

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede

Arbeitsgruppe für Molekulare Onkoimmunologie

Leiterin: Frau Prof. Dr. Ana Maria Waaga-Gasser

**Untersuchungen zur Expression von Toll-like Rezeptoren im Pankreas - und
Nierenzellkarzinom sowie im kolorektalen Karzinom**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Julia Fertinger

aus Markt Bibart

Würzburg, Januar 2007

Referentin: Prof. Dr. Ana Maria Waaga-Gasser

Koreferent: Prof. Dr. Markus Böck

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2007

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Das humane Immunsystem - Die angeborene und erworbene Immunität	1
1.2 Toll-Like Rezeptoren und die pro-inflammatorische Antwort	3
1.3 Toll-Like Rezeptoren und die antivirale Immunantwort	4
1.4 Toll-like Rezeptoren	5
1.4.1 TLR1	5
1.4.2 TLR2	6
1.4.3 TLR3	6
1.4.4 TLR4	6
1.4.5 TLR5	7
1.4.6 TLR6	7
1.4.7 TLR7, TLR8	8
1.4.8 TLR9	8
1.4.9 TLR10	8
1.4.10 TLR11	9
1.5 Der TLR-Signalweg	11
1.6 Klinische Aspekte untersuchter Tumore	13
1.6.1 Pankreaskarzinom	14
1.6.2 Nierenzellkarzinom	15
1.6.3 Kolorektales Karzinom	15
2. Fragestellung	17
3. Material und Methoden	18
3.1 Patientengut	18
3.1.1 Patienten mit Pankreaskarzinom	18
3.1.2 Patienten mit Nierenzellkarzinom	20
3.1.3 Patienten mit kolorektalem Karzinom	22
3.2 Immunhistologie	23
3.3 Real-Time-PCR Analyse zum Nachweis von Toll-like Rezeptor Genen im Tumorgewebe	25

	Seite
4. Ergebnisse	27
4.1 Immunhistologie	27
4.1.1 Toll-like Rezeptor-Expression im Pankreaskarzinom	27
4.1.2 Toll-like Rezeptor-Expression im Nierenzellkarzinom	33
4.1.3 Toll-like Rezeptor-Expression im kolorektalen Karzinom	37
4.1.4 Vergleich der Toll-like Rezeptor-Expression untersuchter Tumore	41
4.2 Real-Time-PCR	43
4.2.1 Ergebnisse der Genexpression im Pankreaskarzinom	43
4.2.2 Ergebnisse der Genexpression im Nierenzellkarzinom	44
4.2.3 Ergebnisse der Genexpression im kolorektalen Karzinom	45
4.3 Zusammenfassung der morphologischen und molekularen Ergebnisse	46
5. Beantwortung der Fragestellung	48
6. Diskussion	51
7. Zusammenfassung	56
8. Ausblick	58
9. Literaturverzeichnis	69
10. Anhang	72

1. Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem – Die angeborene und erworbene Immunität

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionen durch verschiedene Pathogene, wie Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten. Der Ausdruck „Immunität“ bezeichnet die allgemeine Fähigkeit eines Wirtsorganismus, dem Eindringen von Mikroorganismen entgegenzuwirken, die den Wirt sonst schädigen. Das Immunsystem muss dabei in den Körper eindringende fremde Substanzen und fremde Substanzen auf Zellen, sogenannte Antigene erkennen und ausschalten, ohne die körpereigenen Strukturen anzugreifen. Die Unterscheidung von „selbst“ und „fremd“, worunter auch pathologisch veränderte eigene Zellen wie Tumorzellen und virusinfizierte Zellen verstanden werden, ist eine der wichtigsten Fähigkeiten des Immunsystems. Bei höheren Vertebraten wird die angeborene (natürliche) Immunität von der erworbenen (adaptiven) Immunität unterschieden. Das erworbene Immunsystem erlaubt die Wiedererkennung von Pathogenen bei einer bereits abgelaufenen Infektion und bot damit einen evolutionsbedingten Selektionsvorteil. Die angeborene Immunität blieb daher erhalten (1). Wesentliche Unterschiede beider Formen der Abwehr liegen in den Mechanismen und Rezeptoren der Pathogenerkennung.

Die angeborene Immunität wird insbesondere durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) wie dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und Monozyten und repräsentiert. Das erworbene Immunsystem wird durch zwei Klassen spezialisierter Zellen vertreten, den B- und T-Lymphozyten. Anstelle mehrerer verschiedener Rezeptoren, von denen jeder ein konserviertes Oberflächenmolekül eines Krankheitserregers erkennt, trägt jede ungeprägte T- oder B-Zelle nur Rezeptoren einer einzigen Spezifität. Diese werden durch einen einzigartigen genetischen Mechanismus festgelegt, welcher während der Entwicklung dieser Zellen im Knochenmark und im Thymus abläuft (2).

Die Gene für die variablen Regionen der Rezeptoren werden als Gruppen von Gensegmenten (V-, D- und J-Segmente) weitergegeben. Diese Gensegmente werden in unterschiedlichen Lymphozyten zu verschiedensten DNA-Sequenzen zusammengesetzt (somatische Rekombination). Die große Anzahl der T- und B-Zellen in der Gesamtpopulation bewirkt ein fast unbegrenztes Repertoire an Antigenrezeptoren (2). Die somatische Selektion umfasst verschiedene Mechanismen, in denen autoreaktive Lymphozyten eliminiert und relevante

Effektorzellen ausgewählt werden. Die Präsentation von Antigenen auf APC ohne sogenannte kostimulierende Signale führt zu einer permanenten Inaktivierung des für das Antigen spezifischen Lymphozyten. Da die Induktion der kostimulierenden Moleküle B7.1 und B7.2 nur nach der Erkennung von PAMPs (*Pathogen associated Molecular Patterns*) durch mustererkennende Rezeptoren erfolgt, scheint die angeborene Immunität bedeutend für die Vermeidung von Immunität gegen Selbstantigene und nichtpathogene Umweltantigene zu sein (3). So könnten Autoimmunkrankheiten und Allergien zum Teil durch Störung dieser Mechanismen erklärt werden.

