen oder Gewebsschnitte zu vermeiden, wurden die Deckgläschen mit Nagellack versiegelt und bei 4 °C aufbewahrt. Die Färbungen wurden mittels des Axio Observers Z1 aufgenommen und mit der Zen Software von Zeiss analysiert.

2.1.4.4 Immunhistochemie

Immunhistochemie-Färbung (IHC) wurde ausschließlich an FFPE-Gewebe und mit dem DAB Substrat System (Dako Agilent Technologies, USA) nach Standardprotokollen angewendet. Die Methode wurde von Dr. Yuhao Yin in einem gemeinsamen Projekt durchgeführt. Zunächst wurden die Schnitte analog zur H&E Färbung rehydriert. Anschließend wurden Antigene wiederhergestellt, indem die Proben in 10 mM Citratpuffer bei pH 6,0 für 15 Minuten in einer Mikrowelle bei 600 Watt gekocht wurden. Danach wurden die Schnitte für 20 bis 30 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten in TBSA-Puffer gewaschen, welcher aus Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) mit 0,1 % BSA besteht. Schnitte wurden für 10 Minuten mit 3 %-iger Peroxidase in Methanol im Dunkeln abreagiert. Danach folgte erneutes waschen für 5 Minuten in TBSA-Puffer. Die Schnitte wurden anschließend mit 19 %-igem Ziegsen Serum in TBSA blockiert und anschließend wurde der Primärantikörper gegen in PBS bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Objektträger dreimal für 10 Minuten mit TBSA gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem waschen in TBSA wurden 20 µl DAB in 1ml Substratlösung angesetzt und auf das Gewebe aufgetragen. Die enzymatische Reaktion wurde mittels Zugabe von Wasser gestoppt. Die Schnitte wurden mit Hämalun Lösung gegengefärbt und durch aufsteigende Alkoholreihe und Inkubation in Rotoclear analog zur H&E Färbung dehydriert und eingebettet. Aufnahmen der Schnitte wurden an einem Axio Observer Z1 Mikroskop der Firma Zeiss aufgenommen und mittels ImageJ ausgewertet.

2.1.4.5 Zellkraftwerk - Multiplexed Chipzytometrie Färbung

Humane schockgefrorene Gewebeproben von Tumoren wurden mittels multiplexed Chipzytometrie nach Ausprägung von immunologischen Markern untersucht. Hierzu wurde die von Jarosch et al. beschriebene Methode zur Färbung und Auswertung am Zellkraftwerk verwendet (Jarosch et al. 2022). Kurz zusammengefasst wurden Cryoschnitte angefertigt, 45 Minuten mit 4 % gepuffertem Formalin fixiert, mit Zellkraftwerk Waschpuffer gewaschen, auf Zellkraftwerk Chips geladen und erneut mit Waschpuffer gespült. Danach wurden die Koordinaten des Gewebes erfasst, eingescannt und interessante Bereiche für die Bildaufnahme ausgewählt. Anschließend wurde das Gewebe mit bis zu fünf Antikörpern, welche an verschiedene Fluorophore gekoppelt waren, gefärbt (siehe Antikörperliste Tabelle 2.10). Nach erneutem Waschen wurden die ausgewählten Bereiche erfasst und anschließend gebleicht, um Restfluoreszenz zu entfernen und Überlappungen mit Folgefärbungen zu minimieren. Anschließend wurde Hintergrundfluoreszenz erneut aufgenommen und erneute Färbung mit weiteren Antikörpern durchgeführt. In diesem Versuch wurden bis zu 16 Antikörper gefärbt. Die Schnitte wurden mittels semi-automatisierter Quantifizierung der Färbeintensitäten analysiert (<https://github.com/SebastianJarosch/ChipCytometry-Image-Processing>). Wie in genannter Publikation beschrieben wurde, hierzu eine zelltypspezifische Segmentierung und Korrektur von Überlappungen der Färbung durchgeführt.

2.1.5 Tierversuche und in vivo Stimulationen

2.1.5.1 Zucht und Haltung von Mäusen

Die Zucht und Verwendung von Tieren erfolgte in Übereinstimmung mit den Genehmigungen der zuständigen örtlichen Behörden (gemäß ROB-55.2-2532.Vt_02-20-214). Die Tiere wurden im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums rechts der Isar der TUM sowie bei Charles River unter kontrollierten Bedingungen von 45- 60 % Luftfeuchtigkeit, Temperaturen zwischen 20 – 24 °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden mit Dämmerungsphase und keinen Ultraschallemissionen gehalten. Tiere erhielten ad libitum autoklaviertes Haltungsfutter (Nummer 1314; Altrumin) und Wasser. Die verwendeten Zuchtlinien nämlich $Apc^{1638N/+}$, $Pvillin-Cre$ ($Tg(Vil1-cre)20Syr$) und $TLR3^{LSL/LSL}$ waren bereits im C57BL/6 Hintergrund vorhanden. Innerhalb dieser Arbeit wurden Kreuzungen von $Apc^{1638N/+}$ $TLR3^{LSL/LSL}$, $Apc^{1638N/+}$ $TLR3^{LSL/LSL}$ $Pvillin-Cre$ und $Apc^{1638N/+}$ $Ticam1^{LSL/LSL}$ erstellt. Beide Geschlechter, männliche und weibliche Tiere, kamen in dieser Studie zum Einsatz. Euthanasie der Tiere wurde mittels tiefer Narkose und zervikaler Dislokation durchgeführt. Organe wurden unverzüglich entnommen und entweder in Flüssigstickstoff schockgefroren, in Tissue Teck OCT eingebettet oder nach 24-stündiger Fixierung bei RT in 4 % PFA oder gepuffertem Formalin für FFPE präpariert.

2.1.5.2 Partielle Hepatektomie an gnotobiotischen und Antibiotikabehandelten Mäusen

Der Tierversuch wurde gemäß der EU-Direktive 2010/63 des deutschen Tierschutzgesetzes sowie aller relevanten nationalen und institutionellen Richtlinien durchgeführt. Weibliche C67BL/6J Mäuse im Alter von 10-12 Wochen wurden für die Versuche eingesetzt. Es kamen Mäuse mit unterschiedlichem mikrobiellem Status zum Einsatz: Spezifizierte Pathogenfreie (SPF), Keimfreie (KF) und Oligo-Maus-Mikrobiota (OMM12) Mäuse. Die Tiere wurden vom Institut für Labortier Wissenschaften (Hannover Medical School, Hannover, Deutschland) bezogen. Sie wurden entweder in individuell belüfteten Käfigen oder in sterilen Mikroisolatoren (Han-Gnotokäfige) mit HEPA-Filtern untergebracht, um gnotobiotische Haltungsbedingungen zu gewährleisten. Mäuse wurden unter kontrolliertem Tages-Nacht-Zyklus von 12 Stunden gehalten und erhielten steriles 50 kGY gamma-bestrahltes Standardfutter (V1124-927, Ssniff, Soest, Deutschland) und autoklaviertes Wasser ad libitum. Der mikrobielle Status der Tiere wurde regelmäßig durch mikroskopische Untersuchung mittels Gram-Färbung von Fekalproben untersucht. Zusätzlich wurde 16S-rRNA PCR des Zökuminhalts am Ende der Studie durchgeführt. Der Tierversuch wurde innerhalb der ROB Tierversuchslizenz 55.2-1-54-2532-147-2015 durchgeführt.

Für Antibiotikaversuche wurde das autoklavierte Trinkwasser mit einer Mischung aus 1 g/l Ampicillin, 0,5 g/l Vancomycin, 1g/l Metronidazol und 0,2 mg/l Fluconazol (alle von Sigma Aldrich, Deutschland) und 1,2 % (Gewicht/ Volumen) Splenda Süßstoff (TC Heartland, USA) angereichert und sterilfiltriert. Diese Antibiotikamischung wurde den Mäusen ab drei Tage vor der Operation bis zum Zeitpunkt der Euthanasie über das Trinkwasser ad

libitum verabreicht und alle drei Tage erneuert. Hierbei wurde das verbrauchte Volumen notiert. Kontrollmäuse erhielten im gleichen Zeitraum 1,2 % Splenda, jedoch ohne Antibiotikazusätze. Der mikrobielle Status der Mäuse wurde mittels aerober Kultur von Fäkalproben und Zökuminhalt, sowie 16S-rRNA Sequenzierung des Zökuminhalts untersucht.

Wie bereits erwähnt, wurde der mittlere und laterale Leberlappen von Mäusen im Alter von 10 bis 12 Wochen operativ unter Isofluroan-Anästhesie entfernt. Der Eingriff wurde unter Berücksichtigung des zirkadianen Rhythmus zwischen 8 und 12 Uhr durchgeführt. Die Versuchstiere wurden unter sterilen Bedingungen operiert und anschließend weiterhin falls zur Erhaltung gnotobiotischer Bedingungen notwendig in sterilen Mikroisolatoren gehalten. Gewebeproben von Leber, Dünndarm, Dickdarm, sowie Blut, Darminhalt und Stuhlproben wurden nach festgelegten Zeitpunkten entnommen und weiterverarbeitet oder schockgefroren.

2.1.5.3 Acetat Gavage

Zwei Stunden vor Beginn des Experiments wurde die Futterzufuhr für die Mäuse unterbrochen. Anschließend wurden sie mit unterschiedlichen Acetat-Konzentrationen (0 M; 0,5 M; 2,5 M oder 6.25 M) in 0.9 % NaCl-Lösung gavagiert und vier Stunden später euthanasiert. Zur Untersuchung der De-Novo-Synthese von Membran-Phospholipiden, erhielten die Tiere 2 Stunden vor der Euthanasie eine intraperitoneale Injektion von stabilem isotopenmarkiertem D9-Cholin. Der Tierversuch wurde in Übereinstimmung mit allen relevanten nationalen und institutionellen Richtlinien und gemäß der ROB-Tierversuchslizenz ROB-55.2-1-54-2532-192-2016 und ROB-55.2-2532.Vet_02-21-124 durchgeführt.

2.1.5.4 Chorion und Allantois Membran (CAM) Migrationsexperimente

Zur Untersuchung von *in vivo* Migrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen mit und ohne TLR3 Defizienz wurde der *in ovo* Versuch verwendet, indem Tumorzellen in einem Matrigeltropfen auf die Chorion und Allantois Membran (CAM) eines Hühnerembryos gegeben werden und für eine Woche inkubiert werden. Anschließend kann sowohl die Größe als auch die Invasivität der Tumorzellen untersucht werden. In diesen Versuchen wurden ausschließlich HCT116 Zellen verwendet, da sie in dem System gut etabliert sind. Die Versuche wurden von Lisa Hornsteiner und Tina Krammel als Teil ihrer Masterarbeit in Kooperation mit AG Reichert bzw. AG Schusser durchgeführt. Zusammenfassend wurden befruchtete Hühnereier 6 bis 8 Tage im Inkubator bei 37 °C und 55 % bzw. 70 – 80 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde die Eierschale geöffnet und 1×10^6 Zellen in 1:3 Verdünnten Matrigel auf die CAM gegeben und für eine Woche inkubiert. Nach dieser Zeit wurden sowohl die Tumore mit der CAM als auch Gewebeproben entnommen. Die Tumore wurden in 4 % PFA auf 4 °C für 4 Stunden fixiert und anschließend in 15 % Sucrose für 4 Stunden und über Nacht in 30 % Sucrose und anschließend in OCT bei -80 °C gelagert. Schnitte der CAM wurden mittels Immunofluoreszenzverfahren oder mit

Hämatoxylin und Eosin gefärbt und anschließend analysiert. Größe der Tumore und Invasionstiefe wurde durch Analyse der Bilder in ImageJ durchgeführt.

2.1.6 Patientendaten

Es wurde mit zwei verschiedenen Patientenkollektiven gearbeitet. Zur Analyse von TLR3 im kolorektalen Karzinom wurde ein bereits bestehendes retrospektives Patientenkollektiv mit Lymphknoten Metastasen verwendet, welches aus 129 Personen mit kolorektalem Karzinom besteht, an denen einen chirurgischer Eingriff in der Klinik und Polyklinik für Chirurgie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt wurde. Eine Tabellarische Übersicht des Kollektivs ist in *Tabelle 6.1* zu sehen. Tumor- und Normalgewebe wurden während des operativen Eingriffs zur Resektion gewonnen, auf Eis gekühlt und schnellstmöglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse gelagert.

Zusätzlich wurden n=13 Personen untersucht, welche an Gallengangkrebs, Kolorektal Karzinom oder Plattenepithelkarzinome des Gallengangs erkrankt waren und Metastasen in der Leber ausgebildet hatten. Lebergewebsproben wurden nach chirurgischer Induktion von Hyperplasie in den hyper- und hypoplastischen Leberlappen während der partiellen Hepatektomie entnommen. Zur Berechnung des Regenerationsindexes wurden CT-Scans erstellt und eine Lebersegmentierung (IntelliSpace Portal Version 12.1) unter Ausschluss des Tumervolumens von Dr. Fabian Lohöfer angefertigt. Das Lebervolumen wurde vor dem chirurgischen Eingriff (pre-Intervention), nach dem Eingriff (post-Intervention) und nach der partiellen Hepatektomie (post-Resektion) analysiert. Die Probennahme und folgende Forschung wurde nur nach zu voriger schriftlicher Einwilligung der Patienten und nach Überprüfung durch das Ethikkommission der School of Medicine and Health der TUM durchgeführt (1926/07; 5428/12; 86/17S).

2.1.7 Bioinformatische Methoden

2.1.7.1 Analyse von Veränderungen in TLR3 und Korrelation mit Überleben

Der methodologische Ansatz ermöglichte die Untersuchung von TLR3 Veränderungen und potenziellen Einfluss auf das Überleben von an verschiedenen Krebsarten erkrankten Personen. Die Analysen wurden unter Zuhilfenahme der Plattform cBioportal durchgeführt (<https://www.cbioportal.org/>). Die Auswahl aus 32 Studien des TCGA Pancreatic Cancer Atlas Datensatzes wurden verwendet und anhand dessen Veränderungen von TLR3 Gen in allen Krebsarten untersucht. Die Daten wurden aufgrund von unterschiedlicher Anzahl an TLR3 Kopien mit Algorithmen wie GISTIC oder RAE untersucht. Im speziellen wurden Amplifikationen (AMP) also eine starke Steigerung der Kopien Anzahl, Funktionszugewinn (GAIN) mit nur geringem Anstieg an TLR3 Kopien, schwache Deletionen (HETLOSS) häufig einhergehen mit heterozygoter Deletion oder starke Reduktion der TLR3 Kopien Anzahl (HOMDEL) repräsentativ für homozygote Deletion von TLR3 untersucht.

Gesamtes und Krankheitsfreies Überleben wurden anhand von erkrankten Personen mit schwacher und starker Reduktion von TLR3 (HOMDEL, HETLOSS) im Vergleich zu Personen ohne starken oder geringen Anstieg der TLR3 Kopien Anzahl berechnet. Der Log-Rank (Mantel-Cox) Test wurde für die statistische Relevanz der Ergebnisse verwendet.

2.1.7.2 Analyse der humanen RNA-Sequenzierungsdaten

Zur Analyse von Transkriptom-Profilen wurde RNA, wie im Abschnitt RNA-Isolation beschreiben, gewonnen. Die Library Vorbereitung und Sequenzierung, sowie Qualitätskontrollen wurden von Eurofins durchgeführt. Die Datenanalyse fand mittels Unterstützung durch Michale Lauber statt. Daten wurde mit DESeq2 (Love et al. 2014) durchgeführt und eine differentielle Expressionsanalyse wurde vorgenommen, um hoch- oder herunterregulierte Gene zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen zu bestimmen. Veränderungen in Signalwegen wurde durch Gene Set Enrichment Analysen (GSEA) mithilfe eines Softwarepackets (Mootha et al. 2003, Subramanian et al. 2005) und im Vergleich zur Molecular Signature Database „hallmark gene sets“ durchgeführt.

2.1.7.3 16S-rRNA Sequenzierung Rhea Analyse

Proben für genomische 16S-rRNA-Sequenzen wurden gewonnen, wie in Abschnitt RNA-Sequenzierung beschrieben, und in der Mikrobiom Sequenzierungs-Corefacility in Freising sequenziert (<https://www.ziel.tum.de/ziel/core-facilities/mikrobiom/>). Für die Sequenzierung wurde zunächst DNA aus Zökum- oder Stuhlproben isoliert und anschließend eine Library erstellt, wie ausführlich von Reitmeier et al. beschrieben wurde (Reitmeier 2020). Für die Analysen in dieser Studie wurde die V3-V4 Region der 16S-rRNA-Sequenz mit dem Primer Paar 341F-ovh and 785r-ovh (Kozich et al. 2013) verwendet und mittels Illumina MiSeq sequenziert.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Plattform Integrated Microbial Next-Generation Sequencing (IMNGS) (Lagkourdos et al. 2016) und Rhea analysiert und visualisiert. IMNGS ist eine UPARSE basierte online verfügbare Plattform zum systematischen Screening, Prozessierung und Analyse von prokaryotischen 16S-rRNA-Genen. Mittels IMNGS kann eine Probenspezifische Sequenzdatenbank erstellt werden und mikrobielle Profile von Operational Taxonomic Units (OTU) anfertigt werden. Hierbei werden neben der Zusammenstellung der einzelnen Sequenzierungs-Reads, auch Qualitätskontrollen durchgeführt, Chimären entfernt und Redundanzfilter integriert. Die Analyse wurde nach Übernahme der empfohlenen Parameter mit „Forward“ und „Reverse Read Files“ durchgeführt. Gewonnene OTU-Tabellen und Sequenzen, sowie taxonomische Informationen der Proben wurden für weitere Analysen mit Rhea verwendet (<https://lagkourdos.github.io/Rhea/>). In diesem R basierten Programm werden die gewonnenen Daten von IMNGS normalisiert, α - sowie β -Diversität bestimmt, die taxonomische Zusammensetzung visualisiert und auf statistisch signifikante Unterschiede analysiert. Hierzu wurden die empfohlenen Einstellungen verwendet.

2.2 Material

2.2.1 Oligonucleotide

Tabelle 2.9: Oligonucleotide und Anwendungen

Name	Sequenz	Anwendung
sgDNA1 TLR3	CCTGAAGTTGACTCAGGTACCCG	CRISPR
sgDNA2 TLR3	CCAGCCGCCAACTTCACAAGGTA	CRISPR
Tlr3 (mouse) Forward universal Reverse WT Reverse LSL	TGC CAC AGG GTG AGG CAT CG TGG CTG CAG TCA GCT ACG TTG T CCA CCC TGG GGT TCG TGT CC	Genotypisierung
Apc ^{1638N/+} (mouse) Forward universal Reverse WT Reverse Apc mutant	TCA GCC ATG CCA ACA AAG TCA GGA AAA GTT TAT AGG TGT CCC TTC T GCC AGC TCA TTC CTC CAC TC	Genotypisierung
pVilCre (mouse) Forward Reverse	CGC GAA CAT CTT CAG GTT CT CAA GCC TGG CTC GAC GGC C	Genotypisierung
16S-rRNA Primer 341F-ovh(16S-rDNA) 785R-ovh (16S-rDNA)	CCTACGGGNGGCWGCAG GACTACHVGGGTATCTAATCC	PCR
Tlr3 sequencing primer (CRISPR KO) Forward Reverse	CAGAATCATGAGACAGACTTTGCC GGATTGAGTTGGACATGAGATGG	PCR
MUC5B (human) Forward Reverse	GCCCACATCTCCACCTATGAT GCAGTTCTCGTTGTCCGTCA	qPCR: SYBR
ARG1 (human) Forward Reverse	GTGGAAACTTGCATGGACAAC AATCCTGGCACATCGGGAATC	qPCR: SYBR
Cxcl5 (mouse) Forward Reverse	GCATTTCTGTTGCTGTTACGCTG CCTCCTTCTGGTTTTTCAGTTTAGC	qPCR: SYBR
Elovl5 (mouse) Forward Reverse	GCA AGA ACA ACC ACC AGA TCA C GAT TGT CAG CAC AAA CTG GAC C	qPCR: SYBR
FOXP3 (human) Forward Reverse	GGCACAATGTCTCCTCCAGAGA CAGATGAAGCCTTGGTCAGTGC	qPCR: SYBR
Gapdh (mouse) Forward Reverse	AGG TGG GTG TGA ACG GAT TTG TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA	qPCR: SYBR
HPRT (human) Forward Reverse	GCT TTC CTT GGT CAG GCA GTA TAA T AAG GGC ATA TCC TAC AAC AAA CTT G	qPCR: SYBR
RORC (human)		qPCR: SYBR

Forward Reverse	GCA GCG CTC CAA CAT CTT CT ACG TAC TGA ATG GCC TCG GT	
Bacterial Load PCR 16s_qPCR_HDA1-338For 16s_qPCR_HDA1-536Rev	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA	qPCR: SYBR
GATA3 (human) Forward Reverse	ACCACAACCACACTCTGGAGGA TCGGTTTCTGGTCTGGATGCCT	qPCR: SYBR
Hprt (mouse) Forward Reverse	TCCTCCTCAGACCGCTTTT CCTGGTTCATCATCGCTAATC	qPCR: SYBR
LGR5 (human) Forward Reverse	CAGCGTCTTCACCTCCTACC TGGGAATGTATGTCAGAGCG	qPCR: SYBR
OPN/SPP1 (human) Forward Reverse	TTG CAG CCT TCT CAG CCA A GGA GGC AAA AGC AAA TCA CTG	qPCR: SYBR
HPRT (human) Forward Reverse	GACCAGTCAACAGGGGACAT GTGTCAATTATATCTTCCACAATCAAG	qPCR: SYBR / UPL #22
Il6 (mouse) Forward Reverse	ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGA TGGTCCTTAGCCACTCCTTC	qPCR: UPL #78
Trif (mouse) Forward Reverse	CAGCTCAAGACCCCTACAGC CTCCCACACAGCCTCGTC	qPCR: UPL #67
FASN(human) Forward Reverse	CAGGCACACACGATGGAC CGGAGTGAATCTGGGTTGAT	qPCR: UPL #11
Tlr3 (mouse) Forward Reverse	GATACAGGGATTGCACCCATA TCCCCCAAAGGAGTACATTAGA	qPCR: UPL #26
Cxcl2 (mouse) Forward Reverse	AAA ATC ATC CAA AAG ATA CTG AAC AA CTT TGG TTC TTC CGT TGA GG	qPCR: UPL #28
ELOVL5 (human) Forward Reverse	CCCTTCCATGCGTCCATA GATTGTCAGCACAAACTGAAGC	qPCR: UPL #31
CXCL10 (human) Forward Reverse	AAG CAG TTA GCA AGG AAA GGT C GAC ATA TAC TCC ATG TAG GGA AGT GA	qPCR: UPL #34
SCD1 (mouse) Forward Reverse	TTC CCT CCT GCA AGC TCT AC CAG AGC GCT GGT CAT GTA GT	qPCR: UPL #34
SCD1 (human) Forward Reverse	CCTACCTGCAAGTTCTACACCTG GACGATGAGCTCCTGCTGTT	qPCR: UPL #37
ELOVL6 (human) Forward	CAAAGCACCCGAACTAGGAG	qPCR: UPL #38

Reverse	GGTGATACCAGTGCAGGAAGA	
Elovl6 (mouse)		qPCR: UPL #4
Forward	CAGCAAAGCACCCGAATA	
Reverse	AGGAGCACAGTGATGTGGTG	
CD3 epsilon (human)		qPCR: SYBR / UPL #49
Forward	CAAGGCCAAGCCTGTGAC	
Reverse	TCATAGTCTGGGTGGGAACA	
b-Actin (mouse)		qPCR: SYBR / UPL #56
Forward	AAGGCCAACCGTGAAAAGAT	
Reverse	GTGGTACGACCAGAGGCATAC	
Fasn (mouse)		qPCR: UPL #58
Forward	GCT GCT GTT GGA AGT CAG C	
Reverse	AGT GTT CGT TCC TCG GAG TG	
Granzyme B (mouse)		qPCR: UPL #66
Forward	ACATGGCCTTACTTTTCGATCA	
Reverse	GCCCCCAAAGTGACATTTATT	
IL8 (human)		qPCR: UPL #72
Forward	AGACAGCAGAGCACACAAGC	
Reverse	AGGAAGGCTGCCAAGAGAG	
CXCL11 (human)		qPCR: UPL #76
Forward	AGTGTGAAGGGCATGGCTA	
Reverse	TCTTTTGAACATGGGGAAGC	
Cxcl11 (mouse)		qPCR: UPL #76
Forward	GCTGCTGAGATGAACAGGAA	
Reverse	CCCTGTTTGAACATAAGGAAGC	
TLR3 (human)		qPCR: UPL #80
Forward	AGAGTTGTCATCGAATCAAATTAAAG	
Reverse	AATCTTCCAATTGCGTGAAAA	
E-Cadherin(human)		qPCR: UPL #84
Forward	TGG AGG AAT TCT TGC TTT GC	
Reverse	CGC TCT CCT CCG AAG AAA C	
Vimentin (human)		qPCR: UPL #11
Forward	TGAGATTGCCACCTACAGGAA	
Reverse	GAGGGAGTGAATCCAGATTAGTTT	
Cxcl10 (mouse)		qPCR: UPL #3
Forward	GCTGCCGTCATTTTCTGC	
Reverse	TCTCACTGGCCCGTCATC	

2.2.2 Antikörper

Tabelle 2.10: Antikörperinformationen und Anwendung

Zielprotein	Firma	Anwendung	Bestellinformation
α -Tubulin (DM1A)	Milipore	Immunoblot	CP06-100 μ l
β -Actin (8H10D10)	Cell Signaling	Immunoblot	#3700
β -Tubulin	Abcam	Immunoblot	ab6046
CD103-BV421 (Ber-ACT8)	BioLegend	Zellkraftwerk	566257
CD14-PerCP/Cy5.5 (HCD14)	BioLegend	Zellkraftwerk	550787
CD161-PE (191B8)	Beckman Coulter	Zellkraftwerk	IM3450
CD19 -PE (HIB19)	BioLegend	Zellkraftwerk	561741

CD3-BV421 (SK7)	BD Biosciences	Zellkraftwerk	659448
CD45-FITC (HI30)	BD Biosciences	Zellkraftwerk	561865
CD45RA-PE (HI100)	BioLegend	Zellkraftwerk	561883
CD45RO-FITC (UCHL1)	BioLegend	Zellkraftwerk	655160
CD4-PerCP/Cy5.5 (RPA-T4)	BioLegend	Zellkraftwerk	560650
CD8 -FITC (B9.11)	Beckman Coulter	Zellkraftwerk	A07756
cleaved caspase 3 (Asp175) (5A1E)	Cell Signaling	Immunoblot	#9664P
Cleaved Caspase 8 (Asp387) (D5B2)	Cell Signaling	Immunoblot	# 8592
Cyclin B1	Cell Signaling	Immunoblot	#4138
FAK	Cell Signaling	Immunoblot	#3285P
FAK (D5O7U)	Cell Signaling	Immunoblot	#71433S
FoxP3-PerCP/Cy5.5 (236A/E7)	BD Biosciences	Zellkraftwerk	665126
GAPDH	Cell Signaling	Immunoblot	#2118
Ki67	BD Biosciences	IHC	550609
Pan-Cytokeratin -AF488 (C11)	Santa Cruz	Zellkraftwerk	sc-8018 AF488
PARP1	Abcam	Immunoblot	ab137653
PDL1-PE (29E.2A3)	BioLegend	Zellkraftwerk	568080
phospho-FAK (Y397)	Cell Signaling	Immunoblot	#3283S
phospho-STAT3 (Tyr 705)	Cell Signaling	Immunoblot	#9131
SCD1	Abcam	Immunoblot	Ab19862
SCD1(C12H5)	Cell Signaling	Immunoblot	#2794
STAT3 (79D7)	Cell Signaling	Immunoblot	#4904
TLR3 (D10F10)	Cell Signaling	Immunoblot	#6961
ZEB1	Sigma-Aldrich	Immunoblot	HPA027524

2.2.3 Zelllinien

Tabelle 2.11: Zelllinien und Herkunft

Name der Zelllinie	Herkunft
DLD1	Humane kolorektal Karzinom Zelllinie (Dexter, D.L. 1979)
HCT116	Humane kolorektal Karzinom Zelllinie (Brattain, M.G; 1981)
AML12	Murine immortalisierte Leberzelllinie (Wu 19994)

2.2.4 Kulturmedien

Tabelle 2.12: Standard Kulturmedium

Reagenz	Zusammenstellung
DMEM	500 ml
FCS	7 % (V/V)
L-Glutamin	1 % (V/V)
Penicillin/Streptomycin	1 % (V/V)

Tabelle 2.13: AML12 Kulturmedium

Reagenz	Zusammenstellung
DMEM F12 + GlutamaxMedium	160 ml
Hydrocortison [50 mg/ml]	0,01 % (V/V)
Insulin Transferin / Selenin	0,2 % (V/V)
FCS	10 % (V/V)

Tabelle 2.14: AML12 Experimentalmedium

Reagenz	Zusammenstellung
DMEM F12 Medium	160 ml
Hydrocortison [50 mg/ml]	0,01 % (V/V)
Insulin Transferin / Selenin	0,2 % (V/V)
FCS	2 % (V/V)
Penicillin/Streptomycin	1 % (V/V)
HEPES	25 mM

2.2.5 Puffer

Tabelle 2.15: Pufferzusammensetzungen

Name	Reagenzien	Konzentration
5 x Lämmli	TRIS-HCl (pH = 6,8) SDS Glycerin DTT Bromphenolblau	1.5 M 10 % (V/V) 50 % (m/V) 77 mg/ml
BES	N, N-bis (2-hydroxyethyl) -2-aminoethane sulfonic acid NaCl Na ₂ HPO ₄ pH adjustieren auf 6.96	50 mM 280 mM 1,5 mM
DNA-Stabilisator	NaCl; 1 M Tris; pH 8,0; 1M EDTA; pH 8,0; 0.2 M H ₂ O	0,2 M 0,2M 20 mM
Laufpuffer SDS-PAGE	TRIS-HCl Glycin SDS	1.5 M 0,96 M 0,5 % (V/V)
PBS-T	PBS Tween-20	1 X 0,1 % (m/V)
RIPA buffer + Inhibitoren	NP-40 TRIS-HCl (pH = 7.5) Natriumdesoxycholat EDTA (pH = 8) NaCl Inhibitoren: Na ₃ VO ₄ NaF Pefabloc, Potease Inhibitor Cocktail β-Glycerophosphat Benzamidin, PMSF Pepstatin	1 % (V/V) 50 mM 0,25 % (V/V) 1 mM 150 mM 1 mM 1 mM 1 mM 1 X 1 mM 1 mM 1 mM 1 µg/mL
Transfer Puffer Immunoblot	TRIS-HCl (pH = 7,5) Glycine Methanol	48 mM 39 mM 20 % (V/V)
TAE Puffer 50X	TRIS-HCl Eisessig EDTA H ₂ O	242 g/L 57,1 ml/L 18,6 g/L

2.2.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.16: Verwendete Kits

Name	Hersteller
Zellproliferationskit II (XTT)	Roche, Schweiz
LightCycler 480 Probes Master	Roche, Schweiz

Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher, USA
QIAGEN Plasmid Kit (Mini; Maxi)	Qiagen, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Deutschland
Universal ProbeLibrary Set	Roche, Deutschland
NucleoSpin gDNA Clean-up Kit	Macherey-Nagel, Deutschland
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Deutschland
Pierce DAB Substrate Kit	Thermo Fisher, USA

Tabelle 2.17: Besondere Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Culture-Insert 2 Well in μ -Dish 35 mm	Ibidi, Deutschland
Transwell Permeable Supports Migrationskammern 8,0 μ m	Corning, USA
Matrigel Invasion Chamber Invasionskammern 8,0 μ m	Corning, USA
Amersham Protran Western-Blotting-Membranen, Nitrozellulose, 0,45 μ m	Sigma-Aldrich, Deutschland
CKMix Tubes Precellys 2 ml	Bertin Technologies, Frankreich

Tabelle 2.18: Reagenzien

Name	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, USA
Acrylamid/Bis Lösung (30 %)	Biorad Laboratories, USA
Adenosintriphosphat	New England Biolabs, USA
Ammoniumpersulfat 10 % (APS)	Sigma Aldrich, USA
Ampicillin	Sigma Aldrich, USA
Attractene	Qiagen, Deutschland
Benzamidin	Sigma Aldrich, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma Aldrich, USA
Calcium chloride (CaCl_2)	Carl Roth GmbH, Germany
Crystal Violet Solution 1 %	Sigma Aldrich, USA
Diaminobenzidine	Sigma Aldrich, USA
Diethyl Pyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich, USA
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, USA
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas, USA
dNTPs 10 mM	Fermentas, USA
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Fisher, USA
DreamTaq Puffer + 20 mM MgCl_2	Thermo Fisher, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Thermo Fisher, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher, USA

Ethanol absolute	Merck, Germany
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Germany
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma Aldrich, USA
Eukitt	Sigma Aldrich, USA
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom, Deutschland
Fibronectin	Roche, Schweiz
FuGene HD Transfection Reagent	Roche, Schweiz
Gel Loading Dye, blau 6x	Fermentas, USA
Gelatine	Sigma-Aldrich, USA
GeneRuler 1 kb DNA ladder	Fermentas, USA
GeneRuler 100 bp DNA ladder	Fermentas, USA
Glycerol-gelatine	Sigma Aldrich, USA
Guanidiniumthiocyanat	Sigma Aldrich, USA
Kanamycin	Sigma Aldrich, USA
Kristallviolett	Sigma Aldrich, USA
LB Medium	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, TUM
L-Glutamin	Biochrom, deutschland
Magnesium Chlorid	Sigma Aldrich, USA
Matrigel	Corning, USA
Methanol	Merck, Germany
Mitomycin C	Sigma Aldrich, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (Temed)	Biorad Laboratories, USA
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)taurin (BES)	Sigma Aldrich, USA
Natriumdesoxycholat	Sigma Aldrich, USA
N-lauroylsarcosine sodium	Sigma Aldrich, USA
Nonidet P40 (NP-40)	Thermo Fisher, USA
Oligo(dT)18 Primer	Fermentas, USA
Ölrot O Pulver	Sigma Aldrich, USA
Opti-MEM	Thermo Fisher, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher, USA
Paraformaldehyde (PFA)	Sigma Aldrich, USA
Pefabloc SC (AEBSF)	Roche, Schweiz
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA
Pepstatin A	Invitrogen, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, USA
Pierc ECL Western Blotting-Substrat	Thermo Fisher, USA
Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt (Poly(I:C))	Sigma Aldrich, USA
Polyvinylpyrrolidone (PVPP)	Sigma Aldrich, USA
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Roche, Schweiz
Proteinase K	Sigma Aldrich, USA
Puromycin	Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA
Random Hexamer Primer	Fermentas, USA

RevertAid H Minus RT	Fermentas, USA
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas, USA
RNase A	Thermo Fisher, USA
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Deutschland
Roticlear	Carl Roth GmbH, Germany
Skimmed milk powder	Fluka, Sigma Aldrich, USA
SOC medium	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, München, Deutschland
Sodium fluorid (NaF)	Sigma Aldrich, USA
Sodium Lauryl sulfate (SDS)	Carl Roth GmbH, Germany
Sodium orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma Aldrich, USA
Splenda	Heartland Food Products Group, USA
Streptomycin Sulfat	Biochrom, Deutschland
Sucrose	Sigma Aldrich, USA
T4 Ligase	New England Biolabs, USA
T4 Polynucleotide Kinase	New England Biolabs, USA
T7 Ligase	New England Biolabs, USA
Tissue-Tek	Sakura Finetek Europe B.V., Deutschland
Tri-Reagent	Sigma Aldrich, USA
Tris	Carl Roth GmbH, Germany
TRITC-phalloidin	Sigma Aldrich, USA
Triton X 100	Biorad Laboratories, USA
Trypan blue	Merck, Germany
Trypsin EDTA	Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA
Tween-20	Merck/Millipore, Germany
β-glycerophosphate	Sigma Aldrich, USA
β-Mercaptoethanol	Promega, USA

2.2.7 Geräte

Tabelle 2.19: Geräte und Herstellerangaben

Geräte	Hersteller
Apotome 3	Zeiss, Deutschland
Autoklav Systec D-65	Systec GmbH, Deutschland
Axio Observer Z1	Zeiss, Deutschland
Axiolab	Zeiss, deutschland
Biometra Compact M /S	Analytik Jena, Deutschland
Biometra Power Pack P25T	Analytik Jena, Deutschland
Biometra Watman Fastblot B43	Biometra, Deutschland
BioRad Transblot SD Semi-Dry Transfer cell	Biorad Laboratories, USA
Bioruptor	Diagenode, USA
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Deutschland
Centrifuge Rotanta 460R	Hettich, Deutschland
Corning Stripettor Plus	Sigma Aldrich, USA
Eismaschine	Ziegra GmbH, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf, Deutschland
Eppendorf Research Plus Gilson Pipetman	Eppendorf, Deutschland
Heidolph Taumler 2040	Heidolph Instruments, Deutschland
Heraeus Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments, Deutschland
HistoCore PEARL	Leica, Deutschland
iFuge BL08VT RPMIX100	Neuation, India
Incubator BB6220 CU	Thermo Fisher Scientific, USA
Inkubator	Heraeus Instruments, Deutschland
inoLab pH Level 1	WTW, Deutschland
Kryostat Leica CM3050 S	Leica, Deutschland
Leica EG1160	Leica, Deutschland
Light Cycler 480 Instrument II	Roche, Switzerland
Megafuge 2.0R	Heraeus Instruments, Deutschland
Microtom Leica RM 2255	Leica, Deutschland
Mikrowelle	Moulinex, Alencon, Frankreich
Mithras LB 940	Berthold Technologies, Deutschland
MRX Microplate Reader ELISA	Dynatech Laboratories, USA
myBath	Benchmark Scientific, USA
Nanodrop ND-1000	Nanodrop Technologies, USA
Neubauer Zählkammer	Brand, Deutschland
PURELAB Ultra Reinswasseranalge	Elga LabWater

Rotamax 12o	Heidolph Instruments, Deutschland
Safety cabinet HSP18	Heraeus Instruments, Deutschland
Sartorius BL610	Sartorius, Deutschland
Sartorius E5500S	Sartorius, Deutschland
SDS chamber PEQLAB Mod: 45-2010-1	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Severin Art. FS 3601	Severin, Deutschland
Shaker Polymax 1040	Heidolph Instruments, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Deutschland
TissueLyser II	Qiagen, Deutschland
UVP Chemstudio Imaging System touch 815	Analytik Jena, Deutschland
UVP GelSolo	Analytik Jena, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Schweiz
Water bath WNB14	Memmert, Deutschland

2.2.8 Software

Tabelle 2.20: Softwareinformationen

Softwarename und Version	Referenz/Hersteller
Rhea Version 1.6	(Lagkouvardos 2017) (Lagkouvardos et al. 2017)
IMNGS Version 1.0	(Lagkouvardos 2016) (Lagkouvardos et al. 2016)
CRISPR Design Tool	(Ran 2013) (Ran et al. 2013)
ICE CRISPR Analysis Tool Synthego	(Conant 2022)
ImageJ 1.53v	Author: Wayne Rasband and contributors Organisation: National Institutes of Health, USA URL: http://imagej.nih.gov/ij
Zen Mikroskopie-Software	Zeiss, Deutschland
R Studio 4.2.2	Titel: R: A language and Environment for Statistical Computing; Author: R Core Team; Organisation: R Foundation for Statistical Computing; Adresse: Wien; Österreich; Jahr: 2023; URL: https://www.R-project.org
ChipCytometry Image Processing	(Jarosch Kohlen 2022) (Jarosch et al. 2022)
Graphpad Prism 8.0.2	Dotmatics, USA
GSEA 4.2.3. (Gene set enrichment analysis)	(Tamayo 2005; Mootha 2003) (Mootha et al. 2003, Subramanian et al. 2005)
LightCyler 480 Software release 1.5.1.62	Roche, Schweiz

3 Ergebnisse

Im Fokus dieser Arbeit steht die Veränderung des Darm-Mikrobioms im Kontext des kolorektalen Karzinoms, zum einen in Abhängigkeit des Mustererkennungsrezeptors TLR3 im primären Darmtumor, zum anderen bei der Leberregeneration, wie sie etwa nach operativer Entfernung von kolorektalen Metastasen auftritt. Demnach gliedert sich die Studie in zwei thematisch miteinander verbundene Teile, die je verschiedene Stadien bzw. Aspekte einer Darmkrebs-Erkrankung, sowie die Wechselwirkung mit der bakteriellen Mikrobiota in Augenschein nehmen.

Im ersten Teil liegt der Fokus auf den komplexen Vorgängen, welche das Tumorwachstum und das Immunsystem modulierenden Effekte von TLR3 bei Darmkrebs betreffen. Bis jetzt ist nicht endgültig geklärt, ob TLR3 eher als Tumorsuppressor oder Tumorpromotor verstanden werden kann und welche molekularen und zelltypspezifischen Mechanismen diesen Zuschreibungen zugrunde liegen. Eigene Vorbefunde hatten eine starke Herabregulation von TLR3 beim humanen Kolorektalkarzinom ergeben. Diese Arbeit zielt darauf ab, Licht auf die TLR3-abhängigen Mechanismen bei Darmkrebs zu werfen und insbesondere die Auswirkung der veränderten Mikro-Umgebung des Tumors und die Darm-Mikrobiota zu untersuchen.

Im Bezug auf die Bedeutung des Mikrobioms wird mit Hilfe von in vivo Modellen und klinischen Proben untersucht, ob Veränderungen in der TLR3 Expression mit taxonomischen Veränderungen der Darm-Mikrobiota verbunden sind und sich etwa bakterielle Liganden als Stimulatoren auf TLR3 auswirken könnten, um so die Mikroumgebung und das Immuninfiltrat des Tumors zu beeinflussen.

Im zweiten Teil liegt der Schwerpunkt auf der vermuteten Bedeutung der Darm-Mikrobiota nach operativer Metastasen Resektion, im speziellen auf der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie. Mit Hilfe vorklinischer, gnotobiotischer und keimfreier Mausmodelle konnten Ergebnisse erzielt werden, die einen neuen Einblick erlauben, wie Bakterien zu dem komplexen Prozess der Leberregeneration beitragen, insbesondere zum Lipidmetabolismus in Leberzellen, und somit das Überleben von Patienten nach chirurgischen Eingriffen verbessern könnten.

Zusammenfassend sollen diese Ergebnisse den Weg für ein tieferes Verständnis der Funktionalität von TLR3 bei der Entstehung und Progression kolorektaler Karzinome ebnen und die Bedeutung der Darm-Mikrobiota bei der Leberregeneration untersuchen. Zukünftig könnten diese Erkenntnisse auch klinisch von hohem Interesse sein, da sie therapeutische Interventionsmöglichkeiten erweitern und somit die Behandelbarkeit von Patienten in verschiedenen Tumorstadien verbessern, und nicht zuletzt unser Verständnis biologischer Prozesse erweitern.

3.1 Der innate Mustererkennungsrezeptor TLR3 als Tumorsuppressor beim kolorektal Karzinom und seine vermutete Wechselwirkung mit dem Darm-Mikrobiom

3.1.1 Die klinische Rolle von TLR3 als Tumorsuppressor bei verschiedenen soliden Krebsarten, sowie beim kolorektalen Karzinom

Im Gegensatz zur Rolle von MYD88 abhängigen Mustererkennungsrezeptoren des innate Immunsystems ist die Einstufung des Trif (Ticam1) abhängigen Rezeptors TLR3 als Tumorpromotor oder -suppressor umstritten. Dies wurde bereits ausführlich im Kapitel „Der TLR3 Signalweg bei Darmkrebs“ besprochen. Um die klinische Bedeutung zu überprüfen, wurde eine Analyse humaner Proben, sowie öffentlich verfügbarer Datensätze vorgenommen, um genetische Veränderungen und Expressionsmuster von TLR3 in soliden Tumoren allgemein und in Darmkrebs im Speziellen zu beleuchten. Daten von 10.953 Patienten aus 32 Studien des öffentlich verfügbaren PanCancer Datensatzes, welche Proben von Personen mit Krebserkrankungen verschiedenen Ursprungs beinhalten (darunter auch Darmkrebs), wurden zunächst für die Analyse herangezogen (Cerami et al. 2012, Gao et al. 2013, de Bruijn et al. 2023).

Der Mustererkennungsrezeptor TLR3 ist in 31 % aller untersuchten Fälle auf genomischem Niveau deletiert, entweder auf einem oder beiden Allelen (**Abbildung 3.1 A**), dagegen haben nur etwa 5 % der Patienten eine Amplifikation des Gen Lokus. Das Gen des Adapter-Proteins TICAM1 (*TRIF*), welches für die Signalweiterleitung nach TLR3 Aktivierung essenziell ist, ist in 23 % der Patienten deletiert und in nur etwa halb so vielen Erkrankten, nämlich 13 %, somatisch amplifiziert, was eine starke Vervielfältigung des Gens beinhaltet oder einen Funktionszugewinn in Form von mehreren Kopien des Gens. Bei TLR3 kommt es nur bei 6 % der Fälle zu einem Funktionsgewinn oder zu einer Amplifizierung. Betrachtet man die Deletionsmutationen genauer, handelt es sich in dem meisten Fällen (n=3195 bei TLR3 und n=2510 bei TICAM1) um heterozygote Deletion, d.h. den Verlust nur eines Allels. Nur 186 Erkrankte haben eine homozygote Deletion von TLR3 und 34 von TICAM1 (**Abbildung 3.1 A**).

Betrachtet man die fünf häufigsten Krebsentitäten des TCGA Datensatzes, Brustkrebs, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Ösophagogastriale Tumore, das Kolorektalkarzinom und Glioblastome, ist auffällig, dass TLR3 in fast 55 % aller nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome und Ösophagogastrialen Tumore und in immerhin 40 % aller Brustkrebs- und Kolorektalkarzinom Patienten verändert ist. In Glioblastomen scheinen TLR3 Veränderungen nur eine geringe Rolle zu spielen, da sie nur mit einer Häufigkeit von 20 % auftreten. Die Deletion von TLR3 tritt bei allen Entitäten deutlich häufiger auf als die Vervielfältigung des Genlokus (**Abbildung 3.1 B**). Bei Brustkrebs treten Vervielfältigungen des TLR3 Genlokus mit 10 % am häufigsten auf. Jedoch ist eine TLR3 Deletionen sehr wahrscheinlich und tritt in Brustkrebs, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, Ösophagogastriale Tumoren und im kolorektalen Karzinom mit einer Häufigkeit von 32 %

– 48 % auf. Besonders bemerkenswert ist, dass ein Verlust von TLR3, egal ob auf einem oder beiden Allelen, sich negativ auf das Krankheitsfreie- und das Gesamtüberleben auswirkt (**Abbildung 3.1 C**). Aufgrund dieser Daten liegt die Vermutung nahe, dass TLR3 einen signifikanten Einfluss auf die Krebserkrankungen zahlreicher Patienten hat und ein Verlust sich negativ auf das Überleben auswirkt.

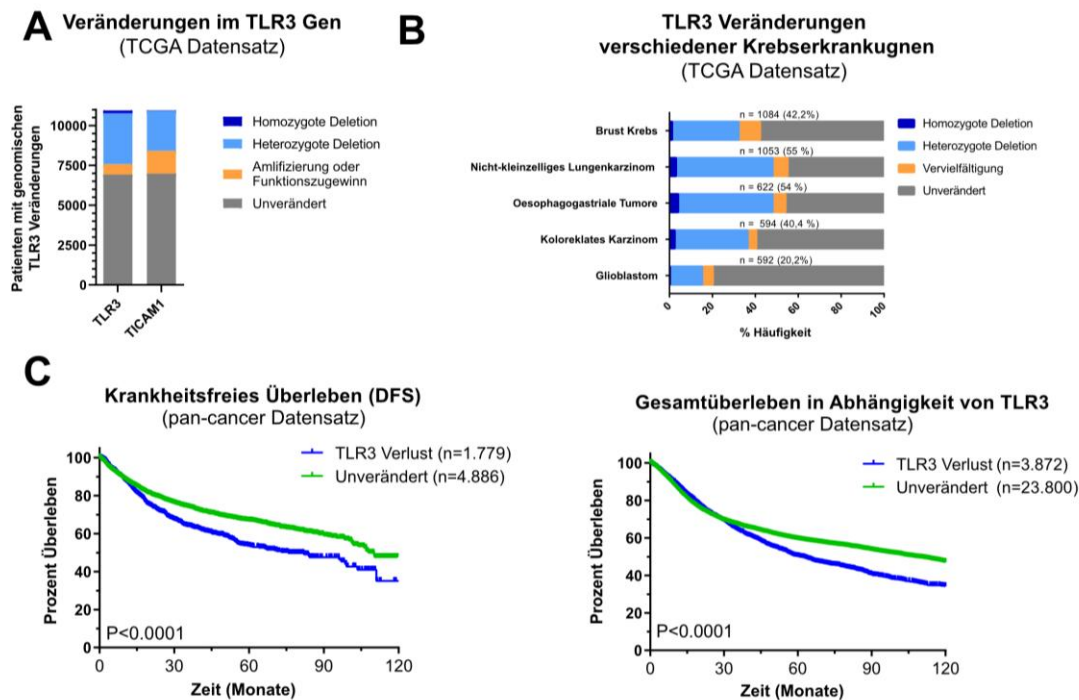


Abbildung 3.1: Prognostische Bedeutung genomischer Deletionen von TLR3 bei Krebserkrankungen

Veränderungen im TLR3 oder TICAM1(Trif) Genlokus aus Daten der TCGA-Datenbank von Patientenproben (n=7758 (TLR3) n=8443 (TICAM1)) aus verschiedenen Krebsentitäten von 32 Studien (A). TLR3 Veränderungen in den häufigsten Krebsentitäten des TCGA-Datensatzes (B). Korrelation des krankheitsfreien Überlebens (disease free survival/DFS) (n = 6668) (C) oder des Gesamtüberlebens (n = 27672) nach Stellung der Diagnose (C) von an Krebs erkrankten Personen mit dem jeweiligen TLR3 Status. Signifikanz wurde mithilfe des Log-Rank (Mantel-Cox) Tests bestimmt.

Die Daten zeigen also einen generellen tumorsuppressiven Effekt von TLR3. Um zu überprüfen, ob die in der cBioportal-Datenbank gefundenen genomischen Deletionen von TLR3 in Tumoren auch auf Expressionsniveau zu beobachten sind, wurden eigene RNA-Expressionsanalysen mithilfe von RT-qPCR durchgeführt. Hierzu wurde ein retrospektives Kollektiv (n=81) von schockgefrorenen operativ resezierten Tumor-Gewebeproben von Patientinnen und Patienten der chirurgischen Klinik der TUM herangezogen. Die Analyse zeigt, dass TLR3 in kolorektalen Tumoren im Vergleich zu normalem Kolon-Darmgewebe auf mRNA-Ebene hochsignifikant reduziert ist (**Abbildung 3.2 A**). Diese Reduktion im Primärtumor ist schon in lokal fortgeschrittenen, noch nicht metastasierten Stadien der Krankheit zu sehen (UICC II, pT3N0M0), und verstärkt sich noch bei fortgeschrittenen Tumoren mit Fernmetastasen (UICC IV, pT3N+M1) (Daten nicht gezeigt). Die TLR3 Ausprägung bleibt dabei auch in Lebermetastasen signifikant reduziert im Vergleich zu „gematchtem“ normalem Darmgewebe, sowie dem primären Darmtumor derselben Person (**Abbildung 3.2 B**).

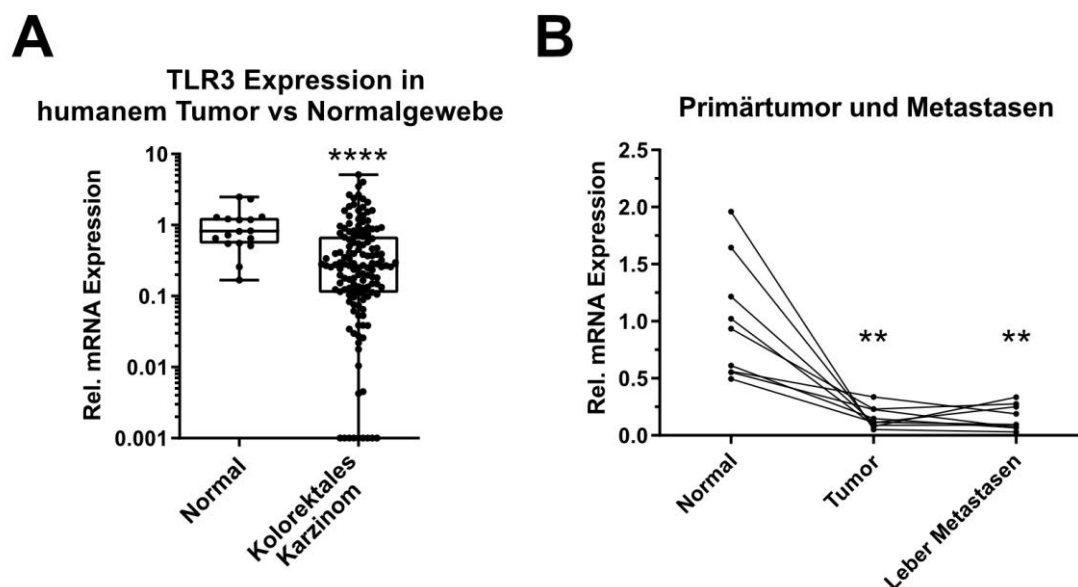


Abbildung 3.2: TLR3 RNA Expression ist im Tumorgewebe und Metastasen von Darmkrebspatienten herunterreguliert

RT-qPCR der TLR3 Ausprägung in humanem Kolorektalgewebe und Dickdarmläsionen (Normal n=17; CRC n = 129) (A). Gepaarte Analyse von TLR3 RNA-Ausprägung in Kolon-, Kolorektalkarzinom- und Lebermetastasengewebe aus derselben entsprechenden Person (n=9) (B). Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-Tests bzw. mithilfe des Wilcoxon-Tests für „gematchte“ Proben ermittelt, wobei $p > 0,05 = \text{n.s.}$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; und $****p < 0,0001$. Für den Signifikanztest wurde jeweils der Unterschied zu Normalgewebe herangezogen.

3.1.2 Molekulare Mechanismen der TLR3-vermittelten Tumorsuppression

Die oben aufgeführten Daten zeigen eine Tumorsuppressor-typische Reduktion der TLR3 Ausprägung im Tumor, sowie einen negativen prognostischen Zusammenhang mit der Mortalität, was ebenfalls auf eine Tumorsuppression hindeutet, die jedoch einen haplo-insuffizienten Typ aufweist. Somit sollte die Frage untersucht werden, welche molekularen und zelltypspezifischen Mechanismen sich hinter dieser putativen Tumorsuppression verbergen, da TLR3 in unterschiedlichen Zelltypen ausgeprägt wird. Zudem stellt sich die Frage nach den Liganden der TLR3 Stimulation, welche möglicherweise die unterschiedlichen Effekte von TLR3 in verschiedenen Tumorentitäten erklären könnten. Es wurde beschrieben, dass endogene, bakterielle oder virale dsRNA TLR3 aktivieren können. Daher kann postuliert werden, dass insbesondere beim Kolorektalkarzinom das Darm-Mikrobiom einen Einfluss auf die Tumorentwicklung haben könnte, der über innate Mustererkennungs-Rezeptoren wie TLR3 vermittelt wird.

Im Folgenden werden daher zuerst die vermuteten TLR3-abhängigen molekularen Mechanismen beim Kolorektalkarzinom untersucht, um dann die Auswirkung des Verlustes von TLR3 im Mausmodell, sowie in Patientengewebe auf das Darm-Mikrobiom zu untersuchen.

Zur Untersuchung der TLR3-abhängigen Transkriptionsprofile wurden zunächst Proben von an Darmkrebs erkrankten Personen (n=10) nach TLR3 mRNA Ausprägung eingeteilt, die mittels RT-qPCR erhoben wurde, und eine RNA-Sequenzierung des Gesamt-Transkriptoms durchgeführt. Eine graphische Auftragung der veränderten Transkripte in einem „Vulcano-Plot“ zeigt eine starke Reduktion der Expression der MAGE A Familie (Melanoma-Associated Antigen) und eine Zunahme von KBTBD12 (Kelch Repeat and BTB Domain Containing 12) in Tumoren mit hoher TLR3 Ausprägung (**Abbildung 3.3 A**). MAGE A Proteine wurden als typische Tumor-assoziierte Epitope beschrieben, die von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden. Sie regulieren vermutlich intrazellulär die Aktivität von E3-Ligasen und können diese aktivieren, die Substratspezifität verändern und die Lokalisation der E3-Ligasen beeinflussen (Weon und Potts 2015). KBTBD12 ist ein Mitglied der Kelch-Protein-Familie und somit ebenfalls ein Adapterprotein für E3 Ligasen und wichtig in der Zusammenstellung des Cullin3 Ubiquitinierungskomplexes. Man sieht also abhängig von TLR3 eine differentielle Regulation verschiedener E3-Ligasen.

Die veränderten Transkripte wurden mithilfe des Softwarepakets DESeq2 (Love et al. 2014) und über Anreicherung von Genmengen (GSEA) und Vergleichen mit der Datenbank *Hallmarks* auf veränderte Signalwege analysiert (Mootha et al. 2003, Subramanian et al. 2005). Die Analyse zeigt: Signifikant herunterreguliert in Tumoren mit hoher TLR3 Expression sind die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT), E2F Zielgene, der G₂M Zellzyklus-Checkpoint und MYC Zielgene V1. Signifikant hochreguliert sind „Allograft Abstoßung“ und „Signalwege der inflammatorischen Antwort“ (**Abbildung 3.3 B und C**). Zusammenfassend scheinen Signalwege im Zusammenhang mit der Proliferation und EMT durch das Vorhandensein von TLR3 negativ und Signalwege der Immunantwort positiv reguliert zu sein.

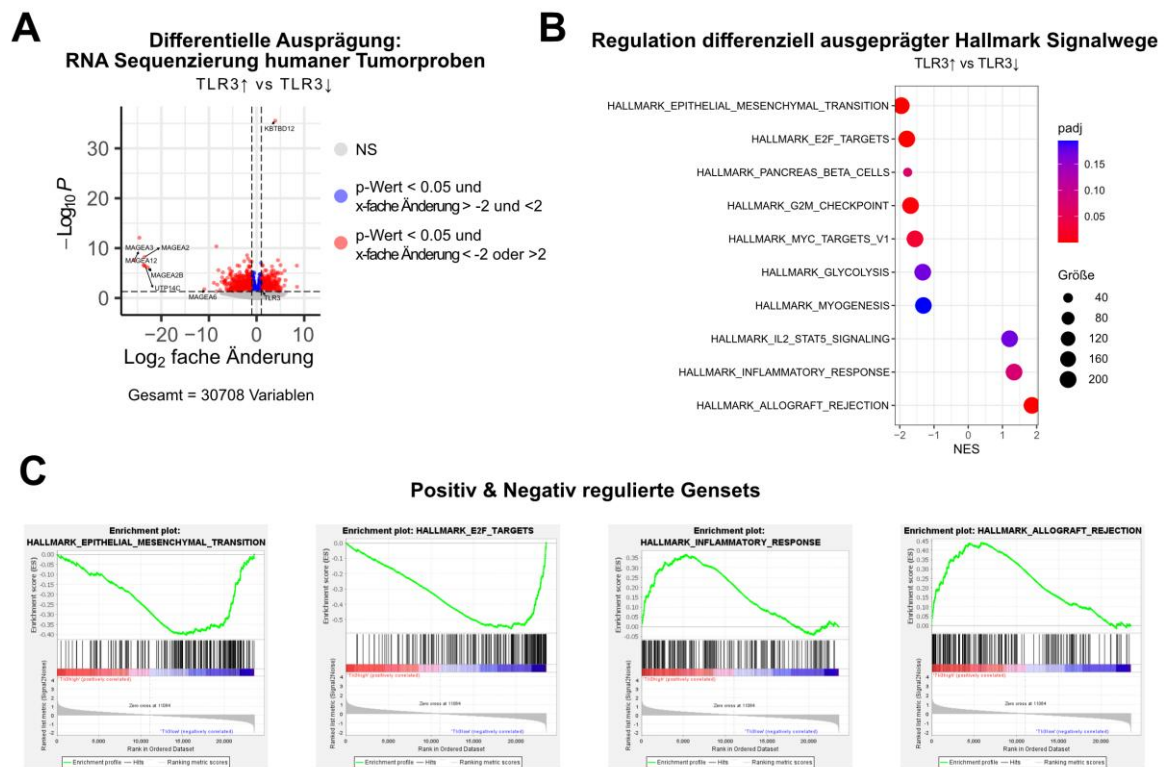


Abbildung 3.3: Analyse der Anreicherung von Genmengen (GSEA) aus der RNA-Sequenzierung humaner Tumorproben, stratifiziert nach der TLR3 Expression

„Vulcano-Plot“ der veränderten Gene humaner kolorektaler Karzinome (n=10) mit hoher (TLR3 $\uparrow$; rechts) und niedriger (TLR3 $\downarrow$; links) Ausprägung von TLR3 (A). Veränderungen in Signalwegen dargestellt als normalisierter Anreicherungs-Wert (normalized enrichment score/NES) in Abhängigkeit von hoher TLR3 Ausprägung (rechts) und niedriger TLR3 Ausprägung (links) (B) oder als Anreicherungsplot (enrichment plot) ausgewählter veränderter Signalwege (C).

3.1.2.1 CRISPR-Cas9 -basierte Erzeugung von humanen TLR3 defizienten Krebszelllinien

Die RNA-Sequenzierungsergebnisse weisen auf verschiedene mögliche molekulare Signalwege hin, welche für die Tumorsuppression verantwortlich sein könnten. Hier ist wichtig zu unterscheiden, welche Effekte direkt von den TLR3 mutierten Tumorzellen herrühren, also Tumorzellautonom sind, und welche indirekten Effekte, wie zum Beispiel durch vorhandene innate und adaptive Immunzellen, induziert werden.

Zur weiteren Untersuchung des Tumorzell-spezifischen Effekts von TLR3, wurden als vereinfachtes, reduktionistisches in vitro Modell TLR3 defiziente humane Zelllinien generiert. Hierzu wurden Kolorektalkarzinom-Zelllinien durch CRISPR-Cas9 induzierter Mutagenese mithilfe von zwei unabhängigen sgRNA erstellt, welche Zielsequenzen im Exon 2 des TLR3 Locus beinhalten (**Abbildung 3.4 A**). Mit diesen Zellklonen wird im Folgenden die vermutete tumorzellautonome Funktion von TLR3 untersucht.