Mechanismen der angeborenen Immunantwort sind zur Induktion der erworbenen Immunität erforderlich. Die Antigenpräsentation auf MHC (*Major Histocompatibility Complex*, Haupthistokompatibilitätsantigen)-Klasse-II-Molekülen und die gleichzeitige Expression kostimulierender Proteine auf APC führen zur Aktivierung und klonalen Proliferation der zu diesem Antigen passenden nativen CD4⁺T-Lymphozyten, die für die Aktivierung von B-Zellen, CD8⁺T-Zellen und weiterer Makrophagen benötigt werden (2).

Wenn pathogene Krankheitserreger eine Epithelbarriere überwinden, werden sie sofort von Phagozyten erkannt. Daraufhin werden durch die unmittelbare, angeborene Immunreaktion mit Hilfe von Gewebsmakrophagen und neutrophilen Granulozyten, antimikrobiellen Peptiden und des Komplementsystem, die eindringenden Mikroorganismen bekämpft (4). Diese Reaktion kann schon ausreichen, um eine Ausbreitung der Infektion zu verhindern. Anderenfalls steuern die Immunzellen durch die Sekretion von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen, durch Antigenpräsentation auf MHC und durch die Expression kostimulierender Moleküle die weitere angeborene und erworbene Immunantwort (2). Durch das Erkennen der Anwesenheit und der Art einer Infektion ist somit das angeborene Immunsystem die erste Verteidigungslinie im Kampf gegen Pathogene. Das angeborene Immunsystem besitzt eine große Anzahl von Rezeptoren, die man unter dem Begriff PRR (*Pattern Recognition Receptors*) zusammenfasst, die sogenannte PAMPs erkennen können (5). PAMPs besitzen drei allgemeine Merkmale, die sie zu idealen Kandidaten für eine solche Erkennung auszeichnen: 1. PAMPs werden nur von Mikroben und nicht vom Wirtsorganismus produziert. Hierdurch kann der Wirtsorganismus diese als fremd (Nicht-Eigen) erkennen. 2. PAMPs variieren nicht zwischen Mikroorganismen einer bestimmten Klasse, so dass es beim hochkonservierten Lipid-A Muster von Lipopolysacchariden (LPS)

beispielsweise einem einzigen PAMP-Rezeptor ermöglicht, die Gegenwart fast aller Gram-negativen Bakterien zu erkennen. 3. PAMPs sind für das Überleben von Mikroorganismen essentiell. Mutation oder Verlust sind entweder für den Mikroorganismus letal oder gehen mit einer stark reduzierten Anpassungsfähigkeit einher. Daher bilden sich keine sogenannten Escape-Mutanten (6). Im Gegensatz zu induzierbaren Virulenzfaktoren werden PAMPs also konstitutiv exprimiert. Ebenfalls im Gegensatz zu Virulenzfaktoren werden sie jedoch auch von apathogenen Mikroorganismen exprimiert, so dass im Zuge der PAMP-Erkennung nur zwischen „Eigen“ und „Nicht-Eigen“ jedoch nicht zwischen „Pathogen“ und „Nicht-Pathogen“ unterschieden werden kann. Die genauen Mechanismen, durch welche diese wichtige Unterscheidung ermöglicht wird, sind bislang größtenteils unbekannt. Jedoch ist bekannt, dass PAMPs von zellspezifischen Rezeptoren erkannt werden und folglich spezifische Immunantworten auslösen. Die Identifizierung der Toll-Like Rezeptoren (TLRs) als Rezeptoren für Moleküle mikrobiellen Ursprungs hat neues Licht in das Zusammenspiel von angeborener und erworbener Immunität gebracht.

1.2 Toll-Like Rezeptoren und die pro-inflammatorische Antwort

Das TLR-Signal induziert die Produktion vieler Zytokine (7). Die TLRs wurden als eine der wichtigsten Zellrezeptor-Familien bei der Induktion unmittelbarer pro-inflammatorischer Antworten auf eine große Vielfalt von Pathogenen von Viren über Bakterien bis hin zu Pilzen identifiziert. Es hat sich gezeigt, dass die TLR-Bindung zu einer Produktion von IL-6, IL-8, RANTES und TNF- α als auch anderer Zytokine führt, die für die Entwicklung erworbener Immunantworten von grundlegender Bedeutung sind (7, 8). Die Eliminierung funktionaler TLRs resultiert in Organismen und Zellen, die gegenüber immunologischer Stimuli weniger empfänglich sind (9, 10). Die Konsequenzen hierfür sind unbekannt, es wurden aber verschiedene humane TLR- Polymorphismen identifiziert, die bei den Individuen dazu beitragen, eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber Infektionen und Erkrankungen zu verhindern. Die Expression von Toll-Like Rezeptoren auf Tumorzellen würde es ermöglichen, die Tumorprogression durch Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zu unterstützen. Die Tumorprogression wird unter anderem von den Zytokinen TNF- α und RANTES unterhalten. Folglich würde eine Infektion (PAMPs) Toll-Like Rezeptor-exprimierende Tumorzellen stimulieren und damit die Tumorprogression begünstigen.