Die TLR3 Defizienz wurde durch RT-qPCR, Immunoblot und direkte DNA-Sequenzierung verifiziert. Eine direkte DNA-Sequenzierung der TLR3 Genloci der Klone wurde durchgeführt, um die Mutation der Klone zu verifizieren (**Abbildung 3.4 B,C, und D**). Das PCR Produkt der Zielregion zeigt bei den parental Linien, sowie den meisten Klonen die erwartete Bande bei 400 bp. Der HCT116 TLR3KO sg2 Klon weist zwei Banden mit einer Größe von 600 und 700 bp auf (**Abbildung 3.4 B**). Sehr wahrscheinlich hat hier eine Insertionsmutation stattgefunden. Die Sequenzanalyse zeigt zudem, dass keine Übereinstimmung mehr zwischen dem Klon HCT116 TLR3KO sg2 und der parental Linie möglich ist (**Abbildung 3.4 D**). Der HCT116 TLR3KO sg1 Klon zeigt eine Frequenz von Insertions- oder Deletionsmutationen (Indels) von 88 %. Die DLD1 TLR3KO Klone zeigen einen Prozentsatz genomischer Indels von 74 bzw. 95 %.

TLR3 mRNA Level sind in CRISPR-Cas9 modifizierten DLD1 Zellklonen im Vergleich zu Wildtyp Zellen reduziert (Anhang **Abbildung 6.2**). Der TLR3 Antikörper bindet im Immunoblot zwei Fragmente; zum einen das komplette Protein bei 130 kDa, sowie ein C-Terminales Fragment bei 70 kDa, welches durch proteolytische Spaltung entsteht. Es wurde gezeigt, dass sowohl das komplette TLR3 Protein als auch das C-Terminale Fragment den synthetischen Liganden Poly(I:C) binden und Signalweiterleitung induzieren kann (Ewald et al. 2011, Garcia-Cattaneo et al. 2012, Toscano et al. 2013). Im Immunoblot sind beide Banden des TLR3 Proteins in DLD1 und HCT116 Zellen nach CRISPR-Cas9 Mutagenese nicht mehr detektierbar (**Abbildung 3.4E**). Folglich sind die erstellten CRC-Zelllinien TLR3 defizient und können in Folgeexperimenten herangezogen werden.

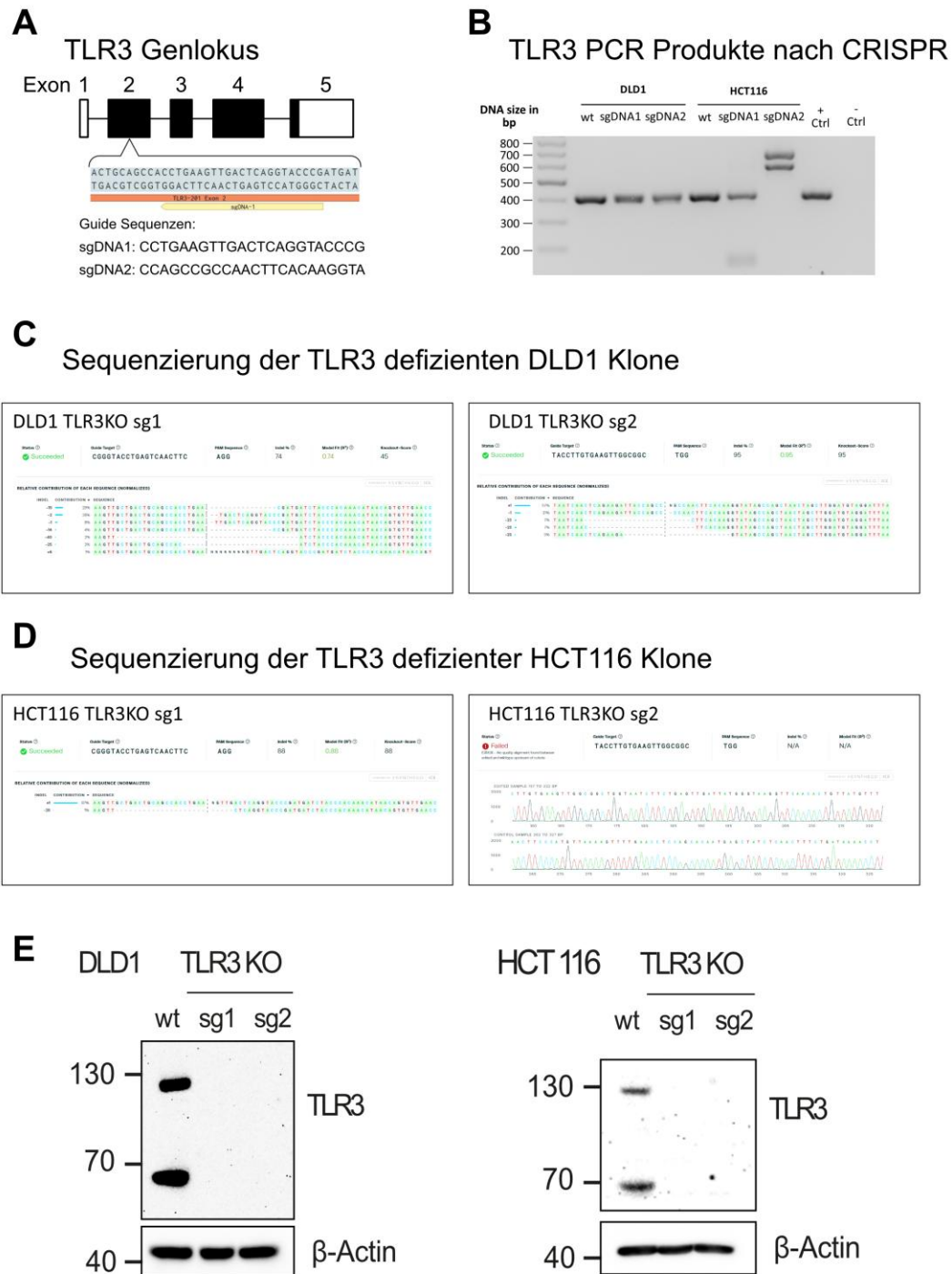


Abbildung 3.4: Erstellung TLR3 defizienter Kolorektalkarzinom-Zelllinien mithilfe von CRISPR-Cas9

Schematische Darstellung des humanen TLR3 Genlokus und der zwei Bindungsstellen für die CRISPR-Cas9 induzierte Mutagenese (A). PCR-Produkte des relevanten Genlokus nach CRISPR-Cas9 Mutagenese mittels zwei verschiedener Guide-RNA (sgRNA) Sequenzen (B). Sequenzierung verschiedener TLR3 defizienter Klone der DLD1 (C) und HCT116 (D) Linien und Analyse durch die Synthego ICE-Analyse Validierung der Frameshift-Mutationen durch die CRISPR-Cas9 induzierte Mutagenese mithilfe zweier sgRNAs. Prozentangaben geben die relative Häufigkeit der jeweiligen Sequenz an, die in der analysierten Probe vorhanden ist. Immunoblot gegen TLR3 in Wildtyp und TLR3 deletierten kolorektalen Krebszelllinien DLD1 und HCT116 (E).

3.1.2.2 Auswirkung von TLR3 auf Migration und Invasion in humanen Kolorektalkarzinom-Zellen

Aufgrund der in der GSEA-Analyse in Patientenproben beobachteten transkriptionellen Veränderung der EMT-Signalwegen in Abhängigkeit von TLR3, wurden die direkten (zellautonomen) Effekte von TLR3 in Krebszellen im Hinblick auf die Migrationsfähigkeit und die Invasivität getestet. Kollektive Zellmigration im 2D Wundheilungsversuch, sowie Einzelzellmigration durch Poren in 3D Transwell-Migrationsexperimenten zeigen, dass die Zell-Migration bei Fehlen von TLR3 in Krebszelllinien DLD1 und Einzelzellmigration in HCT116 reduziert ist (**Abbildung 3.5A, B und C**). In Wildtyp DLD1 Zellen kann man einen Trend erkennen, dass durch Poly(I:C) Stimulation die Motilität der Zellen steigt, allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant. Im Gegensatz zur reduzierten Migrationsfähigkeit nach Verlust von TLR3, kommt es bemerkenswerterweise zu einer Steigerung der Invasivität von HCT116 Zellen mit TLR3 Defizienz (**Abbildung 3.5 D**). Die Ergebnisse des Invasions-Assays spiegeln somit die Daten der RNA-Sequenzierung (EMT als bedeutendster deregulierter Signalweg) besser wieder als die Migrations-Experimente, bei denen die Interaktion mit der extrazellulären Matrix nicht abgebildet wird. Die Veränderungen in den Transkripten, die in **Tabelle 6.2** (Anhang) dargestellt sind, weisen zudem auf Modifikationen der extrazellulären Matrix hin. Möglicherweise führen diese zu einer stärkeren Aktivierung der Integrin getriebenen Aktivierung der Kinasen FAK-SRC, die eine wichtige Komponente der EMT darstellt (Franke et al. 2020). Um experimentell zu überprüfen, ob FAK-SRC Signalweiterleitung eine Rolle in TLR3 abhängigen Veränderungen in Migration oder Invasion spielt, wurden einige wichtige Proteine dieses Signalwegs mittels Immunoblot analysiert. Sowohl FAK und phospho-FAK als auch der nachgeschaltete Signaladapter p130Cas und phospho-p130Cas werden TLR3 abhängig nach Poly(I:C) Behandlung hochreguliert (**Abbildung 3.5 E**). Bei Verlust von TLR3 ist keine Induktion der Expression mehr zu beobachten, was für einen TLR3 abhängigen Phänotyp spricht. Bemerkenswerterweise scheint die Grundexpression von FAK, p130Cas und die Aktivierung von phospho-p130Cas bei TLR3 Deletion im Vergleich zum unstimulierten Zustand der Wildtyp Zelllinien erhöht zu sein. Dies könnte allerdings auch einen klonalen Artefakt darstellen. Zusammenfassend scheint also bei TLR3 Defizienz die Induzierbarkeit von FAK und p130Cas Phosphorylierung verloren zu gehen, allerdings ist ihre Grundaktivierung möglicherweise erhöht.

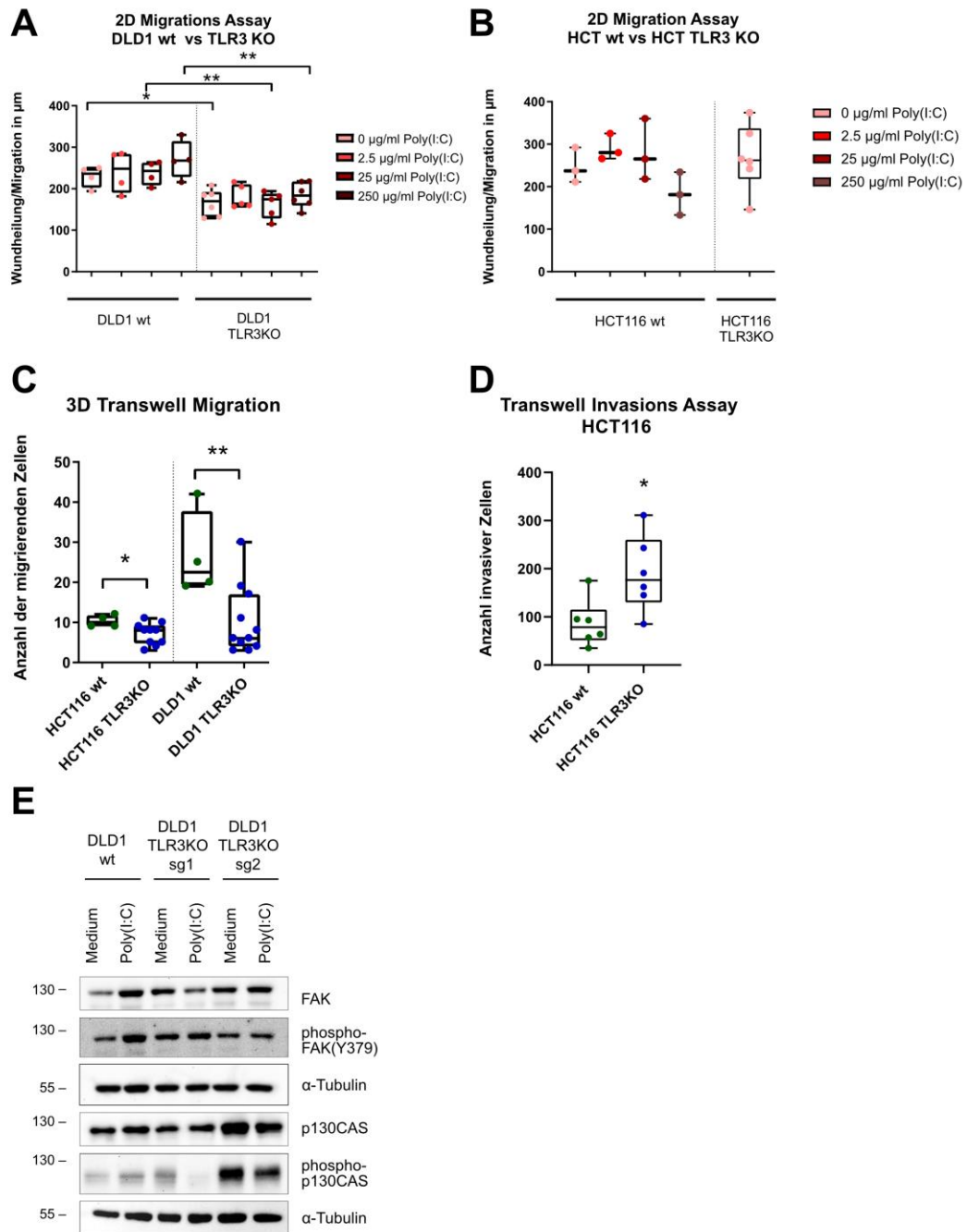


Abbildung 3.5: Krebszellautonome Veränderung in Migration und Invasion

Kollektive Zellmigration wurde mittels 2D Wundheilungsexperimenten unter der Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an Poly(I:C) in den TLR3 defizienten Zelllinien und parentalen DLD1 (A) oder HCT116 Zellen (B) untersucht. Die Schließung der Lücke wurde 0 Stunden und 19 Stunden für DLD1 bzw. 15 Stunden für HCT116 nach Entfernung des Abstandshalters mikroskopisch bestimmt. Einzelzellmigration der beiden Zelllinien wurde in einem Transwell-Migrationsassay untersucht (C). Die Migration der HCT116 Zellen wurde in einem Transwell-Invasions-Experiment bestimmt (D). Immunoblot von Signalweiterleitungsproteinen im FAK-SRC Signalweg, welche wichtig für Epitheliale-Mesenchymal-Transition (EMT) sind (E). Signifikanzen sind wie folgt gezeigt: $p > 0,05$ = n.s. kein Index; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; und **** $p < 0,0001$. Signifikanzen wurden mittels zwei-seitigem Student-T-Test berechnet. Teile dieser Daten wurden mit Unterstützung von Laura Geyer und Tina Krammel erstellt.

Der Unterschied im Migrations- und Invasionsverhalten der TLR3 defizienten Zellen wirft die Frage auf, welcher dieser Phänotypen *in vivo* überwiegt. Um dies zu testen, wurden die bereits beschriebenen Zellen in Matrigel auf eine Chorion Allantois Membran (CAM) von befruchteten Hühnereiern ausgebracht (CAM-Assay). Nach 7 Tagen Inkubation bei 37 °C wurde das Tumorstadium, sowie speziell das vermutete Eindringen der humanen Krebszellen in die Wirtsmembran analysiert.

Bezüglich der Morphologie und der Tumorgroße gibt es keinen offenkundigen TLR3 abhängigen Unterschied (**Abbildung 3.6 B, C**). Die Anzahl der nicht angewachsenen Tumore beträgt mit und ohne TLR3 Defizienz ungefähr 3 % (**Tabelle 3.1**), allerdings ist die Tumorentstehungsrate bei TLR3 defizienten Zellen deutlich höher. Es liegt nahe, dass die hohe Anzahl an abgestorbenen Membranen mit Wildtypzellen ausschlaggebend hierfür ist.

Tabelle 3.1: Statistik der angewachsenen Tumore in Chorion Allantois Membran (CAM)

	HCT116 wt	HCT116 TLR3KO
Anzahl der Eier	39	36
Anzahl angewachsener Tumore	26	31
Anzahl abgestorbener Tumore	1	1
Tote Eier	12	4
Tumorentstehungsrate	66,7 %	86,1 %
Tumorentstehungsrate (ohne tote Eier)	96,3 %	96,9 %

Mikroskopische Analysen nach Einbetten der resezierten Tumore zeigen, dass Tumorzellen ohne TLR3 in der Lage sind, sich zu vereinzeln und deutlich weiter in die Membran des Wirtes einwandern (**Abbildung 3.6 A und C**). Zusätzlich wurde eine Einteilung der Tumore in ein Punktesystem, einen Invasionscore, vorgenommen. Score 0 zeichnet sich durch klare und histologisch scharf abgegrenzte Ränder zwischen Tumor und CAM-Gewebe aus. Hierbei sind Tumorzellen auch in Hämatoxylin & Eosin Färbung deutlich von der CAM unterscheidbar. In Score 1 fallen Tumore mit überwiegend klar abgegrenztem Rand und invasiven Zellen an nur einer Stelle. Außerdem ist die Tumorstuktur eher porös und schwammartig, was auf Nekrosen durch rasches Wachstum hindeutet. Ein Tumor des Score 2 ist an mehreren Stellen nicht klar zur CAM abgrenzbar und zeigt Zellen, die eine Invasionstiefe von mindestens 200 µm erreichen. Die Struktur ist, analog zu Score 1, ebenfalls schwammartig. Ein Tumor mit Score 3 zeigt keine klaren Grenzen zur CAM mehr und besteht aus vielen invasiven Zellen und vereinzelt Zellclustern. TLR3 defiziente HCT116 Zellen zeigen einen signifikant erhöhten Invasionscore im Vergleich zu TLR3 Wildtyp Zellen (**Abbildung 3.6 C**).

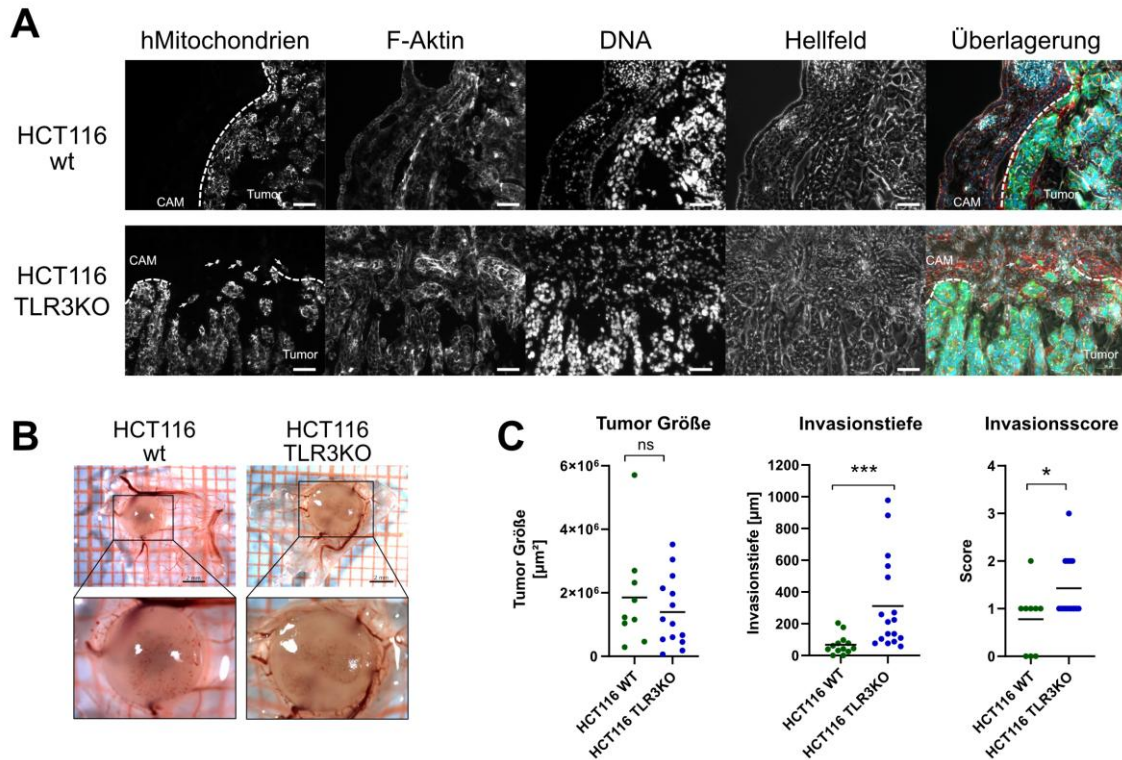


Abbildung 3.6: Gesteigerte Invasivität von TLR3 defizienten HCT116 Zellen in vivo CAM (Chorion Allantois Membran) Experimenten

Immunofluoreszenzfärbung der Tumor-CAM Grenzfläche von HCT116 parental Zellen (wt) und TLR3 defizienten Zellen (TLR3KO) in Matrigel; Maßstabsbalken = 50 μm (A). Repräsentative makroskopische Bilder der TLR3 kompetenten und defizienten HCT116-Tumore auf der CAM (B) mit Quantifizierung der Tumorgroße, Invasionstiefe und Invasionswertung (C). Signifikanzen wurde mittels des Mann-Whitney-Tests bestimmt und zeigen $p > 0,05 = \text{n.s.}$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; und $****p < 0,0001$. Die Daten wurden von Lisa Hornsteiner und Tina Krammel und in enger Kooperation mit Raphela Anjan (AG Reichert, MRI) und Hannah Vikkula (AG Schusser, Freising) erstellt.

3.1.2.3 TLR3 Effekte auf Proliferation von Krebszelllinien

Als zweiter wichtiger differenziell regulierter Mechanismus wurden in der RNA-Sequenzierung humaner Proben Proliferations-assoziierte Signalwege festgestellt (**Abbildung 3.3 B**). Aus diesem Grund wird im Folgenden die Abhängigkeit der Tumorzell-Proliferation von TLR3 untersucht. Hierzu wurden erneut die in **Abbildung 3.4** beschriebenen TLR3 defizienten Zelllinien DLD1 und HCT116 und deren parentale Linien als Kontrolle verwendet.

Zunächst wurde ein Vergleich von Wachstum und Überleben der Zellen mit und ohne Stimulation durch das dsRNA Analogon Poly(I:C) in einem Klonogenen-Überlebens-Experiment (Clonogenic Survival) durchgeführt. Hierzu wurden Zellen in niedriger Anzahl ausgesät und nach 120 Stunden Inkubation mit Kristallviolett gefärbt. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde das Kristallviolett mittels Methanolextraktion aus den Zellen gelöst und die Absorption bei 560 nm gemessen. Da in DLD1 Zelllinien auch bei hohen Konzentrationen kein Einfluss von Poly(I:C) auf das klonogene Überleben der Zellen festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde hier mit einer Konzentration von 25 µg/ml Poly(I:C) stimuliert, welche auch für weitere Experimente verwendet wurde. Wie schon beschrieben, gibt es keinen direkten Effekt von Poly(I:C) auf das Überleben der parentalen DLD1 Zelllinie (**Abbildung 3.7 A,B**). Auch die TLR3 defizienten DLD1 Zelllinien zeigen keine sichtbare Reduktion der Zellzahl durch Poly(I:C) Stimulation (**Abbildung 3.7 A,B**). Vergleicht man die makroskopischen Bilder der Färbungen, so entsteht der Eindruck, dass die TLR3 defizienten DLD1 Linien etwas weniger dicht wuchsen als die parentale Linie (**Abbildung 3.7 A**), allerdings bestätigt die Quantifizierung nach Methanolextraktion diesen Eindruck nicht. Möglicherweise ist der Effekt nicht detektierbar, da eine relative hohe Standardabweichung zugrunde liegt. Im Gegensatz zu DLD1 Zellen verringert sich das Wachstum von HCT116 durch Zugabe von Poly(I:C). Dies tritt allerdings erst bei hohen Konzentrationen von Poly(I:C) deutlich zu Tage (Anhang **Abbildung 6.3**). Aus diesem Grund wurde eine Konzentration von 250 µg/ml Poly(I:C) gewählt. Unter diesen Bedingungen sieht man ein signifikant geringeres Wachstum der parentalen HCT116 Zellen mit und ohne Poly(I:C) Stimulation (**Abbildung 3.7 C,D**). Die TLR3 defizienten HCT116 Linien zeigen keine Veränderung im Wachstum nach Poly(I:C) Stimulation. Diese sind also vermutlich vor TLR3-vermitteltem Zelltod geschützt (**Abbildung 3.7 C,D**). Vergleicht man die Wildtyp HCT116 Zellen im Wachstum mit den TLR3 defizienten Linien, sieht man, dass die Zelllinie, welche mit der „guide RNA“ sg1 erstellt wurde, deutlich langsamer wächst als die Linie mit der sgRNA2. Dies ist möglicherweise ein klonaler Effekt und somit nicht direkt auf TLR3 zurückzuführen.

Die vermuteten Unterschiede in der Zell Proliferation zwischen den parentalen DLD1 und den TLR3 defizienten Zelllinien wurden mittels eines XTT-Experiments untersucht. Hier bestätigte sich der Trend, dass TLR3 defiziente Linien etwas langsamer wachsen als die parentale Linie. Dieser Unterschied ist aber auch hier nicht signifikant (**Abbildung 3.7 E**). Betrachtet man auf molekularer Ebene die Aktivierung von ERK1/2, also einem intrazellulären Kinase-Signalweg, der für die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges

steht und zentral in die Regulation der Proliferation involviert ist, ist keine Veränderung in der gesamten Proteinmenge von ERK1/2 erkennbar. Es ist weder zwischen den Zelllinien noch durch Stimulation mit Poly(I:C) eine deutliche ERK1/2 Aktivierung durch Phosphorylierung zu erkennen (**Abbildung 3.7 F**). Ein starker Einfluss von TLR3 auf die Proliferation der Krebszellen *in vitro* scheint somit nicht vorhanden zu sein.

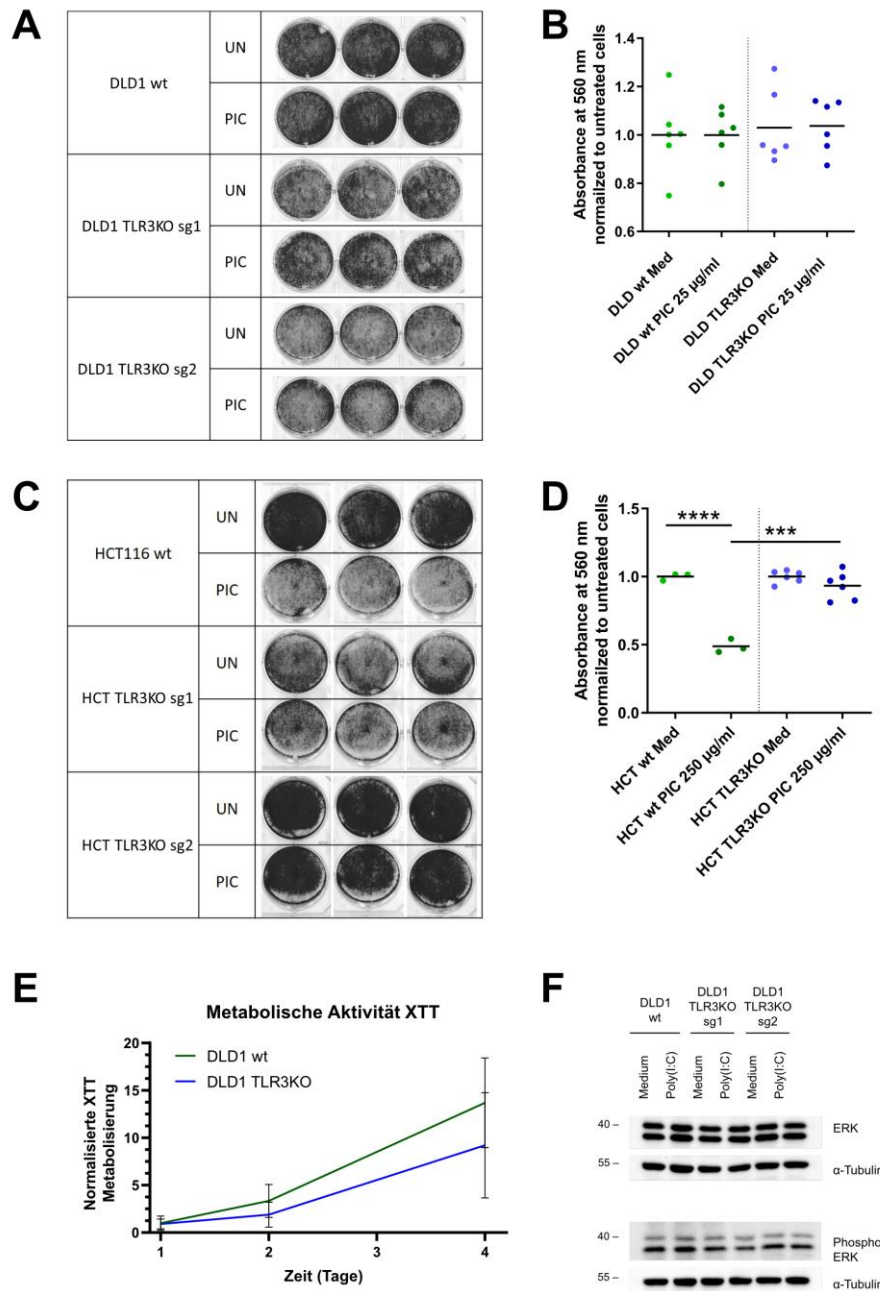


Abbildung 3.7: Proliferation der kolorektalen Krebszelllinien HCT116 und DLD1 in Abhängigkeit von TLR3

Klonogenes Überleben von DLD1 Wildtyp (wt) und TLR3KO Zellen mit und ohne Stimulation durch 25 µg/ml Poly(I:C) (PIC) für 120 Stunden visualisiert durch Kristallviolett Färbung (A) und Quantifizierung mittels Methanolextraktion des Farbstoffes (B). Kristallviolett Färbung des klonogenen Überlebens von HCT116 Wildtyp (wt) und TLR3KO Zellen nach Stimulation mit 250 µg/ml Poly(I:C) (PIC) oder Kontrolle (UN) nach 120 Stunden (C). Methanolextraktion des Kristallviolett zur Quantifizierung der Ergebnisse des klonogenen Überlebens (D). Proliferationsanalyse von DLD1 wt (grün) und TLR3 KO (blau) Zelllinien auf Grundlage von XTT Experimenten (n=5) (E). Immunoblot von Zelllysaten der verschiedenen DLD1 Zelllinien mit und ohne Einfluss von 25 µg/ml Poly(I:C) (F). Gezeigt sind Mittelwerte $\pm$ SD. Signifikanztest wurde mit zweiseitigem Student-T-Test durchgeführt mit $p > 0,05$ = n.s.; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; und **** $p < 0,0001$.

3.1.2.4 Das Transkriptom von DLD1-Zelllinien mit und ohne Poly(I:C)-Stimulation in Abhängigkeit von TLR3

Zur weiteren Aufschlüsselung der tumorzellspezifischen-Effekte wurde das Transkriptom von TLR3 defizienten DLD1-Zellen und der parentalen Zelllinie, jeweils mit und ohne Poly(I:C) Stimulation sequenziert und die differenzielle Aktivierung von Signalwegen analysiert. Da dsRNA nicht nur von TLR3, sondern auch anderen Rezeptoren, wie die RNA Helicase RIG-I (retinoic acid-inducible gene I), MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5), PKR (protein kinase R), oder OASes (oligoadenylate synthases) erkannt wird (Luan et al. 2024), wurde hier Poly(I:C) auf die TLR3 defizienten Klone gegeben, um Mechanismen der TLR3 unspezifische Aktivierung auszuschließen. Im Vergleich der Zelllinien ohne Stimulation sind vier „Hallmark“ Signalwege signifikant in der parentalen Linie hochreguliert, nämlich MYC Zielgene V1, oxidative Phosphorylierung, Allograft Abstoßung und Protein Sekretion (**Abbildung 3.8 A**). Nur der Signalweg „Pankreas Beta Zellen“ ist signifikant erhöht in TLR3 defizienten DLD1 Zellen, jedoch ist dieser nur durch wenige Zielgene vertreten und auch biologisch in diesem Zusammenhang eher vernachlässigbar. In guter Übereinstimmung mit der zuvor durchgeführten Transkriptom-Analyse im Tumorgewebe von Patienten taucht auch hier der Signalweg „Allograft Abstoßung“ positiv mit TLR3 korreliert auf. Dagegen erscheinen „MYC Zielgene V1“ in Tumorzellen zwar positiv mit TLR3 korreliert zu sein, jedoch gegenläufig zu den Ergebnissen in der humanen Gewebeanalyse.

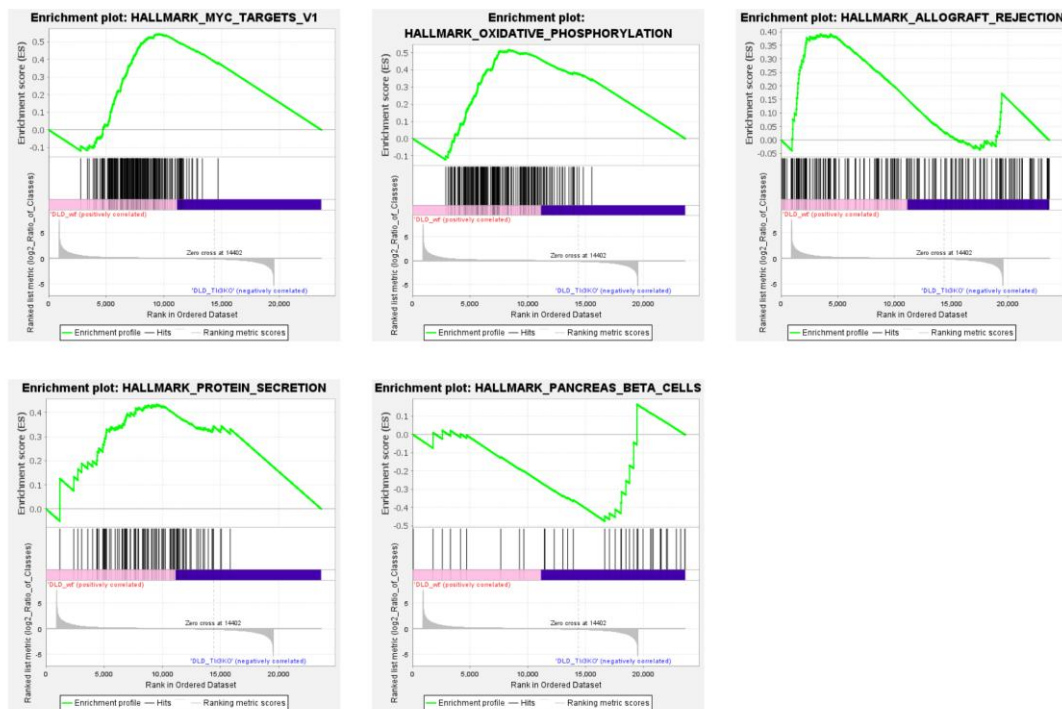
Nach Stimulation mit Poly(I:C) sind 16 verschiedene Signalwege differenziell hochreguliert, darunter sind bemerkenswerterweise auch die Signalwege „Allograft Abstoßung“ und „Inflammatorische Antwort“ in Abhängigkeit von TLR3 signifikant hochreguliert (**Abbildung 3.8 B**). Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung der humanen Tumorproben überein (**Abbildung 3.3 C**). Eine signifikante Veränderung von Signalwegen in Verbindung mit Proliferation oder der EMT (Epithelial zu Mesenchymalen Transition), wie es bei der Sequenzierung humaner Tumorproben beobachtet wurde, kann in den Zelllinien *in vitro* nicht festgestellt werden, was auf die Zellkulturbedingungen und Zelllinien-spezifische Effekte zurückzuführen sein könnte. Es liegen jedoch auch bei dem *in vitro* Ansatz Hinweise für eine Tumorzell-induzierte Aktivierung des Immunsystems vor, etwa durch Produktion von Chemokinen durch die Tumorzellen selbst. Somit induzieren die Tumorzellen Transkriptionsprofile, welche möglicherweise auch in der *in vivo* Situation zur Aktivierung des Immunsystem führen könnten.

Um diese Hypothese zu testen, wurden DLD1 Zellen mit und ohne TLR3 Ausprägung mit Poly(I:C) behandelt, um anschließend die Zytokin Expression und Zielgenaktivierung auf RNA-Ebene zu analysieren. Die TLR3 Aktivierung führt zur TLR3 abhängigen Steigerung der Expressionslevel von CXCL8, CXCL10, so wie CXCL11 (Anhang **Abbildung 6.4**). Diese Zytokine dienen zur chemotaktischen Rekrutierung von Immunzellen, spezifisch von T-Zellen, NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten. Erwartungsgemäß führt eine Stimulation von DLD1 Zellen mit Poly(I:C) nach 6 Stunden zur Expressionssteigerung von

Interferon- β -1, bei Betrachtung späterer Zeitpunkte kommt es allerdings zu hohen Schwankungen. Durch Deletion von TLR3 schwankt das Expressionslevel von Interferon- β -1 stark und eine Induktion mit Poly(I:C) ist nicht mehr möglich (Anhang **Abbildung 6.4**). IRF3, Interleukin-1- α , Vimentin, JAM-A, Occludin sind durch Poly(I:C) Stimulation oder TLR3 Defizienz in DLD1 Zellen unverändert (Anhang **Abbildung 6.4**).

A

Genset Veränderungen in DLD1 Wildtyp vs. DLD1 TLR3KO



B

Ausgewählte Genset Veränderungen in stimulierten DLD1 Wildtyp vs. DLD1 TLR3KO

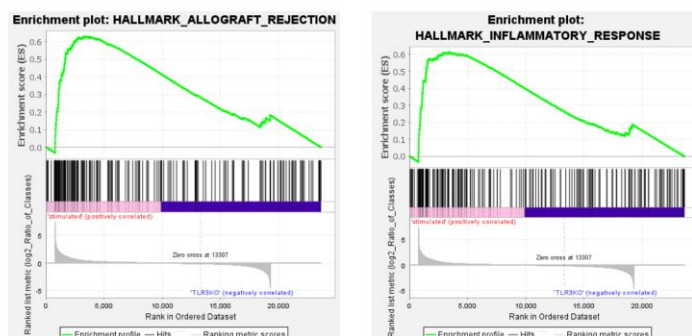


Abbildung 3.8: RNA-Sequenzierung von TLR3 defizienten DLD1 Zelllinien

Anreicherung von Genen bestimmter Signalwege der Annotationsdatenbank *Hallmark* aus der RNA-Sequenzierung der kolorektalen Krebszelllinie DLD1 mit und ohne TLR3 Defizienz (A) und nach Stimulation mit 25 μ g/ml Poly(I:C) (B).

3.1.2.5 Das Tlr3^{LSL} und Ticam1 Mausmodell in einem genetischen Darmkrebsmodell als Werkzeug zur Erforschung komplexer molekularer Zusammenhänge

Zur Analyse der systemischen Effekte von TLR3 wurde ein Mausmodell verwendet, bei dem sich eine lox-stop-lox (LSL) Kasette zwischen Exon 3 und 4 des murinen Tlr3 Gens befindet (Anhang **Abbildung 6.5**) (Garcias Lopez et al. 2020, Hidalgo-Sastre und Kuebelsbeck et al. 2021), die Methode wurde schon bei anderen Genloci eingesetzt (Holtorf et al. 2018) und zur Zelltypspezifischen re-expression von Tlr3 verwendet (Hidalgo-Sastre und Kuebelsbeck et al. 2021). Die Kasette führt zu einer globalen Tlr3 Defizienz (Tlr3^{Stop}) und sie wurde in einem Apc^{1638N/+} Hintergrund gezüchtet, welcher zur Ausbildung von Tumoren vorwiegend im Dünndarm der Mäuse führt. Da eine zelltypspezifische Funktion von TLR3 erwartet wurde, wurde zudem ein Mausmodell mit p-Villin spezifischer Expression der Cre-Rekombinase eingekreuzt (Anhang **Abbildung 6.5**). Dies führt in dem Modell zu einer Re-Expression von Tlr3 in intestinalen epithelialen Zellen (IEC) (Tlr3^{IEC}). Die Auswirkungen des globalen Tlr3 Verlustes (Tlr3^{Stop}) und der erneuten Expression in IECs (Tlr3^{IEC}) auf die Tumorausprägung, sowie die immunologische Antwort wurde im Weiteren untersucht.

Da Tlr3 der einzige Toll-like-Rezeptor ist, welcher ausschließlich Trif (Ticam1) für die Signalweiterleitung verwendet, stellt sich die Frage, ob der Verlust des Adapterproteins Trif zu einem vergleichbaren Phänotyp führt. Hierfür wurden Mausmodelle mit Mutationen im *Ticam1* Gen untersucht. Zum einen handelt es sich bei den Modellen um eine bereits beschriebene Punktmutation im Ticam1 Gen (Hoebe et al. 2003) und zum anderen um eine Insertion einer LSL-Kasette analog zum Tlr3 Model (unveröffentlichte Daten). Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse im Alter von 5 bis 18 Monaten analysiert (Anhang **Abbildung 6.6**).

Die Überlebensrate der Tiere ist bei Verlust von Tlr3 drastisch reduziert (Apc^{1638N/+} Tlr3^{stop}) (**Abbildung 3.9 A**). Bei einer Re-Expression von Tlr3 im Darmepithel (Apc^{1638N/+} Tlr3^{IEC}) kommt es zu einem sogenannten „Rescue“-Effekt, das Überleben der Tiere unterscheidet sich nicht mehr signifikant von dem des Apc^{1638N/+} Modells. Generell rekapituliert der Verlust von Tlr3 im Mausmodell, den tumorsuppressiven Effekt auf das Überleben, welcher im Menschen zu beobachten ist. Da es bei globalem Tlr3 Verlust bereits bei jungen Tieren zu einer Einschränkung des Überlebens kommt, besteht die Möglichkeit, dass ein stärkerer Phänotyp oder ein schnelleres Voranschreiten der Krankheit ursächlich für das verringerte Überleben sein könnte. Die Verbesserung im Überleben in der Apc^{1638N/+} Tlr3^{IEC} Tiere bedeutet, dass Tlr3 speziell in den IEC für die tumorsuppressive Wirkung verantwortlich ist, welche zu einer Verbesserung im Überleben führt. Mit Verlust von Ticam1 verbessert sich das Überleben im Vergleich zu Mäusen des Apc^{1638N/+} Modells signifikant und Ticam1 wirkt folglich eher tumorfördernd und überlebensverkürzend (**Abbildung 3.9 A**). Das Ticam1 Mausmodell rekapituliert somit nicht den Phänotyp des Tlr3 Modells. Ticam1 vermittelt neben TLR3 Signalweiterleitung auch die Aktivierung von TLR4. Es ist wahrscheinlich, dass der TLR4 Effekt für den beobachteten Effekt im Ticam1 Model verantwortlich ist, da TLR4 als tumorfördernd beschrieben wurde (Wen et al. 2024).

In diesem Mausmodell scheinen die TLR4 Effekte gegenüber denen von TLR3 zu dominieren. Aus diesem Grund wird im Rahmen dieser Arbeit das Ticam1 Mausmodell nicht weiter untersucht.

Es stellt sich die Frage, inwiefern sich die Modelle mit Tlr3 Verlust und Re-Expression unterscheiden und welche Faktoren zu dem veränderten Überleben beitragen. Die Tumorgroße ist bei globalem Tlr3 Verlust nicht signifikant verändert, jedoch sind die Tumore tendenziell größer (**Abbildung 3.9 B und E**). Eine Re-Expression von Tlr3 in $Apc^{1638N/+} Tlr3^{IEC}$ Mäusen führt zu einer Vergrößerung des Tumordurchmessers, was makroskopisch deutlich sichtbar und signifikant ist (**Abbildung 3.9 B und E**). Tlr3 scheint in IEC einen Tumor-fördernden Effekt auf die Tumorgroße zu haben. Ein globaler Verlust von Tlr3 führt allerdings nicht zu einer Verkleinerung der Tumore. Beachtlicherweise führt der vergrößerte Durchmesser der Tumore bei $Apc^{1638N/+} Tlr3^{IEC}$ Mäusen nicht zu einer Einschränkung im Überleben der Mäuse. Tlr3 defiziente Mäuse ohne $Apc^{1638N/+}$ Mutation und wildtyp Tiere entwickeln keine Läsionen (Anhang **Abbildung 6.6**). Die Dünndarm Mukosa aller Modelle ist laut histologischer Befunde unauffällig. Die Histologie der Tumore zeigt, bei den Läsionen aller Genotypen eine desorganisierte Architektur mit Krypten, die in mehreren Schichten wachsen und typische Zellkernatypien (**Abbildung 3.9C und D**). Ein Zeichen der Dedifferenzierung im Tumor bei allen Genotypen ist eine Gobletzell Dysplasie im Bereich der Läsion. Zudem sieht man bei allen ein dereguliertes Immunsystem. Generell findet man bei den drei Mausmodellen $Apc^{1638N/+}$, $Apc^{1638N/+} Tlr3^{stop}$ und $Apc^{1638N/+} Tlr3^{IEC}$ in der Morphologie der Tumore keine drastischen Unterschiede. Bei $Apc^{1638N/+}$ Tumoren bilden sich größtenteils Adenome mit niedrig oder hochgradiger Differenzierung aus, wobei in $Apc^{1638N/+} Tlr3^{stop}$ und $Apc^{1638N/+} Tlr3^{IEC}$ tendenziell eher gering Differenzierte Adenome und teils sogar Karzinome entstehen. Diese zeigen dann Tumorzellinvasion in die Tunica Muscularis oder Lymphgefäße. Teils kommt es zu einer Erweiterung der Lymphgefäße. Ein dereguliertes Immunsystem wurde bereits für alle Tumore beschrieben, allerdings sieht man in $Apc^{1638N/+} Tlr3^{stop}$ und $Apc^{1638N/+} Tlr3^{IEC}$ mehr Macrophagen und teilweise sehr deutliche Anzeichen für Entzündung, wie Abstumpfung der Mikrovilli. Generell ist in allen Tumormodellen im Vergleich zum Wildtyp das Körpergewicht verringert und das Milzgewicht vergrößert (**Abbildung 3.9 E**). Dies sind Merkmale, die einen schlechteren Allgemeinzustand der Tiere aufgrund des Tumorphänotyps zeigen. Das Körpergewicht ist bei $Apc^{1638N/+} Tlr3^{stop}$ Mäusen im Vergleich zu $Apc^{1638N/+}$ Mäusen erhöht. Innerhalb der Tumormäuse ist das Milzgewicht nicht signifikant verändert, aber es besteht ein Trend, dass bei Verlust von Tlr3 ($Apc^{1638N/+} Tlr3^{stop}$ und $Tlr3^{IEC}$) die Milz weiter vergrößert ist.

Betrachtet man die Tumoranzahl beim $Apc^{1638N/+} Tlr3^{stop}$ Model, sind tendenziell mehr Läsionen im Vergleich zu $Apc^{1638N/+}$ vorhanden. Bei einer Re-Expression von Tlr3 ($Apc^{1638N/+} Tlr3^{IEC}$) gibt es keine Erhöhung der Tumoranzahl im Vergleich zu $Apc^{1638N/+}$ Mäusen (**Abbildung 3.9 E**).

Das deutlich geringere Überleben der Mäuse ist nicht durch starke Veränderung in der Anzahl der Tumore, also der Initiation oder der Größe und folglich der Proliferation der Läsionen erklärbar. Es ist jedoch möglich, dass der Phänotyp durch eine erhöhte

Aggressivität der Tumore und demnach einer stärkeren Progression beschrieben werden kann.

Möglicherweise führt dieser maligne Phänotyp bei einem Teil der Mäuse zu einer frühen Verschlechterung des Allgemeinzustands und somit zu einem deutlich verringerten Überleben von jungen Mäusen (**Abbildung 3.9 A**). Höchstwahrscheinlich kommt es besonders bei jungen Tieren mit globalem Tlr3 Verlust ($Apc^{1638N/+} Tlr3^{Stop}$) gehäuft zu Invaginationen des Darms und folglich zu Darmverschlüssen und zum Tod, während die überlebenden älteren Tiere nur einen milden Phänotyp aufweisen, und sich in Größe und Anzahl nicht mehr deutlich von der parentalen $Apc^{1638N/+}$ Linie unterscheiden. Welche Ursachen zur Heterogenität im Phänotyp in der $Apc^{1638N/+} Tlr3^{Stop}$ Linie führen ist nicht vollkommen klar. Möglicherweise gibt es Unterschiede im Mikrobiom, wodurch Tiere mit stärkerem und schwächerem Phänotyp unterschieden werden können.

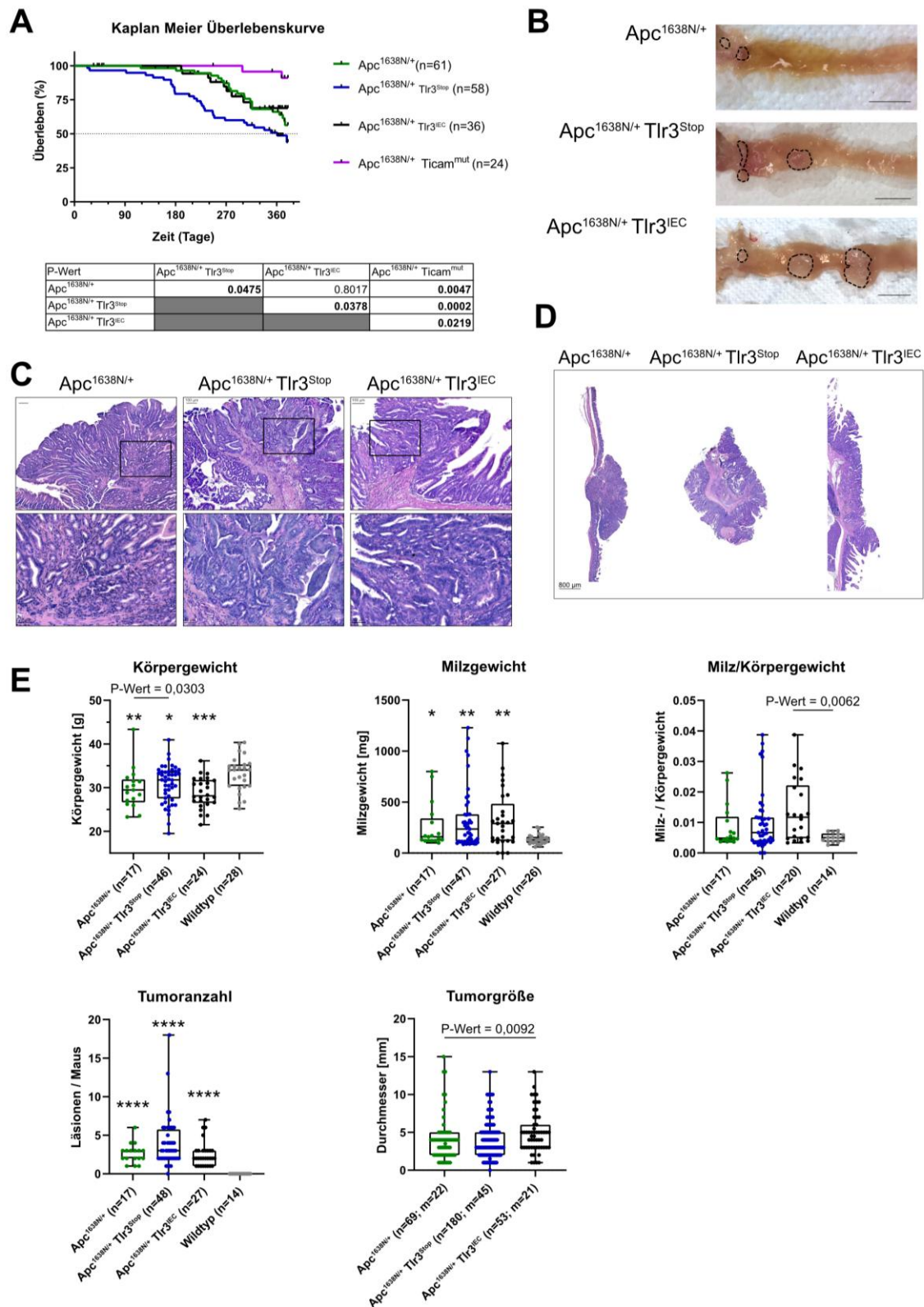


Abbildung 3.9: Charakterisierung der Tlr3^{Stop} und Tlr3^{IEC} Apc^{1638N/+} Mausmodelle

Kaplan Meier Überleben von Mäusen mit dem Apc^{1638N/+} Hintergrund und globaler Tlr3 Defizienz (Tlr3^{Stop}), Re-Expression von Tlr3 in intestinalen-epithelialen Zellen (Tlr3^{IEC}) und von Mäusen mit Mutationen in Ticam1/Trif (Ticam^{mut}), dem Adapterprotein der Tlr3 Signalübertragung (A). Makroskopische Bilder von Läsionen der verschiedenen Mausmodelle; Maßstabsbalken = 1 cm (B). HE-Färbung von Läsionen der Tlr3^{Stop} Apc^{1638N/+}, Tlr3^{IEC} Apc^{1638N/+} und Apc^{1638N/+} Mäuslinien zur histologischen Evaluierung (C,D). Physiologische Parameter des Körpergewichts, Milzgewichts, Gesamtanzahl der Läsionen und Tumorgroße der verschiedenen Mausmodelle (E). Signifikanzen wurden mittels des Mann-Whitney-Tests oder für Überlebensunterscheide mittels des Mantel-Cox Test nachgewiesen. Signifikanzen im Vergleich zum Wildtyp sind folgendermaßen dargestellt: p>0,05 = kein Index., *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; und ****p<0,0001. Signifikante Unterschiede unabhängig vom Wildtyp sind durch Angabe des P-Wertes zwischen den verglichenen Gruppen dargestellt.

3.1.2.6 Molekulare Charakterisierung des Apc^{1638N/+} Tlr3^{LSL} Mausmodells mit Fokus auf immunologische Marker

Die phänotypische Beschreibung der Mausmodelle zeigt eine eindeutige Verringerung der Lebenserwartung der Tlr3^{stop} Mäuse in dem Apc^{1638N/+} Tumormodell, in dem spontane Tumore vor allem im Dünndarm der Tiere entstehen. Zur weiteren Untersuchung der molekularen Mechanismen wurden Tumore der Tiere mittels quantitativer RT-qPCR auf die Ausprägung von molekularen Tumor- und Immunmarkern analysiert. Der Fokus liegt hier auf den Immunmarkern, da die RNA-Sequenzierung von humanen Tumoren und CRC-Zelllinien auf eine starke Einbindung des Immunsystems in der Interaktion von TLR3 und Tumorgenese hinweist.

Im Vergleich zu normalem Jejunum Gewebe ist erwartungsgemäß in Darm-Läsionen der Tumormarker Osteopontin, ein WNT-Zielgen, stärker ausgeprägt (**Abbildung 3.10 A**). Zwischen Läsionen mit und ohne Tlr3 gibt es keinen signifikanten Unterschied in dem Osteopontin Niveau, jedoch einen Trend zu stärkerer Osteopontin Ausprägung in Läsionen Tlr3 defizienter Mäuse (**Abbildung 3.10 A**). Der Stammzellmarker Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5), ist in normalem Jejunum Gewebe in ähnlicher Höhe vorhanden, als in Tlr3 defizienten Läsionen von Apc^{1638N/+} Mäusen (**Abbildung 3.10 B**). Bei Ausprägung von Tlr3 ist auch die Lgr5 Expression erhöht (**Abbildung 3.10 B**). Dies könnte auf verstärkte Stammzell-Eigenschaften der Tumore mit Tlr3 Ausprägung hindeuten.

Um nun genauer den immunologischen Phänotyp des globalen TLR3 Verlustes zu untersuchen, wurden die RNA-Level von Zytokinen und Immunzellmarkern untersucht (**Abbildung 3.10C**). Das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-6 (IL6) ist in Läsionen im Vergleich zu normalem Jejunum signifikant erhöht. IL6 steigt allerdings bei Tlr3 Defizienz signifikant weiter an (**Abbildung 3.10C**), was auf ein stärker entzündliches und damit eher pro-tumorigenes Milieu hinweist. Im Gegensatz dazu ist bei dem Chemokin Cxcl10, das an der Rekrutierung von TH1-Typ T Lymphozyten beteiligt ist, eine deutliche Verringerung in der Expressionsstärke im Vergleich zu Normalgewebe und Tumorkläsionen mit Tlr3 Profizienz zu beobachten (**Abbildung 3.10C**). Auch die Expression der T-Zellrezeptor-Untereinheit CD3ε in den Tumoren der Tlr3 defizienten Mäuse ist signifikant reduziert im Vergleich zu Normalgewebe und zu Läsionen aus Tlr3 exprimierenden Mäusen (**Abbildung 3.10C**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass möglicherweise weniger T-Zellen in Tumoren von Tlr3 defizienten Mäusen vorhanden sind. Betrachtet man T-Zell Subtypen in den Tumoren der Mäuse, sieht man, dass in Tlr3 defizienten Mäusen die RNA-Level von RoryT und FoxP3 erhöht sind (**Abbildung 3.10 D**). Diese Marker werden in T_{H17}-T Zellen und regulatorischen T-Zellen, sogenannten T_{regs}, exprimiert. Zusammenfassend kommt es also zu einer verringerten Ausprägung des Stammzellmarkes Lgr5 und zu einer Verschiebung des Chemokin-Milieus bei Tlr3 Defizienz, sowie zu einem stärker pro-inflammatorischen Milieu mit insgesamt geringerer CD3ε Ausprägung, aber einer relativen Erhöhung von Markern der regulatorischen T_{regs} und der eher pro-tumorigenen T_{H17} T-Zellen auf mRNA-Ebene in den murinen Tumoren.

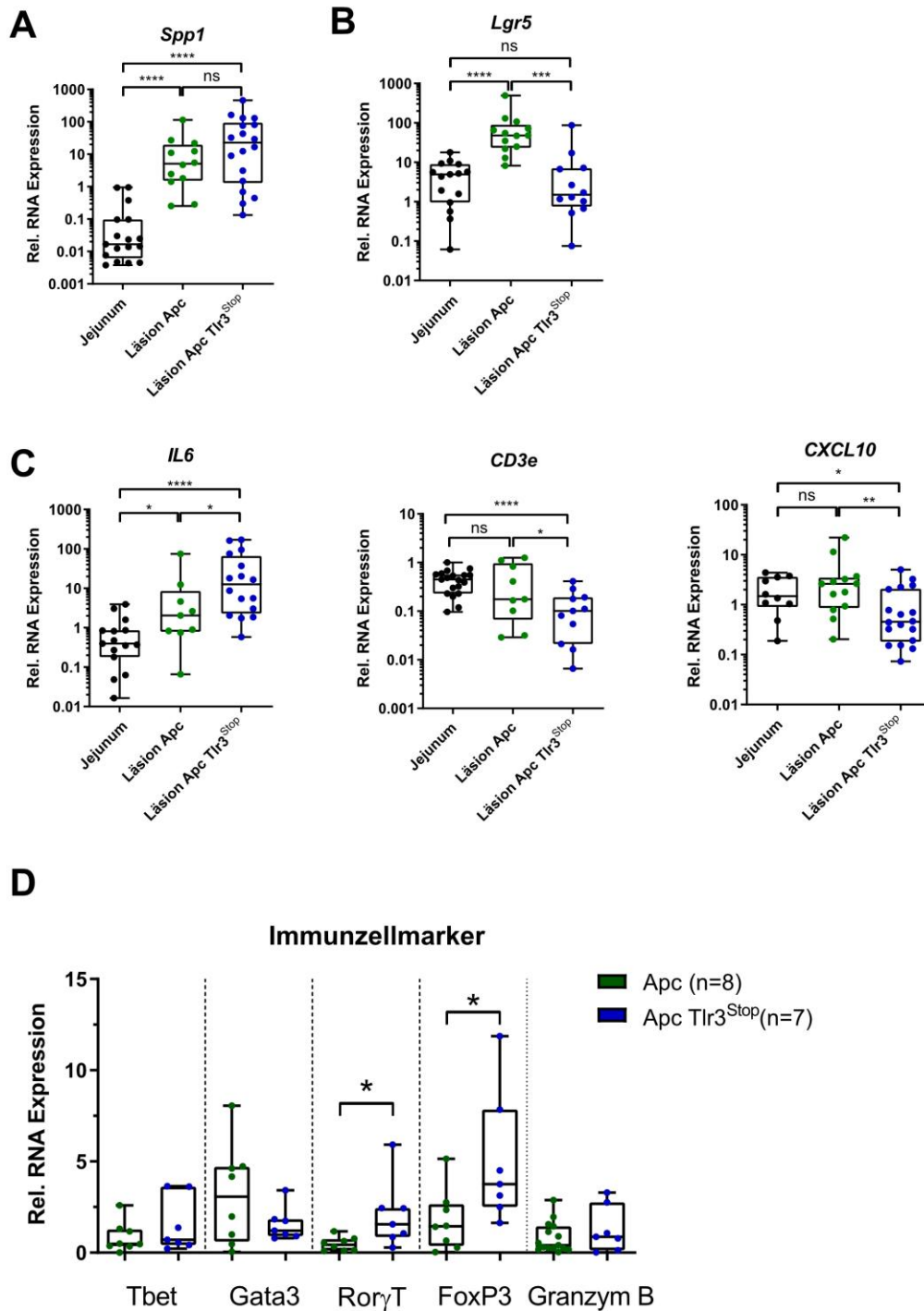


Abbildung 3.10: RT-qPCR Analyse von Tumor- und immunologischen Markern des Tlr3^{Stop} Apc^{1638N/+} Mausmodells
 Untersuchung der Tumormarker *Spp1* (A) und *Lgr5* (B) auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR. Ausprägung der Immunologischen Marker *Il6* und *Cxcl10* (C), sowie der Immunzellmarker *CD3e* (C), *Tbet*, *Gata3*, *RorγT*, *FoxP3* und *Granzym B* (D) ermittelt ebenfalls durch Analyse der RNA-Expression. Alle Daten sind normalisiert auf die Expression im Jejunum von Wildtyp Mäusen. Statistische Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney-Tests untersucht und ist wie folgt dargestellt: $p > 0,05$ = ns/ kein Index., * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; und **** $p < 0,0001$.