1.3 Toll-Like Rezeptoren und die antivirale Immunantwort

TLRs sind ein wichtiger Initiator der antiviralen Antwort. Verschiedene TLRs, wie TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 und TLR9 binden bekanntermaßen virale Motive und initiieren Immunantworten, aber nur TLR3 und TLR4 haben die Aktivierung einer IRF3 (*Interferon Regulatory Transcription Factor 3*) nukleären Translokation aufgezeigt (11-14). Eine Stimulation mit dsRNA (Doppelstrang RNA) initiiert TLR3 und aktiviert darüber IRF3. TLR4, so nimmt man an, erkennt virale Glykoproteine (9, 15). Sowohl TLR3 und TLR4 Signale resultieren in einer Aktivierung von IRF3, aber die Immunantworten differieren in Quantität wie auch Qualität. TLR3 initiiert eine antivirale Antwort, die stärker und anhaltender ist als die Antwort, die durch das TLR4-Signal initiiert wird (16, 17). TLR4, so hat sich gezeigt, erfordert einen Beitrag der NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-B* Teileinheit) und p65, um ISREs (*IFN-stimulated Response Element*) nach einer Phosphorylierung von rIRF3 zu binden und zu aktivieren. Auch wenn zahlreiche TLRs sich als wichtig für die Verstärkung der Immunantwort auf Virusinfektionen erwiesen haben, so induziert nur TLR3 und in einem geringeren Ausmaß TLR4 potente IRF3-vermittelte antivirale Antworten (7, 16, 17, 20).

TLR3 erkennt dsRNA, um die oben diskutierten antiviralen Antworten zu initiieren (15, 21, 22). Auch wenn die TLR3 Bindung eine potente antivirale Antwort induziert, wird die Rolle von TLR3 *in vivo* bei einer viralen Infektion diskutiert. Die Doppelstrang-RNA-Kinase, PKR, und die zytosolische RNA Helicase, RIG1, binden, so hat sich gezeigt, unabhängig von der Sequenz an dsRNA Motive so kurz wie 11 Nukleotide durch 2 RNA-bindende-Domänen (23). Nach der dsRNA-Bindung wird PKR autophosphoryliert und phosphoryliert dann eIF-2 α , was zu einer Inhibition von NF- κ B führt (24). RIG1 bindet dsRNA durch 2 Caspase Rekrutierungsdomänen (CARD) und aktiviert die IRF3 und NF- κ B Transkriptionsfaktoren (25, 26). Es ist bekannt, dass PKR eine Komponente der TLR3 Signalkaskade ist, und es werden noch weitere Studien benötigt, um festzustellen, ob RIG1 und PKR TLR3 unabhängige Wege repräsentieren, die die antivirale Antwort induzieren.

1.4 Toll-like Rezeptoren

Das Protein *Toll* ist ein Typ I transmembranöser Rezeptor in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Die extrazelluläre Domäne von *Toll* enthält Leucin-reiche Regionen (LRR) und die intrazelluläre Domäne zeigt eine Homologie mit der des IL-1R und wird als Toll/IL-1R (TIR) Domäne bezeichnet. *Toll* wurde als ein essentielles Gen für die dorso-ventrale Entwicklung in dem *Drosophila*-Embryo identifiziert. Als inaktives Precursor-Protein wird es von der Protease *Easter* gespalten und löst durch seine Bindung an *Toll* eine Signalkaskade aus. Die Adapterproteine *Tube* und *Pelle* werden rekrutiert und in der Folge der NF- κ B ähnliche Transkriptionsfaktor *Dorsal* aktiviert. *Toll* spielt aber auch in der angeborenen Immunität von *Drosophila* eine entscheidende Rolle, da es an der mikrobiellen Abwehr gegen Bakterien und Pilze beteiligt ist. Im adulten Tier induziert eine durch *Toll* ausgelöste mikrobielle Infektion die Produktion von antimikrobiellen Proteinen im Fettgewebe (27, 28).

Eine sehr wichtige Rolle innerhalb der PRR des angeborenen Immunsystems in Wirbeltieren spielen die zu *Drosophila Toll*-homologen TLRs. TLS sind ebenso wie *Drosophila Toll* Typ I Transmembranproteine und stellen eine neue Familie von Wirbeltier-PRRs dar (29). Nach Aktivierung durch PAMP initiieren TLRs eine Signalkaskade über die Adapterproteine MyD88, IRAK und TRAF6, die letztlich Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP1 aktivieren (30, 31). Elf Mitglieder (TLR 1-11) wurden bis jetzt charakterisiert, wovon in den letzten Jahren fast alle Liganden aufgeklärt werden konnten (32).

1.4.1 TLR1

TLR1 erkennt das native mykobakterielle 19-kDa Lipoprotein, sowie ein synthetisches triazyliertes Lipopeptid durch Bildung von Heterodimeren mit TLR2 (33). Außerdem wurde gezeigt, dass TLR1 an der Erkennung des Oberflächenlipoproteins von *Borrelia burgdorferi* beteiligt ist (34).

1.4.2 TLR2

Für TLR2 wurde eine Beteiligung an der Erkennung von Peptidoglycan auf Gram-positiven Bakterien (35, 36), Lipoarabinomannan der mykobakteriellen Zellwand (36, 37), Glykosylphosphatidylinositol-Lipid von *Trypanosoma cruzi* (38) und Zymosan des Hefepilzes *Saccharomyces cerevisiae* (39), aufgezeigt. Underhill et al. wiesen weiterhin eine spezifische Rekrutierung von TLR2 zu Zymosan-haltigen Phagosomen nach, sowie die durch eine Punktmutation im TLR2-Gen aufgehobene Entzündungsantwort auf Zymosan. Für TLR2 ist weiterhin bekannt, dass dieser im Zuge der Erkennung von Mikroorganismen Heterodimere mit TLR1 und TLR6 auszubilden vermag (40). Ob diese Heterodimerisierung nach oder vor der Bindung an den Mikroorganismus erfolgt, ist bislang nicht bekannt. Die Lokalisation von TLR2 scheint sich auf APCs und auf Endothelzellen zu beschränken (41). Neuere Daten lassen den Schluss zu, dass TLR2 in nicht-stimulierten Makrophagen vor allem intrazellulär zu finden ist (42).