3.1.2.7 Evaluierung des Immunphänotyps in humanen kolorektalen Tumoren in Abhängigkeit der TLR3 Expression

Zur translationalen Überprüfung der Erkenntnisse des Mausmodell wurde die Ausprägung einiger Tumor- und Immunmarker in Abhängigkeit von TLR3 in humanen Kolorektakarzinom Proben untersucht. Die Tumorproben wurden mittels RNA-Analyse in Gruppen mit hoher und geringer TLR3 Expression eingeteilt. Zunächst wurden diverse Marker auf RNA-Ebene mittels RT-qPCR untersucht (**Abbildung 3.11**). Die WNT-Aktivierungsmarker bzw. Stammzellmarker Osteopontin und LGR5 sind unverändert (**Abbildung 3.11 A, B**). Ebenso sind Chemokine wie IL6, CXCL9, CXCL10 und CXCL11 in humanen Proben unverändert (**Abbildung 3.11 C – F**). Unter den Untersuchten Chemokinen ist nur Interleukin 8 (IL8) in Tumoren mit geringer TLR3 Ausprägung deutlich reduziert (**Abbildung 3.11 G**).

Bezüglich Immunzellmarkern ist CD3 ϵ , übereinstimmend mit den Erkenntnissen aus dem Mausmodell, signifikant reduziert bei geringer TLR3 Expression (**Abbildung 3.11 H**). Ebenso ist die relative Expression der Immunzellmarker TBET, GATA3, RORC, die respektive assoziiert sind mit TH₁, T_{H2} oder T_{H17}-Helfer Zellen, in Tumoren mit geringer TLR3 Ausprägung niedriger (**Abbildung 3.11 I-K**). Die Expression des M2-Makrophagen-Markers ARG1 ist ebenfalls negativ mit der TLR3 Expression korreliert (**Abbildung 3.11 L**). Zusammenfassend scheinen generell weniger Immunzellen in Tumoren mit wenig TLR3 vorhanden zu sein, im speziellen sind T-Zellen und T-Zell-Subpopulationen, aber auch M2-Makrophagen in TLR3 negativen Tumoren geringer vertreten.

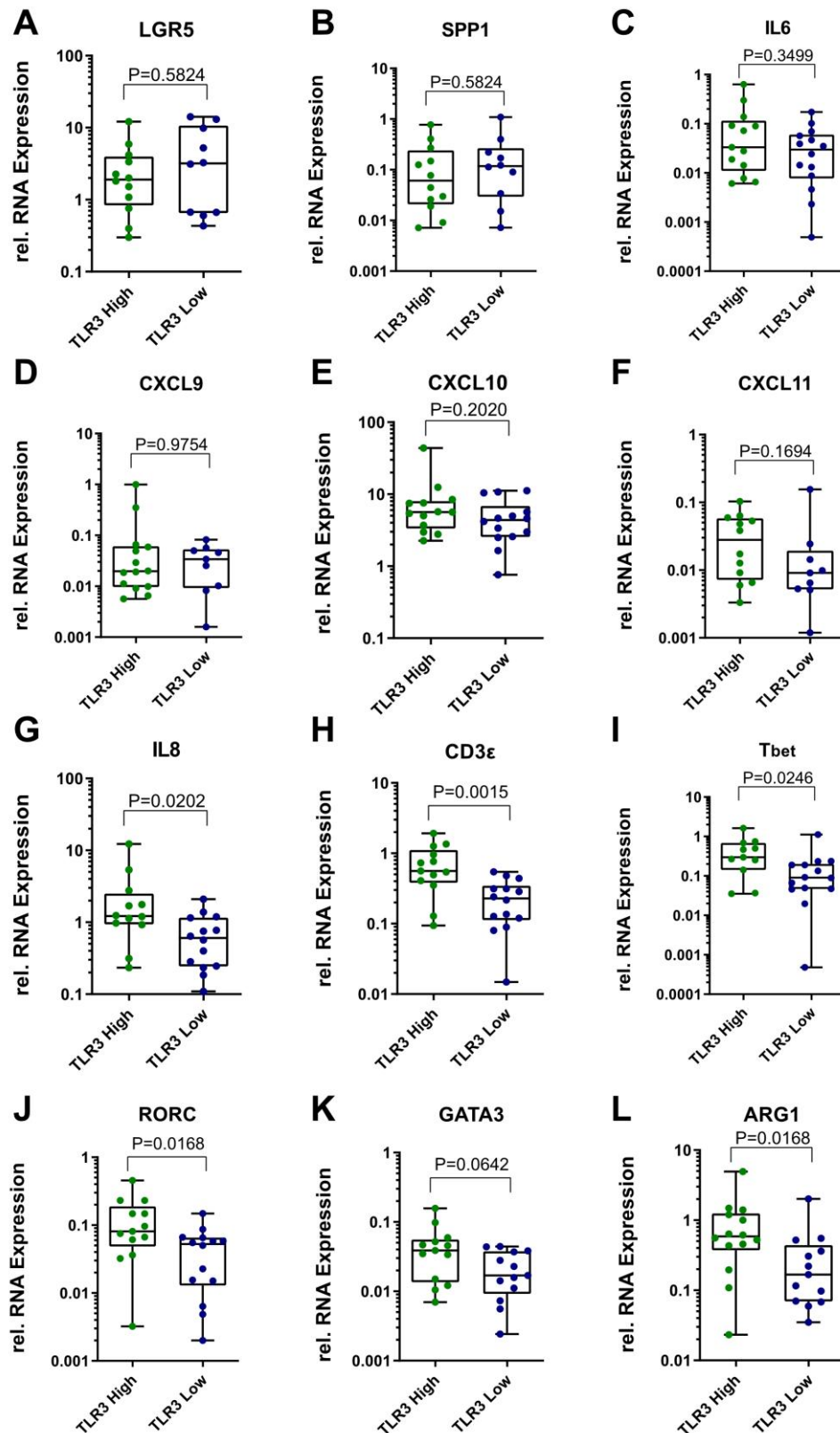


Abbildung 3.11: Charakterisierung molekularer Marker auf RNA-Ebene in humanen Kolorektalkarzinom Proben mit starker und geringer Ausprägung von TLR3

Tumorproben von Patienten wurden mittels RNA-Analysen nach starker (TLR3 High) und geringer (TLR3 Low) Ausprägung von TLR3 in den Tumoren stratifiziert. RNA-Expression ermittelt über RT-qPCR verschiedener genereller Tumormarker (A,B), Chemokine (C-G) und Immunzellmarker (H-L) wurden untersucht. Alle Daten wurden auf HPRT normalisiert und Signifikanzbestimmung wurde mittels des Mann-Whitney-Tests durchgeführt. P-Werte der Analyse sind direkt angegeben. Die RNA-Analysen wurden mit Unterstützung von Agnes Huber durchgeführt.

Zusätzlich wurden Immunmarker auf Gewebeschnitten zweier repräsentativer humaner Gewebe mittels Chipzytometrie gefärbt. Diese Methode ermöglicht die Färbung einer Vielzahl von Markern an einem einzigen Gewebeschnitt und die überlagernde räumliche Analyse seltener Immunzellpopulationen.

Die Keratinfärbung als Marker für den Tumoraufbau zeigt, dass ähnliche Bereiche der Tumore mit geringer (TLR3 Low) und hoher (TLR3 High) TLR3 Ausprägung ausgewählt wurden (**Abbildung 3.12**). CD45⁺ Lymphozyten sind sehr häufig in der Gruppe „TLR3 High“ vorhanden und befinden sich im Tumorstroma um epitheliale Zellen (**Abbildung 3.12**). CD3⁺ CD4⁺-T-Helfer-Zellen sind in dem „TLR3 High“ Gewebe augenscheinlich häufiger vertreten als zytotoxische T-Lymphozyten (CD3⁺CD8⁺). Erwartungsgemäß sind nur sehr wenige FoxP3⁺-Zellen vorhanden. Generell ist auffällig, dass in humanem Gewebe mit geringer TLR3 Ausprägung alle Immunzellmarker geringer nachweisbar sind. Es scheinen also weniger Immunzellen in diesen Tumoren vorhanden zu sein. Dieses Erkenntnis stützt qualitativ die durch RT-qPCR gewonnenen Erkenntnisse, für genauere Aussagen sollte eine quantitative Auswertung durchgeführt werden.

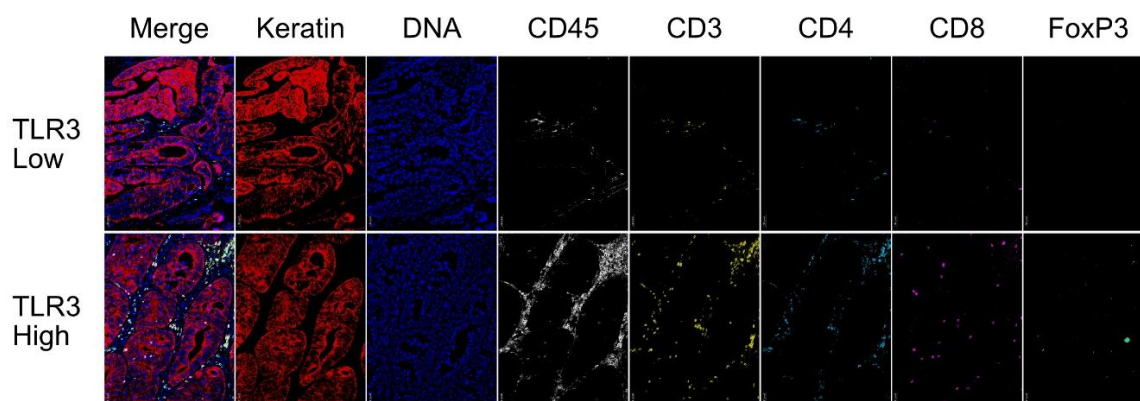


Abbildung 3.12: Immunzell-Charakterisierung durch Chipzytometrie basierte Immunfluoreszenzfärbung in humanen Kolorektalkarzinom Proben mit starker und geringer Ausprägung von TLR3

Tumorproben von Patienten wurden anhand von RT-qPCR Analysen nach hoher (TLR3 High) und niedriger (TLR3 Low) Ausprägung stratifiziert und mittels Zellkraftwerk Chipzytometrie gefärbt. Die allgemeine Gewebsstruktur ist mit Pan-Cytokeratinfärbung (rot) und DNA-Färbung (blau) dargestellt. Zusätzlich wurden die Marker CD45 (weiss), CD3 (gelb), CD4 (Cyan), CD8 (pink), FoxP3 (türkis) mit spezifischen Antikörpern angefärbt und entsprechender Farbkodierung dargestellt.

3.1.3 TLR3 Expression ist nicht mit Mikrobiota-Modulationen verbunden

Es gilt mittlerweile als gesichert, dass Bakterien einen Einfluss auf die Entstehung und Progression von Tumoren haben können, insbesondere im Darmtrakt. So wäre es auch denkbar, dass bakterielle dsRNA zur Aktivierung von TLR3 führt. Besonders bei CRC ist dies durch die räumliche Nähe zum Darmlumen, das Durchbrechen der intestinalen Barriere bei undifferenziertem Tumorwachstum denkbar. So könnten Bakterien die natürlichen Epithelbarrieren überwinden und zum Tumor gelangen, wo sie mit den Tumorzellen oder Immunzellen interagieren. Es liegt also nahe, dass Bakterien und ihre Stoffwechselprodukte auch TLR3 in Darmtumoren stimulieren könnten und so das Immunsystem beeinflussen. So wurde in der Literatur beschrieben, dass dsRNA aus Laktobakterien TLR3 in dendritischen Zellen aktivieren und zu einer T_H1 abhängigen Immunantwort führen kann (Kawashima et al. 2018). Daraus kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die taxonomische Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota durch das Vorhandensein oder die Abwesenheit von TLR3 in Tumorzellen, über einen Rückkopplungseffekt, indirekt über das Immunsystem des Wirtes beeinflusst wird. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob das Vorhandensein oder die Abwesenheit von TLR3 im Darmtrakt, etwa aufgrund unterschiedlicher Immunstimulation, Sekretion antimikrobieller Peptide oder anderer Effekte, das Mikrobiom beeinflussen und zu einem anderen mikrobiellen Milieu führen kann.

Zunächst wurde die Darm-Mikrobiota des schon beschriebenen $Tlr3^{Stop}$ Mausmodells im Vergleich zu Wurfgeschwistern mit $Tlr3$ Expression untersucht. Ein grundlegender Parameter zur Beschreibung der Mikrobiota ist die Diversität, welche die Artenvielfalt in einem Lebensraum, in diesem Fall im Darm, beschreibt. Betrachtet man also nun die mikrobielle Diversität anhand der 16S-rRNA-Sequenzierung von Zökuminhalt im Mausmodell mit einer globalen Defizienz von $Tlr3$ im Vergleich zu den Kontrollen, so unterscheidet sich die α -Diversität nicht in Abhängigkeit von $Tlr3$ (**Abbildung 3.13 A**). Auch die β -Diversität der homozygot oder heterozygot $Tlr3$ defizienten Mäuse zeigt keinen Unterschied bezüglich der bakteriellen Zusammensetzung zwischen den Gruppen (**Abbildung 3.13 B**). Zur Kontrolle wurde die Aufteilung der Mäuse in verschiedenen Zuchtanlagen untersucht. Darunter verschiedene Gruppenhaltungsformen, wie die Haltung in zwei verschiedenen Einrichtungen (ZPF der TUM, sowie Charles River) (**Abbildung 3.13 C**) oder in einem Käfig mit Tieren verschiedener Genotypen (Genotyp-Gruppenhaltung) oder mit Tieren desselben Genotyps (Genotyp-Einzelhaltung) (**Abbildung 3.13 D**). Diese zeigt lediglich einen Unterschied bei Wildtyp Mäusen, jedoch ist dieser Unterschied nach Adjustierung des p-Wertes auf multiples Testen nicht mehr signifikant. Die Aufgliederung der Ergebnisse in Einzel- und Gruppenhaltung des jeweiligen genetischen Hintergrunds zeigt ebenfalls keine bemerkbaren Unterschiede.

In einem translationalen Ansatz wurden humane Datensätze untersucht. Hierzu wurde in einem kleinen Kollektiv von $n=24$ Stuhlproben von Patientinnen und Patienten mit Darmkrebs, die in Vorarbeiten erstellt worden war (Anhang **Abbildung 6.10**) wurde festgestellt, dass sich das Mikrobiom von an Darmkrebs erkrankten Personen mit viel und

wenig TLR3 in einigen taxonomischen Einheiten (OTUs) im Tumor unterscheidet, basierend auf 16S-rRNA Analysen. Diese Studie sollte aufgrund der geringen Anzahl an erkrankten Personen an einer größeren Kohorte geprüft werden. Aus diesem Grund wurde eine bioinformatische Analyse bakterieller 16S-rRNA Sequenzdaten vorgenommen, gefiltert aus öffentlich zugänglichen TCGA-Sequenzierungs-Daten humaner Tumormproben über die cBioPortal Plattform. Hier wurde in den TCGA-Datensätzen nach genetischen Deletionen von TLR3 und TICAM1 in Kolorektalkarzinomen (COAD, READ) stratifiziert. Die Analysen wurden von Prof. Georg Zeller, EMBL Heidelberg in Kooperation durchgeführt. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in bakteriellen Taxa zwischen Tumoren mit genomischen Deletionen in TLR3 bzw. TICAM1 im Vergleich zu Tumoren mit Wildtyp-Status eines oder beider Gene (Anhang **Abbildung 6.10**). Demnach führt eine Veränderung in der TLR3 Ausprägung im Darmtrakt des Wirtes oder des Tumors zu keiner signifikanten Änderung des bakteriellen Mikrobiota im Zökuminhalt von Mäusen oder in Tumormproben von an Darmkrebs erkrankten Personen.

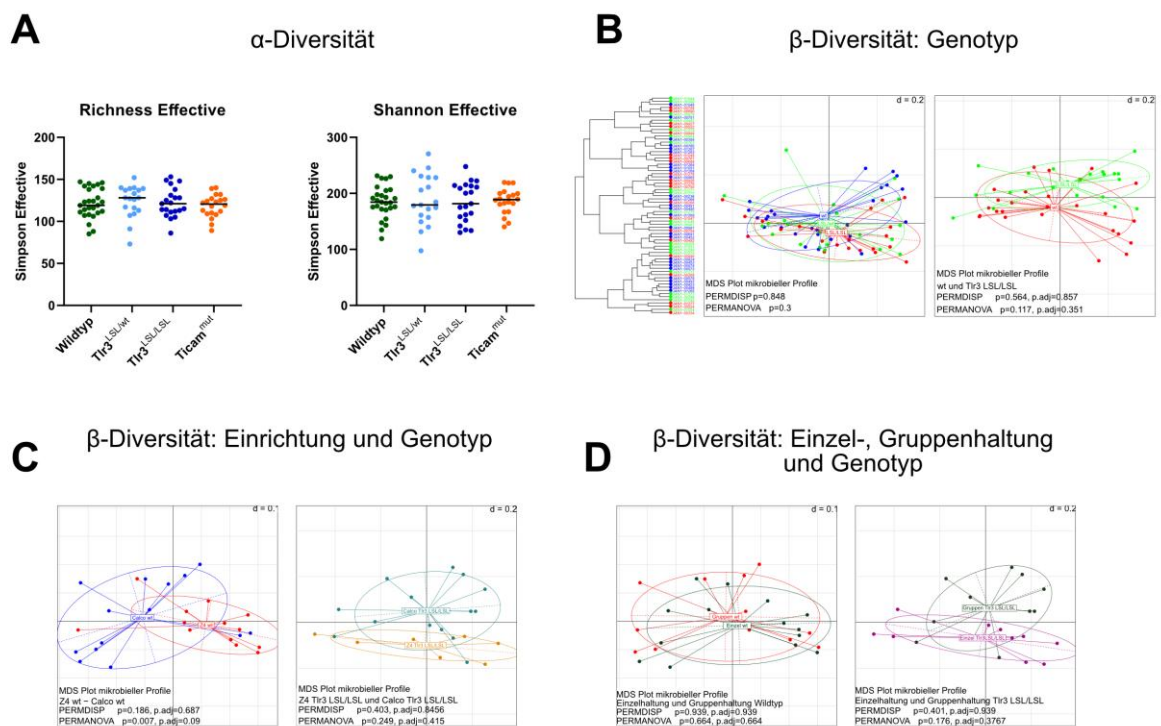


Abbildung 3.13: 16S-rRNA-Sequenzierung des Zökuminhalts von Mäusen mit unterschiedlichem genetischen Tlr3 oder Ticam1 Hintergrund

Bestimmung der α-Diversität als „Richness Effective“ und „Shannon effective“ in Mäusen mit homo- oder heterozygoter ($Tlr3^{LSL/wt}$ oder $Tlr3^{LSL/LSL}$) Defizienz in Tlr3 oder dem Adapterprotein Trif ($Ticam1^{LSL/LSL}$) (A). β-Diversität des Mikrobioms der Tlr3 defizienten Mäuse mit Unterscheidung aufgrund des Genotyps und das entsprechende Phylogramm (n=69) (B). Aufteilung der Gruppen nach Genotyp in Kombination mit Mauszuchtanlagen (C) oder Genotyp und Einzel- bzw. Gruppenhaltung. Ein Datenpunkt repräsentiert das Mikrobiom einer Maus. Statistische Signifikanz wurde mittels des zweiseitigen Student-T-tests oder durch PERMANOVA bestimmt.

3.2 Die Rolle des Mikrobioms für die Leberregeneration

Die Gefährlichkeit von Krebs liegt meist nicht am Primärtumor selbst, sondern an den Metastasen, welche für den Großteil der Krebs-bezogenen Todesfälle verantwortlich sind (Chaffer und Weinberg 2011). Im Fall des kolorektalen Karzinoms findet meist eine Metastasierung in die umgebenden Lymphknoten und vor allem die Leber statt, welche chirurgisch behandelt werden können, indem der erkrankte Teil der Leber entfernt wird. Allerdings ist es für das Überleben der erkrankten Person essenziell, dass genügend Restlebertvolumen vorhanden ist, sodass der gesunde Teil der Leber regenerieren und nachwachsen kann. Eine Verbesserung der Leberregeneration könnte demnach das Überleben von krebskranken Personen fördern und das Spektrum der Anwendung eines chirurgischen Eingriffs möglicherweise erweitern. Ein Einfluss der Mikrobiota auf Leberregeneration ist unumstritten, jedoch sind die molekularen Mechanismen und im Besonderen der Einfluss von kurzkettigen Fettsäuren und der Lipidmetabolismus noch unzureichend verstanden (Zheng und Wang 2021).

3.2.1 Leberregeneration ist nach Antibiose verringert

3.2.1.1 Mikrobielle Verschiebung (Dysbiose) durch Breitbandantibiotika bei partieller Hepatektomie im Mausmodell

Im Folgenden wird deshalb die Leberregeneration in Abhängigkeit des Mikrobioms nach Entfernung eines Teils der Leber, einer partiellen Hepatektomie (PHx), im vorklinischen Tiermodell untersucht. Die Operation wurde, wie von Mitchell und Willenbring beschrieben, am Mausmodell durchgeführt, wobei der linke Leberlappen und zwei Drittel des medianen Leberlappens entfernt werden (Mitchell und Willenbring 2008).

Um eine Dysbiose und eine generelle Reduktion der bakteriellen Besiedlung zu induzieren, wurden Mäusen drei Tage vor der Durchführung der partiellen Hepatektomie die Breitbandantibiotika Ampicillin, Vancomycin, Metronidazol und das Antimykotikum Fluconazol über das Trinkwasser verabreicht, das mit Splenda gesüßt war, um den bitteren Geschmack der Antibiotika zu kompensieren (n=72). Kontrollmäuse erhielten während des gesamten Zeitraums gesüßtes Splenda-Wasser ohne Antibiotika (n=63). Das getrunzene Wasservolumen wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht und kontrolliert. Die Behandlung wurde nach dem chirurgischen Eingriff bis zum jeweiligen Endzeitpunkt fortgesetzt.

Die Effizienz der Antibiotikabehandlung wurde direkt mittels der Anzahl von aerob wachsenden Bakterien (ausplattiert auf Blut-Agarplatten), sowie durch Bestimmung der bakteriellen Besiedlung mit Hilfe von RT-qPCR ermittelt. In Exkrementen zeigt sich eine steigende Anzahl an aerob wachsenden Bakterien durch die Antibiotikabehandlung bis

zum Zeitpunkt des chirurgischen Eingriffs (**Abbildung 3.14 A**). Ebenso sieht man eine erhöhte Anzahl aerob wachsender Bakterien, gewonnen aus dem Zökuminhalt nach Opferung der Mäuse, welche stabil bis zum Ende des Experimentes zu beobachten ist (**Abbildung 3.14 B**). Bemerkenswerterweise gibt es zum 40 Stunden nach der Operation einen Einbruch der koloniebildenden Einheiten (CFU) bei den Kontrollmäusen. Bei längerer Behandlung nähert sich die Anzahl der aeroben Kolonien von Mäusen mit Antibiotikagabe und Kontrollmäusen an, ist aber beim Endzeitpunkt dennoch klar voneinander unterscheidbar. Im Gegensatz zur steigenden Anzahl der aerob wachsenden Bakterien nach der Antibiotikagabe sinkt die komplette bakterielle Besiedlung gemäß den Erwartungen (**Abbildung 3.14 C**).

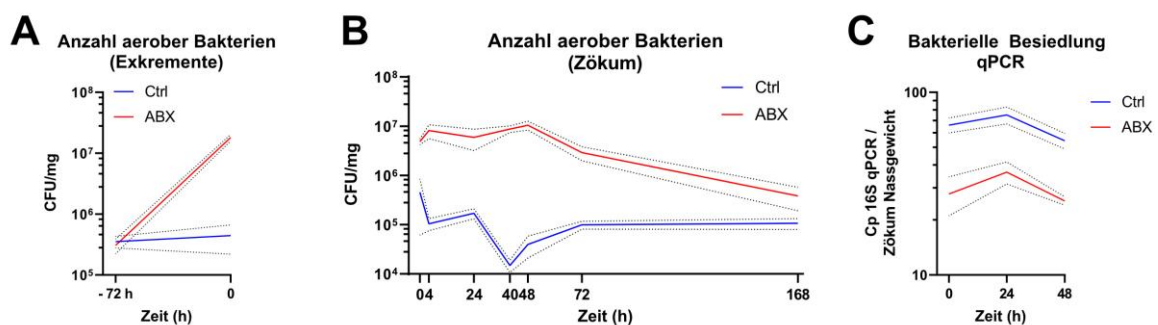


Abbildung 3.14: Verminderung der bakteriellen Besiedlung durch Antibiotikabehandlung und Verschiebung des Mikrobioms hin zu aerob wachsenden Bakterien

Anzahl der Kolonieformenden Einheiten (CFU) pro mg Nassgewicht aus gesammelten Exkrementen (ABX n=4-10; Ctrl n=6-9) (A) oder Zökuminhalt (n≥6 pro Zeitpunkt) (B) von antibiotikabehandelten- (ABX; rot) oder Kontrollmäusen (Ctrl; blau), welche nach aerober Kultivierung für 24 bis 48 Stunden auf Blutagarplatten sichtbar sind. SYBR Green basierte RT-qPCR bakterieller 16S-rRNA DNA isoliert aus Zökuminhalt von ABX und Ctrl Mäusen. Gezeigt ist der PCR-Zyklus normalisiert auf Nassgewicht des Zökums von 6 Mäusen je Zeitpunkt und Behandlung. Standardabweichung ist durch gestrichelte Linie angegeben. Daten wurden unter Mithilfe von Yasmin Gärtner erstellt. Abbildung verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

Bei genauerer Betrachtung der Mikrobiota mittels Sequenzierung der bakteriellen 16S-rRNA, konnte erwartungsgemäß eine Reduktion der bakteriellen Diversität im Zökuminhalt aller behandelten Mäuse beobachtet werden (**Abbildung 3.15 A**). Auch die einzelnen sequenzierten Zeitpunkte zeigen eine signifikant verringerte α -Diversität in antibiotikabehandelten (ABX) Mäusen (**Abbildung 3.15 B, C**). Im Vergleich der Diversität zwischen den Gruppen, der β -Diversität, unterscheidet sich das Mikrobiom antibiotikabehandelter Mäuse klar von dem der Kontrollmäuse. Eine De-Novo-Cluster Analyse zeigt, dass drei Cluster für antibiotikabehandelte (ABX) Mäuse erkennbar sind, wohingegen Mikrobiota aus Kontrolltieren (Ctrl)- alle in ein Cluster fallen (**Abbildung 3.15 D**). ABX Mäuse zeigen demnach eine weitere Streuung des Mikrobioms als Kontrollmäuse. Bei diesem behandlungsspezifischen Vergleich der beiden Gruppen sieht man, dass sich ABX und Ctrl Mäuse in ihrer β -Diversität signifikant voneinander unterscheiden (**Abbildung 3.15 D**).

Die häufigsten Phyla bei Kontrollmäusen sind Bacteroidetes und Firmicutes. Durch Antibiotika werden Bakterien dieser Phyla dezimiert und es kommt zu einem Anstieg der relativen Häufigkeit von Proteobakterien (**Abbildung 3.15 J - L**). Bei ABX Mäusen schwanken die relativen Häufigkeiten besonders bei Proteobacteria, aber auch bei einigen Zeitpunkten in der Gruppe der Firmicutes stark.

Die taxonomische Verteilung zeigt auf allen Ebenen eine deutliche Verschiebung des Mikrobioms. Es ist auffällig, dass die relativen Häufigkeiten der Taxa in Kontrollmäusen innerhalb eines Zeitpunktes recht stabil sind, wohingegen sich einzelne Mäuse in der Antibiotika Gruppe deutlich voneinander unterscheiden. Besonders eindeutig ist dies bei Mäusen, die zum 96 Stunden Zeitpunkt analysiert wurden. Allerdings sind auch Unterschiede der relativen Häufigkeiten von Bakterien auf Ordnungs- oder Familien-Ebene bei 24 und 48 Stunden zu erkennen (**Abbildung 3.15 F – I**).

Im Detail findet bei Mitgliedern der taxonomischen Klassenebene eine Verschiebung von Bacteroidia und Clostridia hin zu Gammaproteobacteria statt (**Abbildung 3.15 G**). Auf einer niedrigeren taxonomischen Stufe, der Ordnung, kommt es zu einer Verschiebung der drei am häufigsten vorkommenden Taxa Bacteroidales, Lachnospirales und Oscillospirales hin zu einer stark ausgeprägten relativen Häufigkeit von Enterobacterales, außerdem erkennt man einen Anstieg von zuvor nur in sehr geringer Zahl vorkommenden Verrucomicrobiales (**Abbildung 3.15 H**). Auf Ebene der Familie erkennt man, dass die bakterielle Zusammensetzung der Mikrobiota etwas komplexer wird. In Kontrollmäusen ist der Großteil der Mikrobiota aus fünf am häufigsten vertretenen Taxa zusammengesetzt. Diese sind Lachnospiraceae, Muribaculaceae, Oscillospiraceae, Prevotellaceae und Rikenellaceae. Durch Antibiotikabehandlung verschiebt sich auch hier das Mikrobiom. Man sieht eine hohe Variabilität zwischen den Mäusen. Hier ist die am häufigsten vertretene Familie ist Enterobacteriaceae (**Abbildung 3.15 I**).

„Richness effective“ und „Simpson effective“ (A) und jeweils nach Aufteilung in die einzelnen Zeitpunkt (B,C). De-Novo-Cluster Analyse des Mikrobioms (D) und Vergleich der β -Diversität der Antibiotika und Kontrollgruppe (E) mit jeweils zugehörigem phylogenetischem Baumdiagramm. Die signifikanten Unterschiede der Clusteranalyse wurden mittels Permanova Test bestimmt. Taxonomische Klasseneinteilung auf Phylum- (F), Klassen- (G), Ordnungs- (H) oder Familienebene (I). Direkter Vergleich der relativen Häufigkeit der meistvertretenen Phyla Bacateroidetes (J), Firmicutes (K) und Proteobacteria (L) zwischen Antibiotika- und Kontrollbehandlung. Signifikanzen wurden mittels eines zweiseitigen Student T-Test mit Holm-Sidak Korrektur für Multiples testen durchgeführt. Signifikanz wurde wie folgt definiert: $p > 0,05$ = n.s., * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; und **** $p < 0,0001$. Teile der Abbildung verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

3.2.1.2 Reduktion der Leberregeneration und Proliferation von Hepatozyten durch Antibiotika Behandlung

Zur Quantifizierung der Leberregeneration wird das Gewicht der Leber im Verhältnis zum Gesamtkörpergewicht berechnet (**Abbildung 3.16 A**). Nach Resektion von 2/3 der Leber wird das Verhältnis offensichtlich reduziert, steigt jedoch bei normaler Regeneration bereits nach 24 Stunden wieder an, zunächst vermutlich durch Größenzuwachs der Leberzellen. Von 24 bis 40 Stunden nach der Operation bleibt das Verhältnis konstant und steigt danach kontinuierlich bis 168 Stunden nach der Operation auf ungefähr 80 % des Ausgangsverhältnisses. Die Leberregeneration in Folge von partieller Hepatektomie ist nach Antibiotikagabe drastisch reduziert, was einerseits an dem signifikant reduzierten Leber-zu-Körpergewicht Verhältnis ab 24 Stunden nach der Operation sichtbar wird. Andererseits erreichen antibiotikabehandelte Mäuse das gleiche Leber-zu-Körpergewicht Verhältnis wie die Kontrolltiere erst nach 168 Stunden. Allerdings muss man beachten, dass Antibiotikabehandlung das Verhältnis vor der Hepatektomie zu Ungunsten der ABX Mäuse verschiebt. Um diesen Anfangseffekt einzubeziehen, wurde das Verhältnisses der jeweiligen Gruppe zum Zeitpunkt der Operation normalisiert (Anhang **Abbildung 6.11**; Yin und Sichler et al 2023;). Hiernach bleibt ein signifikant verändertes Verhältnis des normalisierten Leber-zu-Körpergewicht Verhältnisses bei 24, 48, 72 und 96 Stunden zu Ungunsten der ABX Mäusen erhalten.

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach partieller Leberresektion kommt es bei den Hepatozyten kaum zur Zellteilung, was hier an der immunhistologischen Färbung des Proliferationsmarkers Ki76 gezeigt wird (**Abbildung 3.16 B, C**). Ab 32 Stunden nach der Operation steigt die Anzahl der proliferierenden Hepatozyten in Kontrollmäusen, erreicht nach 48 Stunden ihren Höhepunkt und nimmt dann kontinuierlich ab. Bei Antibiotikabehandlung setzt die Proliferation zwei Tage verspätet, also erst ab 96 Stunden nach Proliferation ein und ist auch 168 Stunden nach der Operation weiterhin erhöht.

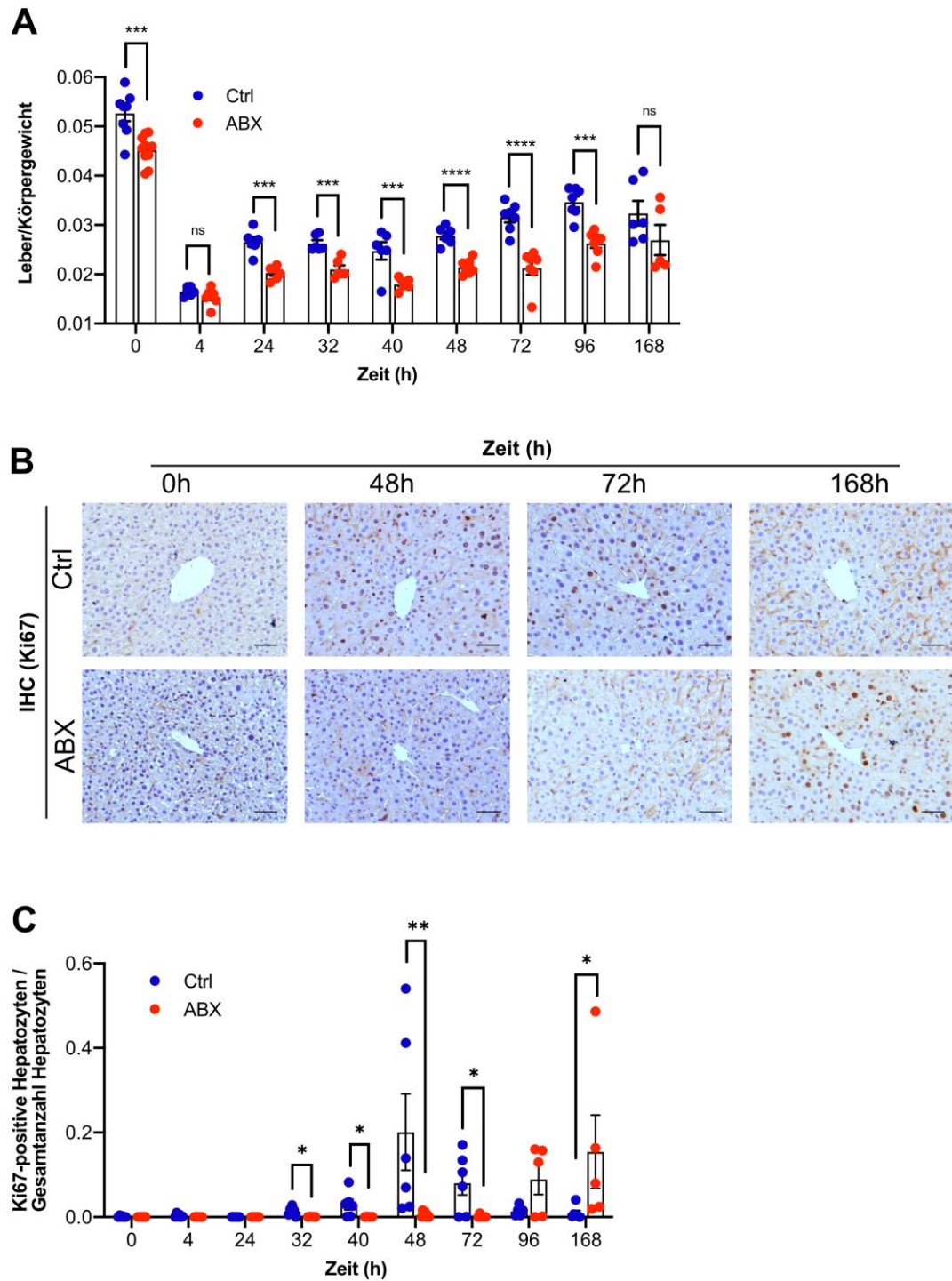


Abbildung 3.16: Verschlechterung der Leberregeneration und Proliferation von Hepatozyten durch Antibiotikabehandlung

Verhältnis des Lebergewicht- zu Körpergewicht zum angegebenen Zeitpunkt nach partieller Hepatektomie (A). Ein Datenpunkt repräsentiert jeweils eine Maus. Repräsentative Bilder immunhistochemischer (IHC) Färbung proliferierender Zellen mittels Ki67 im Leberparenchym von Antibiotika- und Kontrollmäusen zu angegebenen Zeitpunkten (B) und Quantifizierung der proliferierenden Hepatozyten (D). Operationen an Mäusen, sowie IHC und Quantifizierung wurden von Dr. Yuhuan Yin durchgeführt. Daten sind bereits in der medizinischen Doktorarbeit von Dr. Yuhuan Yin und in gemeinsamer Publikation veröffentlicht (Yin 2023, Yin und Sichler et al. 2023).

3.2.1.3 Rückgang von kurzkettigen Fettsäuren im Darmlumen und der De-Novo-Lipidsynthese in der Leber durch Antibiotikabehandlung

Die Zunahme an aeroben Bakterien und die Verschiebung von Bakteroidetes und Firmicutes hin zu Proteobacteria deutet auf eine Abnahme an fermentierenden Bakterien hin. Es liegt nahe, dass die Metabolisierung von Ballaststoffen zu kurzkettigen Fettsäuren im Darmlumen gestört ist und es zu einer geringeren Produktion an kurzkettigen Fettsäuren kommt. Kurzkettige Fettsäuren können im physiologischen Zustand im Darm aufgenommen, über die Pfortader zur Leber transportiert und dort durch die Fettsäuresynthase FASN zu langkettigen Fettsäuren, wie Palmitat oder Stearälsäuren, aufgebaut werden. Die Desaturase SCD1 kann eine Doppelbindung in die neu synthetisierten Fettsäuren (16 bzw. 18 C-Atome) einfügen und die desaturierten Fettsäuren werden dann in Membranphospholipide inkorporiert (**Abbildung 3.17 A**), die essenziell für die Synthese neuer Zellmembranen sind.

Zur Überprüfung der Hypothese, ob die Produktion kurzkettiger Fettsäuren im Darmlumen tatsächlich eingeschränkt ist, wurden die häufigsten kurzkettigen Fettsäuren im Kolon-Inhalt der Mäuse mittels GC-MS gemessen. Entsprechend der Hypothese sind bei antibiotikabehandelten Mäusen zum Resektionszeitpunkt Acetat, Propionat, Butyrat und Iso-Butyrat signifikant reduziert (**Abbildung 3.17 B**), Dieser Phänotyp ist über die Zeit stabil (**Abbildung 3.17 C**).

De-Novo-Synthese von Membranphospholipiden durch den Wirt wurde durch stabile Isotopenmarkierung der Kopfgruppe Cholin mithilfe von Deuterium (D9) verfolgt und im Lebergewebe und Plasma durch Massenspektrometrie gemessen. Kontrollmäuse zeigen eine erhöhte De-Novo-Lipidsynthese im Lebergewebe 72 Stunden nach Operation im Vergleich zu ABX Mäusen (**Abbildung 3.17 D**). Bei Kontrollmäusen befindet sich tendenziell mehr Mono-Desaturiertes Phosphatidyl-Cholin (MU PC) im Plasma als bei ABX Mäusen (**Abbildung 3.17 E**). Dieser Unterschied ist zum 24 und 72 Stunden Zeitpunkt signifikant. Insgesamt ist also zu beobachten, dass die De-Novo-Lipidsynthese in Mäusen, die zu einem beträchtlichen Teil in der Leber stattfindet, mit partieller Hepatektomie nach Antibiotikabehandlung reduziert ist.

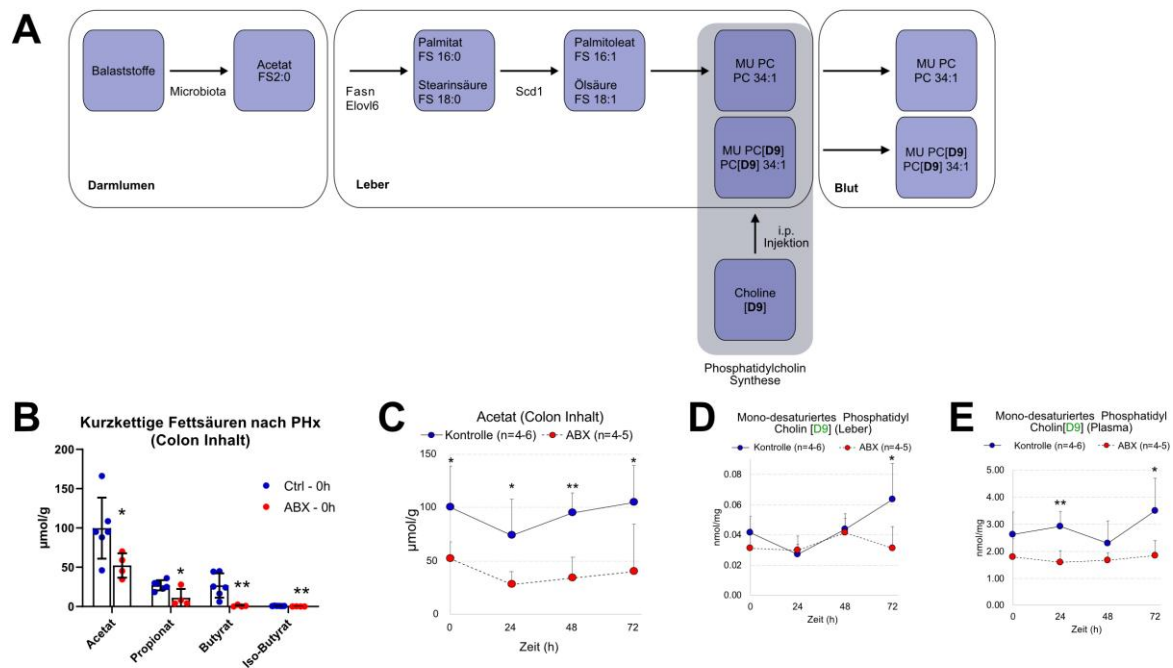


Abbildung 3.17: Reduktion kurzkettiger Fettsäuren und De-Novo-Lipidsynthese in antibiotikabehandelten Mäusen

Schematische Darstellung des Abbaus von Ballaststoffen durch fermentierende Mikroorganismen im Darmlumen zu kurzkettigen Fettsäuren, wie Acetat. Die Metabolisierung zu langkettigen bzw. langkettigen-desaturierten Fettsäuren und Einbau in Mono-desaturiertes Phosphatidyl-Cholin (MU PC) mit und ohne stabile Isotopen-markiertes D-9-Cholin, welches durch intraperitoneale (i.p.) Injektion zugeführt wird (A). Konzentration kurzkettiger Fettsäuren im Kolon-Inhalt von Antibiotika- und Kontrollmäusen zum Zeitpunkt der Operation (B). Zeitlicher Verlauf der Acetat Konzentration im Kolon-Inhalt von Antibiotika- und Kontrollmäusen nach partieller Hepatektomie (C). De-Novo-Synthese von stabilen Isotopen-markierten Mono-desaturiertem Phosphatidyl-Cholin gemessen in Leber (D) und Plasma (E). Signifikanzen der Ergebnisse wurden durch zweiseitigen Student T-Test überprüft, wobei $p > 0,05$ = n.s., * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; und **** $p < 0,0001$. Kurzkettige Fettsäuren und De-Novo-Lipidsynthese wurde gemessen und analysiert von Josef Ecker (TUM). Verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

Die Verschiebung der Mikrobiota durch Antibiotikabehandlung führt demnach zu einer Reduktion an kurzkettigen Fettsäuren und zur verminderten Lipidsynthese. Im Folgenden wurden die für die Lipidsynthese notwendigen Enzyme im Wirt untersucht, um zu testen, ob sie abhängig von der mikrobiellen Verschiebung ebenfalls differenziell reguliert sind. Die Desaturase Scd1, welche eine Doppelbindung in C16 oder C18 Fettsäuren einfügt, ist in Kontrollmäusen auf RNA-Ebene im Vergleich zu ABX Mäusen zu frühen Zeitpunkten nach der Operation hochreguliert (**Abbildung 3.18 A**). Fasn und Elovl6 sind nach 48 Stunden reduziert (**Abbildung 3.18 B, C**). Insgesamt sieht man eine ähnliche Kinetik von Scd1 und Fasn nach partieller Hepatektomie. Diese zeigt bei den Kontrollmäusen anfangs eine recht starke Expression der Enzyme Scd1 und Fasn, welche dann abfällt. Die Ausprägung der Elongase Elovl6 fluktuiert auf RNA-Ebene. Grundsätzlich ist Scd1 im Lebergewebe von normalen Mäusen auf Proteinebene gut nachweisbar. Kurz nach der Resektion kommt es tendenziell zu einer Erhöhung der Scd1 Ausprägung. Während Hepatozyten von Kontrollmäusen zwischen 24 und 48 Stunden stark proliferieren (**Abbildung 3.16 C**), sieht man zu diesem Zeitpunkt einen Rückgang der Scd1

Proteinmenge (**Abbildung 3.18 D,E**). Ab 72 Stunden, wenn die Proliferationsrate in der Leber wieder sinkt, wird die Scd1 im Lebergewebe erneut hochreguliert. Bei antibiotikabehandelten Mäusen ist zu frühen Zeitpunkten Scd1 auf Proteinebene nicht nachweisbar. Erst ab 72 Stunden wird das Enzym hochreguliert und zusammen mit proliferativen Markern (**Abbildung 3.16 C**) bleibt die Expression von Scd1 bis 168 Stunden nach der Hepatektomie erhöht.

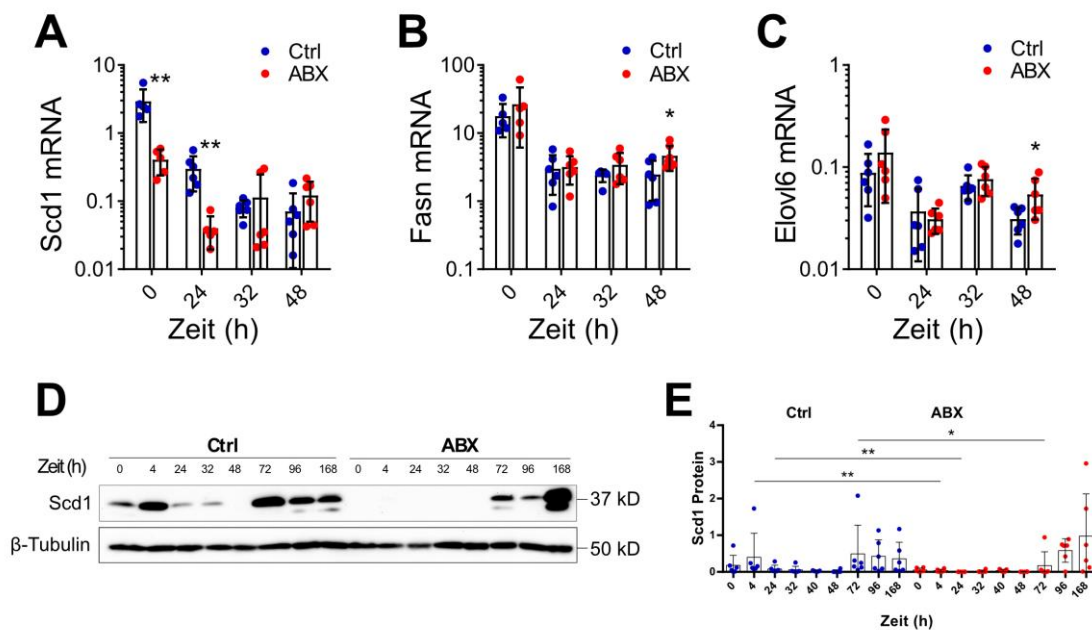


Abbildung 3.18: Regulierung von Enzymen des Lipidmetabolismus

RT-qPCR der Fettsäuresynthese Enzyme Scd1 (A), Fasn (B) und Elovl6 (C) wurden mit der Hilfe von Yasmin Gärtner und Dr. Yuhang Yin im Leberparenchym von antibiotikabehandelten- und Kontrollmäusen zu frühen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie ermittelt und normalisiert auf β-Aktin. Immunoblot der Scd1 Kinetik repräsentativer Proben und β-Tubulin als Ladekontrolle (D) mit entsprechender Quantifizierung (E). Statistische Signifikanz wurde mittels des Student-t-Tests mit Holm-Sidak-Korrektur für Multiples Testen oder des Mann-Whitney U Tests ermittelt, wobei $p > 0,05$ = n.s., $*p < 0,05$ und $**p < 0,01$ repräsentiert. Abbildung verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

3.2.2 Leberregeneration im keimfreien Mausmodell und nach Wiederbesiedelung mit Minimalmikrobiota

3.2.2.1 Mikrobielle Analyse der Modelle

Wie zuvor gezeigt, führt die Antibiotikabehandlung zu einer ausgeprägten Dysbiose, nicht aber zur vollständigen Eliminierung aller Bakterien im Darmtrakt (**Abbildung 3.14** und **Abbildung 3.15**). Um den Einfluss von Bakterien weitergehend zu untersuchen und zudem unerwünschte Nebeneffekte der Antibiotika ausschließen zu können, wurde zusätzlich ein keimfreies Mausmodell genutzt. In diesem Modell wurden spezifiziert-Pathogen-freie Kontrolltiere (SPF; n = 7), keimfreie Tiere aus gnotobiotischer Haltung (GF; n = 5) und Mäuse mit einer minimalen mikrobiellen Besiedlung von 12 verschiedenen Bakterien (OMM12; n = 6) einer partiellen Hepatektomie unterzogen und nach 48 Stunden Proben entnommen (**Abbildung 3.19 A**). Alle Tiere entstammten aus einer Maushaltung (MHH, Hannover) und wurden mit dem selben Futter versorgt, um Abweichungen gering zu halten. Die definierte minimal Mikrobiota enthält fermentierende bakterielle Spezies, durch welche die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren wieder hergestellt wird und somit den Verlust von Bakterien im keimfreien Modell ausgleichen (Brugiroux et al. 2016). Erwartungsgemäß konnte im Gegensatz zu SPF und OMM12-Mäusen keine 16S-rRNA-Sequenzierung des Zökuminhalts von GF-Mäusen vorgenommen werden, da keine bakterielle DNA im Stuhl nachweisbar war und kein PCR-Produkt erhalten werden konnte (**Abbildung 3.19 B**). SPF und OMM12-Mäuse zeigten vergleichbare bakterielle Besiedelung, gemessen an der im Zökum vorhandenen bakteriellen 16S-rRNA, welche über RT-qPCR analysiert wurde (**Abbildung 3.19 C**). OMM12-Mäuse haben durch die Besiedelung mit nur wenigen unterschiedlichen bakteriellen Taxa den Vorteil, dass die Komplexität des Mikrobioms reduziert wird, wohingegen generelle Funktionen wiederhergestellt werden. In dem OMM12-Modell ist die α -Diversität daher natürlicherweise deutlich reduziert und es unterscheidet sich auch die mikrobielle Zusammensetzung bezüglich der β -Diversität deutlich von SPF-Mäusen (**Abbildung 3.19 D, E**). Der Vergleich der Taxa auf Phylum-, Klassen- und Ordnungsebene bestätigt, dass OMM12-Mäuse die mikrobielle Zusammensetzung von SPF-Mäusen rekapitulieren, jedoch mit deutlich geminderter Komplexität. (**Abbildung 3.19 F-H**). Der Unterschied in der Komplexität der Mikrobiota zeigt sich besonders auf taxonomischer Ebene der Genera (**Abbildung 3.19 I**). Auf Ebene der Phyla sind Bacteroidota, Firmicutes und Verrucomicrobiota am häufigsten vertreten. Bei OMM12-Mäusen kommt es zu einer minimalen Verschiebung, was zu einer etwas geringeren relativen Häufigkeit von Firmicutes und einem leicht erhöhten Vorhandensein von Bacteroidota und Verrucomicrobiota führt. Die drei Hauptklassen sind sowohl bei SPF als auch OMM12-Mäusen Bacteroidia, Clostridia und Verrucomicrobiae. Hier ist erneut Clostridia leicht vermindert und Bacteroidia, sowie Verrucomicrobiae leicht erhöht. Auch auf Ordnungsebene ähneln sich die Mikrobiota der SPF- und OMM12-Mäuse, allerdings sieht

man, dass bei SPF-Mäusen mehrere verschiedene Taxa vorhanden sind. Betrachtet man die Genera der SPF- und OMM12-Mäuse, zeigt sich hier ein klarer und erwartbarer Unterschied in der mikrobiellen Zusammensetzung mit weniger Diversität in den bakteriellen Gemeinschaften der OMM12-Mäuse.

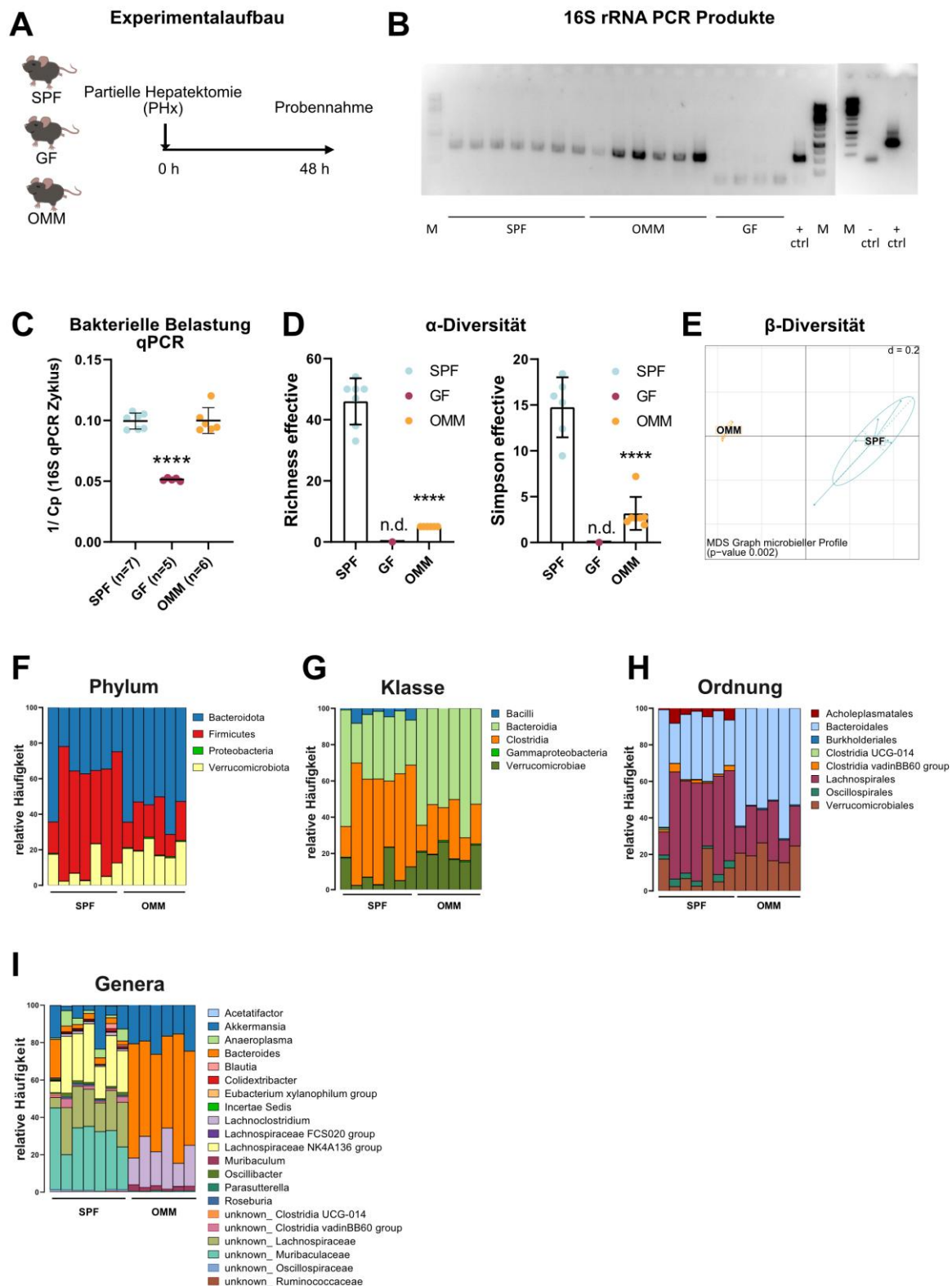


Abbildung 3.19: Partielle Hepatektomie und mikrobielle Analyse spezifiziert-pathogen-freier Kontrollmäuse (SPF), keimfreier Tiere (GF) und von Mäusen mit einer minimalen mikrobiellen Besiedlung (OMM12)

Eine partielle Hepatektomie (PHx) wurde bei Mäusen mit unterschiedlicher mikrobieller Besiedlung durchgeführt (A). Elektrophoretische Auftrennung der V3-V4 16S-rRNA PCR-Produkte, welche für die 16S-rRNA-Sequenzierung erstellt wurden (B). RT-qPCR der bakteriellen 16S-rRNA Sequenzen zur Bestimmung der bakteriellen Last (C). Diversität innerhalb der Gruppen (α-Diversität) gezeigt an „Richness effective“ und „Simpson effective“ (D) und Diversität

zwischen den Gruppen (β -Diversität) der SPF und OMM12-Mäuse in einer multidimensionalen Analyse (E). Taxonomische Einteilung der jeweiligen Mikrobiota auf Phylum- (F), Klassen- (G), Ordnungs- (H) oder Genera-Ebene (I). Eine Analyse der GF-Mäuse ist nicht gezeigt, da qualitativ hochwertige Ergebnisse aufgrund von fehlenden Bakterien nicht detektierbar (n.d.) sind. Signifikanzen der Clusteranalyse wurden durch Permanova Test bestimmt. Signifikanzen der PCR-Ergebnisse und α -Diversität wurden durch zweiseitigen Student T-Test überprüft, wobei $p > 0,05$ = n.s. (nicht angegeben), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; und **** $p < 0,0001$. Angezeigte Signifikanzen beziehen sich auf SPF-Mäuse als Kontrollgruppe. Abbildung verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

3.2.2.2 Versagen der Regeneration in keimfreien Mäusen und Wiederherstellung durch minimale mikrobielle Besiedelung

In GF-Mäusen beobachtet man nach PHx eine drastisch erhöhte Mortalität (**Abbildung 3.20 A**). Die Wiederbesiedlung mit minimaler Mikrobiota führt zur signifikanten Reduktion der Sterblichkeit. Eine „Sham“-Operation ohne Entfernung der Leber bei GF-Mäusen beeinflusst das Überleben nicht negativ (Daten der MHH Hannover, Prof. A. Bleich, nicht gezeigt). Außerdem zeigen GF-Mäuse ein reduziertes Verhältnis des Lebergewichts zum Körpergewicht 48 Stunden nach partieller Hepatektomie, welches durch die Kolonisierung mit minimaler Mikrobiota wieder auf das Niveau der SPF-Mäuse angehoben wird (**Abbildung 3.20 B**).

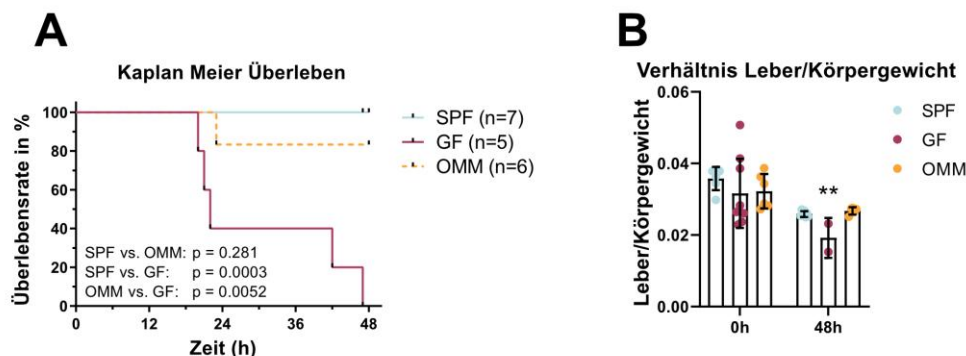


Abbildung 3.20: Erhöhte Mortalität und Reduktion der Leberregeneration in GF-Mäusen

Kaplan Meier Überleben der SPF-, GF- und OMM12-Mäuse bis 48 Stunden nach partieller Hepatektomie (A). Signifikanz der Überlebensunterschiede wurden mit Mantel-Cox Test nachgewiesen. Verhältnis des Leber-zu-Körpergewichtsverhältnisses während und 48 Stunden nach partieller Hepatektomie als Parameter der Leberregeneration (B). Angezeigte Signifikanzen beziehen sich auf SPF-Mäuse als Kontrollgruppe, wobei $p > 0,05$ = n.s. (kein Index) und ** $p < 0,01$. Verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

Zur Überprüfung, ob das verminderte Leber-zu-Körpergewichts Verhältnis im Zusammenhang mit reduzierter Proliferation steht, wurden wichtige Proliferationsmarker auf RNA und Proteinebene im Leberparenchym untersucht. Die Proliferationsmarker Cyclin D1, A2 und B1, sowie CDK1 sind in GF-Mäusen auf RNA-Ebene kaum detektierbar (**Abbildung 3.21 A**). In OMM12-Mäusen ist die Ausprägung dieser Marker deutlich erhöht, jedoch nicht wieder auf dem Niveau der SPF-Mäuse. In der Cyclin E1 Ausprägung kann kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen detektiert werden.

Auf Proteinebene sind zum 0 Stunden Zeitpunkt Cycline nicht detektierbar. 48 Stunden nach der Operation sind diese in SPF-Mäusen hochreguliert (**Abbildung 3.21 B**). Analog zur RNA-Analyse, ist die Proteinexpression von Proliferationsmarkern, hier CDK1, phospho-RB und Zykin D1 bei GF-Mäusen nicht detektierbar und wird in OMM12-Mäusen teils sogar komplett rekonstituiert.

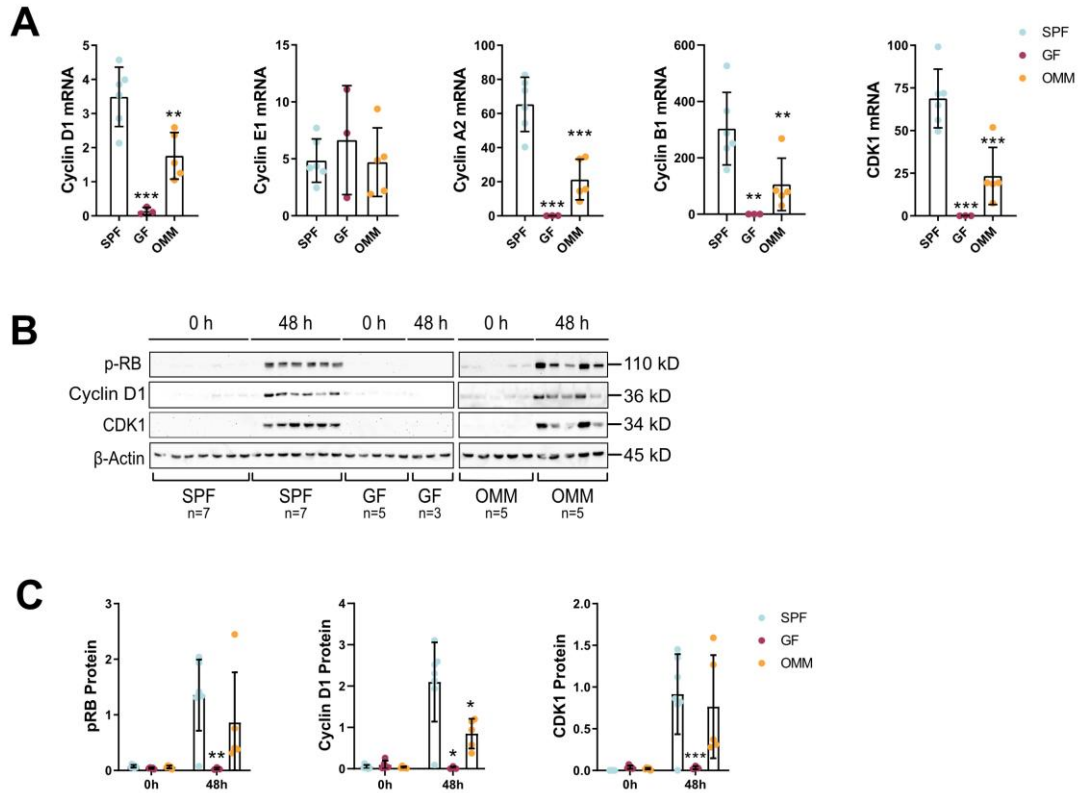


Abbildung 3.21: Reduktion von Proliferationsmarkern auf RNA- und Proteinebene in keimfreien Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen und Wiederherstellung der Proliferation in OMM12-Mäusen

RT-qPCR wichtiger Proliferationsmarker im Leberparenchym 48 Stunden nach partieller Hepatektomie (A). Immunoblot ausgewählter Proliferationsmarker (B) und deren Quantifizierung mit Normalisierung auf β -Aktin. Jeder Datenpunkt beschreibt ein biologisches Replikat. Statistische Auswertung wurde mittels einfaktoriellem ANOVA oder Student T-Test durchgeführt, wobei $p > 0,05$ = n.s. (nicht dargestellt), $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; und $***p < 0,001$. Angezeigte Signifikanzen beziehen sich auf SPF-Mäuse als Kontrollgruppe. Abbildung verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

3.2.2.3 De-Novo-Lipidsynthese in GF Mäusen nicht nachweisbar und partielle

Wiederherstellung im OMM12 Mausmodell

Wie schon zuvor beschrieben, basiert diese Arbeit auf der Hypothese, dass kurzkettige Fettsäuren bakteriellen Ursprungs als Baustein für die De-Novo-Lipidsynthese in der Leber dienen und bei der Leberregeneration essenziell zur Bereitstellung von Membranlipiden sind. Aus diesem Grund wurde der Lipidmetabolismus und im Speziellen die De-Novo-Lipidsynthese mit zwei verschiedenen deuterierten Verbindungen nachverfolgt, welche intraperitoneal zwei Stunden vor Entnahme der Proben injiziert wurden. Hierzu wurde neben stabilen-isotopen-markiertem D9-Cholin auch D4-Ethanolamin verwendet, um die De-Novo-Synthese von D4-Phosphatidyl-Ethanolamin und dessen Umwandlung in D4-Phosphatidyl-Cholin in der Massenspektrometrie messen zu können.

Der Einbau von Cholin[D9] und Ethanolamin[D4], sowie die Umwandlung von Mono-desaturiertem-Ethanolamin (MU PE [D4]) zu Mono-desaturiertem-Phosphatidylcholin (MUC PC [D4]) ist in **Abbildung 3.22** schematisch dargestellt.

In SPF-Mäusen ist der Einbau von stabilen Isotopen und damit eine Aktivierung der De-Novo-Synthesewege deutlich erkennbar (**Abbildung 3.22** B, C, D). In keimfreien Mäusen findet dagegen fast keine De-Novo-Lipidsynthese von Phosphatidyl-Cholin(D9), Phosphatidyl-ethanolamin(D4) und keine Umwandlung in Phosphatidyl-Cholin(D4) statt. Die Wiederbesiedelung mit minimaler Mikrobiota rekonstituiert die De-Novo-Lipidsynthese von Phosphatidyl-Ethanolamin(D4) (**Abbildung 3.22** B), sowie die Umwandlung in Phosphatidyl-Cholin(D4) vollständig (**Abbildung 3.22** D) und die direkte Synthese von Phosphatidyl-Cholin(D9) teilweise (**Abbildung 3.22** E).

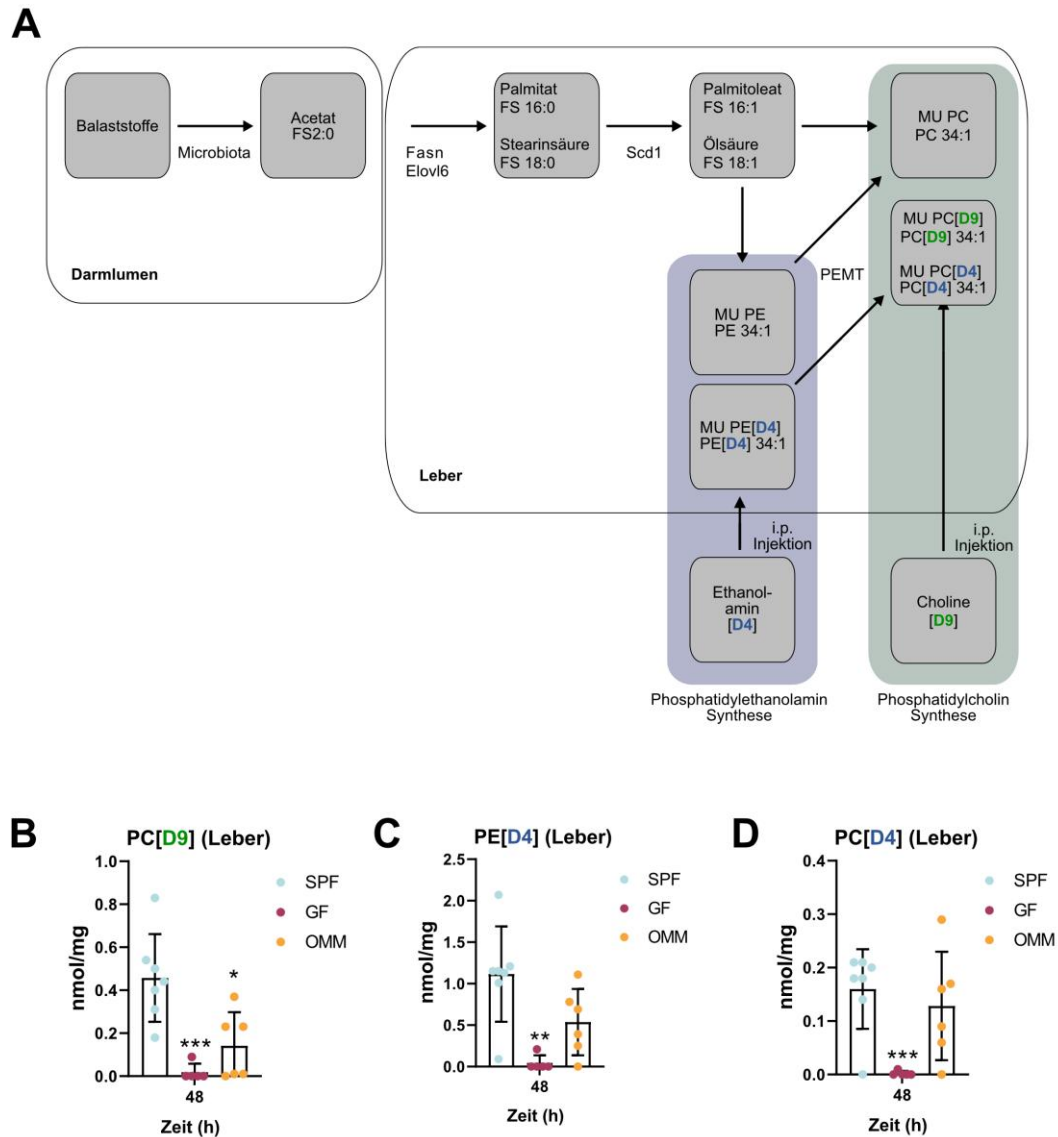


Abbildung 3.22: Nachweis der De-Novo-Lipidsynthese mit Markierung durch stabile Isotopen markiertes D4-Ethanolamine und D9-Cholin.

Schematische Darstellung der De-Novo-Lipidsynthese aus kurzkettigen Fettsäuren, wie Acetat, welche durch die Mikrobiota hergestellt wurden. Verfolgung der Synthese von Mono-desaturiertem-Phosphatidyl-Cholin (MU PC [D9]) wird ermöglicht über intra-peritoneale (i.p.) Injektion von stabilen Isotopen-markierten Cholin[D9], von Mono-desaturiertem-phosphatidyl-Ethanolamin[D4] (MU-PE [D4]) über markiertes Ethanolamin[D4], sowie die Umwandlung von MU-PE [D4] zu MU PC[D4].

Messung des neu-synthetisierten MU PC[D9] (B), MU PE[D4] (C), sowie der Umwandlung in MU-PC[D4] (C) im Leberparenchym 48 Stunden nach partieller Hepatektomie. Signifikanz wurde bestimmt durch zweiseitigen Student-t-Test mit $p > 0,05$ = n.s. (kein Index), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; und **** $p < 0,0001$. Angezeigte Signifikanzen beziehen sich auf SPF-Mäuse als Kontrollgruppe. De-Novo-Lipidsynthese Daten wurden in Kooperation mit Josef Ecker durch MS-Analysen erstellt. Abbildung verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

Da die De-Novo-Lipidsynthese in GF-Mäusen fast komplett zum Erliegen kommt, stellt sich die Frage nach der Ausprägung essenzieller Enzyme der Lipidsynthese in diesem Model. Die Enzyme *Scd1*, *Fasn* und *Elovl6* sind vor dem Eingriff in keimfreien und OMM12-Mäusen auf RNA-Ebene reduziert. Zwischen GF und OMM12-Mäusen im Vergleich zu SPF-Mäusen ist allerdings kein signifikanter Unterschied feststellbar. Wie schon für *Scd1* und *Fasn* in **Abbildung 3.18** gezeigt, fällt die Ausprägung der Enzyme im Allgemeinen von 0 bis 48 Stunden ab, was im Fall von SPF-Mäusen auch hier zu sehen ist (**Abbildung 3.23 A**). Während der Operation ist die Ausprägung von *Scd1*, *Fasn* und *Elovl6* sowohl in GF als auch in OMM12-Mäusen im Vergleich zu SPF reduziert.

Scd1 und *Fasn* zeigen 48 Stunden nach Hepatektomie eine höhere Ausprägung in GF- und OMM12-Mäusen im Vergleich zu SPF-Mäusen, jedoch ist das Niveau jeweils recht niedrig. *Elovl6* ist 48 Stunden nach der Operation zwischen den verschiedenen bakteriellen Besiedelungsmodellen nicht signifikant verändert.

Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (SPF, GF und OMM12) zum Nullzeitpunkt oder 48 Stunden nach der Operation bezüglich der *Scd1* Proteinausprägung, jedoch unterliegt die Proteinausprägung erheblicher Heterogenität (**Abbildung 3.23 B, C, D**).

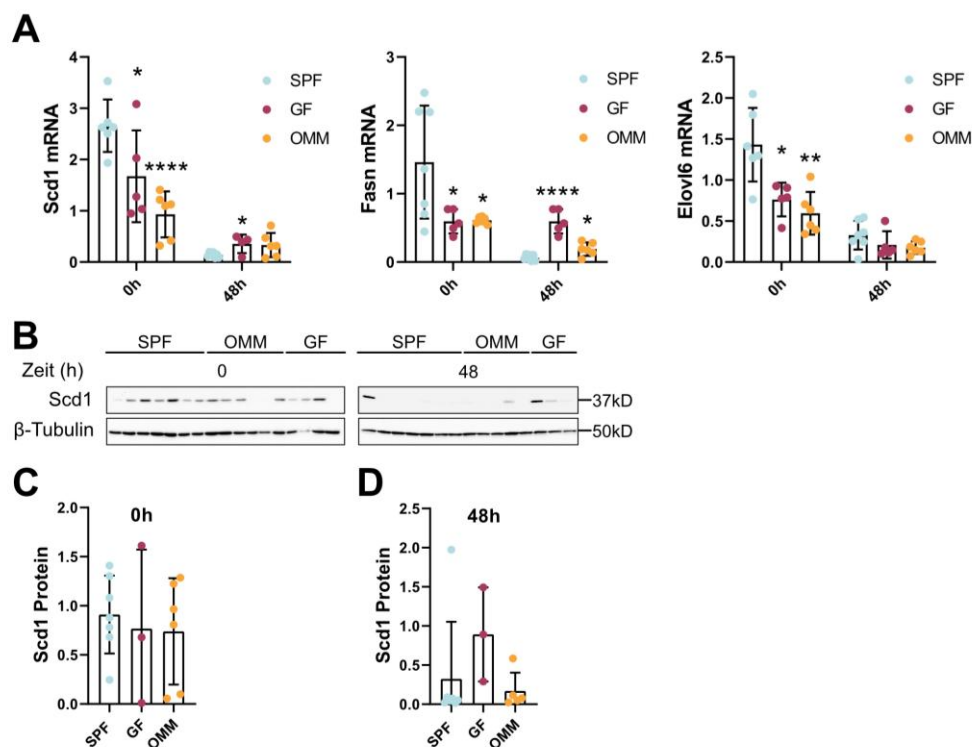


Abbildung 3.23: Expression wichtiger Enzyme für Lipidsynthese während Leberregeneration in keimfreien Mäusen im Vergleich zu Kontrollen und OMM12-Mäusen

Scd1, *Fasn* und *Elovl6* RNA-Ausprägung im Leberparenchym während (0 h) und 48 Stunden (48 h) nach partieller Hepatektomie (A). Immunoblot der *Scd1* Expression der verschiedenen Mausmodelle während und 48 Stunden nach Operation (B) mit der jeweiligen Quantifizierung (C,D). Dargestellt sind Mittelwert $\pm$ SD, jeder Datenpunkt repräsentiert ein biologisches Replikate. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde der Student-T-Test mit Holm-Sidak Korrektur für multiples Testen verwendet, wobei $p > 0,05$ = n.s. (kein Index), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; und **** $p < 0,0001$. Unterschiede ohne statistische Signifikanz sind nicht ausgezeichnet. Angezeigte Signifikanzen beziehen sich auf SPF-Mäuse als Kontrollgruppe. Abbildung verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

3.2.3 Regulation des Lipidsyntheseenzym Scd1 und Auswirkung auf Hepatozytenwachstum

Zur Untersuchung der Regulation von Scd1 in normalen Hepatozyten der Maus wurde als Modell die AML12 Zelllinie verwendet, welche ursprünglich durch Immortalisierung von isolierten Hepatozyten einer Maus (Alter drei Monate) gewonnen wurden. Diese Zellen wurden für vier Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Acetat oder Palmitat und den jeweiligen Kontrollen in vitro stimuliert, um anschließend auf RNA-Ebene die Scd1 Ausprägung zu analysieren (**Abbildung 3.24 A**). Sowohl Acetat in hoher und niedriger Konzentration als auch Palmitat sind in der Lage, die Scd1 Transkription zu aktivieren. Des Weiteren wurde die Produktinhibition der Scd1 gemessen, indem dem Medium eine Fettsäuren Mischung aus Palmitoleinsäure (C 16:1), Octadeca-9-ensäure (C 18:1n-9) und Octadeca-11-ensäure (C 18:1n-11) zugesetzt wurde. Nach 24 Stunden sieht man, dass die Mischung dieser einfach-ungesättigten Fettsäuren die Scd1 Expression signifikant reduziert (**Abbildung 3.24 B**). Palmitat zeigt weiterhin einen Trend die Scd1 Ausprägung auch nach 24 Stunden zu erhöhen. Des Weiteren wurde die Ablagerung von Lipiden in primären Maus-Hepatozyten 48 Stunden nach Inkubation mit 10 mM Acetat analysiert. Hierfür wurde eine Ölrot-O-Färbung durchgeführt, mit deren Hilfe neutrale Lipide (u.a. Triglyceride) angefärbt werden. Man sieht an repräsentativen Bildern (**Abbildung 3.24 C**), dass die Anzahl der Lipidvesikel (rot) nach Acetat Stimulation deutlich erhöht ist.

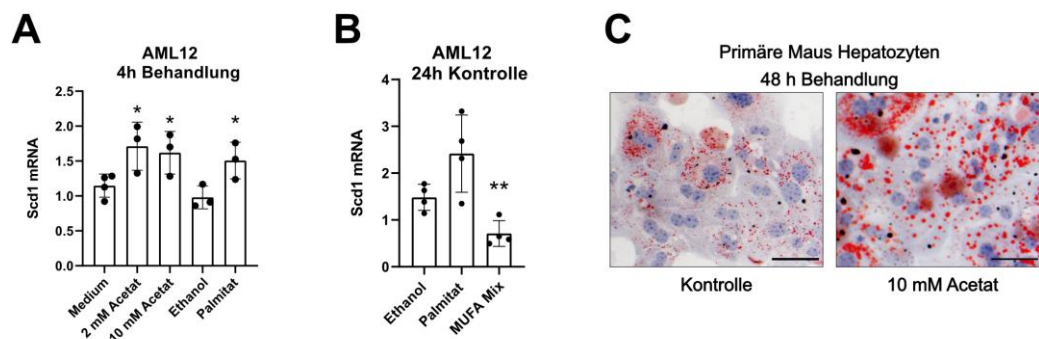


Abbildung 3.24: Regulation der Ausprägung von Scd1 durch Substrat-Induktion und Produktinhibition

Scd1 RNA Analyse von AML12 Zellen nach 4-stündiger Behandlung mit 2 mM und 10 mM Acetat im Vergleich zu Kontrollmedium und direkte Substratstimulation mit 100 μ M Palmitat gelöst in Ethanol und die respektive Kontrolle versetzt mit gleichem Volumen an Ethanol (EtOH) (A). Scd1 Ausprägung 24 Stunden nach Behandlung mit 100 μ M Palmitat oder 100 μ M einer Mono-desaturierten Fettsäuremischung (MUFA Mix) bestehend aus den Fettsäuren Palmitoleinsäure (C 16:1), Octadeca-9-ensäure (C 18:1n-9) und Octadeca-7-ensäure (C 18:1n-7) (B). Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SD, alle Daten sind normalisiert auf β -Aktin. Ein Datenpunkt zeigt ein biologisches Replikat und Signifikanz wurde mittels des zweiseitigen Student-t Tests analysiert, wobei $p > 0,05$ = n.s. (kein Index), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; und **** $p < 0,0001$. Angegebene Signifikanzen beziehen sich auf die jeweilige Kontrolle. Primäre Maus-Hepatozyten stimuliert mit 10 mM Acetat für 48 Stunden und Färbung der Neutrallipide mit Ölrot O und Gegenfärbung mit Hämatoxylin (C). Der Maßstab repräsentiert 50 μ m. Teile der Abbildung verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

Um zu testen, ob das Zellwachstum der Hepatozyten durch Acetat Supplementierung direkt gesteigert werden kann oder ob sich die Fettsäuren lediglich innerhalb von Lipidvesikeln in die Zellen einlagern, wurden murine Hepatozyten als primäre Organoiden in Matrigel kultiviert und in vitro mit Acetat stimuliert. Anschließend wurde die Größe der Organoiden bestimmt. Tatsächlich führt die Zugabe von Acetat in vitro zu einem signifikant erhöhten Größenwachstum der Organoiden (**Abbildung 3.25 A, B**). Zusätzlich wurde die Rolle der Scd1 in diesem Wachstums-assoziierten Phänotyp getestet, indem ein pharmakologischer Scd1 Inhibitor hinzugegeben wurde. Scd1-inhibierte Organoiden sind tendenziell etwas kleiner, aber eine signifikante Veränderung ist nicht nachweisbar. Die Proliferationsmarker Cyclin B1, Cyclin A2 und Cyclin D1, welche mittels RT-qPCR bestimmt wurden, sind durch Scd1-Inhibition sichtbar reduziert. Die Gabe von Acetat allein ist allerdings nicht ausreichend, um eine stärkere Expression von Proliferationsmarkern zu induzieren (**Abbildung 3.25 C**).

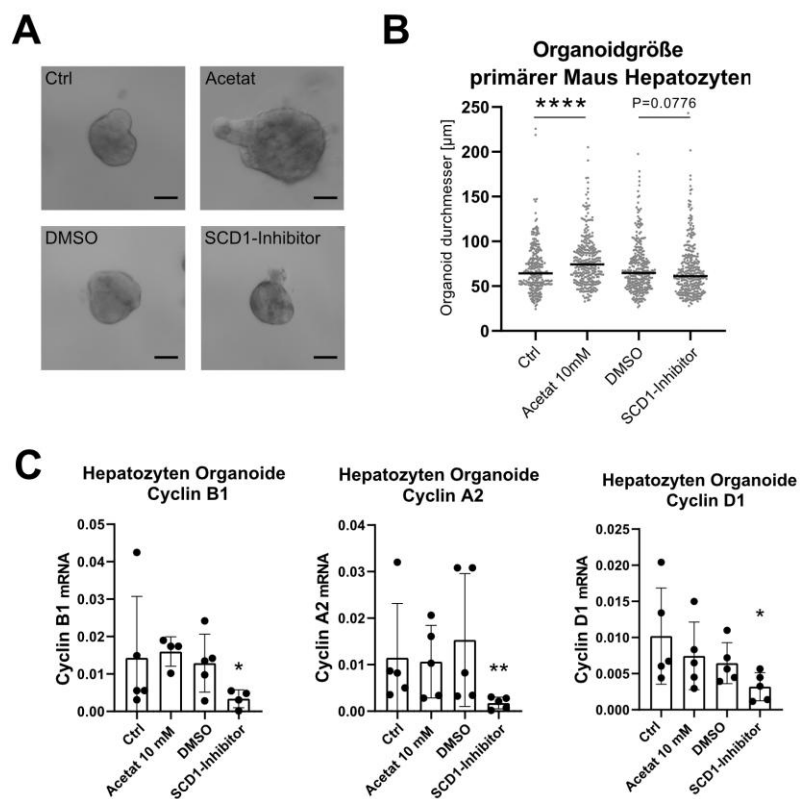


Abbildung 3.25: Murine Leber Organoiden: Induktion von Größenwachstum durch Zugabe von Acetat und Hemmung der Proliferation durch pharmakologische Blockade von Scd1

Hellfeld Aufnahmen von murinen Leber Organoiden aus primären Maus Hepatozyten. Organoiden wurden mit 10 mM Acetat und Kontrollmedium (Ctrl) oder mit SCD1-Inhibitor und der entsprechenden Kontrolle mit DMSO für 48 Stunden behandelt (A). Der Organoid Durchmesser von 300 Organoiden pro Versuch von n=5 Mäusen bestimmt. Außerdem wurde die Ausprägung der Proliferationsmarker Cyclin B1, A2 und D1 auf RNA-Ebene analysiert. Die RNA-Daten wurden auf β -Aktin normalisiert. Signifikanz wurde mittels des Mann-Whitney U Test ermittelt, $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet, wobei $p > 0,05 = n.s.$ (kein Index), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; und **** $p < 0,0001$. Zusätzliche P-Werte sind für Ergebnisse nahe an der Signifikanzgrenze angegeben. Isolierte primäre murine Hepatozyten wurden von Emely Scherer (AG Wohlleber) bereitgestellt. Die Organoidgröße einzelner technischer Replikate wurde von Laura Geyer (AG Janssen) ermittelt. Abbildung verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

Bei *in vitro* Experimenten mit AML12 Zelllinien und Organoiden konnte ein direkter Effekt von Acetat auf Scd1 Ausprägung und Wachstum nachgewiesen werden (**Abbildung 3.24** und **Abbildung 3.25**). Zur Untersuchung der Induzierbarkeit von Scd1 *in vivo* wurden Mäuse nach zweistündigem Fasten steigende Konzentrationen von Acetat oral verabreicht und nach vier Stunden die Leber entnommen (**Abbildung 3.26 A**). Bei der Analyse der Lipidsyntheseenzyme auf RNA-Ebene kann man sehen, dass die Scd1 Expression mit steigender Acetat Konzentration signifikant zunimmt, wohingegen weder die Transkription von *Fasn* noch von *Elovl6* von Acetat beeinflusst werden (**Abbildung 3.26 B**).

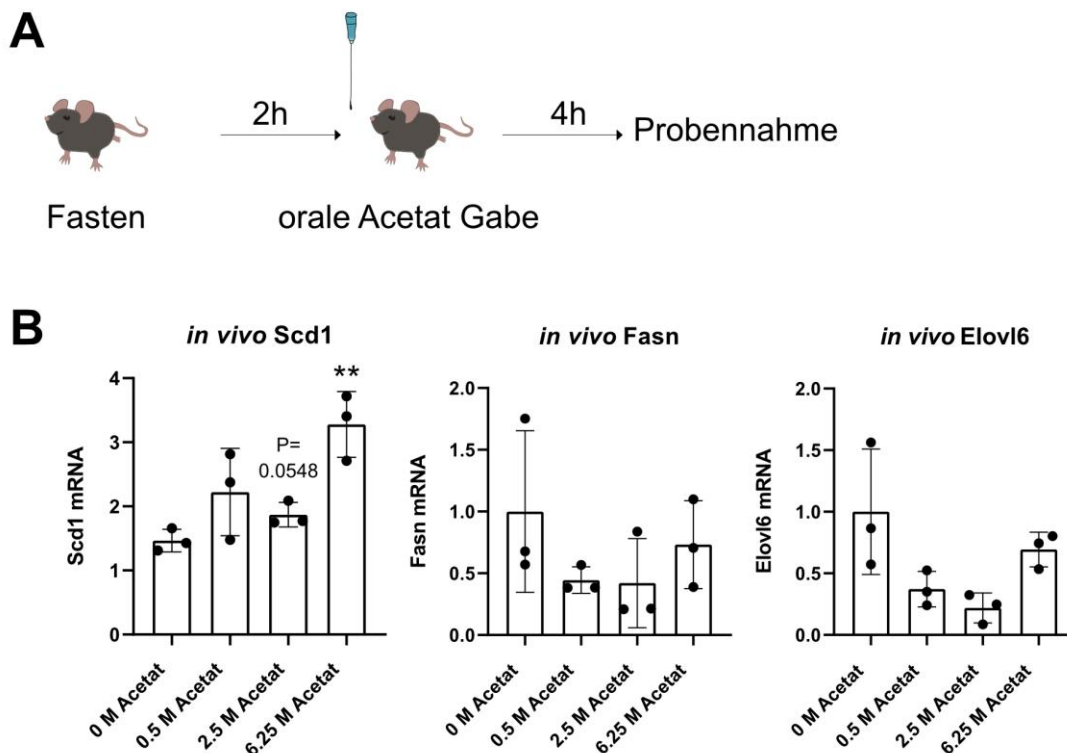


Abbildung 3.26: In vivo Erhöhung der Scd1 Expression in Lebergewebe durch orale Gabe von Acetat

Experimentaldesign der oralen Acetat Gabe mit steigender Acetat Konzentration, durchgeführt von Johannes Plagge (A). Analyse des mRNA-Niveaus von Scd1, Fasn und Elovl6 im Leberparenchym von n=3 Mäusen je Zeitpunkt (B). Daten zeigen den Mittelwert ± SD. Signifikanzbestimmung durch zweiseitigen Studenten t-Test mit $p > 0,05$ = n.s. (nicht angegebenen) und $**p < 0,01$. Bei Ergebnissen Nahe der Signifikanzgrenze ist der P-Wert angegeben. Abbildung verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

3.2.4 SCD1-Expression im menschlichem Lebergewebe steht in positivem Zusammenhang mit der Leberregeneration

Bisherige Ergebnisse konnten einen Einfluss von Acetat und SCD1 auf das Hepatozytenwachstum im Mausmodell feststellen. Wie bei jedem Modell ist auch hier zu klären, ob die beobachteten Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Hierzu wurden erkrankte Personen mit Lebermetastasen von Darmkrebs oder Cholangiokarzinomen untersucht. Die Behandelten unterliefen zuerst eine Intervention, um das Restlebertvolumen zu erhöhen, eine sogenannte ALPPS (Associating Liver Partition with Portal vein ligation for Staged hepatectomy). Computertomographische Scans wurden vor der Intervention zur Pfortader-Ligatur (pre-Intervention), kurz vor der partiellen Hepatektomie (post-Intervention) und nach der Resektion (post-Resektion) erstellt (**Abbildung 3.27 A**), um das Lebertvolumen zu bestimmen. Zum Zeitpunkt der Resektion wurden von dem hyperproliferativen gesunden Gewebe und dem entfernten hypoproliferativen Gewebe Biopsien entnommen (n=13 Personen) und die Ausprägung von Enzymen der Lipidsynthese analysiert (**Abbildung 3.27 B**). Die RNA-Expression von SCD1 und FASN ist in hyperproliferativem Lebergewebe (rot) im Vergleich zu hypoproliferativem Gewebe (blau) derselben Person signifikant erhöht. ELOVL 6 ist nicht signifikant verändert (**Abbildung 3.27 B**). Für eine Untergruppe von drei behandelten Personen wurde eine detaillierte Volumetrie des regenerierten Lebertvolumens erstellt. Diese bezieht sich einerseits auf den Volumenzuwachs zwischen Intervention und partieller Hepatektomie (Regenerationsindex post-Intervention) oder den Zeitabschnitt zwischen partieller Hepatektomie und einige Wochen nach der Operation (Regenerationsindex post-Resektion). Der jeweilige Regenerationsindex wurde anschließend mit der Enzymexpression in gesundem hypertrophen Lebergewebe korreliert (**Abbildung 3.27 C, D**). SCD1 mRNA Expression zeigt eine positive und signifikante Korrelation mit der Regeneration post-Intervention. Es ist ein positiver Trend sichtbar für die Korrelation der FASN-Ausprägung mit dem Regenerationsindex post-Intervention und post-Resektion, sowie für SCD1 zum Zeitpunkt post-Resektion. Im Gegensatz dazu zeigt ELOVL6 keinen Trend im Zusammenhang mit der Regeneration der Leber.

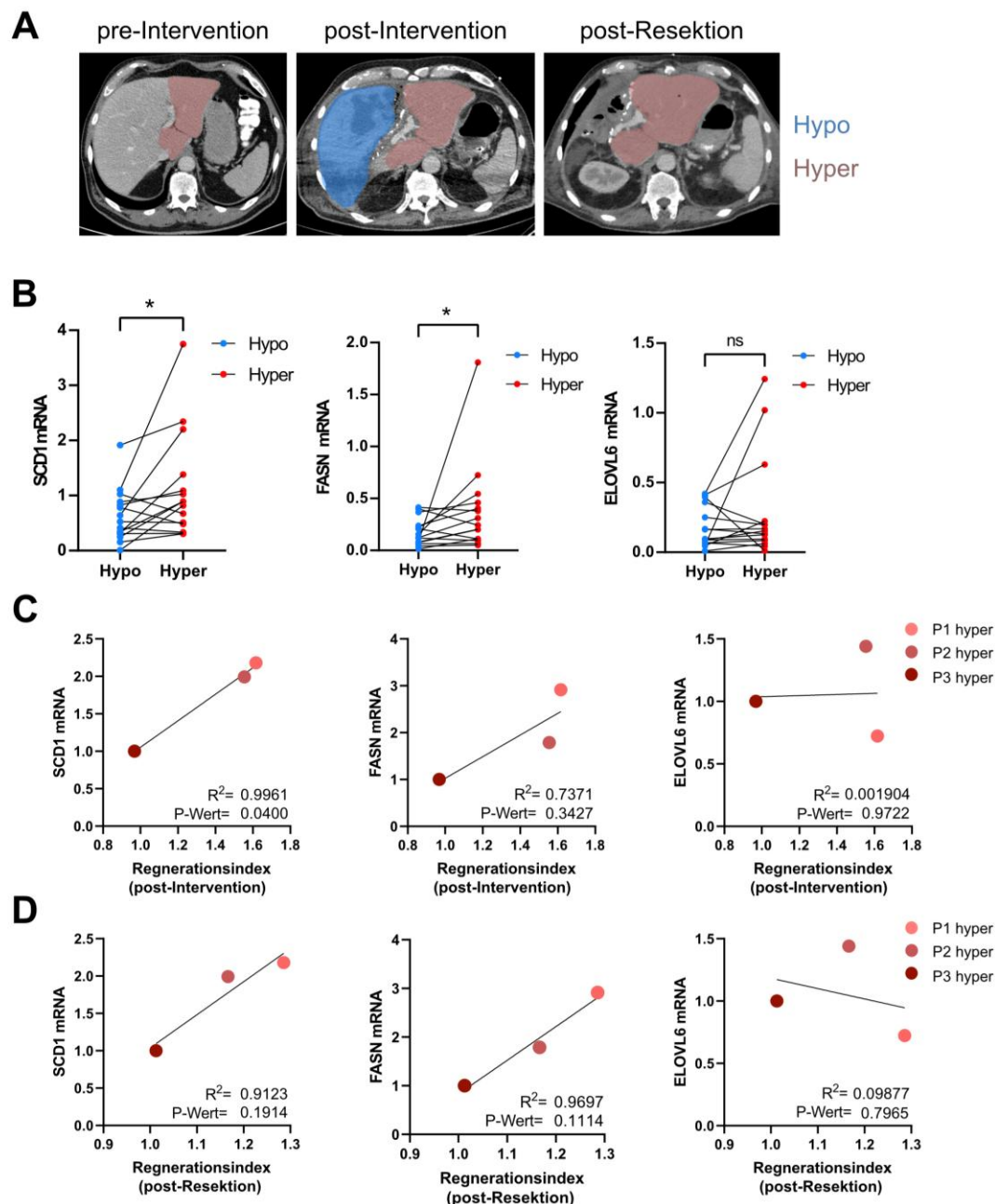


Abbildung 3.27: Hochregulierung der wichtigen Lipidsynthese Enzyme SCD1 und FASN in proliferierendem Gewebe von erkrankten Personen nach Proliferation induzierender Intervention

Pre-Intervention: Leber vor Behandlung durch ALPPS (associated liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy) zur Induktion der Proliferation im gesunden (rot) Teil der Leber. Post-Intervention: direkt vor partieller Hepatektomie mit hyperproliferierendem Teil (rot) und hypoproliferierenden erkrankten Teil (blau). Post-Resektion: Leber nach partieller Hepatektomie (A). Biopsien wurden zum Zeitpunkt der Resektion von 13 behandelten Personen aus hypo- (blau) und hyper- (rot) proliferativen Gewebe entnommen auf SCD1, FASN, und ELOVL6 RNA Ausprägung untersucht. Korrelation des Regenerationsindex zwischen Intervention und Resektion (post-Intervention; C) oder zwischen dem Zeitpunkt der Resektion und einige Wochen später (post-Resektion; D) mit der Ausprägung der Lipidsynthese-Enzyme im gesunden hypertrophen Lebergewebe. Daten zeigen einzelne Messwerte der gepaarten Proben mit Signifikanzbestimmung durch Wilcoxon Test mit $p > 0,05$ = n.s., $*p < 0,05$; $**p < 0,01$. Der lineare Zusammenhang zwischen Enzymexpression und Regenerationsindex wurde mittels der Pearson Korrelationsanalyse untersucht. Computer Tomographie Scans erkrankter Personen mit Lebermetastasen, bei denen partielle Hepatektomie durchgeführt wurde, wurden von PD Dr. Fabian Lohöfer und PD Dr. Melanie Laschinger (beide Klinikum rechts der Isar, TUM) ausgewertet. Teile der Abbildung verändert aus (Yin und Sichler et al. 2023).

4 Diskussion

Diese Arbeit umfasst zwei Teilbereiche, welche den Einfluss der Mikrobiota auf klinisch relevante Aspekte im Zusammenhang mit dem kolorektalen Karzinom (CRC) und Leberregeneration untersuchen. Das Darm-Mikrobiom hat in den letzten Jahren erheblich an Bedeutung in der biomedizinischen Forschung gewonnen und birgt vielversprechendes Potential, da es vermutlich sowohl die Entstehung als auch die Behandlung von CRC zu beeinflussen vermag. (Elinav et al. 2019, Shanahan et al. 2021, Fernandes et al. 2022, Hou, Chen, et al. 2022, Xu et al. 2022, Wong und Yu 2023). Folglich besteht die wissenschaftliche Grundfrage dieser Arbeit darin, das Verständnis der vielschichtigen mikrobiellen Einflüsse zu vertiefen und bisher unerforschte Aspekte im Entwicklungsprozess des CRC, seiner Therapiemöglichkeiten und der Leberregeneration nach Metastasenentfernung zu beleuchten.

Im ersten Teil wird zunächst der Mustererkennungsrezeptor TLR3, welcher doppelsträngige RNA (dsRNA) erkennt, in den Vordergrund gestellt und seine Funktion bei CRC, sowie seine vermutete Wechselwirkung mit dem Mikrobiom untersucht. Die Rolle von TLR3 als Tumorsuppressor kann durch neue genetische Mausmodelle *in vivo* bestätigt und durch klinische Daten untermauert werden. Die molekularen Mechanismen des anti-tumorigenen Effekts von TLR3 werden erstmals in einem Zelltyp-spezifischen Ansatz untersucht. In dieser Forschungsarbeit wurden somit die Tumorzell-autonomen Effekte im Vergleich zu globalen Effekten von TLR3 beleuchtet. Hierzu wurden weiterhin klinische Daten von Patientinnen und Patienten mit kolorektalem Karzinom erhoben, humane CRC-Zelllinien mit einer CRISPR-Cas9 induzierten TLR3 Defizienz für *in vitro* und *in vivo* Assays generiert und verwendet, sowie *Tlr3*- und *Trif*-defiziente Maus-Tumormodelle mit Zelltyp-spezifischer Expression in einem genetischen „switch-on“ Modell verwendet.

In diesem Zusammenhang liegt der Fokus insbesondere auf Aspekten der Metastasierung, speziell auf der Invasivität und Migration von Tumorzellen, sowie auf der Proliferation und dem Überleben von Darmkrebs-Zellen und ihrer Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem. Die mutmaßlichen Veränderungen der Mikrobiota in Abhängigkeit von TLR3 wurden in den Mausmodellen, sowie in Patientenproben über 16S-rRNA-Sequenzierung analysiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird das Augenmerk auf die Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie (PHx), die etwa als Folge einer chirurgischen Resektion kolorektaler Metastasen erfolgt, gelegt. Diese Arbeit zeigt, dass die Darm-Mikrobiota maßgeblich den hepatischen Lipidstoffwechsel während des regenerativen Prozesses beeinflusst. Die Daten wurden durch PHx in verschiedenen Mausmodellen mit Antibiotika-induzierter mikrobieller Dysbiose, in keimfreien Mäusen oder in gnotobiotischen Modellen mit minimaler definierter Mikrobiota durchgeführt. Um die Befunde zu bestätigen, wurden neben klassischen 2D Zellkulturexperimenten, 3D

Organoid Modelle aus primären Hepatozyten, klinische Daten und Gewebeproben von Patienten und Patientinnen herangezogen.

Diese Forschungsergebnisse eröffnen die Möglichkeit, zukünftig durch Überwachung des Stuhlmikrobioms vor einem elektiven Eingriff, sowie durch innovative Behandlung mittels Gabe mikrobieller Metaboliten oder Verabreichung der Mikrobiota selbst, den post-operativen Genesungsprozess zu verbessern. Hierdurch könnte zukünftig die Anzahl an Patienten, die für eine operative Behandlung mittels partieller Leberresektion in Frage kommen, deutlich erhöht werden.

4.1 Toll-Like-Rezeptor 3 im Tumorkontext

Der Toll-like-Rezeptor-3 ist ein Mustererkennungsrezeptor (pattern recognition receptor: PRR) des angeborenen Immunsystems. Er erkennt dsRNA, etwa viralen Ursprungs, und aktiviert die IRF3 und NFκB abhängige Genexpression (Kawai und Akira 2006, Muresan et al. 2022). Im Gegensatz zu anderen PRRs ist TLR3 allein von der TRIF-Signalübertragung abhängig und nicht auf das Adapterprotein MYD88 angewiesen (Gay et al. 2014, Leifer und Medvedev 2016). In der Vergangenheit wurde von uns und anderen Arbeitsgruppen gezeigt, dass die MYD88-abhängige Signalübertragung und die Aktivierung anderer Toll-like-Rezeptoren einen tumorfördernden Effekt haben (Rakoff-Nahoum und Medzhitov 2007, Holtorf et al. 2018). Welche Rolle speziell TLR3 auf die Entwicklung von CRC hat und welche molekularen Mechanismen dafür verantwortlich sind, wird noch kontrovers diskutiert. TLR3 kann Onkogene aktivieren oder tumorfördernd wirken (Scatozza et al. 2020, Matissek et al. 2022, Matissek et al. 2023), aber auch tumorsuppressiv wirken (Yuan et al. 2015, Fan et al. 2019, Bianchi et al. 2020). In der Literatur werden Viabilität und Apoptose als Faktoren beschrieben, die durch TLR3 reguliert werden. So gehen beispielsweise Makrophagen und Darmepithelzellen (IEC) ohne maligne Veränderungen nach TLR3 Stimulation Caspase-3 und -8 abhängig in die Apoptose (McAllister et al. 2013, Hidalgo-Sastre und Kuebelsbeck et al. 2021). Dies wurde auch in Studien mit Brust-, Lungen- und Prostatakrebszelllinien gezeigt (Salaun et al. 2006, Harashima et al. 2012, Bianchi et al. 2020). In CRC-Zelllinien und Zellen des hepatozellulären Karzinoms hingegen ist dieser Effekt nicht zu beobachten (Yoneda et al. 2008, Bugge et al. 2017). Möglicherweise spielt der Tumortyp eine Rolle, jedoch konnte bislang keine direkte Korrelation von TLR3 mit der Tumorentität festgestellt werden (Muresan et al. 2020). Des Weiteren stehen Veränderungen in Differenzierung und Metastasierung im Verdacht, von TLR3 abhängige Mechanismen zu sein. So wurde in Prostatakrebszelllinien gezeigt, dass TLR3 Überexpression *in vitro* und *in vivo* in einem Maus-Xenograft-Model zu erhöhter Zellmotilität, Migration und Invasion führt (Muresan et al. 2022). Bei Brustkrebs wurde gezeigt, dass eine TLR3 Aktivierung NFκB abhängig zu einem stammzellartigen Phänotyp der Zellen führt (Jia et al. 2015, Muresan et al. 2020). Zudem wird natürlich die Immunregulation im Zusammenhang mit TLR3 häufig untersucht. So wurde gezeigt, dass

durch die Gabe von TLR3 Agonisten NK und CTLs aktiviert werden und sich die zelluläre Zusammensetzung der Tumorumgebung ändert (Muresan et al. 2020). Generell gilt als etabliert, dass TLR3-abhängig die Produktion von Zytokinen angeregt werden kann und zu einer Immunaktivierung führt, was bereits in der Therapie beim Mammakarzinom angewendet wird (Salaun et al. 2011, Bugge et al. 2017, De Waele et al. 2018). Bei diesen Untersuchungen wurde häufig das komplette Tumorgewebe histologisch nach der TLR3 Expression stratifiziert oder mittels Immunoblot oder qPCR nachgewiesen (Yoneda et al. 2008, Salaun et al. 2011, Xiang et al. 2012, Bugge et al. 2017, De Waele et al. 2018, Yoshida et al. 2020). Hier muss jedoch angemerkt werden, dass der zelluläre Ursprung der beobachteten Effekte noch nicht ausreichend geklärt ist, da TLR3 in Tumorzellen und in manchen Epithelzellen teils in Endosomen, teils auf der Plasmamembran oder im Nucleus zu finden ist und nicht nur in Zellen des Immunsystems ausgeprägt wird (Yoneda et al. 2008, Leifer und Medvedev 2016, Muresan et al. 2020). Außerdem ist offen, ob ein Verlust von TLR3 die Darm-Mikrobiota nachhaltig verändert und sich somit indirekt auf die Tumorentstehung auswirkt.

4.1.1 TLR3: ein Tumorsuppressor *in vivo* mit prognostischer Relevanz für Langzeitüberleben

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, führt die Ansammlung somatischer Mutationen in Tumorsuppressoren und Onkogenen zu Krebs (Fearon und Vogelstein 1990). Dabei induzieren sogenannte Initiationsmutationen, welche normale Zellen zu aberranten transformieren, unkontrolliertes Zellwachstum und Dysplasien. Allerdings führen diese allein noch nicht zur Krebsentstehung. Für die Progression, welche letztlich gutartige zu malignen Läsionen transformiert, müssen über den Verlauf eines Zeitraumes von Jahren mehrere Mutationen auftreten und eine Reihe von Faktoren erfüllt werden (Hanahan und Weinberg 2011, Hanahan 2022). Mutationen des Tumorsuppressors APC wurden als Initiationsmutationen bei Darmkrebs beschrieben (Fearon und Vogelstein 1990, Powell et al. 1992, Leggett und Whitehall 2010, Zhou et al. 2023), weswegen in dieser Studie ein *Apc*-mutiertes Mausmodell verwendet wird (Fodde et al. 1994). Jedoch könnten auch andere spontane Initiationsmutationen für die Tumorentstehung verantwortlich sein, wie Mutationen in dem Tumorsuppressor TP53, oder den Onkogenen BRAF und KRAS (Janssen et al. 2002, Leggett und Whitehall 2010, Rad et al. 2013, Zhou et al. 2023). Wie beschrieben werden Tumorsuppressoren von Genen kodiert, bei denen der Funktionsverlust zur Entstehung oder Entwicklung aberranter Zellen führt. Dahingegen führen Mutationen in Onkogenen mit „Funktionsgewinn“ zu einer Initiation oder Progression von aberranten Zellen (Hanahan und Weinberg 2000). Folglich kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Deletion auf genomischer Ebenen eher auf einen Tumorsuppressor hinweist, während ein Onkogen genomisch eher amplifiziert ist. Wie die in dieser Arbeit durchgeführten bioinformatischen Analysen zeigen, wird TLR3 (Chr4q35.1) bei verschiedenen Krebserkrankungen sechsmal häufiger genetisch deletiert

als amplifiziert, demnach kommt es in weitaus mehr Fällen zu einem Funktionsverlust als zu einer starken Ausprägung des Rezeptors. Die Deletion von *TLR3* tritt mit 31 % in vergleichbarem Maß wie bei *TP53* auf, das anhand von cBioportal Analysen bei 37 % aller an Krebs erkrankten Personen deletiert ist. Eine Deletion von *TLR3* könnte zwar auch als Folge der Deletion eines anderen, bislang unbekannten Tumorsuppressors in der unmittelbaren genomischen Nachbarschaft auftreten, wahrscheinlicher jedoch hat der *TLR3* Verlust direkte Vorteile für die Initiation bzw. das Fortschreiten von Tumoren. Diese Annahme wird untermauert durch prognostische Analysen der öffentlich zugänglichen cBioPortal Plattform, wonach das Krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben verschlechtert ist, wenn *TLR3* in Tumoren genetisch deletiert ist. Interessant ist hierbei, dass vor allem beim Gesamtüberleben *TLR3* eher eine langfristige Rolle zu spielen scheint, da sich die Unterschiede im Überleben erst 30 Monate nach Stellung der Diagnose zeigen. Möglicherweise deutet dies auf Veränderungen im Therapie-Ansprechen und einer Resistenzentwicklung der Krebszellen, der Evasion des Immunsystems oder der Fähigkeit zur metachronen Metastasierung hin. Allerdings ist diese Interpretation der Überlebensdaten eher spekulativ, denn es werden bei der beschriebenen *in silico* Analyse sehr viele verschiedene Tumorerkrankungen zusammengefasst, die unterschiedliche Verlaufsformen aufweisen, zudem spielt *TLR3* in verschiedenen Krebserkrankungen möglicherweise unterschiedliche Rollen. Betrachtet man die am häufigsten weltweit auftretenden Krebserkrankungen (Brustkrebs, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Tumore des ösophago-gastralen Übergangs, Kolorektalkarzinom und Glioblastom), die in der cBioportal Datenbank häufig vertreten sind, sieht man bei allen Entitäten dasselbe Muster: eine gehäufte homo- oder heterozygote Deletion des *TLR3* Genlokus. Auch in einer Kohorte von 25 an Darmkrebs erkrankten Personen, welche an der chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar behandelt wurden, konnte eine gehäufte Herabregulation von *TLR3* auf mRNA-Ebene in allen Stadien der Erkrankung bestätigt werden (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe). Besonders bemerkenswert ist hier, dass *TLR3* der einzige Toll-like Rezeptor mit reduzierter Ausprägung war, und *TLR3* zudem nicht nur insgesamt in Tumoren im Vergleich zur nicht erkrankten Darmmukosa herabreguliert ist, sondern bei fortgeschrittenen, metastasierenden Tumoren (T3N+M1) signifikant geringer ausgeprägt ist als im frühen, lokal begrenzten Stadium der Erkrankung (T3N0M0). Dies deutet auf eine negative Korrelation von *TLR3* mit Progression und Metastasierung hin. Diese Hypothese wird weiterhin dadurch unterstützt, dass die *TLR3* Expression negativ mit dem Nodalstatus (pN), also der Anzahl an Lymphknoten, in denen Tumorzellen gefunden werden, korreliert. Analog zu den Befunden auf genomischer Ebene in den cBioPortal Datensätzen ist auch die mRNA-Expression von *TLR3* in Primärtumor und Metastasen signifikant reduziert. Eine inverse Korrelation von *TLR3* mit Lymphknoten-Metastasierung wurde übereinstimmend dazu bereits in anderen CRC-Kohorten beobachtet (Yoshida et al. 2020).

Eine globale *TLR3* Defizienz führt bei dem hier eingesetzten genetischen Maus-Modell nicht zur spontanen Entstehung von Tumoren, selbst nach einer Beobachtungsdauer von

12 Monaten unter SPF-Haltungsbedingungen. TLR3 allein hatte in subkutanen Allotransplantationen von murinen RMA-S Lymphom Zellen keinen Einfluss auf Krebsentstehung (Guillerey et al. 2015). Zum aktuellen Zeitpunkt ist keine Studie bekannt (nach intensiver Literaturrecherche), in der eine TLR3 Defizienz allein zur Tumorinitiation führt, obwohl transgene Tlr3 Mäuse für die Erforschung verschiedener Erkrankungen verwendet wurden (Gowen et al. 2006, Lu et al. 2014, McCall et al. 2015, Tavora et al. 2020). Eine Defizienz mehrerer TLRs, wie TLR7 in Kombination mit TLR3 und TLR9 kann allerdings zur Entstehung einer T-Zell lymphoblastischen Leukämie führen (Yu et al. 2012). Ein weiterer genetischer Faktor, wie zum Beispiel eine APC-Mutation mit Funktionsverlust, erscheint also notwendig, um Tumore zu induzieren. Die korrelativen Ergebnisse aus dem Patientenkollektiv wurden in dem genetischen *Apc*^{1638N/+} Tumor-Mausmodell (Fodde et al. 1994) mit globaler *Tlr3* Defizienz im C57Bl/6 Hintergrund, das im Rahmen dieser Arbeit neu generiert wurde, rekapituliert. Hier zeigt sich, dass bereits eine heterozygote Deletion, wie sie unseren Analysen der TCGA-Daten zufolge bei Tumorerkrankungen beim Menschen in den meisten Fällen auftritt, eine negative prognostischen Assoziation mit dem Gesamtüberleben hat.

Die Mäuse mit Tlr3 Defizienz zeigen demnach eine stärkere tumorbedingte Morbidität, was sich in einer signifikanten Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) gegenüber den Tlr3-profizienten Tieren widerspiegelt. Zudem sind mehr Läsionen vorhanden, auch wenn diese nicht größer zu sein scheinen. Dies deutet auf einen spezifischen Effekt auf die Tumorinitiation hin, nicht aber auf das Wachstum und die Proliferation der Tumore. Da TLR3 beim Menschen (Matsumoto et al. 2003, Yoneda et al. 2008, Huhta et al. 2016, Bugge et al. 2017, Smok-Kalwat et al. 2024), sowie auch bei Mäusen (Huhta et al. 2016, Tavora et al. 2020, Gao et al. 2021) in vielen Zelltypen ausgeprägt wird, darunter adaptive und innate Immunzellen, sowie im Darmepithel selbst, wie auch unsere eigenen Befunde zeigen (Anhang **Abbildung 6.1**), stellt sich die Frage, in welchem Gewebe oder Zelltyp sich die beobachtete tumorsuppressive Wirkung von TLR3 entfaltet. Hierzu wurde ein weiteres genetisches Mausmodell generiert, das eine Cre-vermittelte gewebespezifische Ausprägung von TLR3 erlaubt, bei gleichzeitiger Defizienz in allen anderen Zelltypen (sog. „Switch-On“ Modell). Die Zelltyp-spezifische Re-Expression in intestinalen Epithelzellen (IEC) mittels einer durch p-villin-Cre (el Marjou et al. 2004) induzierten Entfernung der Stop-Kassette im *Tlr3* Genlokus zeigt eine partielle Überlebensverlängerung der Mäuse. Das Überleben unterscheidet sich nicht mehr von der parentalen *Apc*^{1638N/+} Linie mit Wildtyp-Tlr3, dagegen aber signifikant von Mäusen mit globalem Tlr3 Verlust. Dies deutet auf Epithelzell-, bzw. Tumorzell- autonome Funktionen von Tlr3 bei der Tumorsuppression hin.

Da das TLR3 Protein keine intrinsische Enzymaktivität hat, ist es zur Signalweiterleitung auf einen Signaladapter angewiesen, das Protein Trif, das vom TICAM1 Gen kodiert wird (Leifer und Medvedev 2016, Muresan et al. 2020). Trif jedoch leitet auch Signale anderer TLRs weiter (Leifer und Medvedev 2016, Muresan et al. 2020), somit ist fraglich, ob eine Deletion von TICAM1 eine Phänokopie des TLR3-KOs darstellt. Dies wurde *in silico* an Patientendaten der cBioPortal Plattform, sowie mit Hilfe eines weiteren, unabhängigen

genetischen Mausmodells untersucht. Bei der Betrachtung des humanen *TICAM1* Genlokus in der Pan-Cancer Kohorte fällt auf, dass er zwar ebenfalls häufiger deletiert als amplifiziert ist, jedoch ist das Verhältnis von Deletionen und Amplifikationen nicht so stark ausgeprägt, wie bei TLR3 und es gibt kaum homozygote Deletionen. Auch zeigt das *Ticam1* defiziente Mausmodell kein verringertes Überleben im Vergleich zu den Kontrollen, jedoch signifikant größere Läsionen, was auf verstärkte Tumورprogression hinweist. Grund hierfür könnte sein, dass das Signalübertragungsprotein TRIF sowohl von TLR3 als auch von TLR4 rekrutiert wird (Gay et al. 2014, Kawai et al. 2024) und sich die tumorsuppressiven, TLR3-abhängigen und die tumorfördernden, TLR4-vermittelten Effekte überlagern. Dies könnte erklären, weswegen eine *Ticam1* Deletion molekular teils zu einem ähnlichen, jedoch prognostisch unterschiedlichen Ergebnis führt als das *Tlr3* defiziente Mausmodell.

Jedoch müssen weitere potenzielle Einflussfaktoren, welche den Phänotyp verändern können, in Betracht gezogen werden. Es ist denkbar, dass systemische Effekte der *Ticam1* Defizienz vorliegen, was sich in der signifikanten Reduktion von Körper- und Milzgewicht bei Mäusen ohne Tumorphintergrund manifestieren würde, allerdings wurde dies bislang in über 20 Jahren seit der Erstveröffentlichung des *Trif^{LSL/LSL}*-Mausmodells nicht publiziert (Beutler et al. 2003, Hoebe et al. 2003, Burfeind et al. 2018).

Aufgrund des systemischen und Mischphänotyps aus TLR3 und TLR4 Aktivierung wurde das Augenmerk dieser Arbeit vor allem auf den Mustererkennungsrezeptor TLR3 gelegt und TRIF nur peripher untersucht (Anhang **Abbildung 6.9**).

4.1.2 Molekulare Mechanismen der TLR3 abhängigen Tumorsuppression

Obwohl TLR3 im kolorektalen Karzinom generell häufig deletiert ist und es zu einer statistisch signifikanten Reduktion der mRNA-Expression kommt, gibt es eine Untergruppe an Patienten mit einer deutlich nachweisbaren mRNA-Ausprägung von TLR3 im Tumor, die ähnlich zu der im Normalgewebe ist. Darauf basierend wurde eine Stratifizierung der beschriebenen Kohorte in hohe, mittlere und niedrige intratumorale TLR3 Expression vorgenommen. Hierbei wurde der Referenzwert zur besseren Vergleichbarkeit der Daten an DLD1 Zellen, einer humanen Krebszelllinie mit relativ starker TLR3 Ausprägung, festgemacht. Zur Analyse der molekularen Mechanismen des vermuteten tumorsuppressiven Effekts von TLR3 wurde eine „Bulk“ RNA-Sequenzierung von Tumorproben der Kohorte mit hoher im Vergleich zu niedriger TLR3 Expression durchgeführt, sowie parallele Analysen an isogenen Zellmodellen mit und ohne TLR3 Expression durchgeführt.

Es wurde eine bioinformatische GSEA-Analyse (Gene Set Enrichment) durchgeführt, um Erkenntnisse über Signalwegs-Aktivierung zu erhalten. Hierzu wurden veränderte Transkriptionsprofile mit der Annotations-Datenbank *Hallmarks* verglichen. Tumore mit hohem TLR3 Niveau zeigen deutliche Anzeichen von Immunaktivierung, einschließlich verstärkter Immunantwort und Allograft-Abstoßungsreaktionen. Im Gegensatz dazu

offenbart die Analyse eine verstärkte Ausprägung der EMT-Signalwege (Epithelial-Mesenchymale Transition) sowie einer Aktivierung der Proliferation (E2F Zielgene, G₂M Zyklus-Checkpoint, MYC Zielgene V1) in Tumoren mit niedriger TLR3 Expression. Die Veränderungen in E2F Zielgenen, G₂M Zyklus-Checkpoint, MYC Zielgenen können als deutliches Indiz für eine generell erhöhte Zellproliferation gewertet werden (Franke et al. 2020). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass der beobachtete Effekt auf MYC tumorzell-unabhängig ist, da GSEA-Analysen, die wie beschrieben, parallel an DLD1 Zellen durchgeführt wurden, zwar ebenfalls eine Aktivierung von MYC-Zielgenen zeigen, die aber im Gegensatz zu den Tumor Analysen positiv mit TLR3 korreliert und somit gegenläufig zu den Ergebnissen aus den Tumor-Gewebeproben ist. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Zelllinie DLD1 eine konstitutive Überexpression von MYC zeigt (Vidyasekar et al. 2015), was die Vergleichbarkeit der RNASeq Analysen mit den Patientenproben in diesem Punkt erschwert.

Die RNA-Sequenzierungsergebnisse zeigen eine inverse Korrelation der TLR3 Ausprägung mit Transkripten der „Melanoma Antigen Gene“ (MAGE) Familie. In Tumoren mit geringer TLR3 Expression sind die MAGE-Transkripte also verstärkt ausgeprägt. Proteine der MAGE-Familie sind generell in die Regulation der Stressantwort involviert und binden E3 RING-Ubiquitin-Ligasen, wodurch sie deren Ligase Aktivität, die Substratspezifität und die Lokalisation regulieren (Florke Gee et al. 2020). Die Ergebnisse zeigen, dass nur MAGE Typ-1 Proteine in der Kohorte verändert sind, im Speziellen MAGE- A2, -A2B, -A3, -A6 und -A12. Im physiologischen Kontext sind MAGE-Typ1-Proteine für die Spermatogenese und Follikulogenese wichtig, aber es kommt häufig in aberranten Tumorzellen zu einer Re-Aktivierung dieser Proteine und zu einer Aktivierung onkogener Funktionen (Weon und Potts 2015). Die Expressionsregulation von MAGE-Proteinen ist in ihrer Komplexität noch nicht vollständig erforscht. Es wurde jedoch beschrieben, dass epigenetische Modifizierung und eine deregulierte proto-onkogene Tyrosinkinase (c-KIT) die Expression induzieren kann (Wischnewski et al. 2007, Yang et al. 2007). Zudem kann MAGE-A3 auch durch die Mikrobiota, genauer gesagt durch *H. pylori*, induziert werden. MAGE-A3 und -A6 binden die E3-Ligase TRIM28, welche auch als KAP1 oder Tif1b bekannt ist. Dadurch wird die AMP-aktivierte Protein Kinase (AMPK) ubiquitiniert und proteosomal abgebaut. Außerdem reguliert MAGE-A2 und A3 zusammen mit TRIM28, welches in dieser Studie ebenfalls invers mit TLR3 korreliert, die Krüppel-assoziierte Box (KRAB) Domäne Zink Finger Protein (KRABZFP) Transkriptionsfaktoren sowie p53. Dies führt zum Abbau des Tumorsuppressors p53 (Cheng et al. 2014). Neben der Funktion als Ligase ist TRIM28 wichtig für das Abschalten endogener Retroviren (Friedman et al. 1996, Cheng et al. 2014), welche als Liganden für TLR3 dienen könnten (Krenz et al. 2021). Zusätzlich könne TRIM28 und MAGE Proteine Transkriptionsfaktoren ohne KRAB-Domäne, wie c-Myc und E2F1, regulieren, Histone modifizieren und als Gerüstprotein dienen (Florke Gee et al. 2020).