1.4.3 TLR3

TLR3 erkennt dsRNA, ein bekanntes virales Motiv (41). dsRNA wird von den meisten Viren im Laufe ihres Vermehrungszyklus gebildet und eignet sich daher als virales PAMP. TLR3 findet sich vorwiegend, jedoch nicht ausschließlich, auf dendritischen Zellen (41).

1.4.4 TLR4

TLR4 war der erste charakterisierte TLR (43). Dieser Rezeptor leitet das Erkennungssignal Gram-negativer Keime ins Zellinnere. Mäuse mit Mutationen in diesem Rezeptor, z. B. C3H/HeJ Mäuse, sind unempfindlich gegenüber bakteriellem Endotoxin (44, 45). Weitere bislang bekannte Liganden für TLR4 sind Lipoteichonsäuren (36), ein hitzelabiler, zellassoziierter Faktor von *Mycobacterium tuberculosis* (37) und das Hitzeschockprotein Hsp60 (46), sowie Mannan von *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* (47). Außerdem erkennt TLR4 Taxol, Hyaluronsäure, Heparansulfat und Fibrinogen. Endogene Liganden benötigen jedoch sehr hohe Konzentrationen, um TLR4 zu aktivieren (48).

TLR4 befindet sich im Säugetier vor allem auf Epithelzellen, Makrophagen und DC, sowie auf anderen Zellen des Immunsystems, z. B. B- und T-Zellen (43). Die Verteilung dieses Rezeptors innerhalb der Zelle ist bisher nur für intestinale Epithelzellen, die Makrophagenzelllinie

RAW264.7, Knochenmarkmakrophagen und Peritonealmakrophagen beschrieben worden (49). An der Erkennung von LPS durch TLR4 ist nicht nur der Rezeptor allein beteiligt. Vielmehr erfolgt die Erkennung durch einen Molekülkomplex. Dieser beinhaltet ein *LPS Binding Protein* (LBP), CD14, welches sich entweder löslich im Serum oder an einem Glykophosphoinositolanker an der Oberfläche von Makrophagen findet, sowie ein kleines Protein. Dieses kleine Protein, MD-2 genannt, besitzt keine Transmembranregion und wird an der Zelloberfläche assoziiert mit TLR4 gefunden. Seine genaue Funktion ist bislang unbekannt, es ist jedoch für die Bindung von LPS durch TLR4 notwendig (50).

1.4.5 TLR5

TLR5 erkennt bakterielles Flagellin (51). TLR5 wird an der basolateralen, nicht jedoch der apikalen Seite von intestinalen Epithelzellen exprimiert, wo er das Flagellin pathogener Bakterien, z. B. das von Salmonella, detektieren kann (52). Außerdem aktiviert Flagellin Lungenepithelzellen (53), was bedeuten könnte, dass TLR5 ein wichtiges Werkzeug zu Erkennung von Mikroorganismen an Schleimhautoberflächen darstellt (48).

Die polarisierte Expression könnte einen Mechanismus zur Unterscheidung zwischen pathogenen und apathogenen Bakterien darstellen, da sich die Bakterien der physiologischen Darmflora im gesunden Menschen nur intraluminal befinden und daher nicht mit diesem Rezeptor in Kontakt kommen. Denn im Unterschied zu pathogenen Bakterien sind die physiologischerweise vorkommenden Bakterien nicht in der Lage, die epitheliale Barriere zu durchbrechen und mit TLR5 in Kontakt zu treten. Diese Art polarisierter Expression wird auch für andere TLRs vermutet.

1.4.6 TLR6

TLR6 erkennt das di-azylierte mykoplasmatistische Makrophagen-aktivierende Peptid MALP-2, in dem dieser ein Heterodimer mit TLR2 ausbildet (54). Die konstitutive Expression von TLR1 und TLR6 erstreckt sich auf sehr viele verschiedene Zelltypen (6).

1.4.7 TLR7, TLR8

Das antivirale Medikament, R848, ein Ubiquimod-Analogon, stimuliert im humanen System über die TLR7 und TLR8 (55), während sein Signal im Maussystem nur über TLR7 und nicht über TLR8 weitergeleitet wird (56).

Außerdem konnte für TLR7 ein weiterer synthetischer Ligand identifiziert werden: Loxoribine, welches antivirale Eigenschaften besitzt (57, 58). Abgesehen von diesen synthetischen Liganden konnte kürzlich gezeigt werden, dass TLR7 und humaner TLR8 Guanosin- oder Uridin-reiche ssRNA von Viren wie dem HI-Virus und dem Influenza-Virus erkennt (57, 59, 60). Wirtseigene ssRNA wird wahrscheinlich nicht durch diese Rezeptoren wahrgenommen, da TLR7 und TLR8 im Endosom exprimiert werden, und wirtseigene ssRNA nicht dorthin gelangt.

TLR7 wird von plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs), sowie von myeloiden dendritischen Zellen (MDCs) exprimiert, während sich TLR8 in Monozyten findet (61).

1.4.8 TLR9

TLR9 erkennt die für Bakterien typische unmethylierte DNA bzw. unmethylierte CpG-Motive (56). Da der größte Teil der Säugetier-DNA methyliert ist, kann so zwischen „Fremd“ und „Eigen“ unterschieden werden. Dass dies nicht immer einwandfrei funktioniert und TLR9 an der Entwicklung autoimmuner Erkrankungen beteiligt sein kann, konnte Leandbetter et al. kürzlich nachweisen (62). Außerdem konnte gezeigt werden, dass TLR9 neben bakterieller CpG-DNA virale CpG-DNA zu erkennen vermag (63, 64). Die Erkennung setzt eine Internalisierung des zu detektierenden Agens in das späte lysosomale oder endosomale Kompartiment voraus (65). Die genaue subzelluläre Lokalisation von TLR9 ist jedoch bis heute nicht bekannt.

1.4.9 TLR10

Für TLR10 wurden bisher keine Liganden beschrieben (6). Außerdem wird vermutet, dass im Maussystem kein funktioneller TLR10 existiert, da das C-terminale Ende durch eine nichtverwandte, unproduktive Sequenz ersetzt wurde (48).

1.4.10 TLR11

Für den erst kürzlich identifizierten TLR11 wurde gezeigt, dass dieser in Blasenepithelzellen exprimiert wird und in Mäusen Resistenz gegen eine Infektion mit uropathogenen Bakterien vermittelt (66). Ein Ligand konnte bis heute noch nicht identifiziert werden. Es liegt jedoch der Schluss nahe, dass TLR11 an der Erkennung uropathogener Bakterien beteiligt ist. Beim Menschen existiert kein funktioneller TLR11, da durch ein Stopcodon in seiner Gensequenz dieser nicht „hergestellt“ werden kann (66).

Die meisten Immunzellen sind durch unterschiedliche TLR-Expressionsmuster gekennzeichnet (67-70). So besitzen MDCs auf ihrer Oberfläche TLR4 und TLR7, während PDCs TLR7 und TLR9 exprimieren. Berücksichtigt man nun beispielhaft nur diese DC-Subpopulationen, so wird ein TLR4-Ligand nur MDCs, nicht aber PDCs aktiviert. Ein TLR9 Ligand wird dagegen PDCs, nicht aber MDCs aktivieren. Ein TLR7-Ligand wird aber in der Lage sein, beide Zelltypen zu aktivieren. Myeloide und plasmazytoide DCs reagieren jedoch sehr unterschiedlich auf eine TLR-Stimulation, was unterschiedliche Funktionen der TLRs annehmen lässt. So sezernieren aktivierte MDCs hohe Mengen an IL-12 und pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), während die PDCs hohe Level an IFN- α produzieren. Diese Zellen sind für den Großteil der IFN- α -Produktion während einer Virusinfektion verantwortlich (71). TLR-7-Liganden wie z. B. Imidazolquinolone induzieren beide Zytokinprofile (71, 72), können aber auch humane Immunzellen mittels TLR8 aktivieren und so zu komplexen Immunantworten führen (55). Darüber hinaus ist TLR9 verantwortlich für die Produktion von IFN- α . Allgemein formuliert kontrolliert IFN- α während einer Virusinfektion die virale Replikation. Dies geschieht jedoch nicht nur über Mechanismen der angeborenen Immunität, sondern auch durch Mechanismen der erworbenen Immunität wie der Aktivierung von NK-Zellen, der Auslösung einer T-Zellantwort (73) sowie der Produktion von Antikörpern (74). Wie es über eine Stimulation dieser TLRs jedoch zu diesen unterschiedlichen Immunantworten kommt, ist noch nicht geklärt.

Ein Erklärungsansatz liegt in den Ähnlichkeiten und Differenzen der Signaltransduktion der verschiedenen TLRs. So werden die beobachteten Immunantworten nach Stimulation von TLR7 und TLR9 durch das Adapterprotein MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88) vermittelt, wohingegen eine TLR4-Aktivierung unterschiedliche Adapterproteine benötigt (in diesem Fall

MyD88 und *Toll-interleukin1 receptor-adaptor protein* (TIRAP)) (75). Erst kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass TLR4 sogar MyD88-unabhängig über TRIF (*TIR Domain-Containing Adaptor inducing IFN- β*) signalisieren kann (76). Somit befähigen die Differenzen in der molekularen Signaltransduktion der TLRs sowie die zellspezifische TLR-Expression und Lokalisation das angeborene Immunsystem, eine auf das Antigen abgestimmte Immunantwort auszulösen und eine intensive Verknüpfung von erworbener und angeborener Immunantwort herzustellen. Tabelle 1.4 zeigt einen Überblick zu dem aktuellen Wissen über bekannte TLR-Agonisten.

Tab.1.4 Humane Toll-Like Rezeptoren und ihre Liganden

TLRs	Liganden	Pathogene	Referenz
TLR1	Kooperiert mit TLR2	Bakterien	
TLR2	Lipoproteine	Gram-positive Bakterien	(36)
	Zymozan	Hefen	(40)
	LAM	Mykobakterien	(77)
TLR3	doppelsträngige RNA	Viren	(78)
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien	(44)
	Protein F	RSF	(79)
TLR5	Flagellin	Bakterien	(78)
TLR6	Kooperiert mit TLR2		(80)
TLR7	Guanosin-Analoga, ssRNA, siRNA	Viren	(81, 82)
TLR8	Guanosin-Analoga, ssRNA, siRNA	Viren	(55)
TLR9	CpG-Motive	Bakterien, Viren	(67)
TLR10	nicht bekannt	nicht bekannt	(83)
TLR11	Uropathogene Bakterien	Bakterien	(66)