Interessanterweise scheinen MAGE-Proteine auch einen Effekt auf die Tumorthherapie zu haben. Sie werden mit schlechterem Ansprechen auf CTLA-basierte *Checkpoint* Inhibition, Resistenzentwicklung gegen EGFR-Tyrosin Kinase Inhibitoren und

Chemotherapie in Verbindung gebracht (Florke Gee et al. 2020). Tumorzellen sind teils abhängig von MAGE-Expression, da eine Deletion zu einem verminderten Zellüberleben führt (Gao et al. 2020). Aus diesem Grund wurde bereits in Studien versucht, MAGE direkt als Ziel für die Therapie einzusetzen (Vansteenkiste et al. 2016). Allerdings scheiterten die klinischen Studien in Phase III aufgrund fehlender Wirksamkeit, was möglicherweise an einer nicht ausreichenden Aktivierung der T-Zell-Antwort liegt (Vansteenkiste et al. 2016, Daud 2018). Nichtsdestotrotz stellen MAGE und die E3 Ligase TRIM28 ein interessantes Ziel für mögliche Therapieansätze besonders im Zusammenhang mit TLR3 Defizienz dar. Bislang wurde kein direkter Zusammenhang von TLR3 und MAGE Family Proteinen gezeigt. In der Behandlung von Brustkrebs und dem Multiplen-Myelom wurde jedoch Poly(I:C) mit MAGE Peptiden zur Immunaktivierung angewendet, um eine CD8⁺ Immunantwort verstärkt zu induzieren (Rapoport et al. 2014, Dillon et al. 2017, Patel et al. 2021). Das oben erwähnte Protein TRIM28, welches zusammen mit MAGE-A2 und A3 den Abbau von p53 veranlasst, wurde im Zusammenhang mit TLR3 bereits beschrieben. TRIM28 kann über Poly(I:C) Stimulation TLR3 abhängig Zelltod in Melanom-Zellen einleiten (Dold et al. 2022).

Positiv korreliert mit hoher TLR3 Ausprägung im Patientengewebe ist zudem ein Protein, welches Kelch und BTB Domänen besitzt. Das *Kelch Repeat And BTB Domain Containing 12* (KBTBD12) bindet die E3 Ligase Cullin3, die das Signaladapterprotein TRIF über USP19 ubiquitiniert, was zu einem Abbau von TRIF und einer Unterbrechung des Signals führt (Wu et al. 2019). Möglicherweise gibt es ein negatives Feedback, wodurch gesteigerte Ausprägung und Aktivierung von TLR3 zu einer stärkeren Expression von KBTBD12 führt, um den Signalweg zu inhibieren. Weitere Forschung ist jedoch notwendig, um die genaue Rolle von KBTBD12 in der TLR3-abhängigen Tumorsuppression besser zu verstehen.

Zudem sollten die hier auf RNA-Ebene identifizierten Faktoren, die möglicherweise durch TLR3 positiv und negativ reguliert werden, auf Proteinebene unabhängig überprüft werden und ihre vermutete funktionelle Rolle im TLR3 Kontext experimentell getestet werden. Zusammengefasst deuten die Sequenzierungsanalysen auf verstärkte EMT und Invasion, sowie erhöhte Proliferation und reduzierte Immunaktivierung in Tumoren mit niedriger TLR3 Expression hin. Aus diesem Grund konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf die Analyse dieser spezifischen molekularen Mechanismen.

4.1.2.1 TLR3 hemmt die Invasivität von Tumorzellen

Die pro- oder anti-metastatischen Effekte von TLR3 werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits ist TLR3 in Zellen des Darmepithels (IEC) mit metastatischem Potential hochreguliert und eine Poly(I:C) Stimulation scheint in diesen Zellen die Invasivität zu steigern (Bugge et al. 2017). Auf der anderen Seite verhindert das murine Tlr3 die Metastasierung von B16F10 Melanom-Zellen im Mausmodell nach intravenöser Inokulation (Guillerey et al. 2015). TLR3 ist zudem in an CRC erkrankten Personen negativ mit Lymphknoten Metastasierung korreliert (Yoshida et al. 2020). Es stellt sich die Frage,

welche tumorzell-autonomen Effekte TLR3 bei Darmkrebs aufweist. Man kann die Hypothese aufstellen, dass bereits die Anwesenheit von TLR3 selbst, ohne spezifische Stimulation durch einen Liganden, einen Einfluss auf die Migration oder Invasivität hat. In Analogie zur Funktionsweise der anderen Toll-like Rezeptoren ist es jedoch eher wahrscheinlich, dass die Aktivierung von TLR3 durch dsRNA-Liganden und die nachfolgende Signalübertragung und Aktivierung von Zielgenen einen Einfluss auf die Invasivität und Migration zeigen.

Zur Analyse der tumorzell-autonomen Effekte wurden CRISPR-Cas9 induzierte TLR3 defiziente CRC-Zelllinien erstellt. Besonders bemerkenswert ist der Unterschied im Migrations- und Invasionsphänotyp der Zelllinien. Dies wurde unabhängig in zwei Zelllinien beobachtet, sowohl die Linie DLD1 als auch HCT116 Zellen zeigen bei der Einzelzellmigration durch Membranporen weniger Motilität nach TLR3 Verlust. In der kollektiven 2D-Zellmigration sieht man nur bei DLD1 Zellen einen Unterschied. Dieser Befund ist vermutlich auf Zelltyp-spezifische Effekten zurückzuführen. Weiterhin könnte dies erklären, warum TLR3 in der Literatur sowohl als fördernd als auch als hemmend für die Migration beschrieben wird. Neben dem gewählten *in vitro* Assay (Wanderung auf Plastikoberfläche oder durch Membranporen) spielt möglicherweise der Zelltyp, in welchem TLR3 betrachtet wird, eine große Rolle, da ein und dasselbe Protein in verschiedenen Zellen unterschiedliche Reaktionen hervorrufen kann. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass SLIT2, ein durch TLR3 induzierbares Protein in Endothelzellen, die Migration von Tumorzellen fördert, wohingegen SLIT2 in Tumorzellen selbst die Migration hemmt (Tavora et al. 2020). Die publizierten Daten zeigen einen Effekt von Poly(I:C) auf die kollektive Zellmigration, auch wenn dieser in der eigenen Studie an CRC-Zelllinien nicht das statistische Signifikanzniveau erreichte. Dieser Effekt von Poly(I:C) Stimulation wurde bereits häufig gezeigt (Bugge et al. 2017, Tavora et al. 2020, Yu et al. 2020, Eskandari et al. 2023). Der Grund hierfür könnte sein, dass sich einige Studien auf andere Zelltypen, wie mesenchymale Stammzellen (Eskandari et al. 2023) Makrophagen (Yu et al. 2020) oder zirkulierende Tumorzellen von metastasierendem Brustkrebs (Tavora et al. 2020) fokussieren. Zellen unterschiedlichen Ursprungs könnten mehr oder weniger stark auf die Stimulation durch Poly(I:C) reagieren. Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass die Heterogenität zwischen verschiedenen Zelllinien sich sehr stark auf die Poly(I:C) Induzierbarkeit auswirkt. Jedoch unterschieden sich nicht nur unterschiedliche Tumorentitäten in ihrer Migrationsfähigkeit nach TLR3 Stimulation. Selbst in CRC-Zelllinien, welche aus demselben Patienten gewonnen wurden, SW480 und SW620, sind Unterschiede in der Induzierbarkeit der Invasion nach Poly(I:C) Stimulation *in vitro* festzustellen (Bugge et al. 2017).

Im Gegensatz dazu wurde in dieser Studie beobachtet, dass TLR3 die Invasion, also das Eindringen in extrazelluläre Matrix, deutlich stärker beeinflusst als die Migration. Die Invasion durch die Basalmembran und das umliegende Bindegewebe ist im klinischen Kontext vermutlich wichtiger als die möglicherweise etwas artifizielle kollektive Migration auf einer 2D Oberfläche. So wurde etwa eine deutlich stärkere Invasivität der TLR3 defizienten HCT116 Zelllinien *in vitro* und vor allem auch im *in vivo* Kontext des Chorion

Allantois Membran (CAM) Assays beobachtet. Da TLR3 defiziente CRC-Zellen ein aggressiveres Invasionsmuster *in vivo* zeigen, kann man annehmen, dass TLR3 deutlich stärkere Auswirkungen auf die Invasivität als auf die Migration ausübt. Diese Befunde werden unterstützt durch die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung, welche eine stärkere Aktivität von EMT Signalwegen bei Verlust von TLR3 beschreiben. Des Weiteren wird die Hypothese, wonach TLR3 die Tumorzell-Invasion hemmt, durch Daten der an CRC erkrankten Personen mit geringer TLR3 Ausprägung gestützt, da bei geringer TLR3 Ausprägung mehr Lymphknoten mit Tumorzellinfiltrat beobachtet werden und es demnach zu einem höheren pN-Status kommt. Die inverse Korrelation von Lymphknotenmetastasen und TLR3 wurde auch unabhängig durch eine andere Arbeitsgruppe an einem Kollektiv von n=264 an kolorektalem Karzinom erkrankten Personen beschrieben (Yoshida et al. 2020). Auf Proteinebene zeigt sich zwar, dass die für die Zelladhäsion und Zellmigration wichtige Kinase FAK bei TLR3 Defizienz nicht mehr induzierbar ist, allerdings sieht man auch eine erhöhte Grundexpression von FAK und erhöhte Phosphorylierung von FAK am Tyrosinrest (Y379). Wenn man diese Befunde zusammen mit Veränderungen in Integrinen, die in den RNA-Sequenzierungsdaten festgestellt wurden betrachtet, so erscheint es wahrscheinlich, dass eine Veränderung der Integrin aktivierten FAK-SRC Signalwege auf molekularer Ebene an der veränderten Invasivität beteiligt ist. Zudem ist es wahrscheinlich, dass die extrazelluläre Matrix (ECM), welche den Tumor umgibt, ihrerseits durch ihre Zusammensetzung starke Auswirkungen auf die Invasionsfähigkeit hat und aufgrund dessen verschiedene Effekte in unterschiedlichen Krebserkrankungen festgestellt wurden. In den RNA-Sequenzierungsergebnissen sieht man zudem Veränderungen in Matrix-Metallo-Proteasen (Tabelle 6.2 im Anhang). Proteasen spielen eine wichtige Rolle für Migration und Invasion, da sie ECM abbauen und dadurch Zell-Matrix Interaktionen abgebaut werden, was einen mesenchymalen Phänotyp begünstigt (Hanahan und Weinberg 2011). Des weiteren sind Proteasen wichtig für die Neo-Angiogenese, also die Bildung neuer Blutgefäße, da sie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Liganden freisetzen und die Bioverfügbarkeit von Wachstumsfaktoren erhöhen (Hanahan und Weinberg 2011).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine duale und gegensätzliche Rolle von TLR3 bei zellulärer Migration und Invasion, welche in Übereinstimmung mit der Heterogenität der Literatur steht. *In vivo* scheint die gesteigerte Invasivität der TLR3 defizienten Tumorzellen andere Effekte wie die verringerte Einzelzellmigration, die *in vitro* beobachtet wurde, zu überwiegen, was im Einklang mit klinischen Daten zur Invasion von Lymphknoten steht. Möglicherweise sind die TLR3-vermittelten Effekte von Integrin-FAK-Src Signalwegen abhängig, jedoch ist hier weitere Forschung notwendig, um die molekularen Mechanismen und Wechselwirkungen genauer zu entschlüsseln. Im Besonderen sollten die tumorzellspezifischen Effekte in Abhängigkeit von dem jeweiligen Gewebe, welches den Tumor umgibt, untersucht werden. Da man in den RNA-Sequenzierungsprofilen eine Veränderung von Proteasen sieht, sollte eine weitere Untersuchung dieser Proteine stattfinden.

4.1.2.2 Überleben und Proliferation in Abhängigkeit von TLR3

TLRs können die Proliferation von Krebszellen fördern (Javaid und Choi 2020). So wurde zum Beispiel beschrieben, dass die Aktivierung von TLR4 zu einer gesteigerten Proliferation in normalen Ösophagus-Epithelzelllinien und Ösophagus-Adenokarzinom-Krebszelllinien führt (Kohtz et al. 2019). Aufgrund der gesteigerten Aktivierung von proliferationsassoziierten Signalwegen in Tumorproben mit hoher TLR3 Ausprägung, wird hier die Hypothese aufgestellt, dass TLR3 in Tumorzellen die Proliferation fördert. In dieser Studie zeigt jedoch TLR3 nur geringen Einfluss auf die Tumorgroße im CAM-Versuch und die Proliferation *in vitro* im XTT Assay. Sowohl die TLR3 defizienten Tumore im CAM-Assay als auch Läsionen der TLR3^{STOP} Mäuse sind etwas kleiner als die TLR3-profizienten Läsionen, auch wenn der Effekt nicht über einen Trend hinaus geht. Genetische Varianten von TLR3 wurden bereits mit gesteigerter mitotischer Aktivität korreliert (Ostojic et al. 2022). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass sich das klonogene Überleben der DLD1 und HCT116 Zelllinien in Abhängigkeit von TLR3 nicht drastisch unterscheidet, da der Verlust des Proteins nicht zu einer signifikanten Veränderung im Überleben führt. Durch die Analyse des klonogenen Überlebens kann allerdings nicht zwischen Effekten auf Proliferation und Zelltod unterschieden werden, was angesichts der beschriebenen Zusammenhänge zwischen TLR3 und Apoptose von Interesse wäre. Deutlich ist, dass bei HCT116 Zellen unter sehr hohen Poly(I:C) Konzentrationen weniger Klone sichtbar sind. Hier muss in Frage gestellt werden, ob eine Liganden-Konzentration von 250 µg/ml im biologischen System noch physiologisch ist, da zum Beispiel Makrophagen bei deutlich geringeren Konzentrationen bereits sterben (Hidalgo-Sastre und Kuebelsbeck et al. 2021). DLD1 Zelllinien zeigen trotz oder gerade wegen ihrer starken konstitutiven TLR3 Ausprägung keine Induktion des Zelltodes durch Poly(I:C). Unterschiedliche Grade an Resistenz gegen Poly(I:C) Stimulation wurde auch schon in Prostata-Krebszelllinien gezeigt (Harashima et al. 2012). Diese Studie ergab, dass LNCaP Zellen in ihrer Proliferation von PI3K/Akt Signalübertragung abhängig sind. Außerdem wurde bei Poly(I:C) initiiert Apoptose in LNCaP Zellen die Spaltung der Caspasen 3, 8 und 9 induziert. Im Gegensatz dazu sterben HCC Zelllinien nicht nach externer Stimulation mit Poly(I:C) ab (Yoneda et al. 2008). In der Studie von Yoneda und Kollegen gibt es Effekte auf das Überleben erst durch Transfektion mit dem dsRNA Analogon. Bei dieser Studie wurde allerdings nicht auf Aktivierung durch cytosolische Rezeptoren kontrolliert. Demnach könnte der beschriebene Effekt durch die Aktivierung von cytosolischen PRR wie beispielsweise RIG-I, welcher ebenfalls dsRNA erkennt, zustande kommen. In Studien von Haddaoui und Kollegen führte eine Aktivierung von TLR3 über das als Therapeutikum zugelassene dsRNA Analogon Ritantolimod (Ampligen) in dukta len pankreatischen Adenokarzinom (PDAC) Zelllinien zu einer Reduktion der Proliferation (Haddaoui et al. 2023).

Ein möglicher direkter Einfluss auf die Proliferation der CRC-Zelllinien hängt zumindest nicht von ERK1/2 und dessen Aktivierung ab, da weder Stimulation mit Poly(I:C) noch

TLR3 Defizienz einen Effekt auf die Expression oder Phosphorylierung der Kinasen haben, wie die Befunde dieser Arbeit zeigen. Ferner wurde unlängst detailliert beschrieben, dass Poly(I:C) über TLR3 Aktivierung zu cleaved-Caspase 8 induzierter Apoptose in Makrophagen führt (Hidalgo-Sastre und Kuebelsbeck et al. 2021). Auch in CRC-Zelllinien, die sensitiv für Poly(I:C) induzierten Zelltod sind, wurde gezeigt, dass TLR3 eine tragende Rolle in der Apoptoseinduktion spielt (Matijevic und Pavelic 2011). Allerdings führten in der genannten Studie schon geringe Konzentrationen von Poly(I:C) zu drastischem Absterben der Immunzellen im Gegensatz zu Ergebnissen dieser Studie. Proteinanalysen der gespaltenen Form der Caspase3 konnten jedoch keine Aktivierung der Apoptose in DLD1 Zelllinien zeigen (Daten nicht gezeigt). Es ist denkbar, dass Krebszellen einen höheren Grad an Resistenz gegen die Zelltod-Induktion durch dsRNA Analoga haben, da sie intrinsische Mechanismen entwickelt haben, um Apoptose und Seneszenz entgegenzuwirken. Möglicherweise sind sowohl die XTT-Proliferationsassays, als auch klonogene Überlebensexperimente und die Analyse der Tumorgroße *in vivo* nicht sensitiv genug, um die Unterschiede definitiv zu bestätigen. Signalwegsveränderungen der Apoptose wurden weder in den humanen RNA-Sequenzierungsdaten noch in den Zelllinien als von TLR3 abhängig gefunden. Möglicherweise ist also die Apoptoseinduktion aufgrund von gesteigerter Resistenz gegen den Zelltod keiner der treibenden tumorsuppressiven Mechanismen von TLR3 bei Darmkrebs. Der krebszellautonome Effekt von TLR3 auf die Proliferation ist sichtbar, aber nicht signifikant. Möglicherweise stammen die in der RNA-Sequenzierung beobachteten Unterschiede der Proliferationssignalwege (MYC- und E2F Zielgene) von anderen im Tumor vertretenen Zellpopulationen, wie zum Beispiel Immunzellen oder Fibroblasten. So wurde auch beschrieben, dass tumorinfiltrierende CD8 positive T-Zellen *ex vivo* nach Poly(I:C) Stimulation mehr proliferierten und vermehrt Zytokine ausschütteten (Mohammad et al. 2024). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Präsenz oder Aktivierung von TLR3 sich nicht drastisch auf die Tumorgroße oder das Überleben von Tumorzellen auswirkt.

4.1.2.3 TLR3 beeinflusst Chemokin-Expression und Infiltration differenzieller Immunzell-Populationen

Da TLR3 ein Rezeptor des innate Immunsystems ist und zu Entzündungsreaktionen und zur Aktivierung der adaptiven Immunreaktion führt, beispielsweise im Kontext von Viruserkrankungen, ist naheliegend, dass das Vorhandensein von TLR3 in Krebszellen sich auf die Immunzellaktivierung auswirkt. In den Transkriptom-Daten der Tumorproben zeigt sich je nach hoher oder niedriger Ausprägung von TLR3 eine transkriptionelle Veränderungen in der entzündlichen Reaktion im Tumor, was durch die Signalwegsanalyse („Entzündungsreaktion“) angezeigt wurde. Außerdem ist bei Vorhandensein von TLR3 der annotierte Signalweg „Allograft-Abstoßung“ verstärkt

aktiviert. Hier handelt es sich natürlich nicht im wörtlichen Sinne um eine Abstoßungsreaktion eines Transplantats, sondern um die bei einer Abstoßungsreaktion beteiligten adaptiven Immunprozesse. So könnte hier der Körper auf Tumorzellen ausgeprägte und präsentierte Epitope als „fremd“ erkennen und aufgrund dessen eine antitumorale Immunreaktion des T_{H1}-Typs auslösen. Im Besonderen beinhalten diese immungestützten Signalwege Gene der T-Zellaktivierung, Antigen Präsentation und Chemokin-Sekretion. Eine chronische Entzündungsreaktion ist typisch für das Tumorgewebe (Dvorak 1986, Hanahan und Weinberg 2011). Im Tumorkontext kommt es durch Zellnekrosen zu einer Freisetzung von „DAMPs“, darunter auch RNA, die Anteile an dsRNA enthält und somit als TLR3 Ligand umliegender Zellen fungieren kann, was zu einer „sterilen“ Entzündung führt (Gong et al. 2020). Daneben ist bei Darmkrebs aufgrund von Barrieredefekten auch ein Einwandern von Mikrobiota oder Metaboliten aus dem Darmlumen und eine Stimulation des Wirts-Immunsystems durch mikrobielle Gefahrensignale vorstellbar und teils auch gut dokumentiert (Grivennikov et al. 2012, Cremonesi et al. 2018). Die Entzündung hat eine duale Rolle, da sie einerseits zur Beseitigung von aberranten Zellen führt, andererseits aber auch die Mutationen im Tumor befördert, sodass es zu einem „immune escape“ kommt (Dunn et al. 2002). Aus diesem Grund wird hier die Hypothese aufgestellt, dass TLR3 eine tumorsuppressive Funktion über die Aktivierung des Immunsystems und Orchestrierung von vorteilhaften Immunzellen, wie etwa zytotoxischen Effektor-T-Zellen ausübt. Besonders wichtig ist es hierbei, funktionelle Lymphozyten-Populationen zu betrachten, da nicht alle Immunzellen zu einem besseren Verlauf beitragen. So können etwa verschiedene Untergruppen von T-Helfer-Zellen unterschiedliche Effekte auf die Tumorprogression und auf die Prognose der Patienten haben. T_{H1}-Helfer-Zellen, M1 Makrophagen, Natürliche-Killer-Zellen, CD8⁺ Effektorzellen (CTLs) und Zytokine wie CXCL9 und CXCL10, welche zum Einstrom von T-Lymphozyten führen, werden mit einer klinisch besseren Prognose korreliert (Galon et al. 2006, Pagès et al. 2010, Algars et al. 2012, Kistner et al. 2017, Malka et al. 2020). Dahingegen haben intratumoral gehäuft auftretende M2 Makrophagen, T_{H17} Helferzellen, B Zellen und MDSC (myeloid derived suppressor cells) eine schlechte klinische Prognose zur Folge (Roelands et al. 2017). Regulatorische T-Zellen, sogenannte T_{Regs}, haben eine immunsuppressive Wirkung, zum Beispiel indem sie Effektor-Funktionen von zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen inhibieren (Mougiakakos et al. 2010) und Angiogenese modulieren (Lužnik et al. 2020). In vielen Krebsentitäten wurden sie mit schlechtem Überleben korreliert (Mougiakakos et al. 2010). Es wurde beschrieben, dass eine erhöhte Präsenz von zytotoxischen Immunzellen, wie zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) und Natürlichen Killerzellen (NK), innerhalb des Tumormilieus bei Patienten mit Kolon- und Eierstockkrebs mit einer verbesserten Überlebensprognose assoziiert ist. (Nelson 2008, Pagès et al. 2010). Allerdings kann es auch zu einer „kalten“ Tumormikroumgebung kommen, was bedeutet, dass entweder nur wenige T-Zellen im Tumorgewebe vorhanden sind und kein entzündliches Milieu vorherrscht (Duan et al. 2020), oder aber die T-Zellen „erschöpft“ (exhausted) sind (Brunell et al. 2023, Gebhardt et al. 2023), was mit verringerter Effektor-Funktion oder eher immunsuppressiven Milieu

einhergeht, weswegen es zu einer insgesamt geringen Immunreaktion im Tumor kommt. T_{Reg}-Zellen sind bekannt für immunsuppressive Milieus, u.a. durch Sekretion von IL10, TGFβ und die Inhibierung der zytotoxischen Effektorfunktionen von CD8⁺ CTLs (Facciabene et al. 2012, Tauriello et al. 2018). Interessanterweise zeigt die RNA-Sequenzierungsanalyse der Zelllinie DLD1 eine verstärkte Aktivierung inflammatorischer Signalwege. Zellen mit TLR3 Defizienz weisen eine geringere Aktivierung von Zielgenen auf, die für die Erkennung von körperfremden Strukturen (Allograft rejection) im unstimulierten Zustand verantwortlich sind. Wie erwartet, zeigen dsRNA stimulierte DLD1 Zellen transkriptionelle Anzeichen einer vermehrten Immunaktivierung, was jedoch nicht experimentell (etwa durch Ko-Kultur mit T-Lymphozyten) weiter bestätigt wurde. Bemerkenswert ist jedoch, dass Krebszellen allein durch TLR3 Stimulation zur Chemokin Produktion angeregt werden und somit direkt ihre Mikroumgebung beeinflussen. So werden Chemokine wie IL8, aber auch CXCL9, CXCL10 und CXCL11 produziert, die von CXCR3-positiven CTLs und T_{H1}-Zellen erkannt werden. Hervorzuheben ist, dass die Chemokine in Abhängigkeit von TLR3 und nicht von cytosolischen dsRNA Rezeptoren exprimiert werden, wie Kontrollversuche in dieser Arbeit eindeutig belegen, die zwischen einer Stimulation endosomaler und cytosolischer dsRNA-Signalwege differenzieren. Zahlreiche Studien beschreiben, dass cytosolische Rezeptoren, wie RIG-I und MDA5, RNA erkennen können und als Reaktion die Produktion bestimmter Chemokine induzieren (Poeck et al. 2010, Ablasser und Hur 2020). Diese Zytokine sind prognostisch wichtig bei Darmkrebs und sorgen für den Einstrom von T-Zellen und NK-Zellen (Doll et al. 2010, Kistner et al. 2017). Somit kann eine TLR3 Stimulation zur tumorzell-abhängigen Produktion von bestimmten Zytokinen führen, die wiederum zur Rekrutierung verschiedener anti-tumoral aktiver Immunzelltypen führt und somit die Immunreaktion in Abhängigkeit von TLR3 orchestriert.

Betrachtet man die Zytokin-Expression in den Darmläsionen der global defizienten Tlr3^{STOP} Mäuse, sieht man, dass Produktion des proinflammatorischen IL6 in den Tumoren erhöht ist, wohingegen Cxcl10 und daneben auch der T-Zell-Marker Cd3ε geringer ausgeprägt sind im Vergleich zu parentalen Apc^{1638N} Mäusen. Dies weist auf eine pro-Inflammatorische Reaktion über IL6 hin, jedoch werden weniger T-Zell Attraktanten produziert, was sich auch auf RNA-Ebene in verringerter Ausprägung von T-Zell Markern niederschlägt. Generell kann man jedoch aufgrund der mRNA-Analyse davon ausgehen, dass sich weniger T-Zellen im Tumor befinden. Dies müsste jedoch noch histologisch nachgewiesen und quantifiziert werden, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Interessanterweise sind die Transkriptionsfaktoren RorγT und FoxP3 signifikant in Tumoren von TLR3^{STOP} Mäusen hochreguliert. Diese Marker sind typisch für Zellen der T_{H17} und der regulatorischen T-Zellen. Dagegen sind Marker für andere wichtige T-Zellpopulationen wie Tbet (T_{H1}), Gata3 (T_{H2}) und Granzym B (CTL) unverändert. Auch hier steht eine Bestätigung der qPCR-basierten Befunde durch immunhistochemische oder durchflusszytometrische Analysen noch aus.

In der humanen CRC-Kohorte ist nur das Zytokin IL8 signifikant intratumoral in Abhängigkeit der TLR3 Ausprägung verändert. Vergleichbare Gen-Homologe in der Maus

sind die Chemokine Cxcl2 und Cxcl5, welche eine ähnliche Funktion aufweisen, jedoch nicht signifikant verändert sind (Anhang **Abbildung 6.7**). Möglicherweise deutet dies auf eine verstärkte Infiltration von Natürlichen Killerzellen bei humanen Tumoren hin, die im Mausmodell nicht rekapituliert wird. Außerdem ist bei CRC-Patienten die Expression von TLR3 positiv korreliert mit der intratumoralen Ausprägung von sowohl CD3ε, als auch TBET, RORC, GATA3 und Arginase 1(ARG1) auf RNA Ebene. Es ist zu erwähnen, dass im murinen Model die Ausprägung von RORC im Gegensatz zum Menschen negativ mit Tlr3 korreliert. Die Marker CD3ε, TBET, RORC und GATA3 wurden zuvor bereits als T-Zell und T-Zellsubpopulationsmarker beschrieben. Das Enzym ARG1 katalysiert den Abbau von L-Arginin zu Urea und L-Ornithin, welches weiter zu Polyaminen metabolisiert wird (Grzywa et al. 2020, Niu et al. 2022). ARG1 Expression wurde in der Literatur mit der Differenzierung von Tumor assoziierten Makrophagen (TAM)s in der M2 Subklassen assoziiert, welche zu einem immunsuppressiven, Tumor-fördernden Mikroumgebung beitragen (Grzywa et al. 2020). Zusammen mit den Ergebnissen der Chipzytometrie (Zellkraftwerk), kann man somit annehmen, dass es generell eine geringere Immunzell-Dichte in Tumoren mit geringer TLR3 Ausprägung gibt. Daher sind womöglich alle Immunzellsubsets herabreguliert und es kommt bei genomischem Verlust von TLR3 zu einem „kalten“ Tumorphänotyp. Somit kann die Arbeitshypothese aufgestellt werden, dass eine der tumorsuppressiven Hauptfunktionen von TLR3 in der Aufrechterhaltung einer effektiven anti-tumoralen Immunantwort des adaptiven Immunsystems besteht.

Man darf jedoch nicht außer Acht lassen, dass Tumore mit hoher *TLR3* Ausprägung möglicherweise eine hohe Anzahl von infiltrierenden Immunzellen mit starker TLR3 Expression aufweisen, wie beispielsweise dendritische Zellen. Die Anzahl dendritischer Zellen ist im Vergleich zu Epithelzellen jedoch sehr gering und kann daher in diesem Kontext vernachlässigt werden. Eine genauere Aufschlüsselung könnte zum Beispiel durch Einzelzell-Sequenzierung oder Ortsauflösende Massenspektrometrie geschehen, da die Qualität der Antikörper für diese Analyse nicht ausreichend ist. Zhang et al. konnten mit Einzelzell-Sequenzierungen eine detaillierte Aufgliederung der Immunzellpopulationen vornehmen und daraus funktionelle Unterschiede ableiten (Zhang et al. 2018). Diese Einzelzell-Analyse wäre besonders auch im Bezug auf TLR3 abhängige Immunzellaktivierung interessant, da so genau funktionale Subpopulationen bestimmt werden könnten.

Außerdem ist es im Mausmodell wichtig, weiterführende molekulare Analysen in dem Modell mit Re-Expression von Tlr3 in Darmepithelzellen und daraus hervorgegangenen Tumorzellen durchzuführen, da ein Verlust von TLR3 in Immunzellen, der in diesem „Switch-on“ Mausmodell noch besteht, auch einen Effekt auf die Immunzellinfiltration haben kann. So wurde gezeigt, dass TLR3 in Immunzellen zur Aktivierung von tumorsuppressiven M1 Makrophagen oder tumorassoziierten CD11b⁺ Ly6G⁺ Neutrophilen und folglich zur Tumorregression führt (Shime et al. 2012, Shime et al. 2017).

Trotz möglicher Spezies-Unterschiede in den tumorassoziierten Immunzellsubtypen, zeigt das Mausmodell doch sehr klare Effekte auf die T-Zellen und die Subtypen der

regulatorischen T-Zellen und der T_{H17}-Helfer-Zellen. Weitere Analysen sind notwendig, um den Krebszell-abhängigen Effekt auf die Rekrutierung von Immunzellen mechanistisch zu verifizieren. Zusammenfassend zeigt sich sowohl im Patienten als auch im Mausmodell eine geringere Infiltration von Immunzellen, spezifisch CD3ε positiven Zellen und eine Verschiebung der Immunzelluntergruppen bei Abwesenheit von TLR3. Somit stellt sich der Rezeptor TLR3 als wichtige Komponente bei der Ausbildung einer anti-tumoralen Immunreaktion bei Darmkrebs dar, was einen Teil seiner tumorsuppressiven Funktion *in vivo* erklärt.

4.1.3 Darm-Mikrobiota zeigen keine Veränderung in Abhängigkeit von TLR3

In den letzten Jahren wurde die vielschichtige Vernetzung des Darm-Mikrobioms mit dem Wirt beim Menschen intensiv untersucht (Hou, Wu, et al. 2022). Die Mikrobiota sind wechselseitig mit dem Wirt in Interaktion und spielen eine Rolle bei der Initiation und Progression von Darmkrebs (Coleman et al. 2018, Cremonesi et al. 2018, Iftekhar und Sigal 2018). In einer Studie zur Entstehung von Diabetes waren NOD-defiziente Mäuse bei Verlust von Trif gegen die Krankheit geschützt, solange sie nicht mit NOD-Mäusen mit Trif Ausprägung in einem Käfig gehalten wurden (sog. „Co-Housing“), was zur Übertragung und Angleichung des Mikrobioms führt (Gülden et al. 2018). Dies zeigt auch, wie wichtig es ist, die Haltung der Tiere bei Mikrobiomstudien zu kontrollieren. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie alle Gruppen jeweils in zwei verschiedenen Tierhaltungen (ZPF der TUM, sowie Charles River) in unterschiedlichen Haltungsformen untersucht, um mögliche Käfig-, Facility- oder Gruppeneffekte auszuschließen.

Eine mögliche Hypothese zur Funktion von TLR3 ist, dass der Verlust des Rezeptors zu veränderten Reaktionen des innate Immunsystems im Wirt führt und als Konsequenz sich das Darm-Mikrobiom taxonomisch verschiebt. So wurde bereits in einer Studie an Activating transcription factor 6 (Atf6) defizienten Mausmodellen gezeigt, dass der Verlust von Atf6 zu Veränderungen im Mikrobiomprofil führt (Coleman et al. 2018)).

Dies könnte sich auf die Zusammensetzung des Mikrobioms entweder in einzelnen bakteriellen Taxa oder in einer Verschiebung der generellen Zusammensetzung auswirken. Möglicherweise könnte eine solch veränderte Mikrobiota als Biomarker dienen. Eine weitere Hypothese, die parallel zur obigen Hypothese aufgestellt werden kann, wäre, dass eine Verschiebung in der Mikrobiota die Ausprägung und Stimulation von TLR3 beeinflusst. Kawashima und Kollegen haben bereits gezeigt, dass nicht nur Viren, sondern auch dsRNA von Laktobazillen TLR3 stimuliert (Kawashima et al. 2013, Kawashima et al. 2018). In diesem Szenario könnte man beispielsweise eine Anreicherung von dsRNA-produzierenden Bakterien, wie Laktobazillen-Stämmen, in Tumoren mit hoher TLR3 Expression erwarten, während ein Fehlen dieser Bakterien bei geringer TLR3 Expression vermutet wird. Diese zwei Hypothesen schließen sich wechselseitig nicht aus und eine gegenseitige Beeinflussung der Prozesse ist gut

vereinbar. Um zu testen, ob die TLR3 Ausprägung des Wirts einen primären Einfluss auf das Darm-Mikrobiom hat, wurde das global defiziente Tlr3^{Stop} Mausmodell herangezogen. Das Mausmodell mit globaler Tlr3 Defizienz ohne Apc-Mutation zeigt keine spontane Tumorgenese, sowie auch keine Veränderungen der α - oder β - Diversität der Mikrobiota. Übereinstimmende Befunde wurden mit Trif-Defizienten Mäusen erhalten. Es gibt demnach keine Verschiebung der bakteriellen Zusammensetzung in Abhängigkeit von Tlr3 oder Trif, somit wirkt sich das Vorhandensein von Tlr3 nicht auf die taxonomische Beschaffenheit der Mikrobiota aus. Möglicherweise ist ein Barrieredefekt im Epithel, der durch die Entstehung eines Tumors auftritt nötig, damit bakterielle dsRNA TLR3 in Zellen aktivieren und somit eine Immunreaktion und eventuelle pathologische Veränderungen hervorrufen können. Im Normalzustand verhindern physikalisch-chemische Barrieren, wie der Mukus oder Defensine die direkte Interaktion von Bakterien mit den Epithelzellen und somit auch, dass dsRNA an und in die Epithelzellen gelangen können. Zudem wird vermutet, dass TLR3 nur bei aberranten Tumorzellen an der Epitheloberfläche und bei normalen IEC ausschließlich in Endosomen lokalisiert ist (Leifer und Medvedev 2016). Eine neuere Studie belegt jedoch, dass TLR3 basolateral und auch in der Plasmamembran lokalisiert ist (Stanifer et al. 2020). Bestimmte Bakterien können auch Effekte durch dsRNA unterdrücken. So wurden zum Beispiel die durch Poly(I:C) Stimulation induzierten Schäden am Darmepithel durch hitzeinaktivierten *Streptococcus thermophilus*; ein Bakterium aus der Ordnung der Laktobazillen, reduziert (Lee et al. 2023). Die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL6, konnte dadurch reduziert werden. Die Produktion von INF γ hingegen wurde durch *S. thermophilus* erhöht (Lee et al. 2023). In dieser Studie konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass cytosolische dsRNA Rezeptoren für die Wirkung verantwortlich sind. Gegen einen Einfluss der TLR3 Ausprägung in Darmtumoren auf die Anwesenheit intratumoraler Bakterien spricht allerdings auch, dass bakterielle Sequenzen aus Sequenzierungsdaten von kolorektalen Karzinomen im TCGA Datensatz, die von einem Kooperationspartner analysiert wurden, keine differentielle Regulation oder Anreicherung bestimmter Taxa je nach TLR3 Status aufwiesen (Anhang **Abbildung 6.10**). Für diese Analyse wurde ein Datensatz humaner CRC-Proben im öffentlich zugänglichen TCGA Datensatz, welcher nach *TLR3* bzw. *TICAM1* Ausprägung stratifiziert wurde, verwendet. Obwohl beschrieben wurde, dass Laktobazillen vermehrt dsRNA produzieren (Kawashima et al. 2013, Kawashima et al. 2018), ist es möglich, dass Viren bzw. Bakteriophagen von Änderungen in der TLR3 Abhängigen Immunaktivierung betroffen sind. Eine Analyse des Viroms könnte möglicherweise mehr Aufschluss darüber geben. In einem Übersichtsartikel wurde beschrieben, dass das Virom einen drastischen Einfluss auf die Wirtsgesundheit hat (Tiamani et al. 2022). Momentan sind Viromanalysen komplexer und aufgrund von fehlenden konservierten Sequenzen, wie der 16S-rRNA-Sequenz, weniger standardisiert. Allerdings wird intensiv daran geforscht, um diese Methoden ebenfalls zu standardisieren (Khan Mirzaei et al. 2021, Smith et al. 2022). Als wahrscheinlichste Aktivatoren von TLR3 können zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings nicht bakterielle, sondern endogene dsRNA-Sequenzen gelten, die von

nekrotischen Wirtszellen im Tumor freigesetzt werden (Krenz et al. 2021). Von besonderem Interesse wäre hier auch eine Analyse endogener Retroviraler Elementen, da gezeigt wurde, dass diese sehr stark zur Stimulation von TLR3 in PDAC beitragen (Krenz et al. 2021). Unabhängig davon wurde gezeigt, dass endogene dsRNA stark zur Stimulation von TLR3 beitragen kann, was sich auf die Metastasierung auswirkt (Tavora et al. 2020).

Bezüglich der Hypothese, dass Veränderungen der Mikrobiota der transkriptionellen Regulation von TLR3 vorangehen, haben Expressionsanalysen in Mäusen, welche drei Tage mit Breitbandantibiotika behandelt wurden, keine Veränderung der Tlr3 RNA Expression im Darmgewebe gezeigt (Anhang **Abbildung 6.8**). Im Gegensatz dazu steht eine Studie, die höhere Tlr3 RNA-Level in Kolon und niedrigere Level im Ileum von antibiotikabehandelten Mäusen zeigt. Jedoch handelt es sich hier um einen längeren Behandlungszeitraum von sieben Tagen und eine Verwendung anderer Antibiotika (Grasa et al. 2015). Möglicherweise ist die Antibiotikabehandlung in dieser Studie zu kurz, um sich auf die Tlr3 RNA Expression auszuwirken, obwohl in dieser Studie gezeigt wurde, dass ein massives Verschieben der taxonomischen Klassen induziert wird. In Hühnern wurde bei oraler Administration von verschiedenen Konzentrationen des Bakteriums *Bacillus subtilis* eine erhöhte Ausprägung von Tlr3 in Leber, Milz und dem Dünndarm beobachtet (Khan et al. 2023). In keimfreien Mäusen ist die Tlr3 Ausprägung Dün- und Dickdarm reduziert (Huhta et al. 2016). In keimfreien Mäusen scheint Tlr3 weniger ausgeprägt zu sein, was auf einen Effekt der Mikrobiota hindeutet, allerdings muss man auch berücksichtigen, dass keimfreie Mäuse generell ein weniger ausgeprägtes und gereiftes Immunsystem besitzen (Basic und Bleich 2018).

Ticam1 ist im Jejunum von keimfreien Mäusen im Vergleich zu konventionell gehaltenen Tieren hochreguliert und im normalen Kolon und in Läsionen nicht signifikant verändert. Demnach sind Ticam1 und Tlr3 in keimfreien Mäusen nicht auf die gleiche Art und Weise transkriptionell reguliert.

4.2 Mikrobiom und Leberregeneration nach chirurgischer Tumorentfernung: Lipidsynthese im Fokus

Die Überlebenswahrscheinlichkeit in Folge einer Krebserkrankung ist stark von den Therapiemöglichkeiten abhängig. Eine gängige chirurgische Methode zur Entfernung von Lebermetastasen ist die partielle Hepatektomie (PHx) (Keck et al. 2022). Dabei können bis zu zwei Drittel der Leber reseziert werden, um erkranktes Gewebe zu entfernen. Der verbleibende gesunde Teil (future liver remnant: FLR) der Leber muss schnellstmöglich seine volle Funktionalität wiedererlangen, um das Überleben der erkrankten Personen zu gewährleisten (Yagi et al. 2020, Dixon et al. 2021).

Trotz der erstaunlichen Regenerationskapazität der Leber kann eine Resektion von sehr vielen oder sehr großen Tumoren zu einem unzureichenden FLR führen. Verbunden mit geringer Regeneration führt dies zu Leberversagen und Tod (Yagi et al. 2020). Demnach

muss die verbleibende Leber groß genug sein, um wichtige Stoffwechselprozesse ausführen zu können und gleichzeitig das Lebervolumen zu regenerieren. Daher besteht aus klinischer Sicht großes Interesse an Verfahren, die die Leberregeneration erleichtern oder beschleunigen, um so den Anwendungsbereich der partiellen Leberresektion erweitern zu können, was das Überleben drastisch verbessern könnte (Holecek 1999). Wie in der vorliegenden Arbeit bereits dargestellt, spielt die Rolle des Mikrobioms im Feld der Forschung zum kolorektalen Karzinom eine zentrale Rolle (Tilg et al. 2018). Die Darm-Mikrobiota beeinflusst natürlich auch die Leber auf verschiedenste Weise (Zheng und Wang 2021), was schon aufgrund der engen anatomischen Verbindung zwischen Leber und Dickdarm, welche die Pfortader darstellt, naheliegend erscheint. Der Zusammenhang der Leberregeneration mit dem Lipidmetabolismus, einer zentralen biochemischen Aufgabe der Hepatozyten zum einen, sowie die Abhängigkeit beider Prozesse von der Darm-Mikrobiota ist jedoch nur unzureichend erforscht. In dieser Studie werden die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen untersucht, in Folge derer eine Dysbiose im Zusammenhang mit gestörtem Lipidstoffwechsel zu schwächerer oder gar ausbleibender Leberregeneration führt.

4.2.1 Antibiotika-induzierte Veränderung des Darm-Mikrobioms führt zur geringerer Leberregeneration und Proliferation von Hepatozyten

Wie bereits beschrieben, erscheint es durchaus naheliegend, dass die Darm-Mikrobiota eine Rolle bei der Leberregeneration spielt. Bereits 1990 wurde festgestellt, dass es bei keimfreien Mäusen zu einer Verzögerung der Leberregeneration kommt (Cornell et al. 1990). In den folgenden Jahren wurde mehrfach untersucht, welchen Einfluss Antibiotika auf die Leberregeneration nach PHx haben. Erst durch die Fortschritte in der DNA-Sequenzierung ist es in den letzten Jahren möglich geworden, eine genauere Analyse des Mikrobioms, auch nicht-kultivierbarer Taxa, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Prozedur durchzuführen (Camarinha-Silva und Fricke 2018). Aus diesem Grund kann nun die genaue Zusammensetzung der Mikrobiota und somit die molekularen Mechanismen genauer untersucht werden.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist es unklar, wie sich das Mikrobiom, welches meist an vorklinischen Modellen untersucht wird, nach PHx verhält. Einerseits wurde eine komplette Änderung der bakteriellen Zusammensetzung beschrieben, die auch nach vollständiger Regeneration stabil ist. Diese Änderung ist durch die Zunahme an Bacteroidetes und die Abnahme von Firmicutes charakterisiert (Liu et al. 2016). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass diese Verschiebung der Taxa hin zu mehr Bacteroidetes und weniger Firmicutes sich nach der Leberresektion wieder auf die Ausgangswerte stabilisieren (Bao et al. 2020). In der vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass bei Mäusen ohne Antibiotikabehandlung 48 Stunden nach PHx eine Zunahme von Bakterien des Phylums Bacteroidetes und eine Abnahme der Firmicutes

auftritt. Nach 96 Stunden normalisiert sich die Mikrobiota und auf taxonomischer Ebene stellt sich wieder die Ausgangssituation ein, was durch unterschiedliche metabolische Voraussetzungen erklärt wurde. Diese Ergebnisse scheinen zu belegen, dass sich nach der Regeneration wieder ein Gleichgewicht einpendelt. Bezüglich der genauen taxonomischen Zusammensetzung gibt es unter den Studien allerdings kein klares Bild, was möglicherweise auf Unterschieden im experimentellen Aufbau (verwendetes Tiermodell: Maus, Ratte, Sequenzierverfahren etc.) zurückgeführt werden kann.

Im Gegensatz zu landläufigen Annahmen führt die Gabe von Breitbandantibiotika nicht zur vollständigen Eradikation von Bakterien im Darmtrakt. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass ihre Anwendung zu einer Verschiebung der bakteriellen Taxa führt, was sich negativ auf die Leberregeneration, gemessen durch das Verhältnis von Lebergewicht zum Körpergewicht, und die Proliferation der Hepatozyten auswirkt. Bereits andere Studien konnten zeigen, dass die bakterielle Belastung durch Antibiotikagabe steigen kann, dass es aber in jedem Fall zu einer Reduktion der Diversität kommt (Litvak et al. 2018, Ramirez et al. 2020). Antibiotika können ein mikroaerophiles Milieu im Darm schaffen und folglich zu einem Wachstum von fakultativ anaeroben Bakterien führt, wie sie im Phylum der Proteobacteria vertreten sind (Litvak et al. 2018). Dies erklärt die gestiegene Anzahl aerob wachsender Bakterien, die in der vorliegenden Studie klar beobachtet wurde. Übereinstimmend damit wurde eine Verschiebung des Mikrobioms hin zu einer höheren Häufigkeit von Bakterien des Phylums Proteobacteria beobachtet. Wie in dieser Studie erläutert, zeigen Sequenzierungsanalysen eine drastische Reduktion der Phyla Bacteroidetes und Firmicutes in antibiotikabehandelten Mäusen. Mitglieder dieser Phyla sind bekannt für ihre Fermentationsfähigkeit und ihre Rolle bei der Produktion kurzkettiger Fettsäuren (Gill et al. 2006, Litvak et al. 2018, Zheng und Wang 2021). Im Gegensatz dazu steigt die relative Häufigkeit von Proteobacteria, die keine Energie durch die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren gewinnen (Zheng und Wang 2021). Bemerkenswert ist zudem, dass das Mikrobiom der Kontrollmäuse eine geringere Heterogenität zwischen den Tieren aufweist, was sowohl an der taxonomischen Aufschlüsselung als auch beim De-Novo-Clustering der β -Diversität sichtbar wird. Die Antibiotikabehandlung führt zu großen Unterschieden in der bakteriellen Zusammensetzung, was sich sowohl in der großen Variabilität der taxonomischen Zusammensetzung der einzelnen Mäuse zum jeweils gleichen Zeitpunkt nach PHx, als auch in der Einteilung der β -Diversität des Mikrobioms in unterschiedliche Gruppen durch De-Novo-Clustering zeigt. Diese großen Unterschiede im Mikrobiom nach Antibiotikagabe könnten die beobachteten individuellen Unterschiede der Regenerationsfähigkeit oder der hepatischen Enzymexpression der Mäuse innerhalb dieser Gruppe erklären. Aus diesem Grund ist es essenziell die bakterielle Zusammensetzung bei einer Antibiotikabehandlung genau zu überwachen. Bei einigen Tieren mit Antibiotikabehandlung wurde zu späten Zeitpunkten ein Anstieg an fermentierenden Clostridien und Lachnospirales beobachtet, welche Hand in Hand mit einer erhöhten Hepatozytenproliferation gehen. Es ist möglich, dass einige Bakterien eine Resistenz gegen die Wirkstoffe entwickelt haben und sich somit

über einen längeren Behandlungszeitraum an die neuen Gegebenheiten angepasst haben (Tirelle et al. 2020).

Der Prozess der Leberregeneration nach PHx kann im Allgemeinen in drei Phasen eingeteilt werden: die Initiation, die Proliferation und die Termination. Während der Initiation treten die Hepatozyten von der G₀ in die G₁ Phase des Zellzyklus (Di-Iacovo et al. 2023). Hierzu tragen zahlreiche Faktoren bei, wie zum Beispiel die Veränderung des Blutdrucks durch den gesteigerten Pfortaderfluss in der nun kleineren Restleber (Abu Rmilah et al. 2019, Zhu et al. 2020). Gefahrensignale werden von Rezeptoren, wie zum Beispiel Toll-like-Rezeptoren, erkannt und führen zur Aktivierung des NFκB Signalwegs und als Folge zur Produktion von Zytokinen wie TNF und Interleukin 6 (IL6) durch Immunzellen (Zhu et al. 2020, Di-Iacovo et al. 2023). Durch den Anstieg an IL6 wird die Phosphorylierung von STAT3 und damit der Start der Proliferationsphase eingeleitet (Di-Iacovo et al. 2023). Wachstumsfaktoren wie der Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) und Liganden des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) ermöglichen das Voranschreiten der Mitose (Abu Rmilah et al. 2019, Zhu et al. 2020, Di-Iacovo et al. 2023). Zudem beeinflussen metabolische Faktoren, wie die Verfügbarkeit von Aminosäuren oder Lipiden die Leberregeneration (Holecek 1999). Bei Erreichen des Ausgangslebertumens erfolgt die Termination der Leberregeneration. Der Terminationsprozess wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst und ist noch nicht vollständig verstanden (Di-Iacovo et al. 2023). Neben anderen Einflüssen spielen hierbei Inhibitoren des mTOR-Signalwegs, sowie TGFβ, welches einen proliferationsinhibierenden Komplex mit Activin bildet, sowie Signale durch die extrazelluläre Matrix eine entscheidende Rollen (Fausto et al. 2006, Di-Iacovo et al. 2023). In der vorliegenden Studie führt die operative Entfernung von 60 % des Lebertumens primär zur starken und erwarteten Reduktion des Leber-Körpergewicht-Verhältnisses und zur Induktion der Proliferation. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Operation gewinnen die Hepatozyten der Kontrollmäuse an Größe und das Leber-Körpergewicht-Verhältnis steigt an. Zwei Tage nach der PHx ist der „Proliferationspeak“ erreicht, bis dahin gibt es keine weitere deutliche Zunahme des Lebergewichts. Nach dem Proliferationsmaximum wachsen die Zellen wieder und das Verhältnis von Leber-zu-Körpergewicht erhöht sich. Diese Abfolge spiegelt das bereits publizierte Standardverhalten der Leber nach PHx wider (Wu et al. 2015, Di-Iacovo et al. 2023). Bei Antibiotika-behandelten Mäusen ist die Regeneration und die Proliferation zeitlich deutlich verschoben. Jedoch wird das Lebertumens im gleichen Maß wie bei den Kontrollen wiederhergestellt, wenn auch stark verlangsamt. Es kommt also in den meisten Fällen zu einer Verzögerung und nicht zu einem kompletten Lebertversagen oder einer unzureichenden Wiederherstellung des Lebertumens. Wu und Kollegen zeigen im Kontrast dazu nach Antibiotikabehandlung keine komplette Wiederherstellung des Lebertumens (Wu et al. 2015). Dies könnte auf Unterschiede im Versuchsaufbau oder der mikrobiellen Zusammensetzung zurückzuführen sein. So wurden vergleichbare Breitbandantibiotika, mit dem Zusatz von Neomycin und ohne Fluconazol, über einen deutlich längeren Zeitraum von vier Wochen vor der Operation verabreicht. Zudem

wurden bei Wut et al. männliche Mäuse verwendet, wohingegen in den Antibiotikaexperimenten dieser Studie weibliche Tiere untersucht wurden. Es steht zur Frage, ob bei einem verlängerten Beobachtungszeitraum auch eine vollständige Regeneration beobachtet worden wäre. Zudem wurde die genaue Zusammensetzung der Mikrobiota über den Zeitraum der Behandlung und nach dem Eingriff nicht verfolgt. In den Fällen, bei denen es in der vorliegenden Studie zu einem Leberversagen kommt, tritt dieses vermehrt zu späten Zeitpunkten auf (Yin und Sichler et al. 2023). Hier erreicht die Proliferation und Scd1 Expression ihren Höhepunkt in ABX-Mäusen, jedoch ist möglicherweise dieser spät einsetzende Regenerationsprozess nicht ausreichend und es kommt zum Leberversagen und der beobachteten erhöhten Letalität. Das Leberversagen ist dann Folge von mehreren Prozessen, die nicht mehr zur Genüge ausgeführt werden können, darunter beispielsweise einen hohen Stoffwechselbedarf der durch die reduzierte Leber nicht mehr ausreichend erfüllt werden kann (Yagi et al. 2020). Übergreifend kann man zusammenfassen, dass eine antibiotikainduzierte Dysbiose die Regeneration der Leber verzögert. Aufgrund der hier erzielten Ergebnisse an Mausmodellen und aufgrund von klinischen Metaanalysen, wonach prophylaktische Antibiotika bei PHx keinen signifikanten Vorteil gegen postoperative Infektionen haben (Murtha-Lemekhova et al. 2022), muss in Betracht gezogen werden, dass routinemäßige prophylaktische Breitbandantibiotika vermutlich nicht nur keinen positiven Effekt, sondern möglicherweise sogar negative Einwirkung auf die Regeneration haben. Dies sollte in zukünftigen Studien überprüft werden, unter anderem durch die genau definierte Analyse des Mikrobioms vor und nach partieller Leberresektion im klinischen Kontext.

4.2.2 Antibiotika induzierte Dysbiose reduziert die Menge an kurzkettigen Fettsäuren und De-Novo-Lipidsynthese

Die mikrobielle Dysbiose kann dazu führen, dass essenzielle metabolische Grundbausteine fehlen, welche für das Eintreten der Hepatozyten in den Zellzyklus und die Mitose notwendig sind. Metabolite der Darm-Mikrobiota haben einen starken Einfluss auf die Regeneration (Zheng und Wang 2021) und Verschiebungen der mikrobiellen Zusammensetzung wurden bereits mit Lebererkrankungen assoziiert (Loomba et al. 2019, Oh et al. 2020). Membranlipide, welche in der Leber aus kurzkettigen Fettsäuren durch die Fettsäuresynthase (FASN) und weitere Enzyme hergestellt werden, könnten aufgrund der fehlenden fermentierenden Bakterien, die unter physiologischen Bedingungen diesen Grundbaustein im Dickdarm herstellen, das fehlende Element sein. Es wurde bereits gezeigt, dass bakterielle kurzkettige Fettsäuren aus dem Darmlumen als Bausteine für Lipide in der Leber dienen (Kindt et al. 2018), und weiterhin, dass Proliferation und Lipidsynthese eng miteinander verbunden sind (Kwok und Wong 2005, Natter und Kohlwein 2013, Scaglia et al. 2014). Bacteroidetes und Firmicutes, welche zum großen Teil kurzkettige Fettsäuren wie Acetat, Propionat, Butyrat und Iso- Butyrat produzieren (Zheng und Wang 2021), sind durch Antibiotikagabe drastisch verringert. Es

kann postuliert werden, dass als Konsequenz hieraus kurzkettige Fettsäuren fehlen und die De-Novo-Lipidsynthese in der Leber reduziert ist, was auch systemische Auswirkungen auf den ganzen Organismus hat. Diese Hypothese konnte durch die experimentelle Beobachtung, wonach die kurzkettigen Fettsäuren im Kolon der antibiotikabehandelten Mäuse signifikant reduziert sind, eindrucksvoll bestätigt werden. Zudem ergaben Lipidom-Analysen durch Massenspektrometrie, dass auch die De-Novo-Lipidsynthese in der Leber deutlich herunterreguliert ist, nachweisbar auch systemisch im Blutserum. Es kann daher von einer deutlich gestörten und verringerten De-Novo-Lipidsynthese in der Leber durch Antibiotikabehandlung ausgegangen werden.

Der Fettsäuremetabolismus und im speziellen die Neu-Synthese von Fettsäuren spielen eine essenzielle Rolle in der Leberregeneration und die Deletion von Repressoren der Fettsäuresynthese führt zu einer gesteigerten Leberregeneration (Ou-Yang et al. 2018). Störungen der Lipidhomöostase zum Beispiel durch eine Defizienz im Hepatozyten-Nucleären-Faktor-1-alpha (HNFα) führen zu Veränderungen in Lipidverfügbarkeit und im Lipid-Transport und haben einen negativen Einfluss auf die Leberregeneration (Hayhurst et al. 2001). Generell wurde gezeigt, dass verschiedene zelluläre Prozesse, wie Zelldifferenzierung, Wachstum und die Organellenbildung von der De-Novo-Synthese von Membranlipiden entscheidend abhängig sind (Ecker et al. 2010, Wenk 2010). In der De-Novo-Lipidsynthese maßgeblich involviert ist die FASN, welche aus Acetyl-CoA Palmitat (FA16:0) erstellt. Die so entstandene gesättigte Fettsäure Palmitat kann im Folgenden durch die Elongase (ELOVL6) verlängert werden, wodurch Ölsäure (C18:0) entsteht. Sowohl bei Palmitat als auch bei Ölsäure kann durch die Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) eine Doppelbindung an Position 9 der Fettsäure eingefügt werden, wodurch Mono-desaturierte Fettsäuren (MUFAs) entstehen (Matsuzaka et al. 2007, Flowers und Ntambi 2008). Diese Fettsäuren können entweder in Lipidtröpfchen primär als Triacylglyceride oder Cholesterolester gespeichert (Storck et al. 2018, Hu et al. 2023) oder direkt zur Synthese von Membranphospholipiden, wie etwa Phosphatidylcholin verwendet werden. Die Ausprägung von FASN und des Transkriptionsfaktors SREBP1c (sterol regulatory element binding protein-1c), welcher entscheidend an der Lipidhomöostase beteiligt ist, steigt nach partieller Hepatektomie (Kohjima et al. 2013), was auf eine verstärkte De-Novo-Lipidsynthese nach dem Eingriff hinweist. Kurz zusammengefasst: der Prozess der De-Novo-Lipidsynthese findet in der Leber unter physiologischen Bedingungen statt und ist essenziell für proliferierende Leberzellen. Dabei wurden FASN sowie SCD1 als zentrale Enzyme der Lipidsynthese beschrieben. Um die gestörte De-Novo-Lipidsynthese auf Enzymebene genauer aufzuschlüsseln, wurden Fasn, Scd1 und Elovl6 in Mauslebern auf mRNA und Proteinebene analysiert. Bei Scd1 ist direkt nach der PHx eine hohe Expression zu beobachten, welche gegenläufig zum Proliferationspeak reguliert ist. Nach Antibiotikagabe ist Scd1 zu frühen Zeitpunkten deutlich dereguliert und weniger transkribiert. In antibiotikabehandelten Mäusen ist Scd1 auf Proteinebene sogar erst ab 72 Stunden nach der Operation detektierbar und wird während des stärksten Anstiegs der Proliferation stark exprimiert. Somit stellt dieses Enzym eine interessante und bislang im Kontext der Leberregeneration nicht ausreichend

erforschte Zielstruktur dar. Dagegen sind die beiden Enzyme Fasn und Elovl6 in antibiotikabehandelten Mäusen in dieser Studie nicht drastisch dereguliert und in keimfreien Mäusen, tendenziell weniger stark ausgeprägt.

Es kann geschlussfolgert werden, dass die Antibiotikabehandlung bereits nach drei Tagen zu einem Fehlen von essenziellen Darm-Bakterien führt, die für die Fermentation von kurzkettigen Fettsäuren benötigt werden und folglich weniger De-Novo-Lipidsynthese in Hepatozyten stattfinden kann. Dies schlägt sich besonders in der stark reduzierten Expression des wichtigen, an der Fettsäuresynthese beteiligten Enzyms Scd1 nieder. Möglicherweise könnte eine Regulation dieses Enzyms genutzt werden, um die Synthese je nach Bedarf anzutreiben oder zu hindern. Allerdings erlauben es die Versuche mit Breitband-Antibiose nicht, eine direkte Kausalität des Mikrobioms zu belegen; zudem kann damit ein möglicher, wenn auch nach der Literatur unwahrscheinlicher toxischer Effekt der Antibiotika auf die Hepatozyten nicht ausgeschlossen werden. Daher sollte im Folgenden mit keimfreien und gnotobiotisch wieder-besiedelten Mäusen ein weiteres, unabhängiges Modell eingesetzt werden.