1.5 Der TLR-Signalweg

Nach Stimulation aktivieren TLRs die Transduktionsfaktoren NF- κ B und AP1, was zu der Produktion von inflammatorischen Cytokinen, wie TNF- α und IL-6, und zur Hochregulation costimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86 auf DCs führt (6). Das cytoplasmatische Adapterprotein MyD88 enthält eine TIR Domäne, die die Bindung zu den entsprechenden Domänen von IL-1R oder den TLRs vermittelt. MyD88 wird nach Aktivierung zu den Rezeptoren rekrutiert. MyD88 enthält aminoterminal eine *Death Domain*, wodurch es an diese Domäne von Serin-Threonin Kinasen der IRAK Familie binden kann (84). Genetische Studien mit MyD88-defizienten Mäusen bestätigten, dass dieses Adapterprotein essentiell für die NF- κ B-abhängige Induktion der Gene für die Cytokine TNF- α und IL-6 als Antwort auf TLR Agonisten ist (85, 86). Die Analyse dieser MyD88-Mutanten zeigte aber auch, dass es unterhalb von einzelnen TLRs einen MyD88-unabhängigen Weg geben muss. So wurde die NF- κ B Induktion durch LPS (TLR4 Agonist) oder dsRNA (TLR3 Agonist) in MyD88-defizienten Mäusen nicht unterbunden, sondern nur verzögert. Zusätzlich ist die dendritische Zellreifung nach Stimulation mit LPS oder dsRNA in MyD88-defizienten Zellen nicht beeinträchtigt (87). Stimuliert man jedoch MyD88-defiziente Zellen mit Stimuli, die TLR2 oder TLR9 aktivieren, so wird die Induktion von NF- κ B und die dendritische Zellreifung komplett unterbunden. Weitere Studien zeigten, dass TLR3 und TLR4 den Transkriptionsfaktor IRF-3 aktivieren und die Produktion der Zytokine IFN- β unabhängig von MyD88 induzieren können (88, 89). Das bedeutet, dass es zwei unterschiedliche Gruppen von TLRs gibt, wovon eine (z.B. TLR3, TLR4) nicht ausschließlich auf MyD88 für die Signalweiterleitung angewiesen ist. Kürzlich wurden zwei zusätzliche TIR Domänen-tragende Adaptermoleküle beschrieben. Zum einen das Protein TIRAP (*TIR-Domain-Containing-Adaptor-Protein* oder auch MAL genannt), das ein essentieller Cofaktor von MyD88 in der Induktion von NF- κ B und AP1 nach Stimulation mit TLR2 oder TLR4 ist (75, 90). Andere TLRs benötigen TIRAP dagegen nicht, um NF- κ B oder AP1 zu aktivieren. Der zweite Adapter TICAM-1/TRIF (*TIR-containing adapter molecular/TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta*) ist an der Regulation des IFN- β -Promotor durch TLR3 und möglicherweise an dem MyD88-unabhängigen Signalweg unterhalb von TLR3 und TLR4 beteiligt (75, 91).

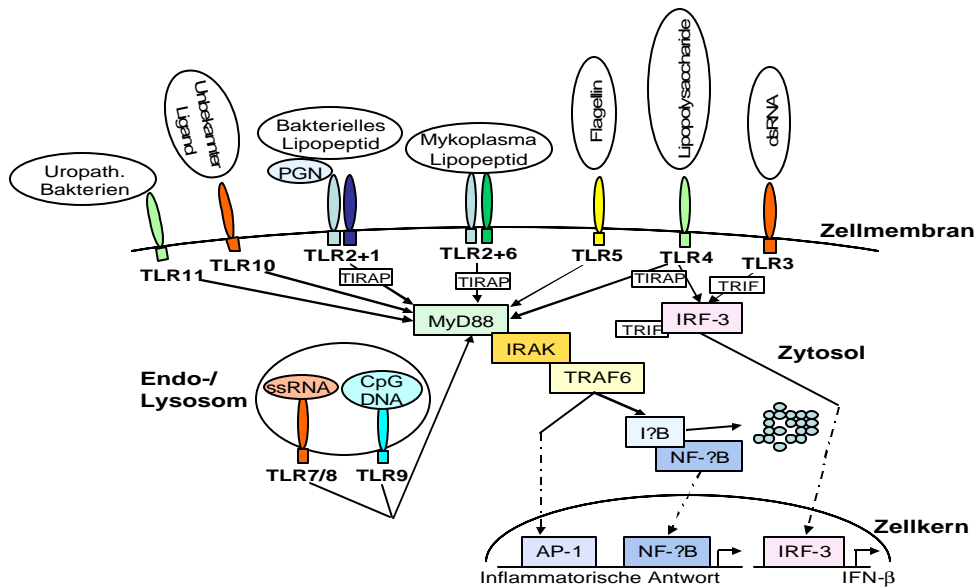


Abb. 1.5 Vereinfachte schematische Darstellung der TLR Signalwege

Auch in dem Verständnis des Signalweges unterhalb von MyD88 wurden in der letzten Zeit große Fortschritte gemacht. Eine Familie von verwandten Kinasen, die IRAKs (Interleukin Receptor-associated Kinase) spielen dort eine wichtige Rolle (siehe Abb.1.5). IRAK-1 wird unabhängig von MyD88 zu dem Rezeptor rekrutiert. Im Gegensatz dazu wird IRAK-4 durch Bindung von MyD88 aktiviert. Ein weiteres Mitglied der Familie ist IRAK-M, das als negativer Regulator in dem Signalweg fungiert (92). Einmal an den Rezeptor gebunden, wird IRAK-1 durch IRAK-4 phosphoryliert (84) (93). Danach dissoziieren die Kinasen von dem Rezeptor-Komplex ab und interagieren mit der im Signalweg unterhalb liegenden Komponente TRAF6. Aktiviertes TRAF6 induziert über weitere Zwischenschritte zum einen die Kinase JNK, was zu der Aktivierung von AP1 führt und zum anderen zur Phosphorylierung und Degradierung des zytoplasmatischen NF-κB Inhibitors IκB mit der Konsequenz, dass NF-κB in den Zellkern translozieren kann. AP1 und NF-κB vermitteln dann die Transkription von Genen, die bei Entzündungsreaktionen beteiligt sind (94, 95). Obwohl man ursprünglich glaubte, dass der Signalweg unterhalb der verschiedenen TLRs identisch sei, zeigt sich jetzt, dass einzelne TLRs verschiedene Arten von Signalwegen aktivieren und so bestimmte biologische Effekte auslösen können. Fehler bei DNA-Replikation und der Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs, der die Aktivierung anti-apoptotischer Moleküle (z.B. bcl-2) induziert und zur Chemoresistenz verschiedener Tumore (z.B. beim Pankreas- und Nierenzellkarzinom) beiträgt, sind Folgen in chronisch-entzündlichem Gewebe.

1.6 Klinische Aspekte untersuchter Tumore

Bei der Entstehung von Tumoren sind eine Vielzahl zellulärer Signalwege beteiligt. Dabei können sich sowohl die involvierten Signalwege an sich als auch die Art ihrer Aktivierung oder Deaktivierung je nach Tumorart unterscheiden. Dennoch ist die Aktivität von bestimmten Signalwegen in einer Vielzahl der Tumoren verändert, da alle Tumorzellen bestimmte Mindestvoraussetzungen wie unbegrenzte und wachstumsfaktor-unabhängige Teilungsfähigkeit oder die Unempfindlichkeit gegen den induzierten Zelltod (Apoptose) aufweisen müssen.

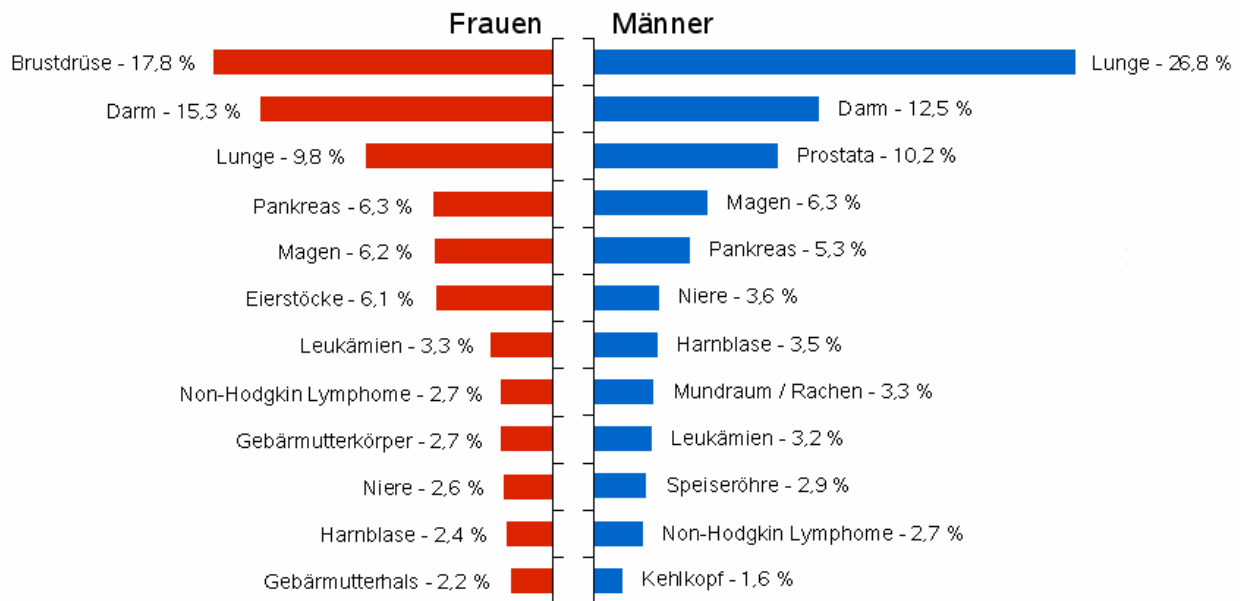


Abb. 1.6 Epidemiologie bösartiger Erkrankungen
(aus http://upload.wikimedia.org/wikipedia/de/a/a9/Krebs_Haeufigkeit_relativ.png)

Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms hat in vielen Ländern seit Mitte des letzten Jahrhunderts kontinuierlich zugenommen. Die Diagnose Pankreaskarzinom ist ungewöhnlich vor dem 45. Lebensjahr. Die Inzidenz steigt danach jedoch stetig, so dass mehr als 80% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose 60-80 Jahre alt sind (96, 97).

Obwohl das Pankreaskarzinom im Allgemeinen als eine Erkrankung der westlichen industrialisierten Länder angesehen wird, bestehen geographische und ethnische Inzidenzunterschiede. Dies legt die Vermutung einer genetischen Abhängigkeit nahe. Unbestritten sind außerdem der Einfluss der Umwelt sowie sozioökonomische Faktoren. Als gesicherte Risikofaktoren können das Rauchen, eine Ernährung mit hohem Fettanteil sowie eine lange bestehende, alkoholbedingte chronische Pankreatitis angesehen werden (98). Das

kumulative Risiko eines Patienten mit chronischer Pankreatitis, ein Pankreaskarzinom zu entwickeln, beträgt 10 Jahre nach Diagnosestellung ca. 2%, nach 20 Jahren 4% und ist damit deutlich höher als bei der Normalbevölkerung (99-102).

Das Nierenzellkarzinom ist nach dem Prostatakarzinom die zweithäufigste urologische Geschwulsterkrankung (Abb.1.6). Die Zunahme der Inzidenz wurde vom National Institute of Health mit weltweit etwa 2% pro Jahr bestätigt.

Betrachtet man die Gesamtheit aller Tumoren, steht das kolorektale Karzinom an *zweiter* Stelle, sowohl bei Männern (nach dem Bronchialkarzinom) als auch bei Frauen (nach dem Mammakarzinom) (103, 104) (Abb.1.6). Etwa 90% der kolorektalen Karzinome finden sich nach dem 50. Lebensjahr und nur vereinzelte Fälle vor dem 40. Lebensjahr. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen (105).