4.2.3 Funktionale Rekapitulation der Leberregeneration und der hepatischen Lipidsynthese nach Kolonisierung keimfreier Mäuse mit minimaler Mikrobiota

Wie zuvor beschrieben zeigt die Mikrobiota antibiotikabehandelter Mäuse größere Heterogenität und Diversität, was zu Limitationen des Modells führt. Außerdem kann wie erwähnt allein durch Antibiotikaexperimente noch keine Kausalität bewiesen werden. Aus diesen Gründen wurde ein weiteres Modell herangezogen, um den Einfluss der bakteriellen Fermentation und Herstellung von kurzkettigen Fettsäuren auf De-Novo-Lipidsynthese und Leberregeneration zu untersuchen. Hierzu wurden keimfreie Mäuse (Hintergrund C57Bl/6) und als „Rescue“-Ansatz ein Modell mit minimaler mikrobieller Besiedelung von 12 Bakterienstämmen (OMM12) verwendet, das von Prof. Stecher-Lesch entwickelt wurde (Brugiroux et al. 2016). Dieses Modell ist stabil, klar definiert und reduziert damit die Diversität des Mikrobioms. Außerdem wurden die verwendeten Bakterienstämme ausgiebig charakterisiert (Brugiroux et al. 2016, Weiss et al. 2023). So konnte gezeigt werden, dass einige der verwendeten Stämme aufgrund von Fermentationsprozessen Acetat und teils auch Propionat, Butyrat oder Isobutytrat produzieren (Weiss et al. 2021). Erwartungsgemäß können durch die 16S-rRNA-Sequenzierung nicht alle dieser Spezies einzeln detektiert werden, jedoch sind die jeweiligen Phyla, Klassen und Genera vertreten mit Ausnahme des *Bifidobacterium animalis* YL2, welches dem Phylum der Aktinobakteria entspricht. Gemäß der Literatur ist der Nachweis dieser Spezies selbst mit der empfindlichen Methode der qPCR am unteren Detektionslimit (Weiss et al. 2021), weswegen möglicherweise die relative Häufigkeit von *B. animalis* unterhalb des Detektionslimits der hier verwendeten 16S-rRNA-

Sequenzierung liegt. Trotzdem rekapitulieren Bakterien der OMM12 Mäuse sehr gut die generelle Zusammensetzung der SPF Mikrobiota auf taxonomischer Ebene der Phyla und Klassen. Das OMM12 Mausmodell reduziert die Komplexität auf niedriger taxonomischer Ebene jedoch erheblich, wie man an dem Vergleich der Genera von SPF und OMM12 sieht. Auch nach der Operation, die zwar steril, nicht jedoch unter komplett keimfreien Bedingungen durchgeführt werden konnte, zeigen sowohl die Ergebnisse der PCR als auch der 16S-Sequenzierung keine detektierbare bakterielle Besiedlung der keimfreien Mäuse und damit konnte augenscheinlich der gnotobiotische Status erhalten werden.

Keimfreie Mäuse zeigen analog zu den Antibiotika-behandelten Tieren stark reduzierte Leberregenerationskapazitäten, drastisch schlechteres Überleben und keine Proliferation von Leberzellen 48 Stunden nach der Operation. Die hepatische De-Novo-Lipid-Synthese in keimfreien Mäusen scheint komplett eingestellt zu sein. In guter Übereinstimmung dazu wurde in einer Arbeit von Kindt und Kollegen unlängst gezeigt, dass die Menge an Fettsäuren, speziell von Phosphatidyl-Cholin mit Mono-desaturierten Fettsäure-Anteilen und von Palmitoleat, also der enzymatischen Produkte der Scd1, bei keimfreien Mäusen drastisch reduziert sind; ebenso die hepatische Expression der Scd1, Fasn und Elovl6 (Kindt et al. 2018).

In dem OMM12 Mausmodell, durch das die bakterielle Fermentation wieder hergestellt wurde, kommt es zu einer mindestens partiellen Funktionswiederherstellung der Leberregeneration, einer deutlichen Verbesserung des Überlebens, der Proliferation und der De-Novo-Lipidsynthese. Die Erkenntnisse über De-Novo-Lipidsynthese stimmen mit Daten aus der Literatur überein, da Mäuse mit Darm-Mikrobiota einen höheren Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren haben, wohingegen in keimfreien Mäusen mehrfach ungesättigte-Fettsäuren, welche aus der Nahrung gewonnen werden, überwiegen (Kindt et al. 2018). Die Enzyme für die De-Novo-Synthese und Modifikation von Fettsäuren, Scd1, Fasn und Elovl6 sind in Lebern der keimfreien, aber auch der OMM12 Modelle auf RNA-Ebene stark reduziert und auf Protein-Ebene heterogen ausgeprägt. Analog wurde für Scd1 eine Reduktion beschrieben (Kindt et al. 2018).

Die Resultate der gnotobiotischen Mäuse mit der Funktionswiederherstellung durch das OMM12 Mausmodell stützen die Hypothese, dass bakterielle Fermentation und kurzkettige Fettsäuren essenziell für die Synthese von Membran-Phospholipiden sind, welche wiederum als Grundbaustein für die Leberregeneration dienen. Jedoch scheint die Regulation der Enzyme komplex und nicht unbedingt nur von genereller bakterieller Besiedlung abhängig zu sein, da nur eine teilweise Wiederherstellung der Enzymausprägung in OMM12 Mäusen beobachtbar ist. Für ein besseres Verständnis der mikrobiellen Einflussfaktoren auf die De-Novo-Lipidsynthese sind somit weitere Analysen zur Regulation dieser Enzyme notwendig.

4.2.4 Auswirkung von Acetat auf Hepatozyten-Organoiden und SCD1-Expression: SCD1 ist für die Proliferation muriner Hepatozyten förderlich und korreliert positiv mit der Leberregeneration bei Patienten

Im Weiteren stellt sich die Frage, wie man sich die Mikrobiota und mikrobielles Acetat für die Leberregeneration zunutze machen könnte. Eine fäkale Mikrobiota-Transplantation (FMT) wird klinisch bei wiederkehrender *Clostridium difficile* Infektionen angewendet, wäre allerdings mit einigem Aufwand verbunden (Yadegar et al. 2024). In Deutschland stellen derzeit Stuhltransplantationen zum therapeutischen Einsatz in der Humanmedizin Arzneimittel nach §2 Abs. 1 des Arzneimittelgesetzes (AMG) dar. Zum einen müsste man die Frage klären, welche Stuhlproben im Kontext von Lebererkrankungen geeignet wären und ob man Autologe- oder Heterologe-Stuhltransplantation anwenden möchte. Bei heterologer Transplantation, von einem anderen Menschen, müssten die Stuhlprobe aufgrund der gesetzlichen Bestimmungen auf ihre Sicherheit, also vorhandene Viren und bekannte Pathogene, Diversität, Komposition und die Genetik, sowie die Immunkomponenten des Empfängers untersucht werden (Porcari et al. 2023). Zudem müsste man diese Stuhlproben in geeigneter Menge und standardisiert herstellen und die Dosierung und der zeitliche Ablauf im Verhältnis zur partiellen Hepatektomie abgeklärt werden (Porcari et al. 2023). Bei einer autologen FMT stellt sich die Frage, ob der Spender überhaupt selbst die benötigten Taxa und Metaboliten in ausreichender Menge enthält. Wie bereits erwähnt, bietet die Regulierung von SCD1 sowie die Verabreichung von Acetat oder Fettsäuren die Möglichkeit, den Regenerationsprozess aktiv zu beeinflussen und stellt somit eine deutlich einfachere Möglichkeit dar, um Regeneration zu verbessern. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob SCD1 durch das Vorhandensein von kurzkettigen Fettsäuren oder dem Produkt der Fettsäuresynthese Palmitat induziert werden kann und somit indirekt über Acetat, also einem Produkt der bakteriellen Fermentation, reguliert wird. Die Regulation der Scd1 Expression wurde bereits in einigen Studien untersucht und ist sehr komplex und durch diverse Signalwege beeinflusst. Wie in Übersichtsartikeln beschrieben wird, ist SCD1 Expression sowohl über hormonelle als auch über Nahrungskomponenten moduliert (Mauvoisin und Mounier 2011). Außerdem kann eine TLR3 abhängige TRIF-Aktivierung die SCD1 Transkription inhibieren, was eine mögliche Verbindung zum ersten Teil dieser Arbeit darstellen könnte (Chen et al. 2017). Neben der Regulation von SCD1 sollte hier untersucht werden, ob Acetat und SCD1 tatsächlich ursächlich für ein stärkeres Hepatozytenwachstum verantwortlich sind.

Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die RNA-Expression von Scd1 in der Zelllinie AML12, sowie in Lebern von Mäusen durch in vivo Stimulation mit Acetat induziert werden kann und die Anzahl von Lipidtröpfchen in den Hepatozyten nach Stimulation mit Acetat in vitro steigt. Eine transiente Steatose, gekennzeichnet durch die Einlagerung von Lipidtröpfchen in der Leber, ist kennzeichnend für die frühen Phasen der Leberregeneration

(Solhi et al. 2021). Die Lipidtröpfchen bestehen zum Großteil aus Triacylglycerol, Cholesterylestern und Retinylestern (Hu et al. 2023). Bistlang ist der komplexe Zusammenhang zwischen Fettakkumulation in der Leber und der Leberregeneration unzureichend verstanden. Allerdings muss man eine transiente Steatose funktional klar von der schweren und pathologischen Steatose unterscheiden; im Besonderen auch in ihren Effekten für die Leberregeneration. Eine ausgeprägte klinische Steatose kann zu schweren post-Operativen Komplikationen führen (Veteläinen et al. 2007, Chu et al. 2015). Lipidtröpfchen, welche nicht im Kontext einer krankhaften Fettleber entstehen, scheinen hingegen eher von Vorteil für die Leberregeneration zu sein (Hu et al. 2023). Zudem konnte durch Futter mit hohem Fettgehalt, welches über sechs Wochen gegeben wurde, die Leberregeneration teils verbessert werden (Sydor et al. 2013). Diese Ergebnisse sollten jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, da andere Studien zeigten, dass ein hoher Fettgehalt die Regeneration zu einigen Zeitpunkten verbessert, zu anderen jedoch inhibiert (Hamano et al. 2014). Neben der direkten Einlagerung von Fetten konnte gezeigt werden, dass die De-Novo-Lipidsynthese zur Einlagerung der Lipidtröpfchen während der Leberregeneration beiträgt (Ou-Yang et al. 2018).

Ein direkter Zusammenhang von Lipidtröpfchen-Einlagerung und Enzymen der De-Novo-Synthese konnte bereits gezeigt werden. Der FASN-Inhibitor Orlistat reduziert und verlangsamt die transiente Steatose während der Leberregeneration (Ou-Yang et al. 2018). Orlistat inhibiert jedoch zusätzlich auch Lipasen, was möglicherweise zu einem gemischten Phänotyp aus Inhibition der De-Novo-Lipidsynthese und Freisetzung von bereits gespeicherten Fettsäuren führt (Heck et al. 2000). Scd1 wurde in einer publizierten Studie in Mausmodellen für die nicht-alkoholische-Steatohepatitis inhibiert. Hier führte die SCD1 Inhibition durch Aramchol zu einer geringeren Einlagerung von Lipidtröpfchen (Iruarrizaga-Lejarreta et al. 2017). Aramchol wurde bereits in klinischen Studien untersucht, in denen Leberfett, wenn auch nicht signifikant, reduziert werden konnte. Die Leiter der Studie stellen Implikationen für generelle Verbesserung der Leber Histologie im Kontext von Typ-2-Diabetes oder mit prä-diabetischen Personen in Aussicht (Ratzliff et al. 2021). Fasn und Elovl6 werden nicht direkt durch Acetatgabe beeinflusst und scheinen zumindest auf RNA-Ebene nicht direkt reguliert. Dies verstärkt den Eindruck, dass Scd1 in der Leberregeneration im Zusammenhang mit der Mikrobiota nach PHx eine zentrale Rolle einnehmen könnte. Zudem konnte ein direkter Zusammenhang von Acetat Stimulation und stärkerem Organoidwachstum *in vitro* gezeigt werden. Interessanterweise wirkt sich Acetat nicht direkt auf die Ausprägung von Zyklinen für das Fortschreiten der Mitose aus. Auch wenn die Organoiden nur marginal kleiner sind, führt die Inhibition von Scd1 dennoch zu einer Reduktion der Ausprägung von Zyklin B1, A2 und D1 in murinen Hepatozytenorganoiden. Diese Ergebnisse untermauern eine direkte negative Regulation der Proliferation durch Scd1-Inhibition und eine Induktion durch Acetat.

Des Weiteren wurde in dieser Studie der translationale Aspekt der Erkenntnisse und ihre mögliche klinische Relevanz untersucht. Bei erkrankten Personen mit Lebermetastasen

oder primärem Leberkrebs werden als chirurgische Therapie oft große Teile der Leber entfernt. Allerdings muss immer ein ausreichend großer Rest der Leber (future liver remnant, FLR) verbleiben, um die notwendigen Funktionen zu erfüllen und gleichzeitig die Regeneration der Leber einzuleiten. Bei gesunden Personen liegt der FLR-Wert zwischen 20 und 25 %, bei einer zirrhotischen Leber bei 40 % (Adams et al. 2013, Del Basso et al. 2021). Zur Vermehrung des gesunden Lebergewebes vor der Resektion und somit der Erhöhung des FLR kann eine Intervention durchgeführt werden. In dieser Studie handelt es sich um eine assoziierte Leberpartition und Pfortaderligatur (ALPPS), bei der Gewebeproben für Forschungszwecke gewonnen werden konnten. Hierbei wird präoperativ in einem Teil der Leber die Blutzirkulation verhindert. Dadurch wird in dem nun stärker durchbluteten Bereich der Leber eine Hyperproliferation induziert, wohingegen der erkrankte Teil unter Atrophie und Hypoproliferation leidet (Schnitzbauer et al. 2012). Mit dieser Intervention wird vor der Resektion das Volumen des verbleibenden Restlebertumors erhöht, um Regeneration zu optimieren und die Überlebenschancen der Behandelten zu verbessern.

Dies ermöglicht es, kleine Gewebeproben zu untersuchen, die jeweils aus dem atrophierten oder dem verstärkt wachsenden Anteil einer Leber entstammen und daher eine exzellente Vergleichsmöglichkeit bieten. Interessanterweise ist die RNA-Expression von SCD1 und FASN im hyperproliferativen Gewebe von 13 erkrankten Personen signifikant erhöht, ELOVL6 hingegen ist unverändert. Zudem ist die Expression von SCD1 positiv mit dem Regenerationsindex nach der Intervention korreliert, der radiologisch bestimmt wird. Jedoch muss angemerkt werden, dass es sich bei dieser Korrelation um eine relative geringe Anzahl von nur drei untersuchten Personen handelt.

Generell lassen die hier erzielten Ergebnisse (Yin und Sichler et al. 2023) den Schluss zu, dass die Ausprägung von Scd1 mittels Acetats aus bakterieller Fermentation *in vivo* induziert werden kann und lipogene Enzyme, im speziellen SCD1, positiv mit Leberproliferation und -regeneration auch beim Menschen korrelieren. Natürlich müssen in Zukunft mehr Patienten in diese Untersuchung eingeschlossen werden, um die Daten zu bestätigen. Bislang wurde nach unserem Wissenstand nicht zur De-Novo-Lipidsynthese in klinischen Studien nach partieller Hepatektomie geforscht, auch die Rolle von SCD1 in diesem Zusammenhang ist bislang noch unklar. Aus diesem Grund wäre es wichtig, die Übertragbarkeit der Ergebnisse des Mausmodells auch im klinischen Kontext an erkrankten Personen zu testen. Als Perspektive könnten in Zukunft standardisierte Mikrobiomanalysen eine verbesserte Vorhersage der Leberregeneration ermöglichen, es erlauben, elektive Operationen an den idealen Zustand des Mikrobioms anzupassen und bei fehlendem Nachweis von fermentierenden Spezies mit Acetat oder Fettsäuren zu supplementieren. Eine kürzlich veröffentlichte Studie, welche die Entwicklung eines niedermolekularen Kinase-Inhibitors mit breitem Anwendungsspektrum zur Verbesserung der Leberregeneration beschreibt, zeigt die Notwendigkeit weiterhin an diesem Thema zu forschen (Sichler et al. 2024). Diese Studie könnte als Vorbild für Medikamentenentwicklung dienen, die in die Fettsäuresynthese eingreift.

4.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der mikrobiellen

Einflüsse: TLR3 in der Tumorentstehung und SCD1 abhängige Lipidsynthese in der Leberregeneration

In den letzten Jahren rückte die Mikrobiota aufgrund der Auswirkungen auf diverse Gesundheitsaspekte und die mögliche Rolle in zahlreichen Krankheitsmechanismen vermehrt in den Fokus wissenschaftlicher Forschung (Goodman und Gardner 2018, Hou, Chen, et al. 2022, Hsu und Schnabl 2023, Wong und Yu 2023, Blake et al. 2024). Die vorliegende Studie untersucht den Einfluss der Mikrobiota, wobei die zwei Teilbereiche dieser Arbeit zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen. Durch eine direkte Gegenüberstellung der auf den ersten Blick völlig unterschiedlichen Teilaspekte dieser Arbeit sollen hier Gemeinsamkeiten und Unterschiede skizziert werden.

Die beiden Proteine, die in den zwei Teilen dieser Studie jeweils im Mittelpunkt stehen, TLR3 und SCD1, sind auf funktionaler Ebene natürlich sehr unterschiedlich, auch wenn in der Literatur SCD1 als durch TLR3/TRIF direkt negativ reguliertes Transkript beschrieben wurde (Chen et al. 2017), was einen funktionellen Zusammenhang impliziert. TLR3 fungiert als Rezeptor zur Erkennung von Gefahrensignalen und Induktion einer Immunantwort, während SCD1 eine enzymatische Funktion zur Synthese von Fettsäuren erfüllt, zum Beispiel für Membranlipide. Das Mikrobiom scheint in Bezug auf TLR3 Expression keinen großen Einfluss zu haben, auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass dsRNA mikrobiellen Ursprungs den Rezeptor aktiviert. Um den Ursprung der dsRNA, welche an TLR3 bindet, aufzuklären, könnte mithilfe von Formaldehyd-vermitteltem „Crosslinking“ und Immunpräzipitation mit anschließender Sequenzierung (fCLIP-seq) an den TLR3 Rezeptor gebundene RNA sequenziert werden. Bemühungen dahingehend wurden bereits in der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Eilers angestellt. Dabei wurde festgestellt, dass in murinen und humanen duktalem Pankreasadenokarzinom (PDAC) Zelllinien TLR3 primär endogene retrovirale Elemente nukleären Ursprungs bindet (Krenz et al. 2021). Diese Daten weisen darauf hin, dass das Mikrobiom zumindest in diesen Zelllinien keine große Rolle spielt. Da die Analyse jedoch vornehmlich an Zelllinien durchgeführt wurde, also ohne Ko-Kultur mit Bakterien, kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei primären Zellen, welche in direktem Kontakt mit Komponenten des Mikrobioms sind, dsRNA bakteriellen Ursprungs TLR3 stimuliert. Die Belege genügen nicht, um einen kausalen Zusammenhang von mikrobiellen Liganden und TLR3 formal auszuschließen, jedoch deuten Daten dieser Studie zusammen mit den Literaturbefunden darauf hin, dass mikrobielle dsRNA eher eine untergeordnete Rolle spielt. In der Leberregeneration hingegen spielt die Mikrobiota eine essenzielle Rolle und stellt unter anderem kurzkettige Fettsäuren als essenzielle Grundbausteine für die De-Novo-Lipidsynthese und die Zellproliferation bereit. Auch werden hier Enzyme der hepatischen Lipidsynthese durch das Mikrobiom, bzw. dessen Metaboliten reguliert. Scd1 als ein zentrales Enzym der Lipidsynthese ist bei bakterieller Dysbiose oder in

keimfreien Mäusen sowohl in dieser als auch in einer vorherigen Studie stark reduziert (Kindt et al. 2018). Im Gegensatz dazu ist Tlr3 durch kurzzeitige Dysbiose in seiner Ausprägung unverändert. Im Dünndarm von keimfreien Mäusen ist Tlr3 weniger exprimiert (Huhta et al. 2016), jedoch in Immunzellen von keimfreien Schweinen unverändert oder teils stärker vorhanden als in konventionellen Mäusen bzw. Schweinen (Shao et al. 2016). In gnotobiotischen Modellen ohne Bakterienbesiedlung kommt es aufgrund der fehlenden Exposition mit dem Mikrobiom zu keiner Reifung des Immunsystems. Dadurch ist die Expression verschiedener Faktoren des Immunsystems dereguliert (Basic und Bleich 2018). Für einige TLRs wurde bereits beschrieben, dass sie in der frühen Entwicklungsphase oder bei erstmaliger Exposition mit bakteriellen Antigenen dynamischen Veränderungen in ihrer Expression in Abhängigkeit vom Mikrobiom unterliegen (Inoue et al. 2017). Dies kann möglicherweise eine niedrigere Expression von TLR3 im Epithel von keimfreien Tieren erklären.

SCD1 wird in dieser Arbeit im Kontext von PHx und Leberregeneration betrachtet, allerdings wurde das Enzym auch bei Krebs, insbesondere beim kolorektalen Karzinom untersucht. SCD1 ist in Tumorgewebe stärker ausgeprägt als in vergleichbarem Normalgewebe, wie die Literatur und unveröffentlichte Befunde unserer Arbeitsgruppe zeigen (Ascenzi et al. 2021). Die genauen Mechanismen werden noch untersucht, jedoch beeinflusst SCD1 die Lipotoxizität, Ferroptose, Autophagie und EMT und wird eher als Onkogen eingestuft (Baenke et al. 2013, Ascenzi et al. 2021, Sen et al. 2023). Im Gegensatz dazu untermauern die Daten dieser Studie, dass TLR3 als Tumorsuppressor klassifiziert werden kann.

Darüber hinaus wurde die Rolle von TLR3 nicht nur im Kontext von Darmkrebs, sondern auch in der Leberregeneration bereits in einer Arbeit der chirurgischen Klinik der TUM untersucht (Stoss et al. 2020). Das verwendete Mausmodell ist identisch zu der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Tlr3 Linie. Es stellte sich heraus, dass TLR3 sehr wichtig ist, um nach einer partiellen Leberresektion das ursprüngliche Verhältnis von Leber- und Körpergewicht zu erreichen. Ein Fehlen dieses Rezeptors verhindert den Eintritt der Zellen in die S-Phase der Proliferation und das Ausgangslebergewicht wird nicht erreicht. Die Störung der De-Novo-Lipidsynthese durch bakterielle Dysbiose behindert ebenso ein Eintreten der Hepatozyten in den Proliferationszyklus, nicht aber eine spezielle Zyklusphase (Yin und Sichler et al. 2023). Allerdings wird hier das Lebergewicht, zwar zeitverzögert, aber komplett wiederhergestellt.

Neben TLR3 wurde auch die Funktion anderer TLRs auf die Leberregeneration eingehend untersucht. Eine TLR5 Defizienz führt ebenso zu einer reduzierten Proliferation der Hepatozyten, einer herabgesetzten Induktion von NFκB und STAT3, sowie geringeren Konzentrationen von Triglyceriden und nicht veresterten Fettsäuren in der Leber (Zhang et al. 2021). Außerdem wurde berichtet, dass eine Stimulation von TLR5 mit dem synthetischen Agonisten CBL502 über eine stärkere Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zu einer Verbesserung der Leberregeneration führt (Zhang et al. 2021).

Sowohl Inhibitoren von SCD1 als auch TLR3 Agonisten wurden in klinischen Studien bereits getestet. Aramchol, welches in klinischen Studien zur Reduktion von NASH getestet wurde, wurde bereits besprochen. TLR3 Agonisten, wie Poly(I:C), Ampligen oder Hiltonol wurden vor allem in Kombination mit konventioneller Chemo- oder Radiotherapie bei verschiedenen soliden Tumoren, wie Leber oder Pankreaskrebs, zur Aktivierung des Immunsystems eingesetzt (Han et al. 2023).

Das Immunsystem bildet einen der zentralen Mechanismen der tumorsuppressiven Effekte von TLR3 bei CRC. Die Rolle von TLR3 in der Immunaktivierung und Immunzellinfiltration wurde neben den Ergebnissen in dieser Studie bereits in verschiedenen Studien bestätigt (Shime et al. 2012, Guillerey et al. 2015, Shime et al. 2017, Bianchi et al. 2020, Matsumoto et al. 2020, Muresan et al. 2020).

Auch in der Leberregeneration spielen verschiedene Immunzellen eine große Rolle und die Effekte wurden in Übersichtsartikeln beschrieben (Li und Hua 2017, Di-Iacovo et al. 2023). Ein Beispiel für gut erforschte Immunzellen in diesem Kontext sind die Makrophagen. Hier muss jedoch unterschieden werden, ob sie entweder als Monozyten aus dem Blutkreislauf in die Leber migrieren oder sich schon zuvor in der Leber aufhalten und aktiviert werden. Sie regen die Regeneration der Leber an und stellen anfängliche Stimulatoren für die Proliferation von Hepatozyten bereit. Dies geschieht entweder direkt durch die Bereitstellung von Zytokinen oder anderen Faktoren. Zu diesen wichtigen regenerationsfördernden Faktoren zählen TNF α oder IL6 (Cressman et al. 1996, Yamada et al. 1997, Aldeguer et al. 2002), welche in Abhängigkeit von Antibiotikabehandlung eher eine untergeordnete Rolle spielen, da die IL6 und TNF α Ausprägung in den ersten Stunden nach PHx in dieser Studie nicht durch Antibiotika verändert sind. Im Gegensatz zu IL6 und TNF α hemmt INF γ den Prozess der Leberregeneration (Li und Hua 2017). Kupfferzellen, eine Unterklasse der Makrophagen, produzieren in Abhängigkeit von TLR und MyD88 die Zytokine TNF und IL6 (Seki et al. 2005). Zusätzlich können Makrophagen auch indirekt die Leberregeneration beeinflussen. So werden Kupferzellen über Ampicillin-sensitive Bakterien aktiviert und verhindern so eine Überreaktion von Natürlichen-Killer-T (NKT) Zellen (Song et al. 2015). NKT-Zellen werden den T-Zellen zugeordnet und beeinträchtigen die Regeneration der Leber, wenn sie beispielsweise durch IL12 bakteriell aktiviert werden (Song et al. 2015). T-Zellen scheinen aber nicht generell einen negativen Einfluss auf die Leberregeneration zu haben. Eine Unterklasse von Lymphozyten, die $\gamma\delta$ -T-Zellen, sekretieren IL17A, was zu einer Produktion von IL6 durch antigenpräsentierende Zellen führt und die Produktion von INF γ durch NKT-Zellen verhindert (Rao et al. 2014). Es handelt sich demnach um eine kontextabhängige Verbesserung der Leberregeneration. Es ist wichtig, die im Gewebe vorhandenen Subtypen der T-Zellen zu betrachten, da sie sich in ihrer Funktion drastisch voneinander unterscheiden (Venkatesh et al. 2023). NK-Zellen inhibieren die Hepatozyten Proliferation durch Produktion von INF γ und eine Depletion der NK- Population führt zu verbesserter Leberregeneration (Li und Hua 2017). Dendritische Zellen verhindern IL10 abhängig die INF γ Produktion von T-Zellen, während Eosinophile die Proliferation von ruhenden Hepatozyten über IL4 stärken (Castellaneta et al. 2006, Goh et al. 2013).

In der Leber zeigte sich im Zusammenhang mit verstärkter De-Novo-Lipidsynthese eine starke Proliferation. Hieraus ergibt sich die Frage, ob auch bei stark proliferierenden Tumoren der Lipidstoffwechsel zentral sein könnte. Tatsächlich wurde bei Darmkrebs eine veränderte Lipidomsignatur in Arbeiten unserer Arbeitsgruppe festgestellt (Ecker et al. 2021), was auf Modifikationen in der Lipidhomöostase in Tumoren hinweist. Neben dem lang bekannten Warburg-Effekt, welcher Veränderungen des Glukosestoffwechsels in Krebszellen beschreibt (Hsu und Sabatini 2008, Hanahan und Weinberg 2011), handelt es sich hierbei möglicherweise um eine weitere metabolische Eigenschaft von Tumoren. Möglicherweise kann der Lipidstoffwechsel auch hier durch die Hemmung von SCD1 oder FASN moduliert werden, um als Therapieansatz zu dienen und im Fall von CRC die Proliferation zu verhindern.

Wie bereits mehrfach beschreiben, dienen kurzkettige Fettsäuren (SCFA) als Grundbausteine für die De-Novo-Lipid-Synthese. Allerdings ist das nicht die einzige Rolle der SCFA, so wurde in einem Übersichtsartikel beschrieben, dass sie weitere wichtige Faktoren der Darmgesundheit beeinflussen (Zheng und Wang 2021). So fördern sie zum Beispiel den Erhalt der Darmbarriere über „tight-junction“ Proteine, ZO-1 und Claudin-1 (Wang et al. 2012, Miao et al. 2016). Acetat, Propionat und Butyrat binden an die G-Protein gekoppelten Rezeptoren GPR41, GPR43 und führen zur Aktivierung von des MAP-ERK Signalwegs (Park et al. 2016). Butyrat kann außerdem GPR109A aktivieren und führen zur Regulation des Nod-like-Rezeptor Proteins 3 und zur Produktion von IL18 (Kalina et al. 2002, Thangaraju et al. 2009, Singh et al. 2014). Dies trägt zum Erhalt der epithelialen Barriere und der Homöostase bei. Darüber wird der Transport von proinflammatorischen Faktoren zur Leber reguliert und somit indirekt die Leberregeneration beeinflusst. Zudem ist Butyrat eine zentrale Energiequelle für intestinale epitheliale Zellen (Karim et al. 2024). Des Weiteren regulieren kurzkettige Fettsäuren die metabolische Homöostase und können die Immunaktivität verändern, zum Beispiel durch die Hemmung der NFkB Aktivierung mittels Butyrats (Luhrs et al. 2002, Chang et al. 2014) oder die Regulation von T-Zellen über Butyrat und Propionat (Arpaia et al. 2013, Furusawa et al. 2013). Zudem können kurzkettige Fettsäuren die Sekretion antimikrobieller Peptide und Mucine induzieren (Hou, Chen, et al. 2022). Die diversen Funktionen von SCFA auf die Immunantwort wurden in Übersichtsartikeln zusammengefasst. So wird zum Beispiel die Funktion von regulatorischen T-Zellen in Abhängigkeit von GPR43 so moduliert, sodass eine verstärkte Ausprägung von FoxP3 und IL10 stattfindet (Furusawa et al. 2013, Smith et al. 2013, Singh et al. 2014). Butyrat reguliert die Funktionen von Makrophagen, wodurch sie weniger pro-inflammatorisch werden und die Produktion von IL12, IL6 und NO reduzieren (Chang et al. 2014). Acetat erhöht die Erkennung von *E. coli* mittels CD4⁺ T-Zellen durch verstärkte TLR-Signalübertragung und stärkere T-Zellabhängige IgA Produktion (Takeuchi et al. 2021). Demnach könnten kurzkettige Fettsäuren auch einen zusätzlichen indirekten Effekt auf die Leberregeneration über das Immunsystem haben. In Stuhlproben von Patienten mit CRC wurden weniger Bakterien gefunden, die kurzkettige Fettsäuren produzieren (Wu et al. 2018). Möglicherweise deutet das Fehlen von fermentierenden Bakterien in CRC-Patienten ebenfalls auf eine schlechtere

Prognose hin. Eine Reihe von Veröffentlichungen zeigen, dass kurzkettige Fettsäuren zum Erhalt des gesunden Darmepithels beitragen und möglicherweise zu einer Verminderung von Neoplasien durch anti-inflammatorische und immunmodulatorische Effekte führen (Kalina et al. 2002, Thangaraju et al. 2009, Singh et al. 2014, Wu et al. 2018). Allerdings dient Acetat auch als Energiequelle für den Tumor, vor allem unter hypoxischen Bedingungen und bei Lipiddepletion greift der Tumor auf diese kurzkettige Fettsäure zurück (Schug et al. 2015). Zusammengefasst haben kurzkettige Fettsäuren über diverse molekulare Effekte einen großen Einfluss auf Darmkrebs und Leberregeneration.

Bevor man einen Teil dieser Aspekte für neue Therapie anwendet, ist jedoch eine genaue Untersuchung notwendig, etwa mit Hilfe einer Acetat Supplementierung in Modellen der Lebermetastasierung im Kontext der partiellen Resektion. Zudem muss die Rolle des Darm-Mikrobioms in erkrankten Personen vor und nach einer PHx aufgeklärt werden, um das komplexe Zusammenspiel zu verstehen. Es besteht die Möglichkeit, dass eine fein ausgewogene Balance bei einer „neoadjuvanten“ Supplementierung von Acetat erforderlich ist, um einerseits die Leberregeneration zu fördern und dabei andererseits das Tumorwachstum nicht zu begünstigen. Eine zeitlich abgestimmte Therapie könnte sinnvoll sein, in der die Gabe von Acetat erst nach Resektion des Tumors und der Metastasen vorgesehen ist, gewissermaßen im „adjuvanten Setting“. Zusätzlich könnte die Verwendung eines gezielten SCD1-Inhibitors, wie Aramchol bei gleichzeitiger Gabe von Acetat, in Erwägung gezogen werden. Der Inhibitor könnte hierbei das Wachstums der Tumorzellen eindämmen, wobei Acetat von den normalen Hepatozyten als Grundbaustein verwendet werden kann. Weitere umfassende Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese möglichen Therapieansätze auf Wirksamkeit und Anwendbarkeit zu überprüfen.

4.4 Kernergebnisse und Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann man festhalten, dass das Mikrobiom unterschiedlich stark Einfluss auf TLR3 im Zusammenhang mit dem kolorektalen Karzinom und die Leberregeneration nach chirurgischer Metastasen- oder Tumorentfernung nimmt. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass TLR3 im kolorektalen Karzinom als Tumorsuppressor einzustufen ist, da schon eine heterozygote Deletion im $Apc^{1638N/+}$ Mausmodell zu einer drastisch erhöhten Morbidität und Mortalität führt. Die spezifische Re-Expression von TLR3 in intestinalen Epithelzellen (IEC) des Mausmodells verringert die erhöhte Tumorgenese und führt zu einer vergleichbaren Sterblichkeit wie in der parentalen $Apc^{1638N/+}$ Linie. Diese Befunde deuten klar auf einen Epithel- bzw. Tumorzell-autonomen Effekt von TLR3 hin. Die tumorsuppressiven Effekte von TLR3 werden sowohl über Invasion *in vivo* als auch über differentielle Immunaktivierung vermittelt. Die Heterogenität der Migrations- und Invasionseigenschaften, welche in der Literatur beschrieben wurde, konnten auch in dieser Studie beobachtet werden, jedoch scheint *in vivo* eine gesteigerte Invasion bei Deletion von TLR3 zu überwiegen. Zudem führte eine Deletion von TLR3 zu einer Verschiebung der intratumoralen Immunzellen in Richtung weniger vorteilhafter Zellpopulationen. TLR3 wird in seiner Ausprägung, mit Ausnahme von gnotobiotischen Modellen, nicht stark vom Darm-Mikrobiom beeinflusst. Es ist naheliegend, dass endogene Retroviren TLR3 aktivieren, jedoch kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass Komponenten der bakteriellen Mikrobiota auch einen Einfluss auf die Aktivierung ausüben. Weitere Studien sind notwendig, um den molekularen Zusammenhang den TLR3 auf den FAK-SRC Signalweg ausübt, die spezifischen Veränderungen der Mikroumgebung und die Zelltyp-spezifischen Aspekte genau aufzuklären. Die Leberregeneration generell, aber im speziellen der dafür notwendige Lipidstoffwechsel, ist stark vom Mikrobiom abhängig. Zudem kann die Leberregeneration durch direkte Supplementierung von Acetat oder durch definierte mikrobielle Wiederbesiedelung mit den notwendigen fermentierenden Bakterien SCD1 abhängig und *in vivo* gesteuert werden. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um eine Verbesserung der Leberregeneration durch direkte Gabe von Acetat *in vivo* zu bestätigen und klinisch den Zusammenhang zwischen fermentierenden Bakterien in der Mikrobiota und dem Regenerationsindex zu untersuchen. Die Erkenntnisse dieser Studie verbessern das Verständnis der Rolle von TLRs im Tumorkontext und könnten zu einer deutlichen Erhöhung der Effizienz der partiellen Hepatektomie bei an metastasiertem Darmkrebs erkrankten Personen führen.

5 Referenzen

- Ablasser, A. und S. Hur (2020). "Regulation of cGAS- and RLR-mediated immunity to nucleic acids." *Nat Immunol* **21**(1): 17-29.
- Abrams, G. D., H. Bauer und H. Sprinz (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.
- Abu Rmilah, A., W. Zhou, E. Nelson, L. Lin, B. Amiot und S. L. Nyberg (2019). "Understanding the marvels behind liver regeneration." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **8**(3): e340.
- Adams, R. B., T. A. Aloia, E. Loyer, T. M. Pawlik, B. Taouli und J. N. Vauthey (2013). "Selection for hepatic resection of colorectal liver metastases: expert consensus statement." *HPB* **15**(2): 91-103.
- Aldeguer, X., F. Debonera, A. Shaked, A. M. Krasinkas, A. E. Gelman, X. Que, G. A. Zamir, S. Hiroyasu, K. K. Kovalovich, R. Taub und K. M. Olthoff (2002). "Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration." *Hepatology* **35**(1): 40-48.
- Algars, A., H. Irjala, S. Vaittinen, H. Huhtinen, J. Sundström, M. Salmi, R. Ristamäki und S. Jalkanen (2012). "Type and location of tumor-infiltrating macrophages and lymphatic vessels predict survival of colorectal cancer patients." *Int J Cancer* **131**(4): 864-873.
- Amieva, M. und R. M. Peek, Jr. (2016). "Pathobiology of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer." *Gastroenterology* **150**(1): 64-78.
- Amieva, M. R. und E. M. El-Omar (2008). "Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection." *Gastroenterology* **134**(1): 306-323.
- Arpaia, N., C. Campbell, X. Fan, S. Dikiy, J. van der Veeken, P. deRoos, H. Liu, J. R. Cross, K. Pfeffer, P. J. Coffey und A. Y. Rudensky (2013). "Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation." *Nature* **504**(7480): 451-455.
- Arthur, J. C., R. Z. Gharaibeh, M. Mühlbauer, E. Perez-Chanona, J. M. Uronis, J. McCafferty, A. A. Fodor und C. Jobin (2014). "Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer." *Nat Commun* **5**: 4724.
- Ascenzi, F., C. De Vitis, M. Maugeri-Saccà, C. Napoli, G. Ciliberto und R. Mancini (2021). "SCD1, autophagy and cancer: implications for therapy." *J Exp Clin Cancer Res* **40**(1): 265.
- Baenke, F., B. Peck, H. Miess und A. Schulze (2013). "Hooked on fat: the role of lipid synthesis in cancer metabolism and tumour development." **6**(6): 1353-1363.
- Bagnoli, F., L. Buti, L. Tompkins, A. Covacci und M. R. Amieva (2005). "Helicobacter pylori CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(45): 16339-16344.
- Bao, Q., L. Yu, D. Chen und L. Li (2020). "Variation in the gut microbial community is associated with the progression of liver regeneration." *Hepatol Res* **50**(1): 121-136.
- Basic, M. und A. Bleich (2018). Gnotobiology. *The Gut Microbiome in Health and Disease*. D. Haller. Cham, Springer International Publishing: 341-356.
- Bell, J. K., J. Askins, P. R. Hall, D. R. Davies und D. M. Segal (2006). "The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(23): 8792-8797.

- Berg, G., D. Rybakova, D. Fischer, T. Cernava, M. C. Vergès, T. Charles, X. Chen, L. Cocolin, K. Eversole, G. H. Corral, M. Kazou, L. Kinkel, L. Lange, N. Lima, A. Loy, J. A. Macklin, E. Maguin, T. Mauchline, R. McClure, B. Mitter, M. Ryan, I. Sarand, H. Smidt, B. Schelkle, H. Roume, G. S. Kiran, J. Selvin, R. S. C. Souza, L. van Overbeek, B. K. Singh, M. Wagner, A. Walsh, A. Sessitsch und M. Schlöter (2020). "Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges." *Microbiome* **8**(1): 103.
- Beutler, B., K. Hoebe, X. Du, E. Janssen, P. Georgel und K. Tabeta (2003). "Lps2 and signal transduction in sepsis: at the intersection of host responses to bacteria and viruses." *Scand J Infect Dis* **35**(9): 563-567.
- Bianchi, F., S. Alexiadis, C. Camisaschi, M. Truini, G. Centonze, M. Milione, A. Balsari, E. Tagliabue und L. Sfondrini (2020). "TLR3 Expression Induces Apoptosis in Human Non-Small-Cell Lung Cancer." *Int J Mol Sci* **21**(4).
- Blake, S. J., Y. Wolf, B. Boursi und D. J. Lynn (2024). "Role of the microbiota in response to and recovery from cancer therapy." *Nat Rev Immunol* **24**(5): 308-325.
- Bligh, E. G. und W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can J Biochem Physiol* **37**(8): 911-917.
- Bos, J. L., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, M. Verlaan-de Vries, J. H. van Boom, A. J. van der Eb und B. Vogelstein (1987). "Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers." *Nature* **327**(6120): 293-297.
- Brennan, C. A. und W. S. Garrett (2019). "Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and oncobacterium." *Nat Rev Microbiol* **17**(3): 156-166.
- Brugiroux, S., M. Beutler, C. Pfann, D. Garzetti, H. J. Ruscheweyh, D. Ring, M. Diehl, S. Herp, Y. Lotscher, S. Hussain, B. Bunk, R. Pukall, D. H. Huson, P. C. Munch, A. C. McHardy, K. D. McCoy, A. J. Macpherson, A. Loy, T. Clavel, D. Berry und B. Stecher (2016). "Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against Salmonella enterica serovar Typhimurium." *Nat Microbiol* **2**: 16215.
- Brunell, A. E., R. Lahesmaa, A. Autio und A. K. Thotakura (2023). "Exhausted T cells hijacking the cancer-immunity cycle: Assets and liabilities." *Front Immunol* **14**: 1151632.
- Bruni, D., H. K. Angell und J. Galon (2020). "The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy." *Nat Rev Cancer* **20**(11): 662-680.
- Bugge, M., B. Bergstrom, O. K. Eide, H. Solli, I. F. Kjonstad, J. Stenvik, T. Espevik und N. J. Nilsen (2017). "Surface Toll-like receptor 3 expression in metastatic intestinal epithelial cells induces inflammatory cytokine production and promotes invasiveness." *J Biol Chem* **292**(37): 15408-15425.
- Burfeind, K. G., X. Zhu, P. R. Levasseur, K. A. Michaelis, M. A. Norgard und D. L. Marks (2018). "TRIF is a key inflammatory mediator of acute sickness behavior and cancer cachexia." *Brain Behav Immun* **73**: 364-374.
- Camarinha-Silva, A. und W. F. Fricke (2018). Molecular Microbiome Analysis. *The Gut Microbiome in Health and Disease*. D. Haller. Cham, Springer International Publishing: 49-65.
- Casasanta, M. A., C. C. Yoo, B. Udayasuryan, B. E. Sanders, A. Umaña, Y. Zhang, H. Peng, A. J. Duncan, Y. Wang, L. Li, S. S. Verbridge und D. J. Slade (2020). "Fusobacterium nucleatum host-cell binding and invasion induces IL-8 and CXCL1 secretion that drives colorectal cancer cell migration." *Sci Signal* **13**(641).

- Castellaneta, A., A. Di Leo, R. Francavilla, M. Margiotta, M. Barone, A. Amoroso, L. Troiani, A. W. Thomson und A. Francavilla (2006). "Functional modification of CD11c+ liver dendritic cells during liver regeneration after partial hepatectomy in mice." *Hepatology* **43**(4): 807-816.
- Cerami, E., J. Gao, U. Dogrusoz, B. E. Gross, S. O. Sumer, B. A. Aksoy, A. Jacobsen, C. J. Byrne, M. L. Heuer, E. Larsson, Y. Antipin, B. Reva, A. P. Goldberg, C. Sander und N. Schultz (2012). "The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data." *Cancer Discov* **2**(5): 401-404.
- Chaffer, C. L. und R. A. Weinberg (2011). "A perspective on cancer cell metastasis." *Science* **331**(6024): 1559-1564.
- Chang, P. V., L. Hao, S. Offermanns und R. Medzhitov (2014). "The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(6): 2247-2252.
- Chen, J., J. Li, J. H. C. Yiu, J. K. W. Lam, C. M. Wong, B. Dorweiler, A. Xu und C. W. Woo (2017). "TRIF-dependent Toll-like receptor signaling suppresses Scd1 transcription in hepatocytes and prevents diet-induced hepatic steatosis." *Sci Signal* **10**(491).
- Cheng, C. T., C. Y. Kuo und D. K. Ann (2014). "KAPtain in charge of multiple missions: Emerging roles of KAP1." *World J Biol Chem* **5**(3): 308-320.
- Cheng, Y., Z. Ling und L. Li (2020). "The Intestinal Microbiota and Colorectal Cancer." *Front Immunol* **11**: 615056.
- Chu, M. J., A. J. Dare, A. R. Phillips und A. S. Bartlett (2015). "Donor Hepatic Steatosis and Outcome After Liver Transplantation: a Systematic Review." *J Gastrointest Surg* **19**(9): 1713-1724.
- Coleman, O. I., E. M. Lobner, S. Bierwirth, A. Sorbie, N. Waldschmitt, E. Rath, E. Berger, I. Lagkouvardos, T. Clavel, K. D. McCoy, A. Weber, M. Heikenwalder, K. P. Janssen und D. Haller (2018). "Activated ATF6 Induces Intestinal Dysbiosis and Innate Immune Response to Promote Colorectal Tumorigenesis." *Gastroenterology* **155**(5): 1539-1552.e1512.
- Cornell, R. P., B. L. Liljequist und K. F. Bartizal (1990). "Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice." *Hepatology* **11**(6): 916-922.
- Cougnoux, A., G. Dalmasso, R. Martinez, E. Buc, J. Delmas, L. Gibold, P. Sauvanet, C. Darcha, P. Déchelotte, M. Bonnet, D. Pezet, H. Wodrich, A. Darfeuille-Michaud und R. Bonnet (2014). "Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype." *Gut* **63**(12): 1932-1942.
- Cremonesi, E., V. Governa, J. F. G. Garzon, V. Mele, F. Amicarella, M. G. Muraro, E. Trella, V. Galati-Fournier, D. Oertli, S. R. Daster, R. A. Droesser, B. Weixler, M. Bolli, R. Rosso, U. Nitsche, N. Khanna, A. Egli, S. Keck, J. Slotta-Huspenina, L. M. Terracciano, P. Zajac, G. C. Spagnoli, S. Eppenberger-Castori, K. P. Janssen, L. Borsig und G. Iezzi (2018). "Gut microbiota modulate T cell trafficking into human colorectal cancer." *Gut* **67**(11): 1984-1994.
- Cressman, D. E., L. E. Greenbaum, R. A. DeAngelis, G. Ciliberto, E. E. Furth, V. Poli und R. Taub (1996). "Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice." *Science* **274**(5291): 1379-1383.

- Cuevas-Ramos, G., C. R. Petit, I. Marcq, M. Boury, E. Oswald und J. P. Nougayrède (2010). "Escherichia coli induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(25): 11537-11542.
- Daud, A. I. (2018). "Negative but not futile: MAGE-A3 immunotherapeutic for melanoma." *Lancet Oncol* **19**(7): 852-853.
- de Bruijn, I., R. Kundra, B. Mastrogiacomo, T. N. Tran, L. Sikina, T. Mazor, X. Li, A. Ochoa, G. Zhao, B. Lai, A. Abeshouse, D. Baiceanu, E. Ciftci, U. Dogrusoz, A. Dufilie, Z. Erkoc, E. Garcia Lara, Z. Fu, B. E. Gross, C. D. Haynes, A. Heath, D. M. Higgins, P. Jagannathan, K. Kalletta, P. Kumari, J. R. Lindsay, A. Lisman, B. Leenknegt, P. Lukasse, D. Madala, R. Madupuri, P. van Nierop, O. Plantalech, J. Quach, A. Resnick, S. Y. A. Rodenburg, B. A. Satravada, F. Schaeffer, R. Sheridan, J. Singh, R. Sirohi, S. O. Sumer, S. van Hagen, A. Wang, M. Wilson, H. Zhang, K. Zhu, N. Rusk, S. Brown, J. A. Lavery, K. S. Panageas, J. E. Rudolph, M. L. LeNoue-Newton, J. L. Warner, X. Guo, H. Hunter-Zinck, T. V. Yu, S. Pillai, C. Nichols, S. M. Gardos, J. Philip, G. Bpc Core Team, A. Project Genie Consortium, K. L. Kehl, G. J. Riely, D. Schrag, J. Lee, M. V. Fiandalo, S. M. Sweeney, T. J. Pugh, C. Sander, E. Cerami, J. Gao und N. Schultz (2023). "Analysis and Visualization of Longitudinal Genomic and Clinical Data from the AACR Project GENIE Biopharma Collaborative in cBioPortal." *Cancer Res.*
- De Waele, J., E. Marcq, J. R. Van Audenaerde, J. Van Loenhout, C. Deben, K. Zwaenepoel, E. Van de Kelft, D. Van der Planken, T. Menovsky, J. M. Van den Bergh, Y. Willemsen, P. Pauwels, Z. N. Berneman, F. Lardon, M. Peeters, A. Wouters und E. L. Smits (2018). "Poly(I:C) primes primary human glioblastoma cells for an immune response invigorated by PD-L1 blockade." *Oncoimmunology* **7**(3): e1407899.
- Dejea, C. M., E. C. Wick, E. M. Hechenbleikner, J. R. White, J. L. Mark Welch, B. J. Rossetti, S. N. Peterson, E. C. Snedrud, G. G. Borisy, M. Lazarev, E. Stein, J. Vadivelu, A. C. Roslani, A. A. Malik, J. W. Wanyiri, K. L. Goh, I. Thevambiga, K. Fu, F. Wan, N. Llosa, F. Housseau, K. Romans, X. Wu, F. M. McAllister, S. Wu, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, D. M. Pardoll und C. L. Sears (2014). "Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(51): 18321-18326.
- Del Basso, C., M. Gaillard, P. Lainas, S. Zervaki, G. Perlemuter, P. Chagué, L. Rocher, C. S. Voican, I. Dagher und H. Tranchart (2021). "Current strategies to induce liver remnant hypertrophy before major liver resection." *World J Hepatol* **13**(11): 1629-1641.
- den Besten, G., K. van Eunen, A. K. Groen, K. Venema, D. J. Reijngoud und B. M. Bakker (2013). "The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism." *J Lipid Res* **54**(9): 2325-2340.
- Derosa, L., B. Routy, A. Desilets, R. Daillère, S. Terrisse, G. Kroemer und L. Zitvogel (2021). "Microbiota-Centered Interventions: The Next Breakthrough in Immuno-Oncology?" *Cancer Discov* **11**(10): 2396-2412.
- Di-Iacovo, N., S. Pieroni, D. Piobbico, M. Castelli, D. Scopetti, S. Ferracchiato, M. A. Della-Fazia und G. Servillo (2023). "Liver Regeneration and Immunity: A Tale to Tell." *Int J Mol Sci* **24**(2).
- Dillon, P. M., G. R. Petroni, M. E. Smolkin, D. R. Brenin, K. A. Chianese-Bullock, K. T. Smith, W. C. Olson, I. S. Fanous, C. J. Nail, C. M. Brenin, E. H. Hall und C. L. Slingluff, Jr. (2017). "A pilot study of the immunogenicity of a 9-peptide breast

- cancer vaccine plus poly-ICLC in early stage breast cancer." *J Immunother Cancer* **5**(1): 92.
- Dixon, M., J. Cruz, N. Sarwani und N. Gusani (2021). "The Future Liver Remnant : Definition, Evaluation, and Management." *Am Surg* **87**(2): 276-286.
- Dold, M. N., X. Ng, C. Alber, I. E. Gentle, G. Häcker und A. Weber (2022). "The deubiquitinase Usp27x as a novel regulator of cFLIP(L) protein expression and sensitizer to death-receptor-induced apoptosis." *Apoptosis* **27**(1-2): 112-132.
- Doll, D., L. Keller, M. Maak, A. L. Boulesteix, J. R. Siewert, B. Holzmans und K. P. Janssen (2010). "Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival." *Int J Colorectal Dis* **25**(5): 573-581.
- Dongre, A. und R. A. Weinberg (2019). "New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**(2): 69-84.
- Downward, J. (2003). "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **3**(1): 11-22.
- Duan, Q., H. Zhang, J. Zheng und L. Zhang (2020). "Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment." *Trends Cancer* **6**(7): 605-618.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old und R. D. Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-998.
- 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.
- Eaden, J. (2004). "Review article: colorectal carcinoma and inflammatory bowel disease." *Aliment Pharmacol Ther* **20 Suppl 4**: 24-30.
- Ecker, J., E. Benedetti, A. S. D. Kindt, M. Horing, M. Perl, A. C. Machmuller, A. Sichler, J. Plagge, Y. Wang, S. Zeissig, A. Shevchenko, R. Burkhardt, J. Krumsiek, G. Liebisch und K. P. Janssen (2021). "The Colorectal Cancer Lipidome: Identification of a Robust Tumor-Specific Lipid Species Signature." *Gastroenterology* **161**(3): 910-923 e919.
- Ecker, J., G. Liebisch, M. Englmaier, M. Grandl, H. Robenek und G. Schmitz (2010). "Induction of fatty acid synthesis is a key requirement for phagocytic differentiation of human monocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(17): 7817-7822.
- el Marjou, F., K. P. Janssen, B. H. Chang, M. Li, V. Hindie, L. Chan, D. Louvard, P. Chambon, D. Metzger und S. Robine (2004). "Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium." *Genesis* **39**(3): 186-193.
- Elinav, E., W. S. Garrett, G. Trinchieri und J. Wargo (2019). "The cancer microbiome." *Nat Rev Cancer* **19**(7): 371-376.
- Eskandari, F., S. Zolfaghari, A. Yazdanpanah, R. M. Shabestari, M. R. Fomeshi, P. B. Milan, J. Kiani, M. S. Zomorrod und M. Safa (2023). "TLR3 stimulation improves the migratory potency of adipose-derived mesenchymal stem cells through the stress response pathway in the melanoma mouse model." *Mol Biol Rep* **50**(3): 2293-2304.
- Ewald, S. E., A. Engel, J. Lee, M. Wang, M. Bogyo und G. M. Barton (2011). "Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase." *J Exp Med* **208**(4): 643-651.

- Facciabene, A., G. T. Motz und G. Coukos (2012). "T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis." *Cancer Res* **72**(9): 2162-2171.
- Fan, L., P. Zhou, Q. Hong, A. X. Chen, G. Y. Liu, K. D. Yu und Z. M. Shao (2019). "Toll-like receptor 3 acts as a suppressor gene in breast cancer initiation and progression: a two-stage association study and functional investigation." *Oncoimmunology* **8**(6): e1593801.
- Fausto, N., J. S. Campbell und K. J. Riehle (2006). "Liver regeneration." *Hepatology* **43**(2 Suppl 1): S45-53.
- Fearon, E. R. und B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-767.
- Fernandes, M. R., P. Aggarwal, R. G. F. Costa, A. M. Cole und G. Trinchieri (2022). "Targeting the gut microbiota for cancer therapy." *Nature Reviews Cancer* **22**(12): 703-722.
- Fitzgerald, K. A. und J. C. Kagan (2020). "Toll-like Receptors and the Control of Immunity." *Cell* **180**(6): 1044-1066.
- Florke Gee, R. R., H. Chen, A. K. Lee, C. A. Daly, B. A. Wilander, K. Fon Tacer und P. R. Potts (2020). "Emerging roles of the MAGE protein family in stress response pathways." *J Biol Chem* **295**(47): 16121-16155.
- Flowers, M. T. und J. M. Ntambi (2008). "Role of stearyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism." *Curr Opin Lipidol* **19**(3): 248-256.
- Fodde, R., W. Edelmann, K. Yang, C. van Leeuwen, C. Carlson, B. Renault, C. Breukel, E. Alt, M. Lipkin, P. M. Khan und 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.
- Franke, F. C., B. O. Slusarenko, T. Engleitner, W. Johannes, M. Laschinger, R. Rad, U. Nitsche und K. P. Janssen (2020). "Novel role for CRK adaptor proteins as essential components of SRC/FAK signaling for epithelial-mesenchymal transition and colorectal cancer aggressiveness." *Int J Cancer* **147**(6): 1715-1731.
- Fre, S., D. Vignjevic, M. Schoumacher, S. L. Duffy, K. P. Janssen, S. Robine und D. Louvard (2008). "Epithelial morphogenesis and intestinal cancer: new insights in signaling mechanisms." *Adv Cancer Res* **100**: 85-111.
- Friedl, P. und K. Wolf (2003). "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms." *Nat Rev Cancer* **3**(5): 362-374.
- Friedman, J. R., W. J. Fredericks, D. E. Jensen, D. W. Speicher, X. P. Huang, E. G. Neilson und F. J. Rauscher, 3rd (1996). "KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain." *Genes Dev* **10**(16): 2067-2078.
- Fu, J., X. Zong, M. Jin, J. Min, F. Wang und Y. Wang (2023). "Mechanisms and regulation of defensins in host defense." *Signal Transduct Target Ther* **8**(1): 300.
- Fung, K. Y., L. Cosgrove, T. Lockett, R. Head und D. L. Topping (2012). "A review of the potential mechanisms for the lowering of colorectal oncogenesis by butyrate." *Br J Nutr* **108**(5): 820-831.
- Furusawa, Y., Y. Obata, S. Fukuda, T. A. Endo, G. Nakato, D. Takahashi, Y. Nakanishi, C. Uetake, K. Kato, T. Kato, M. Takahashi, N. N. Fukuda, S. Murakami, E. Miyauchi, S. Hino, K. Atarashi, S. Onawa, Y. Fujimura, T. Lockett, J. M. Clarke, D. L. Topping, M. Tomita, S. Hori, O. Ohara, T. Morita, H. Koseki, J. Kikuchi, K. Honda, K. Hase und H. Ohno (2013). "Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells." *Nature* **504**(7480): 446-450.

- Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pages, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoue, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman und F. Pages (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." *Science* **313**(5795): 1960-1964.
- Gao, D., M. J. Ciancanelli, P. Zhang, O. Harschnitz, V. Bondet, M. Hasek, J. Chen, X. Mu, Y. Itan, A. Cobat, V. Sancho-Shimizu, B. Bigio, L. Lorenzo, G. Ciceri, J. McAlpine, E. Anguiano, E. Jouanguy, D. Chaussabel, I. Meyts, M. S. Diamond, L. Abel, S. Hur, G. A. Smith, L. Notarangelo, D. Duffy, L. Studer, J. L. Casanova und S. Y. Zhang (2021). "TLR3 controls constitutive IFN- β antiviral immunity in human fibroblasts and cortical neurons." *J Clin Invest* **131**(1).
- Gao, J., B. A. Aksoy, U. Dogrusoz, G. Dresdner, B. Gross, S. O. Sumer, Y. Sun, A. Jacobsen, R. Sinha, E. Larsson, E. Cerami, C. Sander und N. Schultz (2013). "Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal." *Sci Signal* **6**(269): pl1.
- Gao, X., G. Chen, H. Cai, X. Wang, K. Song, L. Liu, T. Qiu und Y. He (2020). "Aberrantly enhanced melanoma-associated antigen (MAGE)-A3 expression facilitates cervical cancer cell proliferation and metastasis via actuating Wnt signaling pathway." *Biomed Pharmacother* **122**: 109710.
- Garcia-Cattaneo, A., F. X. Gobert, M. Müller, F. Toscano, M. Flores, A. Lescure, E. Del Nery und P. Benaroch (2012). "Cleavage of Toll-like receptor 3 by cathepsins B and H is essential for signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(23): 9053-9058.
- Garcias Lopez, A., V. Bekiaris, K. Muller Luda, J. Hutter, I. Ulmert, K. Getachew Muleta, J. Nakawesi, K. Kotarsky, B. Malissen, M. O'Keeffe, B. Holzmann, W. Winston Agace und K. Lahl (2020). "Migration of murine intestinal dendritic cell subsets upon intrinsic and extrinsic TLR3 stimulation." *Eur J Immunol* **50**(10): 1525-1536.
- Gay, N. J., M. F. Symmons, M. Gangloff und C. E. Bryant (2014). "Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes." *Nat Rev Immunol* **14**(8): 546-558.
- Gebhardt, T., S. L. Park und I. A. Parish (2023). "Stem-like exhausted and memory CD8(+) T cells in cancer." *Nat Rev Cancer* **23**(11): 780-798.
- Gerstberger, S., Q. Jiang und K. Ganesh (2023). "Metastasis." *Cell* **186**(8): 1564-1579.
- Gill, S. R., M. Pop, R. T. Deboy, P. B. Eckburg, P. J. Turnbaugh, B. S. Samuel, J. I. Gordon, D. A. Relman, C. M. Fraser-Liggett und K. E. Nelson (2006). "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome." *Science* **312**(5778): 1355-1359.
- Goh, Y. P., N. C. Henderson, J. E. Heredia, A. Red Eagle, J. I. Odegaard, N. Lehwald, K. D. Nguyen, D. Sheppard, L. Mukundan, R. M. Locksley und A. Chawla (2013). "Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(24): 9914-9919.
- Gong, T., L. Liu, W. Jiang und R. Zhou (2020). "DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases." *Nature Reviews Immunology* **20**(2): 95-112.
- Goodman, B. und H. Gardner (2018). "The microbiome and cancer." *J Pathol* **244**(5): 667-676.
- Gowen, B. B., J. D. Hoopes, M. H. Wong, K. H. Jung, K. C. Isakson, L. Alexopoulou, R. A. Flavell und R. W. Sidwell (2006). "TLR3 deletion limits mortality and disease severity due to Phlebovirus infection." *J Immunol* **177**(9): 6301-6307.

- Grasa, L., L. Abecia, R. Forcén, M. Castro, J. A. de Jalón, E. Latorre, A. I. Alcalde und M. D. Murillo (2015). "Antibiotic-Induced Depletion of Murine Microbiota Induces Mild Inflammation and Changes in Toll-Like Receptor Patterns and Intestinal Motility." *Microb Ecol* **70**(3): 835-848.
- Grivennikov, S. I., K. Wang, D. Mucida, C. A. Stewart, B. Schnabl, D. Jauch, K. Taniguchi, G.-Y. Yu, C. H. Österreicher, K. E. Hung, C. Datz, Y. Feng, E. R. Fearon, M. Oukka, L. Tessarollo, V. Coppola, F. Yarovinsky, H. Cheroutre, L. Eckmann, G. Trinchieri und M. Karin (2012). "Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth." *Nature* **491**(7423): 254-258.
- Groden, J., A. Thliveris, W. Samowitz, M. Carlson, L. Gelbert, H. Albertsen, G. Joslyn, J. Stevens, L. Spirio, M. Robertson und et al. (1991). "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." *Cell* **66**(3): 589-600.
- Grzywa, T. M., A. Sosnowska, P. Matryba, Z. Rydzynska, M. Jasinski, D. Nowis und J. Golab (2020). "Myeloid Cell-Derived Arginase in Cancer Immune Response." *Front Immunol* **11**: 938.
- Guillerey, C., M. T. Chow, K. Miles, S. Olver, J. Sceneay, K. Takeda, A. Moller und M. J. Smyth (2015). "Toll-like receptor 3 regulates NK cell responses to cytokines and controls experimental metastasis." *Oncoimmunology* **4**(9): e1027468.
- Gülden, E., C. Chao, N. Tai, J. A. Pearson, J. Peng, M. Majewska-Szczepanik, Z. Zhou, F. S. Wong und L. Wen (2018). "TRIF deficiency protects non-obese diabetic mice from type 1 diabetes by modulating the gut microbiota and dendritic cells." *J Autoimmun* **93**: 57-65.
- Gupta, G. P. und J. Massague (2006). "Cancer metastasis: building a framework." *Cell* **127**(4): 679-695.
- Gur, C., Y. Ibrahim, B. Isaacson, R. Yamin, J. Abed, M. Gamliel, J. Enk, Y. Bar-On, N. Stanietzky-Kaynan, S. Copenhagen-Glazer, N. Shussman, G. Almogy, A. Cuapio, E. Hofer, D. Mevorach, A. Tabib, R. Ortenberg, G. Markel, K. Miklić, S. Jonjic, C. A. Brennan, W. S. Garrett, G. Bachrach und O. Mandelboim (2015). "Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack." *Immunity* **42**(2): 344-355.
- Haddaoui, H. E., C. W. van Eijck, M. Doukas, T. P. van den Bosch, P. M. van Koetsveld, L. J. Hofland, D. A. Mustafa und C. H. van Eijck (2023). "Rintatolimod: a potential treatment in patients with pancreatic cancer expressing Toll-like receptor 3." *Am J Cancer Res* **13**(6): 2657-2669.
- Hamano, M., H. Ezaki, S. Kiso, K. Furuta, M. Egawa, T. Kizu, N. Chatani, Y. Kamada, Y. Yoshida und T. Takehara (2014). "Lipid overloading during liver regeneration causes delayed hepatocyte DNA replication by increasing ER stress in mice with simple hepatic steatosis." *J Gastroenterol* **49**(2): 305-316.
- Han, B., C. Zhang, X. Wang, H. Song, L. Zhang, T. Li, J. He und H. Zhao (2023). "The Functional Mechanisms of Toll-Like Receptor 3 and Its Implications in Digestive System Tumors." *Front Biosci (Landmark Ed)* **28**(11): 297.
- Hanahan, D. (2022). "Hallmarks of Cancer: New Dimensions." *Cancer Discov* **12**(1): 31-46.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

- Harashima, N., T. Inao, R. Imamura, S. Okano, T. Suda und M. Harada (2012). "Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells." Cancer Immunol Immunother **61**(5): 667-676.
- Hayhurst, G. P., Y.-H. Lee, G. Lambert, J. M. Ward und F. J. Gonzalez (2001). "Hepatocyte Nuclear Factor 4 α (Nuclear Receptor 2A1) Is Essential for Maintenance of Hepatic Gene Expression and Lipid Homeostasis." Molecular and Cellular Biology **21**(4): 1393-1403.
- Heck, A. M., J. A. Yanovski und K. A. Calis (2000). "Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity." Pharmacotherapy **20**(3): 270-279.
- Heigwer, F., G. Kerr und M. Boutros (2014). "E-CRISP: fast CRISPR target site identification." Nat Methods **11**(2): 122-123.
- Hidalgo-Sastre, A., L. A. Kuebelsbeck, L. S. Jochheim, L. M. Stauffer, F. Altmayr, W. Johannes, K. Steiger, M. Ronderos, D. Hartmann, N. Huser, R. M. Schmid, B. Holzmann und G. von Figura (2021). "Toll-like receptor 3 expression in myeloid cells is essential for efficient regeneration after acute pancreatitis in mice." Eur J Immunol **51**(5): 1182-1194.
- Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han und B. Beutler (2003). "Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling." Nature **424**(6950): 743-748.
- Hohmann, M., V. Brunner, W. Johannes, D. Schum, L. M. Carroll, T. Liu, D. Sasaki, J. Bosch, T. Clavel, S. A. Sieber, G. Zeller, M. Tschurtschenthaler, K. P. Janßen und T. A. M. Gulder (2024). "Bacillamide D produced by *Bacillus cereus* from the mouse intestinal bacterial collection (miBC) is a potent cytotoxin in vitro." Commun Biol **7**(1): 655.
- Holecek, M. (1999). "Nutritional modulation of liver regeneration by carbohydrates, lipids, and amino acids: a review." Nutrition **15**(10): 784-788.
- Holtorf, A., A. Conrad, B. Holzmann und K. P. Janssen (2018). "Cell-type specific MyD88 signaling is required for intestinal tumor initiation and progression to malignancy." Oncoimmunology **7**(8): e1466770.
- Hou, H., D. Chen, K. Zhang, W. Zhang, T. Liu, S. Wang, X. Dai, B. Wang, W. Zhong und H. Cao (2022). "Gut microbiota-derived short-chain fatty acids and colorectal cancer: Ready for clinical translation?" Cancer Lett **526**: 225-235.
- Hou, K., Z. X. Wu, X. Y. Chen, J. Q. Wang, D. Zhang, C. Xiao, D. Zhu, J. B. Koya, L. Wei, J. Li und Z. S. Chen (2022). "Microbiota in health and diseases." Signal Transduct Target Ther **7**(1): 135.
- Hsu, C. L. und B. Schnabl (2023). "The gut-liver axis and gut microbiota in health and liver disease." Nat Rev Microbiol **21**(11): 719-733.
- Hsu, P. P. und D. M. Sabatini (2008). "Cancer cell metabolism: Warburg and beyond." Cell **134**(5): 703-707.
- Hu, H., H. Gehart, B. Artegiani, C. López-Iglesias, F. Dekkers, O. Basak, J. van Es, S. M. Chuva de Sousa Lopes, H. Begthel, J. Korving, M. van den Born, C. Zou, C. Quirk, L. Chiriboga, C. M. Rice, S. Ma, A. Rios, P. J. Peters, Y. P. de Jong und H. Clevers (2018). "Long-Term Expansion of Functional Mouse and Human Hepatocytes as 3D Organoids." Cell **175**(6): 1591-1606.e1519.
- Hu, Y., R. Wang, J. Liu, Y. Wang und J. Dong (2023). "Lipid droplet deposition in the regenerating liver: A promoter, inhibitor, or bystander?" Hepatol Commun **7**(10).

- Huhta, H., O. Helminen, J. H. Kauppila, T. Salo, K. Porvari, J. Saarnio, P. P. Lehenkari und T. J. Karttunen (2016). "The Expression of Toll-like Receptors in Normal Human and Murine Gastrointestinal Organs and the Effect of Microbiome and Cancer." *J Histochem Cytochem* **64**(8): 470-482.
- Iftekhar, A. S., A ; Janssen, K-P; Sagal, m. und a. M. Sigal (2018). Microbiome and Diseases: Colorectal Cancer. *The Gut Microbiome in Health and Disease*. D. Haller, Springer International Publishing AG. **1**: 231 - 250.
- Inoue, R., T. Yajima und T. Tsukahara (2017). "Expression of TLR2 and TLR4 in murine small intestine during postnatal development." *Biosci Biotechnol Biochem* **81**(2): 350-358.
- Iruarizaga-Lejarreta, M., M. Varela-Rey, D. Fernández-Ramos, I. Martínez-Arranz, T. C. Delgado, J. Simon, V. G. Juan, L. delaCruz-Villar, M. Azkargorta, J. L. Lavin, R. Mayo, S. M. Van Liempd, I. Aurrekoetxea, X. Buqué, D. D. Cave, A. Peña, J. Rodríguez-Cuesta, A. M. Aransay, F. Elortza, J. M. Falcón-Pérez, P. Aspichueta, L. Hayardeny, M. Nouredin, A. J. Sanyal, C. Alonso, J. Anguita, M. L. Martínez-Chantar, S. C. Lu und J. M. Mato (2017). "Role of Aramchol in steatohepatitis and fibrosis in mice." *Hepatol Commun* **1**(9): 911-927.
- James D. Brierley (Editor), M. K. G. E., Christian Wittekind (Editor) (2017). *TNM Classification of Malignant Tumours*, Wiley-Blackwell.
- Janssen, K. P., F. el-Marjou, D. Pinto, X. Sastre, D. Rouillard, C. Fouquet, T. Soussi, D. Louvard und S. Robine (2002). "Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice." *Gastroenterology* **123**(2): 492-504.
- Jarosch, S., J. Köhlen, S. Wagner, E. D'Ippolito und D. H. Busch (2022). "ChipCytometry for multiplexed detection of protein and mRNA markers on human FFPE tissue samples." *STAR Protoc* **3**(2): 101374.
- Javaid, N. und S. Choi (2020). "Toll-like Receptors from the Perspective of Cancer Treatment." *Cancers (Basel)* **12**(2).
- Jia, D., W. Yang, L. Li, H. Liu, Y. Tan, S. Ooi, L. Chi, L. G. Fillion, D. Figeys und L. Wang (2015). "β-Catenin and NF-κB co-activation triggered by TLR3 stimulation facilitates stem cell-like phenotypes in breast cancer." *Cell Death Differ* **22**(2): 298-310.
- Kalina, U., N. Koyama, T. Hosoda, H. Nuernberger, K. Sato, D. Hoelzer, F. Herweck, T. Manigold, M. V. Singer, S. Rossol und U. Böcker (2002). "Enhanced production of IL-18 in butyrate-treated intestinal epithelium by stimulation of the proximal promoter region." *Eur J Immunol* **32**(9): 2635-2643.
- Karim, M. R., S. Iqbal, S. Mohammad, M. N. Morshed, M. A. Haque, R. Mathiyalagan, D. C. Yang, Y. J. Kim, J. H. Song und D. U. Yang (2024). "Butyrate's (a short-chain fatty acid) microbial synthesis, absorption, and preventive roles against colorectal and lung cancer." *Arch Microbiol* **206**(4): 137.
- Kaur, H. und S. A. Ali (2022). "Probiotics and gut microbiota: mechanistic insights into gut immune homeostasis through TLR pathway regulation." *Food Funct* **13**(14): 7423-7447.
- Kawai, T. und S. Akira (2006). "TLR signaling." *Cell Death Differ* **13**(5): 816-825.
- Kawai, T., M. Ikegawa, D. Ori und S. Akira (2024). "Decoding Toll-like receptors: Recent insights and perspectives in innate immunity." *Immunity* **57**(4): 649-673.
- Kawashima, T., N. Ikari, Y. Watanabe, Y. Kubota, S. Yoshio, T. Kanto, S. Motohashi, N. Shimojo und N. M. Tsuji (2018). "Double-Stranded RNA Derived from Lactic Acid

- Bacteria Augments Th1 Immunity via Interferon-beta from Human Dendritic Cells." *Front Immunol* **9**: 27.
- Kawashima, T., N. Ikari, Y. Watanabe, Y. Kubota, S. Yoshio, T. Kanto, S. Motohashi, N. Shimojo und N. M. Tsuji (2018). "Double-Stranded RNA Derived from Lactic Acid Bacteria Augments Th1 Immunity via Interferon- β from Human Dendritic Cells." *Frontiers in immunology* **9**: 27-27.
- Kawashima, T., A. Kosaka, H. Yan, Z. Guo, R. Uchiyama, R. Fukui, D. Kaneko, Y. Kumagai, D.-J. You, J. Carreras, S. Uematsu, Myoung H. Jang, O. Takeuchi, T. Kaisho, S. Akira, K. Miyake, H. Tsutsui, T. Saito, I. Nishimura und Noriko M. Tsuji (2013). "Double-Stranded RNA of Intestinal Commensal but Not Pathogenic Bacteria Triggers Production of Protective Interferon- β ." *Immunity* **38**(6): 1187-1197.
- Keck, J., J. Gaedcke, M. Ghadimi und T. Lorf (2022). "Surgical Therapy in Patients with Colorectal Liver Metastases." *Digestion* **103**(4): 245-252.
- Khan Mirzaei, M., J. Xue, R. Costa, J. Ru, S. Schulz, Z. E. Taranu und L. Deng (2021). "Challenges of Studying the Human Virome - Relevant Emerging Technologies." *Trends Microbiol* **29**(2): 171-181.
- Khan, S., A. Khalid, R. Yang, F. Khalid, M. H. Zahid, H. Liu, Y. Zhang und Z. Wang (2023). "Effect of Bacillus subtilis Supplemented Diet on Broiler's Intestinal Microbiota and TLRs Gene Expression." *Probiotics Antimicrob Proteins*.
- Kim, R., M. Emi und K. Tanabe (2007). "Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape." *Immunology* **121**(1): 1-14.
- Kim, S., A. Covington und E. G. Pamer (2017). "The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens." *Immunol Rev* **279**(1): 90-105.
- Kindt, A., G. Liebisch, T. Clavel, D. Haller, G. Hörmannspurger, H. Yoon, D. Kolmeder, A. Sigrüener, S. Krautbauer, C. Seeliger, A. Ganzha, S. Schweizer, R. Morisset, T. Strowig, H. Daniel, D. Helm, B. Küster, J. Krumsiek und J. Ecker (2018). "The gut microbiota promotes hepatic fatty acid desaturation and elongation in mice." *Nat Commun* **9**(1): 3760.
- Kistner, L., D. Doll, A. Holtorf, U. Nitsche und K. P. Janssen (2017). "Interferon-inducible CXC-chemokines are crucial immune modulators and survival predictors in colorectal cancer." *Oncotarget* **8**(52): 89998-90012.
- Koeppel, M., F. Garcia-Alcalde, F. Glowinski, P. Schlaermann und T. F. Meyer (2015). "Helicobacter pylori Infection Causes Characteristic DNA Damage Patterns in Human Cells." *Cell Rep* **11**(11): 1703-1713.
- Kohjima, M., T. H. Tsai, B. C. Tackett, S. Thevananther, L. Li, B. H. Chang und L. Chan (2013). "Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adipose differentiation related protein-null mice." *J Hepatol* **59**(6): 1246-1254.
- Kohtz, P. D., A. L. Halpern, M. A. Eldeiry, K. Hazel, S. Kalatardi, L. Ao, X. Meng, T. B. Reece, D. A. Fullerton und M. J. Weyant (2019). "Toll-Like Receptor-4 Is a Mediator of Proliferation in Esophageal Adenocarcinoma." *Ann Thorac Surg* **107**(1): 233-241.
- Kostic, A. D., E. Chun, L. Robertson, J. N. Glickman, C. A. Gallini, M. Michaud, T. E. Clancy, D. C. Chung, P. Lochhead, G. L. Hold, E. M. El-Omar, D. Brenner, C. S. Fuchs, M. Meyerson und W. S. Garrett (2013). "Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment." *Cell Host Microbe* **14**(2): 207-215.

- Kozich, J. J., S. L. Westcott, N. T. Baxter, S. K. Highlander und P. D. Schloss (2013). "Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform." *Appl Environ Microbiol* **79**(17): 5112-5120.
- Krenz, B., A. Gebhardt-Wolf, C. P. Ade, A. Gaballa, F. Roehrig, E. Vendelova, A. Baluapuri, U. Eilers, P. Gallant, L. D'Artista, A. Wiegering, G. Gasteiger, M. T. Rosenfeldt, S. Bauer, L. Zender, E. Wolf und M. Eilers (2021). "MYC- and MIZ1-Dependent Vesicular Transport of Double-Strand RNA Controls Immune Evasion in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Cancer Res* **81**(16): 4242-4256.
- Kumar, H., T. Kawai und S. Akira (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." *Int Rev Immunol* **30**(1): 16-34.
- Kwok, A. C. und J. T. Wong (2005). "Lipid biosynthesis and its coordination with cell cycle progression." *Plant Cell Physiol* **46**(12): 1973-1986.
- Labun, K., T. G. Montague, J. A. Gagnon, S. B. Thyme und E. Valen (2016). "CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering." *Nucleic Acids Res* **44**(W1): W272-276.
- Lagkouvardos, I., S. Fischer, N. Kumar und T. Clavel (2017). "Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons." *PeerJ* **5**: e2836.
- Lagkouvardos, I., D. Joseph, M. Kapfhammer, S. Giritli, M. Horn, D. Haller und T. Clavel (2016). "IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies." *Sci Rep* **6**: 33721.
- Lambert, A. W., D. R. Pattabiraman und R. A. Weinberg (2017). "Emerging Biological Principles of Metastasis." *Cell* **168**(4): 670-691.
- Lee, G. A., Y. W. Chang, W. L. Lin, Y. S. H. Yang, W. J. Chen, F. H. Huang und Y. R. Liu (2023). "Modulatory Effects of Heat-Inactivated Streptococcus Thermophilus Strain 7 on the Inflammatory Response: A Study on an Animal Model with TLR3-Induced Intestinal Injury." *Microorganisms* **11**(2).
- Leggett, B. und V. Whitehall (2010). "Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis." *Gastroenterology* **138**(6): 2088-2100.
- Leifer, C. A. und A. E. Medvedev (2016). "Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling." *J Leukoc Biol* **100**(5): 927-941.
- Leonard, J. N., R. Ghirlando, J. Askins, J. K. Bell, D. H. Margulies, D. R. Davies und D. M. Segal (2008). "The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(1): 258-263.
- Li, N. und J. Hua (2017). "Immune cells in liver regeneration." *Oncotarget* **8**(2): 3628-3639.
- Liebl, M. C. und T. G. Hofmann (2021). "The Role of p53 Signaling in Colorectal Cancer." *Cancers (Basel)* **13**(9).
- Litvak, Y., M. X. Byndloss und A. J. Baumler (2018). "Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota." *Science* **362**(6418).
- Liu, H. X., C. S. Rocha, S. Dandekar und Y. J. Wan (2016). "Functional analysis of the relationship between intestinal microbiota and the expression of hepatic genes and pathways during the course of liver regeneration." *J Hepatol* **64**(3): 641-650.
- Loomba, R., V. Seguritan, W. Li, T. Long, N. Klitgord, A. Bhatt, P. S. Dulai, C. Caussy, R. Bettencourt, S. K. Highlander, M. B. Jones, C. B. Sirlin, B. Schnabl, L. Brinkac, N. Schork, C. H. Chen, D. A. Brenner, W. Biggs, S. Yooseph, J. C. Venter und K. E. Nelson (2019). "Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive

- Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Cell Metab* **30**(3): 607.
- Lopetuso, L. R., F. Scaldaferri, V. Petito und A. Gasbarrini (2013). "Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis." *Gut Pathog* **5**(1): 23.
- Louis, P., G. L. Hold und H. J. Flint (2014). "The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer." *Nat Rev Microbiol* **12**(10): 661-672.
- Love, M. I., W. Huber und S. Anders (2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome Biol* **15**(12): 550.
- Lu, C., D. Ren, X. Wang, T. Ha, L. Liu, E. J. Lee, J. Hu, J. Kalbfleisch, X. Gao, R. Kao, D. Williams und C. Li (2014). "Toll-like receptor 3 plays a role in myocardial infarction and ischemia/reperfusion injury." *Biochim Biophys Acta* **1842**(1): 22-31.
- Luan, X., L. Wang, G. Song und W. Zhou (2024). "Innate immune responses to RNA: sensing and signaling." *Front Immunol* **15**: 1287940.
- Luhrs, H., T. Gerke, J. G. Muller, R. Melcher, J. Schaubert, F. Boxberger, W. Scheppach und T. Menzel (2002). "Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis." *Scand J Gastroenterol* **37**(4): 458-466.
- Lužnik, Z., S. Anchouche, R. Dana und J. Yin (2020). "Regulatory T Cells in Angiogenesis." *J Immunol* **205**(10): 2557-2565.
- Lynch, H. T. und A. de la Chapelle (2003). "Hereditary colorectal cancer." *N Engl J Med* **348**(10): 919-932.
- Malka, D., A. Lièvre, T. André, J. Taïeb, M. Ducreux und F. Bibeau (2020). "Immune scores in colorectal cancer: Where are we?" *Eur J Cancer* **140**: 105-118.
- Matijevic, T. und J. Pavelic (2011). "The dual role of TLR3 in metastatic cell line." *Clin Exp Metastasis* **28**(7): 701-712.
- Matissek, S. J., M. Karbalivand, W. Han, A. Boutilier, E. Yzar-Garcia, L. L. Kehoe, D. S. Gardner, A. Hage, K. Fleck, V. Jeffers, R. Rajsbaum und S. F. Elswa (2022). "A novel mechanism of regulation of the oncogenic transcription factor GLI3 by toll-like receptor signaling." *Oncotarget* **13**: 944-959.
- Matissek, S. J., M. Karbalivand, W. Han, A. Boutilier, E. Yzar-Garcia, L. L. Kehoe, D. S. Gardner, A. Hage, K. Fleck, V. Jeffers, R. Rajsbaum und S. F. Elswa (2023). "Correction: A novel mechanism of regulation of the oncogenic transcription factor GLI3 by toll-like receptor signaling." *Oncotarget* **14**: 448.
- Matsumoto, M., K. Funami, M. Tanabe, H. Oshiumi, M. Shingai, Y. Seto, A. Yamamoto und T. Seya (2003). "Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells." *J Immunol* **171**(6): 3154-3162.
- Matsumoto, M., S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake und T. Seya (2002). "Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling." *Biochem Biophys Res Commun* **293**(5): 1364-1369.
- Matsumoto, M. und T. Seya (2008). "TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C)." *Adv Drug Deliv Rev* **60**(7): 805-812.
- Matsumoto, M., Y. Takeda und T. Seya (2020). "Targeting Toll-like receptor 3 in dendritic cells for cancer immunotherapy." *Expert Opin Biol Ther*: 1-10.
- Matsuzaka, T., H. Shimano, N. Yahagi, T. Kato, A. Atsumi, T. Yamamoto, N. Inoue, M. Ishikawa, S. Okada, N. Ishigaki, H. Iwasaki, Y. Iwasaki, T. Karasawa, S. Kumadaki,

- T. Matsui, M. Sekiya, K. Ohashi, A. H. Hasty, Y. Nakagawa, A. Takahashi, H. Suzuki, S. Yato, H. Sone, H. Toyoshima, J. Osuga and N. Yamada (2007). "Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance." *Nat Med* **13**(10): 1193-1202.
- Mauvoisin, D. und C. Mounier (2011). "Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression." *Biochimie* **93**(1): 78-86.
- McAllister, C. S., O. Lakhdari, G. Pineton de Chambrun, M. G. Gareau, A. Broquet, G. H. Lee, S. Shenouda, L. Eckmann und M. F. Kagnoff (2013). "TLR3, TRIF, and caspase 8 determine double-stranded RNA-induced epithelial cell death and survival in vivo." *J Immunol* **190**(1): 418-427.
- McCall, K. D., J. R. Thuma, M. C. Courreges, F. Benencia, C. B. James, R. Malgor, N. Kantake, W. Mudd, N. Denlinger, B. Nolan, L. Wen und F. L. Schwartz (2015). "Toll-like receptor 3 is critical for coxsackievirus B4-induced type 1 diabetes in female NOD mice." *Endocrinology* **156**(2): 453-461.
- Mejías-Luque, R. und M. Gerhard (2017). "Immune Evasion Strategies and Persistence of *Helicobacter pylori*." *Curr Top Microbiol Immunol* **400**: 53-71.
- Miao, W., X. Wu, K. Wang, W. Wang, Y. Wang, Z. Li, J. Liu, L. Li und L. Peng (2016). "Sodium Butyrate Promotes Reassembly of Tight Junctions in Caco-2 Monolayers Involving Inhibition of MLCK/MLC2 Pathway and Phosphorylation of PKC β 2." *Int J Mol Sci* **17**(10).
- Mitchell, C. und H. Willenbring (2008). "A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice." *Nat Protoc* **3**(7): 1167-1170.
- Mohammad, T. A. M., F. N. Hussein, A. N. Abbas, H. M. Jaafar und B. B. Salam (2024). "Ex vivo treatment with poly (I:C) alleviates the exhausted phenotype of tumor-infiltrating TCD8(+) cells of gastric cancer patients." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **397**(2): 1189-1196.
- Molina-Cerrillo, J., M. San Roman, J. Pozas, T. Alonso-Gordoa, M. Pozas, E. Conde, M. Rosas, E. Grande, M. L. Garcia-Bermejo und A. Carrato (2020). "BRAF Mutated Colorectal Cancer: New Treatment Approaches." *Cancers (Basel)* **12**(6).
- Mootha, V. K., C. M. Lindgren, K.-F. Eriksson, A. Subramanian, S. Sihag, J. Lehar, P. Puigserver, E. Carlsson, M. Ridderstråle, E. Laurila, N. Houstis, M. J. Daly, N. Patterson, J. P. Mesirov, T. R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E. S. Lander, J. N. Hirschhorn, D. Altshuler und L. C. Groop (2003). "PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes." *Nature Genetics* **34**(3): 267-273.
- Morey, P., L. Pfannkuch, E. Pang, F. Boccellato, M. Sigal, A. Imai-Matsushima, V. Dyer, M. Koch, H. J. Mollenkopf, P. Schlaermann und T. F. Meyer (2018). "*Helicobacter pylori* Depletes Cholesterol in Gastric Glands to Prevent Interferon Gamma Signaling and Escape the Inflammatory Response." *Gastroenterology* **154**(5): 1391-1404.e1399.
- Moser, A. R., H. C. Pitot und W. F. Dove (1990). "A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse." *Science* **247**(4940): 322-324.
- Mougiakakos, D., A. Choudhury, A. Lladser, R. Kiessling und C. C. Johansson (2010). "Regulatory T cells in cancer." *Adv Cancer Res* **107**: 57-117.
- Muresan, X. M., J. Bouchal, Z. Culig und K. Soucek (2020). "Toll-Like Receptor 3 in Solid Cancer and Therapy Resistance." *Cancers (Basel)* **12**(11).
- Muresan, X. M., E. Slabakova, J. Prochazkova, S. Drapela, R. Fedr, M. Pickova, O. Vacek, R. Vichova, T. Suchankova, J. Bouchal, D. Kurfurstova, M. Kral, T. Hulinova, R. P.

- Sykora, V. Student, V. Hejret, W. M. van Weerden, M. Pühr, V. Pustka, D. Potesil, Z. Zdrahal, Z. Culig und K. Soucek (2022). "Toll-Like Receptor 3 Overexpression Induces Invasion of Prostate Cancer Cells, whereas Its Activation Triggers Apoptosis." *Am J Pathol* **192**(9): 1321-1335.
- Murphy, K. M. (2011). *Janeway's Immunobiology*, Taylor & Francis Group.
- Murtha-Lemekhova, A., J. Fuchs, M. Teroerde, U. Chiriac, R. Klotz, D. Hornuss, J. Larmann, M. A. Weigand und K. Hoffmann (2022). "Routine Postoperative Antibiotic Prophylaxis Offers No Benefit after Hepatectomy-A Systematic Review and Meta-Analysis." *Antibiotics (Basel)* **11**(5).
- Natter, K. und S. D. Kohlwein (2013). "Yeast and cancer cells - common principles in lipid metabolism." *Biochim Biophys Acta* **1831**(2): 314-326.
- Nelson, B. H. (2008). "The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes." *Immunol Rev* **222**: 101-116.
- Nishisho, I., Y. Nakamura, Y. Miyoshi, Y. Miki, H. Ando, A. Horii, K. Koyama, J. Utsunomiya, S. Baba und P. Hedge (1991). "Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients." *Science* **253**(5020): 665-669.
- Nitsche, U., H. Friess, A. Agha, M. Angele, R. Eckel, W. Heitland, K. W. Jauch, D. Krenz, N. C. Nüssler, H. G. Rau, R. Ruppert, G. Schubert-Fritschle, D. Wilhelm, J. Werner und J. Engel (2016). "Prognosis of mucinous and signet-ring cell colorectal cancer in a population-based cohort." *J Cancer Res Clin Oncol* **142**(11): 2357-2366.
- Nitsche, U., M. Maak, T. Schuster, B. Künzli, R. Langer, J. Slotta-Huspenina, K. P. Janssen, H. Friess und R. Rosenberg (2011). "Prediction of prognosis is not improved by the seventh and latest edition of the TNM classification for colorectal cancer in a single-center collective." *Ann Surg* **254**(5): 793-800; discussion 800-791.
- Nitsche, U., R. Rosenberg, A. Balmert, T. Schuster, J. Slotta-Huspenina, P. Herrmann, F. G. Bader, H. Friess, P. M. Schlag, U. Stein und K. P. Janssen (2012). "Integrative marker analysis allows risk assessment for metastasis in stage II colon cancer." *Ann Surg* **256**(5): 763-771; discussion 771.
- Niu, F., Y. Yu, Z. Li, Y. Ren, Z. Li, Q. Ye, P. Liu, C. Ji, L. Qian und Y. Xiong (2022). "Arginase: An emerging and promising therapeutic target for cancer treatment." *Biomed Pharmacother* **149**: 112840.
- O'Keefe, S. J. (2016). "Diet, microorganisms and their metabolites, and colon cancer." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **13**(12): 691-706.
- Oh, T. G., S. M. Kim, C. Caussy, T. Fu, J. Guo, S. Bassirian, S. Singh, E. V. Madamba, R. Bettencourt, L. Richards, R. T. Yu, A. R. Atkins, T. Huan, D. A. Brenner, C. B. Sirlin, M. Downes, R. M. Evans und R. Loomba (2020). "A Universal Gut-Microbiome-Derived Signature Predicts Cirrhosis." *Cell Metab* **32**(5): 878-888.e876.
- Ostojic, N., T. Radevic, L. Kandolf Sekulovic, B. Djordjevic, L. Jaukovic, N. Stepic und G. Supic (2022). "Polymorphisms in toll-like receptor 3 and 4 genes as prognostic and outcome biomarkers in melanoma patients." *Melanoma Res* **32**(5): 309-317.
- Ou-Yang, Q., X. M. Lin, Y. J. Zhu, B. Zheng, L. Li, Y. C. Yang, G. J. Hou, X. Chen, G. J. Luo, F. Huo, Q. B. Leng, F. J. Gonzalez, X. Q. Jiang, H. Y. Wang und L. Chen (2018). "Distinct role of nuclear receptor corepressor 1 regulated de novo fatty acids synthesis in liver regeneration and hepatocarcinogenesis in mice." *Hepatology* **67**(3): 1071-1087.

- Pabst, O. und E. Slack (2020). "IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific." *Mucosal Immunol* **13**(1): 12-21.
- Pages, F., J. Galon, M. C. Dieu-Nosjean, E. Tartour, C. Sautès-Fridman und W. H. Fridman (2010). "Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored." *Oncogene* **29**(8): 1093-1102.
- Pagès, F., J. Galon, M. C. Dieu-Nosjean, E. Tartour, C. Sautès-Fridman und W. H. Fridman (2010). "Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored." *Oncogene* **29**(8): 1093-1102.
- Park, J. H., T. Kotani, T. Konno, J. Setiawan, Y. Kitamura, S. Imada, Y. Usui, N. Hatano, M. Shinohara, Y. Saito, Y. Murata und T. Matozaki (2016). "Promotion of Intestinal Epithelial Cell Turnover by Commensal Bacteria: Role of Short-Chain Fatty Acids." *PLoS One* **11**(5): e0156334.
- Parker, T. W. und K. L. Neufeld (2020). "APC controls Wnt-induced β -catenin destruction complex recruitment in human colonocytes." *Scientific Reports* **10**(1): 2957.
- Patel, S. P., G. R. Petroni, J. Roszik, W. C. Olson, N. A. Wages, K. A. Chianese-Bullock, M. Smolkin, N. Varhegyi, E. Gaughan, K. T. Smith, K. Haden, E. H. Hall, S. Gnjatic, P. Hwu und C. L. Slingluff (2021). "Phase I/II trial of a long peptide vaccine (LPV7) plus toll-like receptor (TLR) agonists with or without incomplete Freund's adjuvant (IFA) for resected high-risk melanoma." *J Immunother Cancer* **9**(8).
- Picard, C., J. Fioramonti, A. Francois, T. Robinson, F. Neant und C. Matuchansky (2005). "Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits." *Aliment Pharmacol Ther* **22**(6): 495-512.
- Poeck, H., M. Bscheider, O. Gross, K. Finger, S. Roth, M. Rebsamen, N. Hanneschläger, M. Schlee, S. Rothenfusser, W. Barchet, H. Kato, S. Akira, S. Inoue, S. Endres, C. Peschel, G. Hartmann, V. Hornung und J. Ruland (2010). "Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 beta production." *Nat Immunol* **11**(1): 63-69.
- Porcari, S., N. Benech, M. Valles-Colomer, N. Segata, A. Gasbarrini, G. Cammarota, H. Sokol und G. Ianiri (2023). "Key determinants of success in fecal microbiota transplantation: From microbiome to clinic." *Cell Host Microbe* **31**(5): 712-733.
- Powell, S. M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T. M. Bryan, S. R. Hamilton, S. N. Thibodeau, B. Vogelstein und K. W. Kinzler (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis." *Nature* **359**(6392): 235-237.
- Price, A. E., K. Shamardani, K. A. Lugo, J. Deguine, A. W. Roberts, B. L. Lee und G. M. Barton (2018). "A Map of Toll-like Receptor Expression in the Intestinal Epithelium Reveals Distinct Spatial, Cell Type-Specific, and Temporal Patterns." *Immunity* **49**(3): 560-575.e566.
- Rad, R., J. Cadiñanos, L. Rad, I. Varela, A. Strong, L. Kriegl, F. Constantino-Casas, S. Eser, M. Hieber, B. Seidler, S. Price, M. F. Fraga, V. Calvanese, G. Hoffman, H. Ponstingl, G. Schneider, K. Yusa, C. Grove, R. M. Schmid, W. Wang, G. Vassiliou, T. Kirchner, U. McDermott, P. Liu, D. Saur und A. Bradley (2013). "A genetic progression model of Braf(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention." *Cancer Cell* **24**(1): 15-29.
- Rajalingam, K., R. Schreck, U. R. Rapp und S. Albert (2007). "Ras oncogenes and their downstream targets." *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1177-1195.
- Rakoff-Nahoum, S. und R. Medzhitov (2007). "Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88." *Science* **317**(5834): 124-127.

- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg und R. Medzhitov (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." *Cell* **118**(2): 229-241.
- Ralser, A., A. Dietl, S. Jarosch, V. Engelsberger, A. Wanisch, K. P. Janssen, M. Middelhoff, M. Vieth, M. Quante, D. Haller, D. H. Busch, L. Deng, R. Mejias-Luque und M. Gerhard (2023). "Helicobacter pylori promotes colorectal carcinogenesis by deregulating intestinal immunity and inducing a mucus-degrading microbiota signature." *Gut* **72**(7): 1258-1270.
- Ramirez, J., F. Guarner, L. Bustos Fernandez, A. Maruy, V. L. Sdepanian und H. Cohen (2020). "Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota." *Front Cell Infect Microbiol* **10**: 572912.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott und F. Zhang (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." *Nat Protoc* **8**(11): 2281-2308.
- Rao, R., C. S. Graffeo, R. Gulati, M. Jamal, S. Narayan, C. P. Zambirinis, R. Barilla, M. Deutsch, S. H. Greco, A. Ochi, L. Tomkotter, R. Blobstein, A. Avanzi, D. M. Tipples, Y. Gelbstein, E. Van Heerden und G. Miller (2014). "Interleukin 17-producing gammadeltaT cells promote hepatic regeneration in mice." *Gastroenterology* **147**(2): 473-484 e472.
- Rapoport, A. P., N. A. Aqui, E. A. Stadtmauer, D. T. Vogl, Y. Y. Xu, M. Kalos, L. Cai, H. B. Fang, B. M. Weiss, A. Badros, S. Yanovich, G. Akpek, P. Tsao, A. Cross, D. Mann, S. Philip, N. Kerr, A. Brennan, Z. Zheng, K. Ruehle, T. Milliron, S. E. Strome, A. M. Salazar, B. L. Levine und C. H. June (2014). "Combination immunotherapy after ASCT for multiple myeloma using MAGE-A3/Poly-ICLC immunizations followed by adoptive transfer of vaccine-primed and costimulated autologous T cells." *Clin Cancer Res* **20**(5): 1355-1365.
- Ratzl, V., L. de Guevara, R. Safadi, F. Poordad, F. Fuster, J. Flores-Figueroa, M. Arrese, A. L. Fracanzani, D. Ben Bashat, K. Lackner, T. Gorfine, S. Kadosh, R. Oren, M. Halperin, L. Hayardeny, R. Loomba, S. Friedman, A. i. s. group und A. J. Sanyal (2021). "Aramchol in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial." *Nat Med* **27**(10): 1825-1835.
- Reitmeier, S., S. Kiessling, K. Neuhaus und D. Haller (2020). "Comparing Circadian Rhythmicity in the Human Gut Microbiome." *STAR Protoc* **1**(3): 100148.
- Roelands, J., P. J. K. Kuppen, L. Vermeulen, C. Maccalli, J. Decock, E. Wang, F. M. Marincola, D. Bedognetti und W. Hendrickx (2017). "Immunogenomic Classification of Colorectal Cancer and Therapeutic Implications." *Int J Mol Sci* **18**(10).
- Ronckers, C., C. Spix, C. Trübenbach, A. Katalinic, M. Christ, A. Cicero, J. Folkerts, J. Hansmann, K. Kranzhöfer, B. Kunz, K. Manegold, U. Meyer zum Büschenfelde, A. Penzkofer, G. Vollmer, S. Weg-Remers, B. Barnes, N. Buttman-Schweiger, S. Dahm, M. Franke, I. Schönfeld, K. Kraywinkel und A. Wienecke (2023). Krebs in Deutschland für 2019/2020, Robert Koch-Institut: 164.
- Rubartelli, A. und M. T. Lotze (2007). "Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox." *Trends Immunol* **28**(10): 429-436.
- Rubinstein, M. R., X. Wang, W. Liu, Y. Hao, G. Cai und Y. W. Han (2013). "Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin." *Cell Host Microbe* **14**(2): 195-206.

- Salaun, B., I. Coste, M. C. Rissoan, S. J. Lebecque und T. Renno (2006). "TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells." *J Immunol* **176**(8): 4894-4901.
- Salaun, B., L. Zitvogel, C. Asselin-Paturel, Y. Morel, K. Chemin, C. Dubois, C. Massacrier, R. Conforti, M. P. Chenard, J. C. Sabourin, A. Goubar, S. Lebecque, M. Pierres, D. Rimoldi, P. Romero und F. Andre (2011). "TLR3 as a biomarker for the therapeutic efficacy of double-stranded RNA in breast cancer." *Cancer Res* **71**(5): 1607-1614.
- Sarkar, S. N., K. L. Peters, C. P. Elco, S. Sakamoto, S. Pal und G. C. Sen (2004). "Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling." *Nat Struct Mol Biol* **11**(11): 1060-1067.
- Scaglia, N., S. Tyekucheva, G. Zadra, C. Photopoulos und M. Loda (2014). "De novo fatty acid synthesis at the mitotic exit is required to complete cellular division." *Cell Cycle* **13**(5): 859-868.
- Scatozza, F., A. D'Amore, R. A. Fontanella, D. E. C. P, F. Marampon, F. Padula, E. Ziparo, A. Riccioli und A. Filippini (2020). "Toll-like Receptor-3 Activation Enhances Malignant Traits in Human Breast Cancer Cells Through Hypoxia-inducible Factor-1alpha." *Anticancer Res* **40**(10): 5379-5391.
- Schnitzbauer, A. A., S. A. Lang, H. Goessmann, S. Nadalin, J. Baumgart, S. A. Farkas, S. Fichtner-Feigl, T. Lorf, A. Goralcyk, R. Horbelt, A. Kroemer, M. Loss, P. Rummele, M. N. Scherer, W. Padberg, A. Konigsrainer, H. Lang, A. Obed und H. J. Schlitt (2012). "Right portal vein ligation combined with in situ splitting induces rapid left lateral liver lobe hypertrophy enabling 2-staged extended right hepatic resection in small-for-size settings." *Ann Surg* **255**(3): 405-414.
- Schug, Z. T., B. Peck, D. T. Jones, Q. Zhang, S. Grosskurth, I. S. Alam, L. M. Goodwin, E. Smethurst, S. Mason, K. Blyth, L. McGarry, D. James, E. Shanks, G. Kalna, R. E. Saunders, M. Jiang, M. Howell, F. Lassailly, M. Z. Thin, B. Spencer-Dene, G. Stamp, N. J. van den Broek, G. Mackay, V. Bulusu, J. J. Kamphorst, S. Tardito, D. Strachan, A. L. Harris, E. O. Aboagye, S. E. Critchlow, M. J. Wakelam, A. Schulze und E. Gottlieb (2015). "Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress." *Cancer Cell* **27**(1): 57-71.
- Secher, T., A. Samba-Louaka, E. Oswald und J. P. Nougayrède (2013). "Escherichia coli producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells." *PLoS One* **8**(10): e77157.
- Seki, E., H. Tsutsui, Y. Iimuro, T. Naka, G. Son, S. Akira, T. Kishimoto, K. Nakanishi und J. Fujimoto (2005). "Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration." *Hepatology* **41**(3): 443-450.
- Sen, U., C. Coleman und T. Sen (2023). "Stearoyl coenzyme A desaturase-1: multitasker in cancer, metabolism, and ferroptosis." *Trends Cancer* **9**(6): 480-489.
- Sender, R., S. Fuchs und R. Milo (2016). "Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body." *PLoS Biol* **14**(8): e1002533.
- Shanahan, F., T. S. Ghosh und P. W. O'Toole (2021). "The Healthy Microbiome-What Is the Definition of a Healthy Gut Microbiome?" *Gastroenterology* **160**(2): 483-494.
- Shang, L., M. Fukata, N. Thirunarayanan, A. P. Martin, P. Arnaboldi, D. Maussang, C. Berin, J. C. Unkeless, L. Mayer, M. T. Abreu und S. A. Lira (2008). "Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria." *Gastroenterology* **135**(2): 529-538.

- Shao, L., D. D. Fischer, S. Kandasamy, L. J. Saif und A. N. Vlasova (2016). "Tissue-specific mRNA expression profiles of porcine Toll-like receptors at different ages in germ-free and conventional pigs." *Vet Immunol Immunopathol* **171**: 7-16.
- Shime, H., M. Matsumoto, H. Oshiumi, S. Tanaka, A. Nakane, Y. Iwakura, H. Tahara, N. Inoue und T. Seya (2012). "Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(6): 2066-2071.
- Shime, H., M. Matsumoto und T. Seya (2017). "Double-stranded RNA promotes CTL-independent tumor cytotoxicity mediated by CD11b(+)Ly6G(+) intratumor myeloid cells through the TICAM-1 signaling pathway." *Cell Death Differ* **24**(3): 385-396.
- Shin, N. R., T. W. Whon und J. W. Bae (2015). "Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota." *Trends Biotechnol* **33**(9): 496-503.
- Sichler, A., N. Hüser und K.-P. Janssen (2024). "Boosting liver regeneration: kinase inhibitor as a new tool to prevent liver failure." *Signal Transduction and Targeted Therapy* **9**(1): 168.
- Sigal, M., M. E. Rothenberg, C. Y. Logan, J. Y. Lee, R. W. Honaker, R. L. Cooper, B. Passarelli, M. Camorlinga, D. M. Bouley, G. Alvarez, R. Nusse, J. Torres und M. R. Amieva (2015). "Helicobacter pylori Activates and Expands Lgr5(+) Stem Cells Through Direct Colonization of the Gastric Glands." *Gastroenterology* **148**(7): 1392-1404.e1321.
- Singh, N., A. Gurav, S. Sivaprakasam, E. Brady, R. Padia, H. Shi, M. Thangaraju, P. D. Prasad, S. Manicassamy, D. H. Munn, J. R. Lee, S. Offermanns und V. Ganapathy (2014). "Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis." *Immunity* **40**(1): 128-139.
- Sivori, S., S. Carlomagno, S. Pesce, A. Moretta, M. Vitale und E. Marcenaro (2014). "TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When?" *Front Immunol* **5**: 105.
- Smith, P. M., M. R. Howitt, N. Panikov, M. Michaud, C. A. Gallini, Y. M. Bohlooly, J. N. Glickman und W. S. Garrett (2013). "The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis." *Science* **341**(6145): 569-573.
- Smith, S. E., W. Huang, K. Tiamani, M. Unterer, M. Khan Mirzaei und L. Deng (2022). "Emerging technologies in the study of the virome." *Curr Opin Virol* **54**: 101231.
- Smok-Kalwat, J., P. Mertowska, S. Mertowski, S. Gózdź, I. Korona-Główniak, W. Kwaśniewski und E. Grywalska (2024). "Analysis of Selected Toll-like Receptors in the Pathogenesis and Advancement of Non-Small-Cell Lung Cancer." *J Clin Med* **13**(10).
- Solhi, R., M. Lotfinia, R. Gramignoli, M. Najimi und M. Vosough (2021). "Metabolic hallmarks of liver regeneration." *Trends Endocrinol Metab* **32**(9): 731-745.
- Song, W., H. Mu, J. Wu, M. Liao, H. Zhu, L. Zheng, X. He, B. Niu, Y. Zhai, C. Bai, A. Lei, G. Li und J. Hua (2015). "miR-544 Regulates Dairy Goat Male Germline Stem Cell Self-Renewal via Targeting PLZF." *J Cell Biochem* **116**(10): 2155-2165.
- Sperlich, A., A. Balmert, D. Doll, S. Bauer, F. Franke, G. Keller, D. Wilhelm, A. Mur, M. Respondek, H. Friess, U. Nitsche und K. P. Janssen (2018). "Genetic and immunological biomarkers predict metastatic disease recurrence in stage III colon cancer." *BMC Cancer* **18**(1): 998.
- Stanifer, M. L., M. Mukenhirn, S. Muenchau, K. Pervolaraki, T. Kanaya, D. Albrecht, C. Odendall, T. Hielscher, V. Haucke, J. C. Kagan, S. Bartfeld, H. Ohno und S.

- Boulant (2020). "Asymmetric distribution of TLR3 leads to a polarized immune response in human intestinal epithelial cells." *Nat Microbiol* **5**(1): 181-191.
- Storck, E. M., C. Ozbalci und U. S. Eggert (2018). "Lipid Cell Biology: A Focus on Lipids in Cell Division." *Annu Rev Biochem* **87**: 839-869.
- Stoss, C., M. Laschinger, B. Wang, M. Lu, F. Altmayr, D. Hartmann, N. Huser und B. Holzmann (2020). "TLR3 promotes hepatocyte proliferation after partial hepatectomy by stimulating uPA expression and the release of tissue-bound HGF." *FASEB J* **34**(8): 10387-10397.
- Su, L. K., B. Vogelstein und K. W. Kinzler (1993). "Association of the APC tumor suppressor protein with catenins." *Science* **262**(5140): 1734-1737.
- Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander und J. P. Mesirov (2005). "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(43): 15545-15550.
- Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal und F. Bray (2021). "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA Cancer J Clin* **71**(3): 209-249.
- Sydor, S., Y. Gu, M. Schlattjan, L. P. Bechmann, U. Rauen, J. Best, A. Paul, H. A. Baba, J. P. Sowa, G. Gerken und A. Canbay (2013). "Steatosis does not impair liver regeneration after partial hepatectomy." *Lab Invest* **93**(1): 20-30.
- Takeuchi, T., E. Miyauchi, T. Kanaya, T. Kato, Y. Nakanishi, T. Watanabe, T. Kitami, T. Taida, T. Sasaki, H. Negishi, S. Shimamoto, A. Matsuyama, I. Kimura, I. R. Williams, O. Ohara und H. Ohno (2021). "Acetate differentially regulates IgA reactivity to commensal bacteria." *Nature* **595**(7868): 560-564.
- Taur, Y. und E. G. Pamer (2013). "The intestinal microbiota and susceptibility to infection in immunocompromised patients." *Curr Opin Infect Dis* **26**(4): 332-337.
- Tauriello, D. V. F., S. Palomo-Ponce, D. Stork, A. Berenguer-Llargo, J. Badia-Ramentol, M. Iglesias, M. Sevillano, S. Ibiza, A. Cañellas, X. Hernando-Momblona, D. Byrom, J. A. Matarin, A. Calon, E. I. Rivas, A. R. Nebreda, A. Riera, C. S. Attolini und E. Batlle (2018). "TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis." *Nature* **554**(7693): 538-543.
- Tavora, B., T. Mederer, K. J. Wessel, S. Ruffing, M. Sadjadi, M. Missmahl, B. N. Ostendorf, X. Liu, J. Y. Kim, O. Olsen, A. L. Welm, H. Goodarzi und S. F. Tavazoie (2020). "Tumoural activation of TLR3-SLIT2 axis in endothelium drives metastasis." *Nature* **586**(7828): 299-304.
- Teng, M. W., J. B. Swann, C. M. Koebel, R. D. Schreiber und M. J. Smyth (2008). "Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer." *J Leukoc Biol* **84**(4): 988-993.
- Thangaraju, M., G. A. Cresci, K. Liu, S. Ananth, J. P. Gnanaprakasam, D. D. Browning, J. D. Mellinger, S. B. Smith, G. J. Digby, N. A. Lambert, P. D. Prasad und V. Ganapathy (2009). "GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon." *Cancer Res* **69**(7): 2826-2832.
- Thomas, A. M., P. Manghi, F. Asnicar, E. Pasolli, F. Armanini, M. Zolfo, F. Beghini, S. Manara, N. Karcher, C. Pozzi, S. Gandini, D. Serrano, S. Tarallo, A. Francavilla, G. Gallo, M. Trompetto, G. Ferrero, S. Mizutani, H. Shiroma, S. Shiba, T. Shibata, S.

- Yachida, T. Yamada, J. Wirbel, P. Schrotz-King, C. M. Ulrich, H. Brenner, M. Arumugam, P. Bork, G. Zeller, F. Cordero, E. Dias-Neto, J. C. Setubal, A. Tett, B. Pardini, M. Rescigno, L. Waldron, A. Naccarati und N. Segata (2019). "Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation." *Nat Med* **25**(4): 667-678.
- Tiamani, K., S. Luo, S. Schulz, J. Xue, R. Costa, M. Khan Mirzaei und L. Deng (2022). "The role of virome in the gastrointestinal tract and beyond." *FEMS Microbiol Rev* **46**(6).
- Tien, Y. W., K. J. Chang, Y. M. Jeng, P. H. Lee, M. S. Wu, J. T. Lin und S. M. Hsu (2001). "Tumor angiogenesis and its possible role in intravasation of colorectal epithelial cells." *Clin Cancer Res* **7**(6): 1627-1632.
- Tilg, H., T. E. Adolph, R. R. Gerner und A. R. Moschen (2018). "The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer." *Cancer Cell* **33**(6): 954-964.
- Tirelle, P., J. Breton, G. Riou, P. Déchelotte, M. Coëffier und D. Ribet (2020). "Comparison of different modes of antibiotic delivery on gut microbiota depletion efficiency and body composition in mouse." *BMC Microbiol* **20**(1): 340.
- Toscano, F., Y. Estornes, F. Virard, A. Garcia-Cattaneo, A. Pierrot, B. Vanbervliet, M. Bonnin, M. J. Ciancanelli, S. Y. Zhang, K. Funami, T. Seya, M. Matsumoto, J. J. Pin, J. L. Casanova, T. Renno und S. Lebecque (2013). "Cleaved/associated TLR3 represents the primary form of the signaling receptor." *J Immunol* **190**(2): 764-773.
- Town, T., D. Jeng, L. Alexopoulou, J. Tan und R. A. Flavell (2006). "Microglia recognize double-stranded RNA via TLR3." *J Immunol* **176**(6): 3804-3812.
- Valastyan, S. und R. A. Weinberg (2011). "Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms." *Cell* **147**(2): 275-292.
- Vansteenkiste, J. F., B. C. Cho, T. Vanakesa, T. De Pas, M. Zielinski, M. S. Kim, J. Jassem, M. Yoshimura, J. Dahabreh, H. Nakayama, L. Havel, H. Kondo, T. Mitsudomi, K. Zarogoulidis, O. A. Gladkov, K. Udud, H. Tada, H. Hoffman, A. Bugge, P. Taylor, E. E. Gonzalez, M. L. Liao, J. He, J. L. Pujol, J. Louahed, M. Debois, V. Brichard, C. Debruyne, P. Therasse und N. Altorki (2016). "Efficacy of the MAGE-A3 cancer immunotherapeutic as adjuvant therapy in patients with resected MAGE-A3-positive non-small-cell lung cancer (MAGRIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial." *Lancet Oncol* **17**(6): 822-835.
- Venkatesh, H., S. I. Tracy und M. A. Farrar (2023). "Cytotoxic CD4 T cells in the mucosa and in cancer." *Front Immunol* **14**: 1233261.
- Veteläinen, R., A. K. van Vliet und T. M. van Gulik (2007). "Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy." *Ann Surg* **245**(1): 44-50.
- Viaud, S., F. Saccheri, G. Mignot, T. Yamazaki, R. Daillère, D. Hannani, D. P. Enot, C. Pfirschke, C. Engblom, M. J. Pittet, A. Schlitzer, F. Ginhoux, L. Apetoh, E. Chachaty, P. L. Woerther, G. Eberl, M. Bérard, C. Ecobichon, D. Clermont, C. Bizet, V. Gaboriau-Routhiau, N. Cerf-Bensussan, P. Opolon, N. Yessaad, E. Vivier, B. Ryffel, C. O. Elson, J. Doré, G. Kroemer, P. Lepage, I. G. Boneca, F. Ghiringhelli und L. Zitvogel (2013). "The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide." *Science* **342**(6161): 971-976.
- Vidyasekar, P., P. Shyamsunder, R. Arun, R. Santhakumar, N. K. Kapadia, R. Kumar und R. S. Verma (2015). "Genome Wide Expression Profiling of Cancer Cell Lines

- Cultured in Microgravity Reveals Significant Dysregulation of Cell Cycle and MicroRNA Gene Networks." *PLOS ONE* **10**(8): e0135958.
- Vogelstein, B., N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, Jr. und K. W. Kinzler (2013). "Cancer genome landscapes." *Science* **339**(6127): 1546-1558.
- Walker, A. W. und L. Hoyles (2023). "Human microbiome myths and misconceptions." *Nat Microbiol* **8**(8): 1392-1396.
- Wang, H. B., P. Y. Wang, X. Wang, Y. L. Wan und Y. C. Liu (2012). "Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription." *Dig Dis Sci* **57**(12): 3126-3135.
- Washington, K. und A. E. D. Zemper (2019). "Apc-related models of intestinal neoplasia: a brief review for pathologists." *Surgical and Experimental Pathology* **2**(1): 11.
- Weiss, A. S., A. G. Burrichter, A. C. Durai Raj, A. von Strempele, C. Meng, K. Kleigewe, P. C. Munch, L. Rossler, C. Huber, W. Eisenreich, L. M. Jochum, S. Going, K. Jung, C. Lincetto, J. Hubner, G. Marinos, J. Zimmermann, C. Kaleta, A. Sanchez und B. Stecher (2021). "In vitro interaction network of a synthetic gut bacterial community." *ISME J*.
- Weiss, A. S., L. S. Niedermeier, A. von Strempele, A. G. Burrichter, D. Ring, C. Meng, K. Kleigewe, C. Lincetto, J. Hübner und B. Stecher (2023). "Nutritional and host environments determine community ecology and keystone species in a synthetic gut bacterial community." *Nat Commun* **14**(1): 4780.
- Weitz, J., M. Koch, J. Debus, T. Hohler, P. R. Galle und M. W. Buchler (2005). "Colorectal cancer." *Lancet* **365**(9454): 153-165.
- Wen, J., J. Zhang, X. Wu, X. Yan, X. Qin und Y. Wang (2024). "Prognostic and clinicopathological significance of TLR4 expression in patients with breast cancer: a meta-analysis." *Front Oncol* **14**: 1344130.
- Wenk, M. R. (2010). "Lipidomics: new tools and applications." *Cell* **143**(6): 888-895.
- Weon, J. L. und P. R. Potts (2015). "The MAGE protein family and cancer." *Curr Opin Cell Biol* **37**: 1-8.
- Wirbel, J., P. T. Pyl, E. Kartal, K. Zych, A. Kashani, A. Milanese, J. S. Fleck, A. Y. Voigt, A. Palleja, R. Ponnudurai, S. Sunagawa, L. P. Coelho, P. Schrotz-King, E. Vogtmann, N. Habermann, E. Nimeus, A. M. Thomas, P. Manghi, S. Gandini, D. Serrano, S. Mizutani, H. Shiroma, S. Shiba, T. Shibata, S. Yachida, T. Yamada, L. Waldron, A. Naccarati, N. Segata, R. Sinha, C. M. Ulrich, H. Brenner, M. Arumugam, P. Bork und G. Zeller (2019). "Meta-analysis of fecal metagenomes reveals global microbial signatures that are specific for colorectal cancer." *Nat Med* **25**(4): 679-689.
- Wischnewski, F., O. Friese, K. Pantel und H. Schwarzenbach (2007). "Methyl-CpG binding domain proteins and their involvement in the regulation of the MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, and MAGE-A12 gene promoters." *Mol Cancer Res* **5**(7): 749-759.
- Wong, C. C. und J. Yu (2023). "Gut microbiota in colorectal cancer development and therapy." *Nature Reviews Clinical Oncology* **20**(7): 429-452.
- Wu, X., C. Lei, T. Xia, X. Zhong, Q. Yang und H. B. Shu (2019). "Regulation of TRIF-mediated innate immune response by K27-linked polyubiquitination and deubiquitination." *Nat Commun* **10**(1): 4115.
- Wu, X., R. Sun, Y. Chen, X. Zheng, L. Bai, Z. Lian, H. Wei und Z. Tian (2015). "Oral ampicillin inhibits liver regeneration by breaking hepatic innate immune

- tolerance normally maintained by gut commensal bacteria." *Hepatology* **62**(1): 253-264.
- Wu, X., Y. Wu, L. He, L. Wu, X. Wang und Z. Liu (2018). "Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer." *J Cancer* **9**(14): 2510-2517.
- Xiang, L., S. Wang, X. Jin, W. Duan, X. Ding und C. Zheng (2012). "Expression of BMP2, TLR3, TLR4 and COX2 in colorectal polyps, adenoma and adenocarcinoma." *Mol Med Rep* **6**(5): 973-976.
- Xu, Z., N. Jiang, Y. Xiao, K. Yuan und Z. Wang (2022). "The role of gut microbiota in liver regeneration." *Front Immunol* **13**: 1003376.
- Yadegar, A., H. Bar-Yoseph, T. M. Monaghan, S. Pakpour, A. Severino, E. J. Kuijper, W. K. Smits, E. M. Terveer, S. Neupane, A. Nabavi-Rad, J. Sadeghi, G. Cammarota, G. Ianaro, E. Nap-Hill, D. Leung, K. Wong und D. Kao (2024). "Fecal microbiota transplantation: current challenges and future landscapes." *Clin Microbiol Rev* **37**(2): e0006022.
- Yagi, S., M. Hirata, Y. Miyachi und S. Uemoto (2020). "Liver Regeneration after Hepatectomy and Partial Liver Transplantation." *Int J Mol Sci* **21**(21).
- Yamada, Y., I. Kirillova, J. J. Peschon und N. Fausto (1997). "Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(4): 1441-1446.
- Yamagishi, H., H. Kuroda, Y. Imai und H. Hiraishi (2016). "Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers." *Chin J Cancer* **35**: 4.
- Yamamura, T., S. Tsukikawa, K. Yamada und S. Yamaguchi (2001). "Morphologic analysis of microvessels in colorectal tumors with respect to the formation of liver metastases." *J Surg Oncol* **78**(4): 259-264.
- Yang, B., J. Wu, N. Maddodi, Y. Ma, V. Setaluri und B. J. Longley (2007). "Epigenetic control of MAGE gene expression by the KIT tyrosine kinase." *J Invest Dermatol* **127**(9): 2123-2128.
- Yin, Y. (2023). A mouse model of partial hepatectomy for studying the effect of the gut microbiota on liver regeneration. Dr.med. Dissertation, TUM.
- Yin, Y., A. Sichler, J. Ecker, M. Laschinger, G. Liebisch, M. Höring, M. Basic, A. Bleich, X.-J. Zhang, L. Kübelsbeck, J. Plagge, E. Scherer, D. Wohlleber, J. Wang, Y. Wang, M. Steffani, P. Stupakov, Y. Gärtner, F. Lohöfer, C. Mogler, H. Friess, D. Hartmann, B. Holzmann, N. Hüser und K.-P. Janssen (2023). "Gut microbiota promote liver regeneration through hepatic membrane phospholipid biosynthesis." *Journal of Hepatology*.
- Yoneda, K., K. Sugimoto, K. Shiraki, J. Tanaka, T. Beppu, H. Fuke, N. Yamamoto, M. Masuya, R. Horie, K. Uchida und Y. Takei (2008). "Dual topology of functional Toll-like receptor 3 expression in human hepatocellular carcinoma: differential signaling mechanisms of TLR3-induced NF-kappaB activation and apoptosis." *Int J Oncol* **33**(5): 929-936.
- Yoshida, T., T. Miura, T. Matsumiya, H. Yoshida, H. Morohashi, Y. Sakamoto, A. Kurose, T. Imaizumi und K. Hakamada (2020). "Toll-Like Receptor 3 as a Recurrence Risk Factor and a Potential Molecular Therapeutic Target in Colorectal Cancer." *Clin Exp Gastroenterol* **13**: 427-438.
- Yu, P., W. Lübben, H. Slomka, J. Gebler, M. Konert, C. Cai, L. Neubrandt, O. Prazeres da Costa, S. Paul, S. Dehnert, K. Döhne, M. Thanisch, S. Storsberg, L. Wiegand, A. Kaufmann, M. Nain, L. Quintanilla-Martinez, S. Bettio, B. Schnierle, L.

- Kolesnikova, S. Becker, M. Schnare und S. Bauer (2012). "Nucleic acid-sensing Toll-like receptors are essential for the control of endogenous retrovirus viremia and ERV-induced tumors." *Immunity* **37**(5): 867-879.
- Yu, X., H. Wang, H. Shao, C. Zhang, X. Ju und J. Yang (2020). "PolyI:C Upregulated CCR5 and Promoted THP-1-Derived Macrophage Chemotaxis via TLR3/JMJD1A Signalling." *Cell J* **22**(3): 325-333.
- Yuan, M. M., Y. Y. Xu, L. Chen, X. Y. Li, J. Qin und Y. Shen (2015). "TLR3 expression correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis." *BMC Cancer* **15**: 245.
- Zeineldin, M. und K. L. Neufeld (2013). "More than two decades of Apc modeling in rodents." *Biochim Biophys Acta* **1836**(1): 80-89.
- Zeller, G., J. Tap, A. Y. Voigt, S. Sunagawa, J. R. Kultima, P. I. Costea, A. Amiot, J. Böhm, F. Brunetti, N. Habermann, R. Hercog, M. Koch, A. Luciani, D. R. Mende, M. A. Schneider, P. Schrotz-King, C. Tournigand, J. Tran Van Nhieu, T. Yamada, J. Zimmermann, V. Benes, M. Kloor, C. M. Ulrich, M. von Knebel Doeberitz, I. Sobhani und P. Bork (2014). "Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer." *Mol Syst Biol* **10**(11): 766.
- Zepeda-Rivera, M., S. S. Minot, H. Bouzek, H. Wu, A. Blanco-Míguez, P. Manghi, D. S. Jones, K. D. LaCourse, Y. Wu, E. F. McMahon, S. N. Park, Y. K. Lim, A. G. Kempchinsky, A. D. Willis, S. L. Cotton, S. C. Yost, E. Sicinska, J. K. Kook, F. E. Dewhirst, N. Segata, S. Bullman und C. D. Johnston (2024). "A distinct *Fusobacterium nucleatum* clade dominates the colorectal cancer niche." *Nature* **628**(8007): 424-432.
- Zhang, L., X. Yu, L. Zheng, Y. Zhang, Y. Li, Q. Fang, R. Gao, B. Kang, Q. Zhang, J. Y. Huang, H. Konno, X. Guo, Y. Ye, S. Gao, S. Wang, X. Hu, X. Ren, Z. Shen, W. Ouyang und Z. Zhang (2018). "Lineage tracking reveals dynamic relationships of T cells in colorectal cancer." *Nature* **564**(7735): 268-272.
- Zhang, W., L. Wang, X. H. Sun, X. Liu, Y. Xiao, J. Zhang, T. Wang, H. Chen, Y. Q. Zhan, M. Yu, C. H. Ge, C. Y. Li, G. M. Ren, R. H. Yin und X. M. Yang (2021). "Toll-like receptor 5-mediated signaling enhances liver regeneration in mice." *Mil Med Res* **8**(1): 16.
- Zheng, Z. und B. Wang (2021). "The Gut-Liver Axis in Health and Disease: The Role of Gut Microbiota-Derived Signals in Liver Injury and Regeneration." *Front Immunol* **12**: 775526.
- Zhou, R. W., N. Harpaz, S. H. Itzkowitz und R. E. Parsons (2023). "Molecular mechanisms in colitis-associated colorectal cancer." *Oncogenesis* **12**(1): 48.
- Zhu, C., B. Dong, L. Sun, Y. Wang und S. Chen (2020). "Cell Sources and Influencing Factors of Liver Regeneration: A Review." *Med Sci Monit* **26**: e929129.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Modell der Progression von Darmkrebs	3
Abbildung 1.2: Die Entstehung von Metastasen ausgehend vom Primärtumor.....	6
Abbildung 1.3: Mikrobielle Einflussfaktoren auf die Entwicklung von CRC.....	12
Abbildung 1.4: Toll-like Rezeptor Signalübertragung	15
Abbildung 1.5: Signalweiterleitung des TLR3 Signalwegs	17
Abbildung 3.1: Prognostische Bedeutung genomischer Deletionen von TLR3 bei Krebserkrankungen	55
Abbildung 3.2: TLR3 RNA Expression ist im Tumorgewebe und Metastasen von Darmkrebspatienten herunterreguliert.....	56
Abbildung 3.3: Analyse der Anreicherung von Genmengen (GSEA) aus der RNA- Sequenzierung humaner Tumorproben, stratifiziert nach der TLR3 Expression	58
Abbildung 3.4: Erstellung TLR3 defizienter Kolorektalkarzinom-Zelllinien mithilfe von CRISPR-Cas9.....	60
Abbildung 3.5: Krebszellautonome Veränderung in Migration und Invasion	62
Abbildung 3.6: Gesteigerte Invasivität von TLR3 defizienten HCT116 Zellen in vivo CAM (Chorion Allantois Membran) Experimenten	64
Abbildung 3.7: Proliferation der kolorektalen Krebszelllinien HCT116 und DLD1 in Abhängigkeit von TLR3	67
Abbildung 3.8: RNA-Sequenzierung von TLR3 defizienten DLD1 Zelllinien.....	69
Abbildung 3.9: Charakterisierung der Tlr3 ^{Stop} und Tlr3 ^{IEC} Apc ^{1638N/+} Mausmodelle	73
Abbildung 3.10: RT-qPCR Analyse von Tumor- und immunologischen Markern des Tlr3 ^{Stop} Apc ^{1638N/+} Mausmodells	75
Abbildung 3.11: Charakterisierung molekularer Marker auf RNA-Ebene in humanen Kolorektalkarzinom Proben mit starker und geringer Ausprägung von TLR3	77
Abbildung 3.12: Immunzell-Charakterisierung durch Chipzytometrie basierte Immunfluoreszenzfärbung in humanen Kolorektalkarzinom Proben mit starker und geringer Ausprägung von TLR3.....	78
Abbildung 3.13: 16S-rRNA-Sequenzierung des Zökuminhalts von Mäusen mit unterschiedlichem genetischen Tlr3 oder Ticam1 Hintergrund	80
Abbildung 3.14: Verminderung der bakteriellen Besiedlung durch Antibiotikabehandlung und Verschiebung des Mikrobioms hin zu aerob wachsenden Bakterien.....	82
Abbildung 3.15: Drastische Verringerung der Diversität und Verschiebung der relativen Häufigkeit bakterieller Taxa durch Antibiotikabehandlung.....	84
Abbildung 3.16: Verschlechterung der Leberregeneration und Proliferation von Hepatozyten durch Antibiotikabehandlung.....	86
Abbildung 3.17: Reduktion kurzkettiger Fettsäuren und De-Novo-Lipidsynthese in antibiotikabehandelten Mäusen	88
Abbildung 3.18: Regulierung von Enzymen des Lipidmetabolismus	89

Abbildung 3.19: Partielle Hepatektomie und mikrobielle Analyse spezifiziert-pathogen-freier Kontrollmäuse (SPF), keimfreier Tiere (GF) und von Mäusen mit einer minimalen mikrobiellen Besiedlung (OMM12)	92
Abbildung 3.20: Erhöhte Mortalität und Reduktion der Leberregeneration in GF-Mäusen	93
Abbildung 3.21: Reduktion von Proliferationsmarkern auf RNA- und Proteinebene in keimfreien Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen und Wiederherstellung der Proliferation in OMM12-Mäusen	94
Abbildung 3.22: Nachweis der De-Novo-Lipidsynthese mit Markierung durch stabile Isotopen markiertes D4-Ethanolamine und D9-Cholin.	96
Abbildung 3.23: Expression wichtiger Enzyme für Lipidsynthese während Leberregeneration in keimfreien Mäusen im Vergleich zu Kontrollen und OMM12-Mäusen	97
Abbildung 3.24: Regulation der Ausprägung von Scd1 durch Substrat-Induktion und Produktinhibition.....	98
Abbildung 3.25: Murine Leber Organoide: Induktion von Größenwachstum durch Zugabe von Acetat und Hemmung der Proliferation durch pharmakologische Blockade von Scd1	99
Abbildung 3.26: In vivo Erhöhung der Scd1 Expression in Lebergewebe durch orale Gabe von Acetat	100
Abbildung 3.27: Hochregulierung der wichtigen Lipidsynthese Enzyme SCD1 und FASN in proliferierendem Gewebe von erkrankten Personen nach Proliferation induzierender Intervention	102
Abbildung 6.1 Tlr3 RNA-Expression in Tumor-infiltrierenden Zellen.....	164
Abbildung 6.2: Tlr3 RNA-Ausprägung in der DLD1 parentalen Zelllinie und nach CRIPR-Cas9 induzierter TLR3 Defizienz	164
Abbildung 6.3 : Klonogenes Überleben von HCT116 mit steigender Poly(I:C) Konzentration.....	165
Abbildung 6.4: Zielgenexpression in DLD1 Zelllinien unter Poly(I:C) Stimulation	166
Abbildung 6.5: Tlr3 Mausmodel	167
Abbildung 6.6: Physiologische Charakterisierung der Tlr3 Apc ^{1638N/+} Mausmodelle.....	168
Abbildung 6.7: Zielgenexpression in Läsionen des Tlr3 ^{Stop} Mausmodells	169
Abbildung 6.8: Tlr3 Expression in Wildtyp Mäusen nach Antibiotikabehandlung	169
Abbildung 6.9 Physiologische Charakterisierung des Ticam ^{mut} Apc ^{1638N/+} Mausmodels	170
Abbildung 6.10: Mikrobiota Analyse humaner Proben.....	171
Abbildung 6.11: Normalisiertes Leber-zu-Körpergewichts-Verhältnis nach PHx der Antibiotika behandelten Mäuse	171

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Pipettierschema der Reversen Transkription	21
Tabelle 2.2: Pipettierschema der RT-qPCR.....	22
Tabelle 2.3: Zyklen des RT-qPCR Programms	22
Tabelle 2.4: SDS-PAGE Gel Zusammensetzung	24
Tabelle 2.5: Phosphorylierung CRISPR-Cas9 Mutagenese.....	29
Tabelle 2.6: Ligationsansatz CRISPR-Cas9 Mutagenese	30
Tabelle 2.7: DNA Verdau CRISPR-Cas9 Mutagenese.....	30
Tabelle 2.8 Entwässerungszyklen Histo Core PEARL.....	33
Tabelle 2.9: Oligonucleotide und Anwendungen	41
Tabelle 2.10: Antikörperinformationen und Anwendung.....	43
Tabelle 2.11: Zelllinien und Herkunft	45
Tabelle 2.12: Standard Kulturmedium	45
Tabelle 2.13: AML12 Kulturmedium.....	45
Tabelle 2.14: AML12 Experimentalmedium	45
Tabelle 2.15: Pufferzusammensetzungen	46
Tabelle 2.16: Verwendete Kits.....	46
Tabelle 2.17: Besondere Verbrauchsmaterialien	47
Tabelle 2.18: Reagenzien.....	47
Tabelle 2.19: Geräte und Herstellerangaben	50
Tabelle 2.20: Softwareinformationen	52
Tabelle 3.1: Statistik der angewachsenen Tumore in Chorion Allantois Membran (CAM)	63
Tabelle 6.1: Kollektiv der an Kolorektalem Karzinom erkrankter Personen	172
Tabelle 6.2: Core Enrichment HALLMARK EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION ..	172

6.3 Zusätzliche Daten

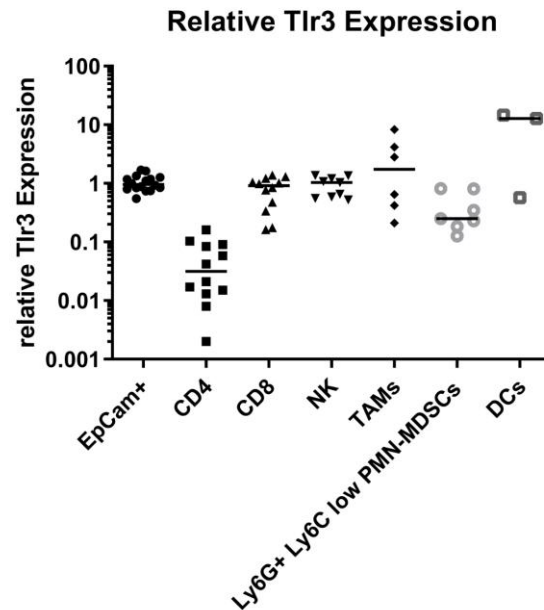


Abbildung 6.1 Tlr3 RNA-Expression in Tumor-infiltrierenden Zellen

Tlr3 Expression auf RNA-Ebene ermittelt durch RT-qPCR Analysen. Die cDNA wurde von Darmläsionen des $Apc^{Min/+}$ Mausmodells gewonnen, anschließend vereinzelt und spezifische Zellpopulationen wurden mittels fluoreszenzaktivierter Durchflusszytometrie extrahiert. Die Bereitstellung und Analyse der Daten erfolgte mit freundlicher Genehmigung von Dr. Kenneth Peukert (Ag Zeissig, TU Dresden).

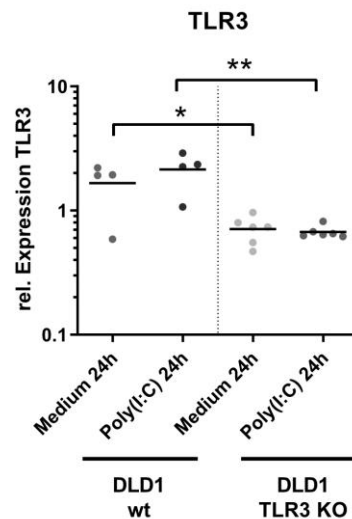


Abbildung 6.2: Tlr3 RNA-Ausprägung in der DLD1 parentalen Zelllinie und nach CRIPR-Cas9 induzierter TLR3 Defizienz

RT-qPCR Ergebnisse der TLR3 Ausprägung in DLD1 Wildtyp (wt) und Tlr3 defizienten Zellen (TLR3KO) ($n \geq 4$) mit und ohne Stimulation durch den TLR3 Liganden Poly(I:C) für 24 Stunden. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei technischen Replikaten (Datenpunkt) und der Mittelwert der Versuchsgruppe (Strich). Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit zweiseitigem Student-T-Test untersucht, wobei $p > 0,05$ = nicht signifikant (nicht gekennzeichnet); * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

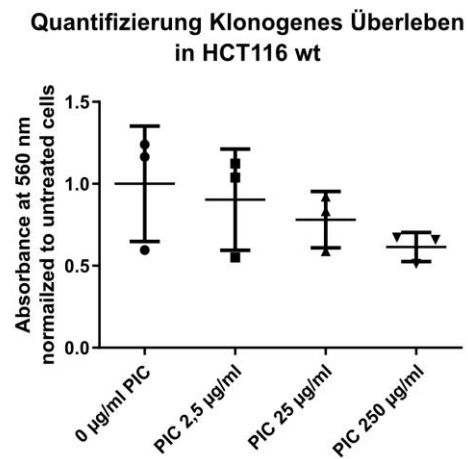


Abbildung 6.3 : Klonogenes Überleben von HCT116 mit steigender Poly(I:C) Konzentration

Quantifizierung des klonogenen Überlebens von HCT116 Wildtyp (wt) Zellen (n=3) nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von Poly(I:C) für 120 Stunden, Kristallviolett Färbung und anschließender Methanolextraktion. Messungen wurden mit jeweils zwei technischen Replikaten durchgeführt. Gezeigt ist der Mittelwert $\pm$ SD.

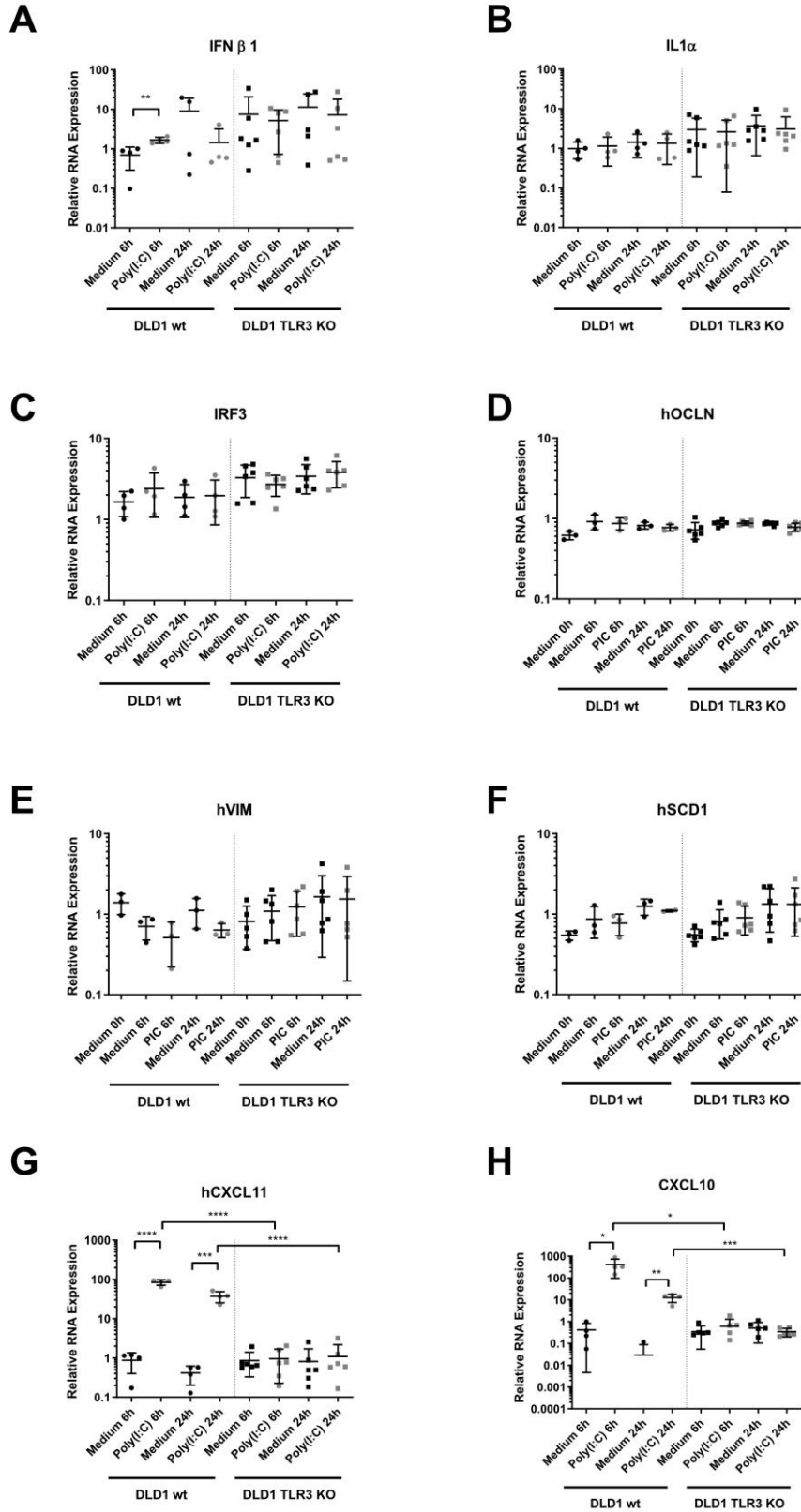


Abbildung 6.4: Zielgenexpression in DLD1 Zelllinien unter Poly(I:C) Stimulation

RNA-Expressionsanalyse bestimmter Zytokine und Zielgene von DLD1 Wildtyp (wt) und TLR3 defizienten (TLR3KO) Zellen mit und ohne Stimulation durch 25 μ g/ml Poly(I:C) mittels RT-qPCR. Daten sind auf das Houskeeping Gen HPRT normalisiert. Ein zweiseitiger Student T-Test wurde angewandt, um die Signifikanz der Ergebnisse zu überprüfen, wobei $p > 0,05$ = nicht signifikant (nicht angegeben), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; und **** $p < 0,0001$.

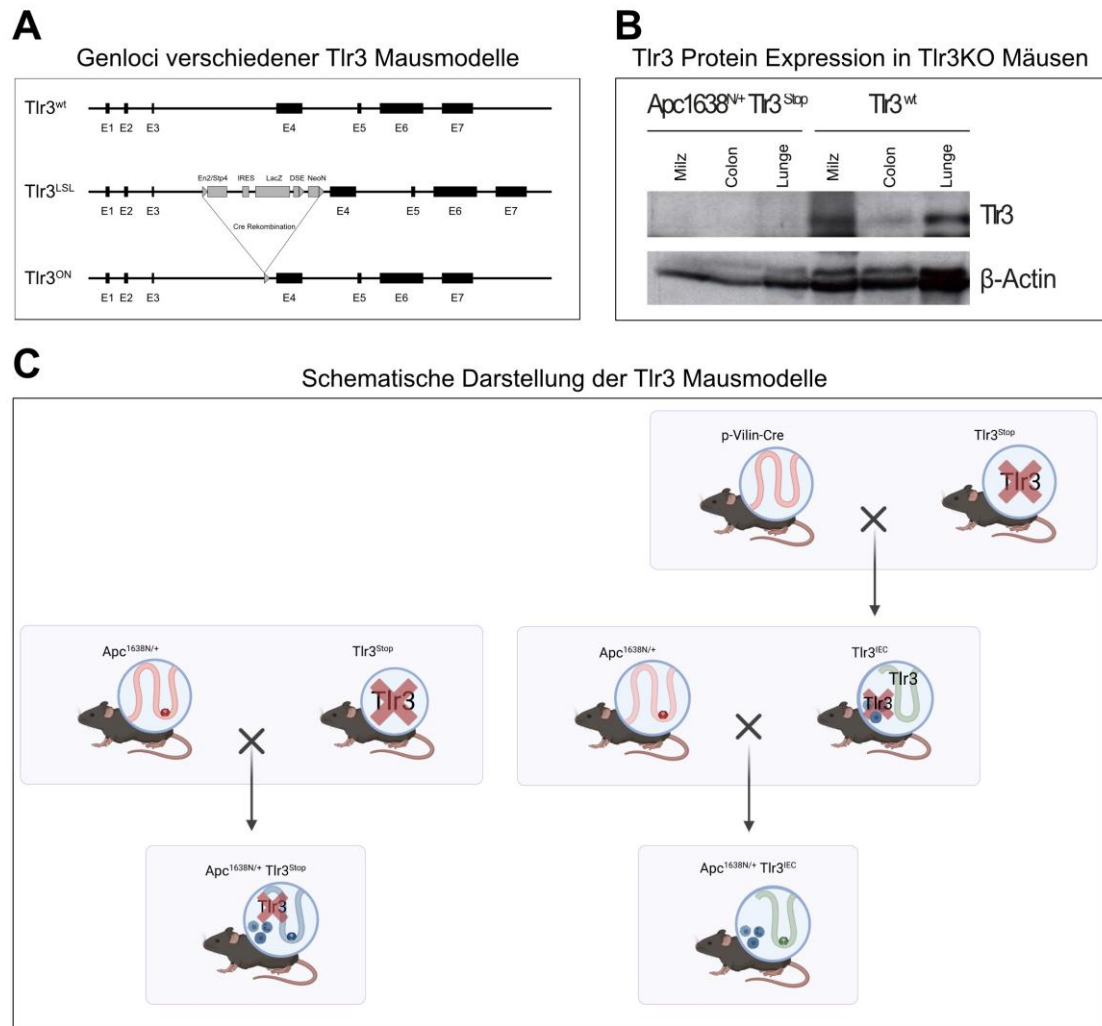


Abbildung 6.5: Tlr3 Mausmodell

Murine Tlr3 Genkarte (A) von Wildtyp Tlr3 (wt), der Lox-Stop-Lox (LSL) Insertion des Tlr3 defizienten Mausmodells zwischen Exon 3 (E3) und Exon 4 (E4) und der rekombinierte Tlr3 Genlokus nach Cre-induzierter Rekombination (ON), was zu einer Re-Expression von Tlr3 führt. Immunoblot der Tlr3 Expression in Milz, Colon und Lunge einer Tlr3 defizienten Maus (Tlr3^{Stop}), welche homozygot die LSL-Insertion aufweist und einer Wildtyp Tlr3 Maus (Tlr3^{wt}) mit β-Actin als Ladekontrolle (B). Der Immunoblot wurde von Eva Stork (AG Janssen, TUM) im Rahmen ihrer Masterarbeit angefertigt. Schematische Darstellung der in dieser Studie entwickelten Mausmodelle (C).

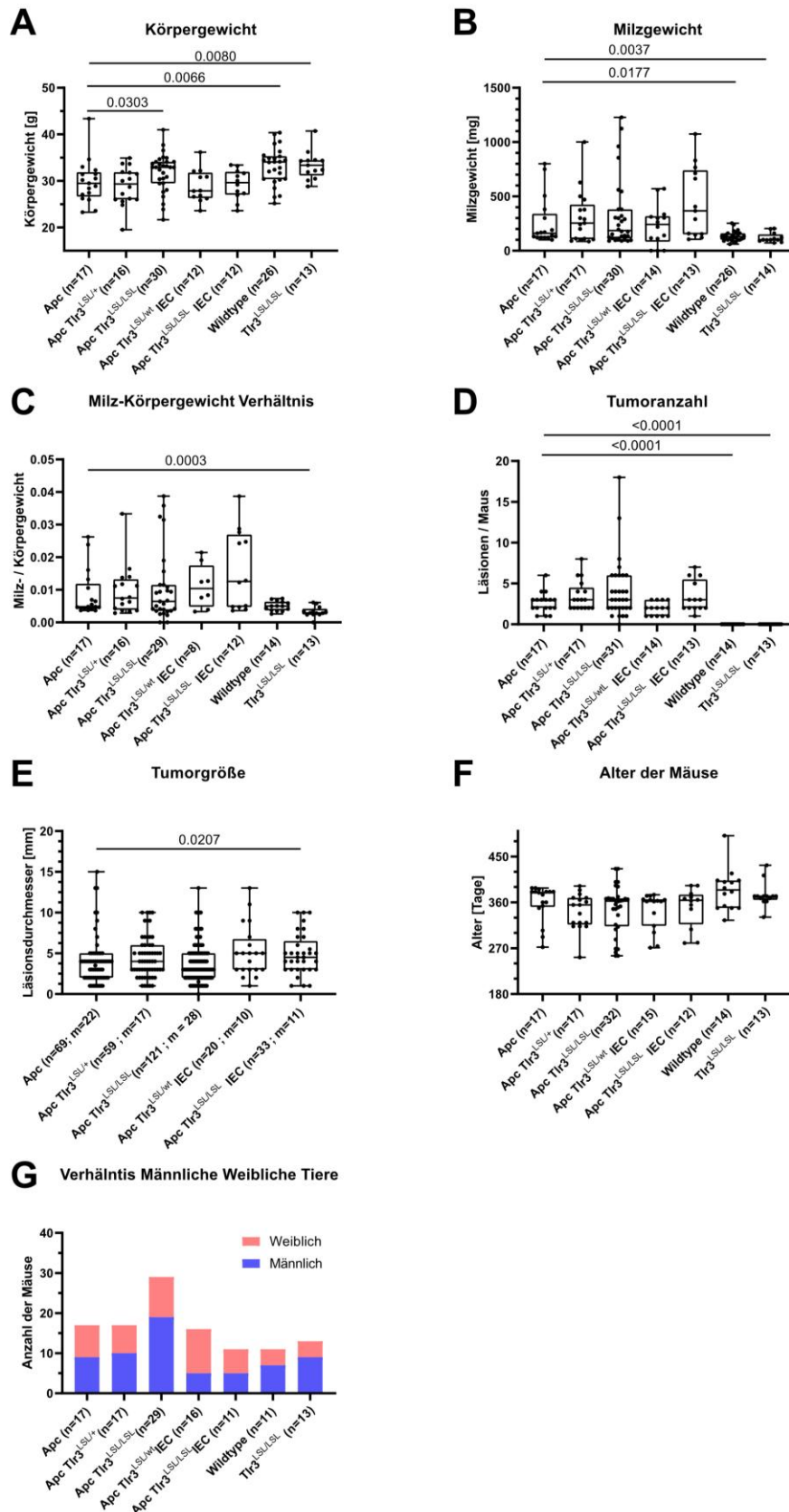


Abbildung 6.6: Physiologische Charakterisierung der Tlr3 Apc^{1638N/+} Mausmodelle

Körpergewicht (A), Milzgewicht (B), Verhältnis des Milz-zu-Körpergewicht-Verhältnisses (C), Tumoranzahl (D) und Tumorgöße (E) der einzelnen Mauslinien mit heterozygoter (LSL) oder homozygoter (LSL/LSL) Insertion der Lox-Stop-Lox Kasette in den Tlr3 Lokus, sowie der Re-Expression von Tlr3 in intestinalen Epithelialen Zellen (IEC) mithilfe der p-Villin spezifischen Expression der Cre-Rekombinase. Kontrolle der Vergleichbarkeit von Alter und des Geschlechterverhältnisses der verschiedenen Mausmodelle (F, G). Signifikanzen wurden mittels des Man-Whitney-Tests untersucht und sind im Vergleich zur Apc^{1638N/+} Parentallinie angegeben. Signifikante Unterschiede sind durch den angegebenen P-Wert über der Linie gekennzeichnet.

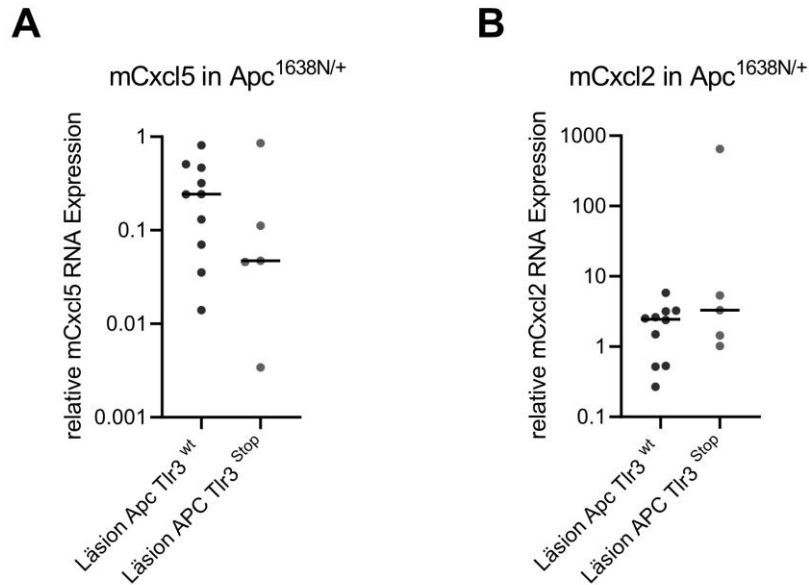


Abbildung 6.7: Zielgenexpression in Läsionen des Tlr3^{Stop} Mausmodells

Relatives RNA-Expressionsniveau der Chemokine Cxcl5 (A) und Cxcl2 (B) in Tumoren des Apc^{1638N/+} und des Apc^{1638N/+} Tlr3^{Stop} Mausmodells. Dargestellte Mittelwerte wurden in zwei technischen Replikaten mittels RT-qPCR ermittelt und sind im Verhältnis zum Housekeeping Gen β -Actin dargestellt. Ergebnisse weisen keine signifikanten Unterschiede aufgrund von Analysen mittels des Man-Whitney-Tests auf.

Tlr3 in Jejunum 3 Tage ABx Behandlung

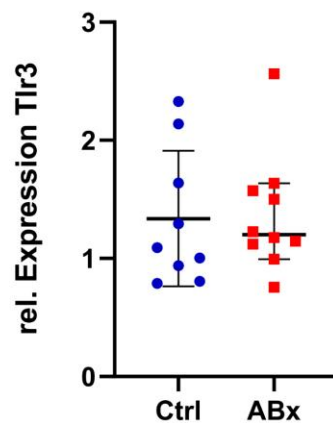


Abbildung 6.8: Tlr3 Expression in Wildtyp Mäusen nach Antibiotikabehandlung

Relatives RNA-Expressionsniveau von Tlr3 in C67BL/6J Wildtyp Mäusen 3 Tage nach Antibiotikabehandlung (ABx) bzw. nach Kontrollbehandlung (Ctrl) und vor partieller Hepatektomie. Dargestellte Mittelwerte, zeigen Analysen der Tlr3 RNA-Ausprägung in Jejunum der Mäuse. Messungen wurden in zwei technischen Replikaten mittels RT-qPCR ermittelt und sind im Verhältnis zum Housekeeping Gen β -Actin dargestellt. Es sind keine signifikanten Unterschiede mittels des Man-Whitney-Tests vorhanden.

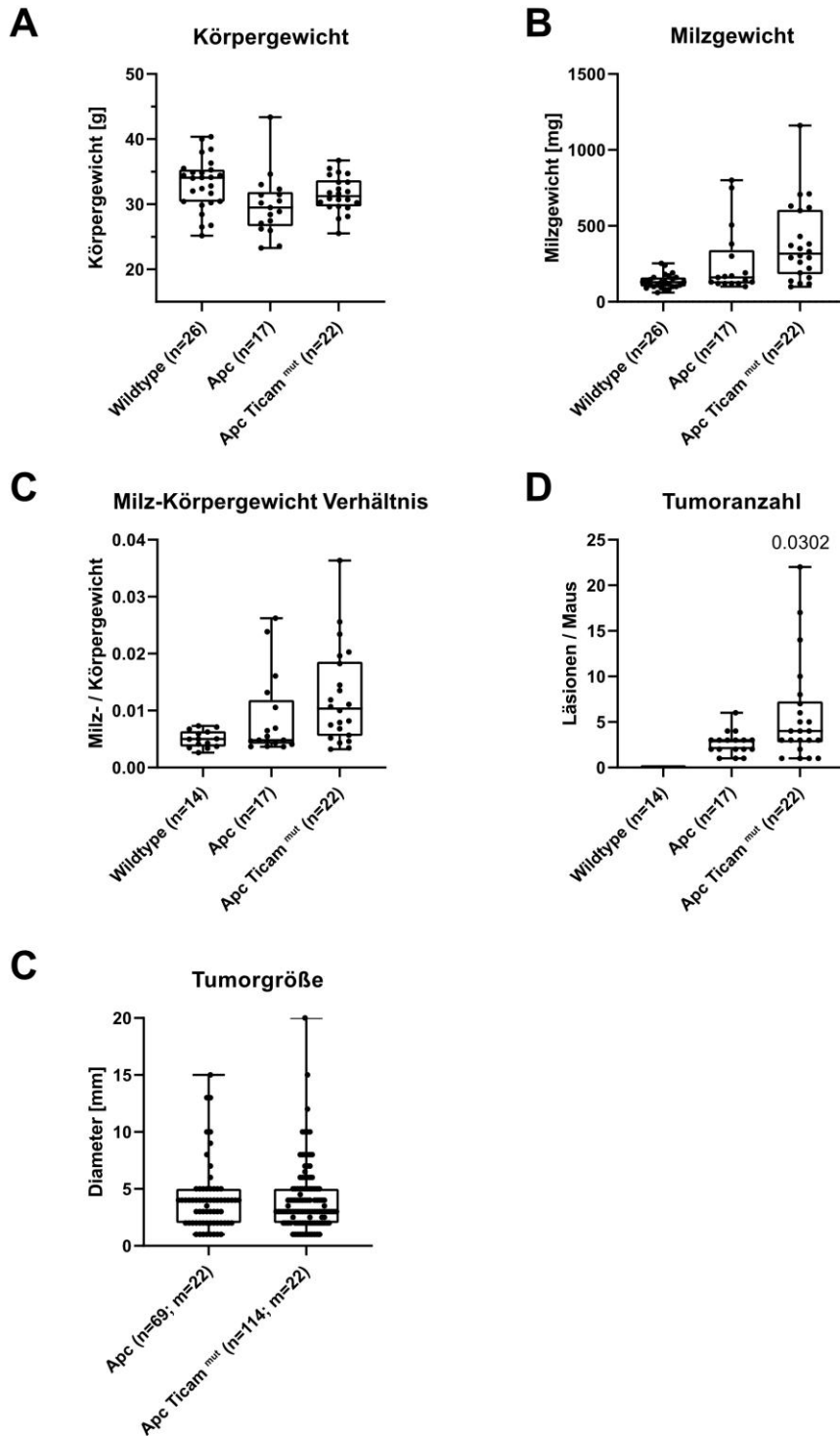


Abbildung 6.9 Physiologische Charakterisierung des Ticam^{mut} Apc^{1638N/+} Mausmodells

Körpergewicht (A), Milzgewicht (B), Milz- zu Körpergewicht-Verhältnis (C), Tumoranzahl (D) und Tumorgroße (E) des Ticam1 Defizienten Mausmodells im Apc^{1638N/+} Hintergrund. Signifikanzen wurden mittels Man-Whitney-Tests im Vergleich zur Parentalmauslinie Apc^{1638N/+} bestimmt und sind in Form des signifikanten P-Wertes über der Veränderten Gruppe dargestellt. Die Ergebnisse der Apc^{1638N/+} und Wildtyp Mäuse wurden bereits für den Vergleich zum Tlr3 Mausmodells verwendet und werden im Sinne der Reduktion von Versuchstieren (3R) hier erneut als Vergleichsgruppen gezeigt.

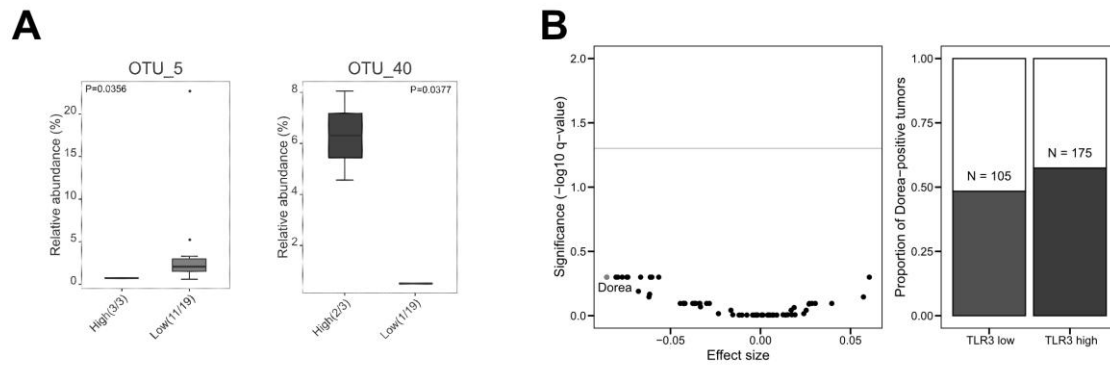


Abbildung 6.10: Mikrobiota Analyse humaner Proben

16S-rRNA-Sequenzierung humaner Stuhlproben (A) von $n=22$ an Darmkrebs erkrankten Personen mit hohen und niedrigen Tlr3 RNA-Expressionsniveaus in den Tumorgeweben zeigte einen Unterschied in zwei „organisational Taxonomic Units“ (OTU). Nach EzTaxon Analysen stimmen die 16S-rRNA-Sequenzen des OTU 5 mit 99,53 % Ähnlichkeit mit Bakterien des Genus *Oscillibacter* überein und die des OTU 40 zu 99,79 % mit Bakterien des Genus *Phocaeicola*. Die Stuhlproben wurden mit Einverständnis der Patienten und mit Genehmigung durch die Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar analysiert. Analyse bakterieller Sequenzen von Tumoren eines TCGA-Datensatzes (B) stratifiziert nach TLR3 und TICAM1 Deletionen (TLR3 low; $n=227$) und ohne TLR3 und TICAM1 Deletion (TLR3 high; $n=308$). Das Signifikanzniveau ist mittels der grauen Linie dargestellt. Keiner der reduziert oder gehäuft vorkommenden Taxa ist signifikant verändert. Sequenzen der Bakterien, welche unter die Klasse Clostridia, Familie Lachnospiraceae und den Genus *Dorea* fallen, sind am häufigsten, jedoch nicht signifikant reduziert und in 105 Tumorproben der Patienten mit TLR3 Deletion (TLR3 low) und 175 Tumorproben der Patienten mit normaler TLR3 Ausprägung (TLR3 high) zu finden. Die Analyse wurde von Georg Zeller und Jakob Wirbel durchgeführt (AG Zeller, EMBL Heidelberg).

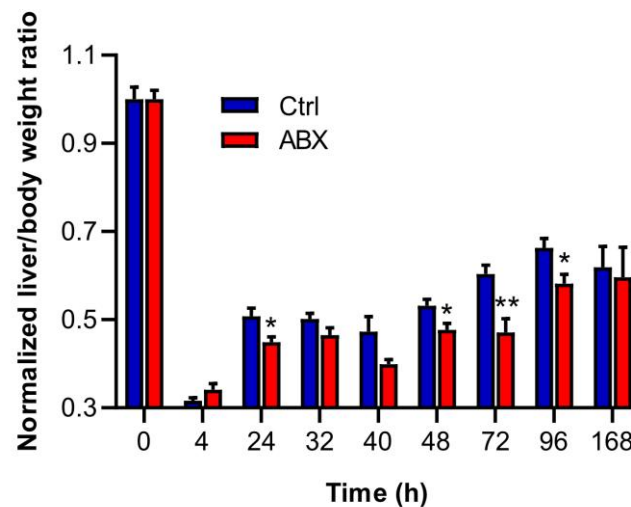


Abbildung 6.11: Normalisiertes Leber-zu-Körpergewichts-Verhältnis nach PHx der Antibiotika behandelten Mäuse

Das Leber-zu-Körpergewichts-Verhältnis zu angegebenen Zeitpunkten nach partieller Hepatektomie (PHx) wurde ermittelt und auf den 0 Stundenzeitpunkt der jeweiligen Gruppe (Kontrolle = Ctrl oder Antibiotikabehandlung = ABX) normalisiert. Gezeigt werden Mittelwert von $n \leq 5$ Mäusen. Operation wurden von Dr. Yuhan Yin durchgeführt. Daten sind bereits in Doktorarbeit von Dr. Yuhan Yin und gemeinsamer Publikation veröffentlicht (Yin 2023, Yin und Sichler et al. 2023). Signifikante Ergebnisse wurden mit Hilfe des zweiseitigen Student T-Test überprüft und dargestellt als $p > 0,05$ = n.s. (nicht gezeigt), $*p < 0,05$ und $**p < 0,01$.

Tabelle 6.1: Kollektiv der an Kolorektalem Karzinom erkrankter Personen

Alle Personen des verwendeten Kollektivs wurden in der Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Klinikums rechts der Isar operiert. Die Gewebe wurden mit Einverständnis der Patienten und mit Genehmigung durch die Ethikkommission der School of Medicine and Health der TUM Analysiert.

Parameter	Spezifizierung	Zusammensetzung	Anzahl
Geschlecht	Männlich	62,6 %	82
	Weiblich	37,4 %	49
Alter	Median	68 (35 – 90)	-
	Durchschnitt	67 ± 11,68	
Anatomische Lokalisation	Colon	94,7 %	124
	Rektum	5,3 %	7
Tumorstadium (pT)	T1	5,3 %	7
	T2	10,7 %	14
	T3	61,8 %	81
	T4	21,4 %	28
Lymphknoten Status (pN)	N0	22,1 %	29
	N1	51,9 %	68
	N2	24,4 %	32
Metastasierung	M0	97,7 %	128
	M1	2,3 %	3

Tabelle 6.2: Core Enrichment HALLMARK EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION

Anreicherung von Genen des Signalwegs Epithelial Mesenchymal Transition der Annotationsdatenbank *Hallmark* aus der RNA-Sequenzierung der humanen kolorektal Tumorproben (n=10) mit hoher und niedriger Ausprägung von TLR3 im Tumorgewebe aus dem eigenen Kollektiv der Klinik und Poliklinik für Chirurgie (TUM, München).

SYMBOL	TITLE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES
ACTA2	actin alpha 2, smooth muscle [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:130]	15460	-0.2247512	-0.4004774
SPP1	secreted phosphoprotein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11255]	15469	-0.2251278	-0.3977548
MMP3	matrix metalloproteinase 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7173]	15470	-0.2251422	-0.3946893
FBN1	fibrillin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3603]	15478	-0.2254729	-0.3919192
CCN2	cellular communication network factor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2500]	15502	-0.2265614	-0.3898195
TNFRSF12A	TNF receptor superfamily member 12A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18152]	15633	-0.2333493	-0.3922105
MSX1	msh homeobox 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7391]	15668	-0.2345971	-0.3904725
BMP1	bone morphogenetic protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1067]	15753	-0.2391579	-0.3908141

EMP3	epithelial membrane protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3335]	15797	-0.2413634	-0.3893695
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6025]	15799	-0.2415778	-0.3861231
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10672]	15965	-0.2501005	-0.3897851
IGFBP3	insulin like growth factor binding protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5472]	16000	-0.2523134	-0.3878059
PLOD3	procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9083]	16003	-0.2524703	-0.384454
FGF2	fibroblast growth factor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3676]	16255	-0.2658904	-0.3915846
VIM	vimentin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12692]	16286	-0.2680863	-0.3892193
SAT1	spermidine/spermine N1- acetyltransferase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10540]	16308	-0.2689918	-0.3864563
CCN1	cellular communication network factor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2654]	16314	-0.2692541	-0.3830043
PMP22	peripheral myelin protein 22 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9118]	16400	-0.2742988	-0.3829103
LAMC1	laminin subunit gamma 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6492]	16433	-0.2766611	-0.380514
PTH1H	parathyroid hormone like hormone [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9607]	16478	-0.2790155	-0.3785996
FLNA	filamin A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3754]	16490	-0.2796039	-0.3752637
COL6A3	collagen type VI alpha 3 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2213]	16499	-0.2802029	-0.3717912
LUM	lumican [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6724]	16566	-0.2836628	-0.3707558
MMP1	matrix metalloproteinase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7155]	16866	-0.2987042	-0.3794955
MATN3	matrilin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6909]	16960	-0.3041539	-0.3793376
PLOD2	procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9082]	17131	-0.3148608	-0.382332

IGFBP2	insulin like growth factor binding protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5471]	17170	-0.31665	-0.3796482
QSOX1	quiescin sulfhydryl oxidase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9756]	17207	-0.3186162	-0.376852
MGP	matrix Gla protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7060]	17211	-0.3187099	-0.372641
LOXL2	lysyl oxidase like 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6666]	17290	-0.3243343	-0.3715658
BDNF	brain derived neurotrophic factor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1033]	17480	-0.3354972	-0.375093
SDC1	syndecan 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10658]	17590	-0.3413077	-0.3751146
COPA	COPI coat complex subunit alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2230]	17748	-0.3494678	-0.3770809
PDGFRB	platelet derived growth factor receptor beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8804]	17785	-0.351876	-0.3738318
PCOLCE2	procollagen C-endopeptidase enhancer 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8739]	17834	-0.3552023	-0.3710514
MFAP5	microfibril associated protein 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29673]	17845	-0.3557306	-0.3666362
GPX7	glutathione peroxidase 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4559]	17949	-0.3612963	-0.3661286
SFRP4	secreted frizzled related protein 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10778]	17993	-0.3636126	-0.3630195
COL6A2	collagen type VI alpha 2 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2212]	18217	-0.3745853	-0.3674708
PRSS2	serine protease 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9483]	18287	-0.3777838	-0.3652824
ECM2	extracellular matrix protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3154]	18292	-0.3778926	-0.3603084
DKK1	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2891]	18341	-0.3801758	-0.357188
VEGFA	vascular endothelial growth factor A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12680]	18347	-0.380337	-0.3522236
GAS1	growth arrest specific 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4165]	18408	-0.3836559	-0.3495697

SCG2	secretogranin II [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10575]	18658	-0.396718	-0.3548333
GPC1	glypican 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4449]	18784	-0.403164	-0.3546979
PRRX1	paired related homeobox 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9142]	18814	-0.4051448	-0.3504237
MXRA5	matrix remodeling associated 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7539]	19079	-0.4198082	-0.3560154
ANPEP	alanyl aminopeptidase, membrane [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:500]	19320	-0.4349617	-0.3603727
COMP	cartilage oligomeric matrix protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2227]	19428	-0.4410187	-0.3589509
SNAI2	snail family transcriptional repressor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11094]	19446	-0.4426173	-0.3536525
COL12A1	collagen type XII alpha 1 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2188]	19513	-0.4469469	-0.3503939
TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11761]	19560	-0.4510106	-0.3462234
ECM1	extracellular matrix protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3153]	19785	-0.4675139	-0.3494522
VCAN	versican [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2464]	19889	-0.4730859	-0.3474225
LOXL1	lysyl oxidase like 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6665]	19926	-0.4755631	-0.3424892
COLGALT1	collagen beta(1-O)galactosyltransferase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26182]	19953	-0.4774621	-0.3371019
IL32	interleukin 32 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16830]	20039	-0.4845423	-0.3341452
GADD45B	growth arrest and DNA damage inducible beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4096]	20074	-0.4867781	-0.3289737
RHOB	ras homolog family member B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:668]	20099	-0.4885662	-0.3233494
RGS4	regulator of G protein signaling 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10000]	20138	-0.4915908	-0.3182837
GJA1	gap junction protein alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4274]	20263	-0.5014412	-0.3167673

LAMA2	laminin subunit alpha 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6482]	20382	-0.5110214	-0.3148636
LAMC2	laminin subunit gamma 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6493]	20469	-0.517707	-0.3114982
PTX3	pentraxin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9692]	20522	-0.5225502	-0.3066105
NNMT	nicotinamide N-methyltransferase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7861]	20569	-0.5266511	-0.30141
ENO2	enolase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3353]	20574	-0.5274757	-0.2943994
COL5A2	collagen type V alpha 2 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2210]	20584	-0.5282262	-0.2875927
LOX	lysyl oxidase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6664]	20594	-0.5291247	-0.2807737
MMP14	matrix metalloproteinase 14 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7160]	20687	-0.536438	-0.2774103
NTM	neurotrophin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17941]	20699	-0.5373437	-0.2705651
HTRA1	HtrA serine peptidase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9476]	20741	-0.5407109	-0.264959
VEGFC	vascular endothelial growth factor C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12682]	20760	-0.5424554	-0.2583441
COL3A1	collagen type III alpha 1 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2201]	20768	-0.5429515	-0.2512512
NID2	nidogen 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13389]	20802	-0.5462843	-0.2452266
THBS2	thrombospondin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11786]	20880	-0.5522425	-0.2410055
GADD45A	growth arrest and DNA damage inducible alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4095]	20972	-0.5589653	-0.2372924
SERPINE1	serpin family E member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8583]	21036	-0.5643209	-0.2323072
EFEMP2	EGF containing fibulin extracellular matrix protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3219]	21039	-0.564445	-0.2247075
PLOD1	procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9081]	21071	-0.5669405	-0.218316
CDH2	cadherin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1759]	21072	-0.5671962	-0.2105932

COL1A2	collagen type I alpha 2 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2198]	21105	-0.5710921	-0.204188
FN1	fibronectin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3778]	21176	-0.577987	-0.1993165
IL6	interleukin 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6018]	21194	-0.5799353	-0.1921484
PCOLCE	procollagen C-endopeptidase enhancer [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8738]	21233	-0.5833212	-0.1858336
COL1A1	collagen type I alpha 1 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2197]	21258	-0.5860977	-0.1788814
COL16A1	collagen type XVI alpha 1 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2193]	21283	-0.5885041	-0.1718965
COL11A1	collagen type XI alpha 1 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2186]	21284	-0.5885395	-0.1638831
COL5A1	collagen type V alpha 1 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2209]	21301	-0.5904922	-0.1565284
LGALS1	galectin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6561]	21315	-0.5924262	-0.1490189
PVR	PVR cell adhesion molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9705]	21336	-0.5944684	-0.1417814
MCM7	minichromosome maintenance complex component 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6950]	21532	-0.6129248	-0.1417882
BGN	biglycan [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1044]	21583	-0.6189104	-0.1355029
SPARC	secreted protein acidic and cysteine rich [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11219]	21671	-0.6302657	-0.1306477
POSTN	periostin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16953]	21714	-0.635518	-0.1237936
CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18831]	21861	-0.6544492	-0.1211363
FAP	fibroblast activation protein alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3590]	21880	-0.6567689	-0.1129649
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11820]	21884	-0.6574512	-0.1041417
FMOD	fibromodulin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3774]	21906	-0.6594455	-0.0960623

PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9053]	21908	-0.6600399	-0.0871182
COL4A2	collagen type IV alpha 2 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2203]	21937	-0.6637023	-0.0792807
ITGB5	integrin subunit beta 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6160]	21996	-0.6717177	-0.072619
FSTL3	follistatin like 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3973]	22023	-0.6751844	-0.0645395
OXTR	oxytocin receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8529]	22212	-0.703182	-0.0630176
COL5A3	collagen type V alpha 3 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14864]	22237	-0.7074709	-0.0544128
SERPINH1	serpin family H member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1546]	22365	-0.7285417	-0.0499328
P3H1	prolyl 3-hydroxylase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19316]	22366	-0.7287596	-0.0400102
COL7A1	collagen type VII alpha 1 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2214]	22653	-0.778515	-0.0416601
COL4A1	collagen type IV alpha 1 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2202]	22675	-0.7842998	-0.0318807
LAMA1	laminin subunit alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6481]	22870	-0.831548	-0.028868
SLC6A8	solute carrier family 6 member 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11055]	22932	-0.848379	-0.0199294
INHBA	inhibin subunit beta A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6066]	23044	-0.885353	-0.012629
FOXC2	forkhead box C2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3801]	23336	-1.0235789	-0.0111564
PPIB	peptidylprolyl isomerase B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9255]	23537	-1.4768461	3.86E-04

7 Publikationsliste

Veröffentlichte Artikel

Sichler, A., N. Hüser and K.-P. Janssen (2024). "Boosting liver regeneration: kinase inhibitor as a new tool to prevent liver failure." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9(1): 168. DOI: 10.1038/s41392-024-01879-0

Yin, Y.*, **Sichler, A.***, J. Ecker, M. Laschinger, G. Liebisch, M. Horing, M. Basic, A. Bleich, X. J. Zhang, L. Kubelsbeck, J. Plagge, E. Scherer, D. Wohlleber, J. Wang, Y. Wang, M. Steffani, P. Stupakov, Y. Gartner, F. Lohofer, C. Mogler, H. Friess, D. Hartmann, B. Holzmann, N. Huser and K. P. Janssen (2023). "Gut microbiota promote liver regeneration through hepatic membrane phospholipid biosynthesis." *J Hepatol* 78(4): 820-835. DOI: 10.1016/j.jhep.2022.12.028 *(shared first authorship)

Ecker, J., E. Benedetti, A. S. D. Kindt, M. Horing, M. Perl, A. C. Machmuller, **A. Sichler**, J. Plagge, Y. Wang, S. Zeissig, A. Shevchenko, R. Burkhardt, J. Krumsiek, G. Liebisch and K. P. Janssen (2021). "The Colorectal Cancer Lipidome: Identification of a Robust Tumor-Specific Lipid Species Signature." *Gastroenterology* 161(3): 910-923 e919. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.05.009

Ehrenfeld, M., A. Schrade, T. Flisikowska, M. Perl, N. D. Hirsch, **A. Sichler**, L. Geyer, K. Flisikowski, D. Wilhelm, S. J. Schober, L. Johannes, A. Schnieke and K. P. Janssen (2022). "Tumor Targeting with Bacterial Shiga Toxin B Subunit in Genetic Porcine Models for Colorectal Cancer and Osteosarcoma." *Mol Cancer Ther* 21(4): 686-699. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0445

Wissenschaftliche Vorträge

Sichler A. 2023. "The role of the microbiome for liver regeneration and TLR3 dependent tumor suppression", Gastvortrag Biozentrum Universität Würzburg, 27.4.2023, Würzburg, Deutschland

Sichler A. 2023. "Gut microbiome is crucial for liver regeneration and lipid metabolism after resection", International AEK Cancer Congress 2023, 15. – 17.2.2023, Kassel, Deutschland

Sichler A. 2021, "Dissecting TRIF- and TLR3- mediated signaling in intestinal tumor development", CRC1371 Annual Retreat, 1.2021, Alpbach, Österreich

Sichler A. 2020 "TLR3 suppresses colorectal carcinogenesis, presumably through up-regulation of T-cell attracting CXCL chemokines", 7th Immunotherapy of Cancer Conference, 10.2020, online

Sichler A. 2020, “Dissecting TRIF- and TLR3- mediated signaling in intestinal tumor development”, CRC1371 Half Annual Retreat, 6.2020, online

Posterpräsentationen

Sichler A. 2021, “Dissecting TRIF- and TLR3- mediated signaling in intestinal tumor development”, CRC1371 Annual Retreat, October 2021, Alpbach, Austria

Sichler A. 2021, “Apc^{1638N/+} model: comparison of tumorigenesis under SPF and GF conditions” CRC1371 Annual Retreat, October 2021, Alpbach, Austria

Sichler A. 2020, “TLR3 has opposing effects on colon cancer: analysis of cell-intrinsic vs. -extrinsic mechanisms”, CRC1371 Annual Retreat, 1.2020, Alpbach, Austria

Frey, M. und **Sichler, A.** 2019 “Role of the gut microbiota in colorectal cancer - Interactions of gut microbiota, colorectal cancer, TLR3 and immune cells”, International AEK Cancer Congress, 2.2019, Heidelberg

Sichler A. 2018, “Gut microbiota and Toll-like receptors as regulators of colorectal cancer formation”, 4th AEK Autumn School 2018, 6.11.2018, Potsdam

8 Danksagung

Diese Arbeit war eine Reise, die ohne die Unterstützung vieler Menschen nicht möglich gewesen wäre, und ich möchte hiermit meine aufrichtige Dankbarkeit ausdrücken.

Zuallererst danke ich Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen für seine wissenschaftliche Anleitung, seine zahlreichen Ideen, sein Vertrauen in meine Fähigkeiten und die Freiheit, meiner eigenen wissenschaftlichen Intuition zu folgen. Ganz besonders schätze ich seine herzliche, menschliche Art und seine Offenheit für Fragen. Meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Hofmann danke ich nicht nur für seine fachliche Unterstützung und interessanten Anregungen, sondern auch für seine inspirierende Begleitung als Mentor im Rahmen des Deutschlandstipendiums. Bis heute prägt mich sein Rat, dass man nicht immer von Anfang an wissen muss, wohin der Weg führt. Meiner Mentorin PD Dr. Raquel Mejías-Luque danke ich für ihre fachliche Expertise und ihren Rat, sowie ihre Unterstützung in meiner Entwicklung. Durch ihre stetige Ermutigung und Hilfestellung habe ich viel gelernt und wertvolle Perspektiven für meine Zukunft gewonnen. Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Melanie Laschinger, die mir sowohl wissenschaftlich als auch persönlich eine große Stütze war. Ihre Förderung und ihre ständige Bereitschaft, auf meine Fragen einzugehen, haben mich immens unterstützt. Sie ist mir ein Vorbild, sowohl in ihrer wissenschaftlichen Präzision als auch in ihrer bewundernswerten Entschlossenheit. Prof. Dr. Holzmann danke ich für seine Unterstützung und den intensiven Austausch im Hepatektomieprojekt. Sein enormes Wissen, seine Offenheit für meine Ideen und die Zusammenarbeit auf Augenhöhe haben mich ermutigt und bereichert.

Vielen Dank an Anja, Gabi und Felicitas, ohne die das Arbeiten im Labor nicht möglich wäre. Ihre Unterstützung, ihr Engagement und die gemeinsamen Gespräche – sei es über Urlaubserlebnisse oder den Alltag – haben maßgeblich zu einer angenehmen und produktiven Arbeitsatmosphäre beigetragen. Ein besonderes Dankeschön gilt Widya, die mich in stressigen Phasen stets unterstützt hat. Ihre Hilfe war von unschätzbarem Wert, sei es bei der ersten 16S-Sequenzierung der keimfreien Mäuse oder bei der Genotypisierung, die uns mehrfach vor Herausforderungen gestellt hat. Widya war nicht nur eine hervorragende Kollegin, sondern auch eine großartige persönliche Unterstützung, mit der ich viele wertvolle und lustige Momente teilen durfte und die Tage von uns allen mit hervorragendem Essen versüßt hat.

Besonders in Erinnerung geblieben sind mir die Experimente mit Yasmin und Yuhan. Trotz oft hoher Temperaturen und körperlicher Anstrengungen waren diese Momente geprägt von starkem Teamgeist und einer positiven Atmosphäre.

Ein weiteres großes Dankeschön geht an Anna Ralser und Sebastian Jarosch. Ihre wissenschaftliche Unterstützung und die enge persönliche Bindung haben mir durch viele Phasen meiner Arbeit geholfen. Ihre Erfahrungen als fortgeschrittene Doktoranden gaben mir stets das Gefühl, nicht allein zu sein.

Ein herzliches Dankeschön an meine engsten Freunde, insbesondere an Laura und Annalisa, die in dieser Zeit zu meinen größten Stützen geworden sind. Wir haben

zusammen gelacht und geweint, und ich bin zutiefst dankbar für die Bindung, die wir aufgebaut haben. Danke auch an Patrick, Flo, Melanie und Leonie, die immer ein offenes Ohr und kluge Ideen für meine Herausforderungen hatten. Ohne die Unterstützung meiner Freunde hätte ich viele Hürden nicht überwinden können. Es ist ein großes Glück, solch ein starkes Netz an Menschen zu haben, die mir mit Rat und emotionaler Unterstützung zur Seite standen.

Zuletzt danke ich meiner Familie für ihren bedingungslosen Rückhalt und das Interesse an meiner Arbeit. Ihre Fürsorge und das Wissen, dass ich immer auf sie zählen kann, haben mir die Kraft gegeben, diese lange Reise zu bewältigen. Ohne eure ständige Ermutigung und euer Verständnis wäre dieser Weg ungleich schwerer gewesen.

Es sind die Menschen, die das Leben besonders machen, und durch euch wurde diese Zeit zu einer ganz besonderen in meinem Leben. Diese Arbeit ist das Ergebnis einer gemeinsamen Anstrengung vieler, und ich bin zutiefst dankbar. Ein herzliches Dankeschön an alle, die an meiner Seite waren.