1.6.1 Pankreaskarzinom

Die Entstehungsursache des duktales Adenokarzinoms des Pankreas bleibt unklar. Ein Großteil des Verständnisses der Ätiologie des Pankreaskarzinoms wurde von demographischen und epidemiologischen Studien abgeleitet. Obwohl eine geringe Aussicht auf Langzeitüberleben für die kleine Gruppe der Patienten mit resektablen Tumoren besteht, ist die Prognose des Pankreaskarzinoms ernüchternd. Weniger als 10% aller Patienten mit dieser Erkrankung überleben das erste Jahr nach Diagnosestellung und weniger als 1% überleben 5 Jahre (106). Die Mortalität und die Inzidenz sind damit nahezu identisch.

Fortschritte in der Molekularbiologie und der Humangenetik erlauben ein zunehmend besseres Verständnis molekularer Ereignisse. Wegen der ungünstigen Prognose des Pankreaskarzinoms und der beschränkten Anzahl resezierter Patienten an unterschiedlichen Institutionen ist der Einfluss verschiedener möglicher prognostischer Faktoren unklar.

Im eigenen Patientengut fanden sich für das duktales Pankreaskarzinom nach R0-Resektion (radikaler chirurgischer Tumorsektion) in einer multivariaten Analyse Tumordifferenzierung und Nodalstatus als unabhängige Prognosefaktoren. Als mögliche weitere tumorabhängige prognostische Faktoren, die jedoch noch weiterer Bestätigung bedürfen, gelten folgende

Faktoren: Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren EGF, TGF- α und EGFR sowie die Onkogene und Onkogenprodukte erb B2, Ki-ras und p53.

1.6.2 Nierenzellkarzinom

Als gesicherte Risikofaktoren zählen die chronische Niereninsuffizienz, die tuberöse Sklerose, eine positive Familienanamnese und die hereditäre Form des Nierenzellkarzinoms beim Von-Hippel-Lindau-Syndrom. Nicht zuletzt durch die routinemäßige Anwendung molekularbiologischer Techniken ist es in der letzten Zeit zu einer gewissen Inflation neuer prognostischer Marker des Nierenzellkarzinoms gekommen.

1.6.3 Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist sowohl bei Männern wie auch bei Frauen der häufigste maligne Tumor des Gastrointestinaltraktes und das zweithäufigste Karzinom in den Industrienationen (107). Pathogenetisch wird für dieses Malignom eine sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz herangezogen (108-111). Dabei entstehen durch Akkumulation genetischer Veränderungen aus Normalgewebe zunächst ein Adenom und schließlich ein Karzinom. Bei diesen Mutationen handelt es sich entweder um Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen oder Aktivierungen von Onkogenen. Die einzelnen Mutationen treten an bestimmten Stellen im Verlauf der Tumorprogression auf; so führt die Mutation des Tumorsuppressorgenes p53 zum Übergang vom späten Adenom zum Karzinom.

Eine ausgedehnte und langjährig bestehende Colitis ulcerosa gilt als Risikofaktor für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms (112). Es ist nachgewiesen worden, dass junge Menschen, die ihre Kolitis bereits im Kindes- oder Jugendalter entwickeln, nach 10-jähriger Krankheit ein Erkrankungsrisiko für das kolorektale Karzinom von jährlich 2% aufweisen (112).

Das karzinoembryonale Antigen (CEA) ist ein Glykoprotein, das im primitiven Endoderm als Differenzierungsantigen vorhanden ist, jedoch in der normalen adulten Kolonmukosa nicht exprimiert wird. Kolonkarzinomzellen hingegen exprimieren CEA in bis zu 97% der Fälle (113). Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom und erhöhten CEA-Werten ist mit einem fortgeschrittenen Tumorleiden zu rechnen; besonders hohe Werte finden sich bei einer Lebermetastasierung. Der CEA-Wert besitzt also besonders in der postoperativen

Verlaufsbeobachtung einen wichtigen Stellenwert bezüglich Tumorrezidiv und Prognose (114, 115). In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass p53-Mutationen, der Verlust von bcl-2-Expression und Tumorangiosefaktoren mit lokaler Tumordinvasion sowie ein nodaler Befall letztlich mit einem schlechteren Gesamtüberleben korreliert sind (116). Ferner resultiert die familiäre Polyposis coli aus einer Mutation des Adenoma-polyposis-coli-(APC-) Gens und wird autosomal dominant vererbt (117). Individuen mit einer Keimbahnmutation in einem der APC-Allele auf dem Chromosom 5q21 entwickeln zahlreiche adenomatöse Polypen im Kolon und Rektum bis zum Alter von 30 Jahren. Die Progression zum Karzinom wird meistens bis zum 40. Lebensjahr erreicht (118).

Die vollständige chirurgische Resektion (R0-Resektion) des Primärtumors ist unverändert die Basis der Therapie des kolorektalen Karzinoms. Weitere Säulen der klassischen Therapie sind neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapien, z. B. mit 5-FU und Folinsäure, und die Strahlentherapie, welche prä-, intra oder postoperativ erfolgen kann.

Zusammenfassend führt die dauerhafte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu einem chronischen inflammatorischen Reiz in der Zelle, der nach bisheriger Erkenntnis bei der Entstehung und Progression von Tumoren eine große Rolle spielt. Fehler bei der DNA-Replikation und der Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs, der die Aktivierung anti-apoptotischer Moleküle (z.B. bcl-2) induziert und zur Chemoresistenz verschiedener Tumore (z.B. beim Pankreas- und Nierenzellkarzinom) beiträgt, sind Folgen in chronisch-entzündlichem Gewebe. Daraus könnten sich Tumore entwickeln. TLRs erscheinen dabei besonders hinsichtlich einer viralen aber auch bakteriellen Karziogenese bedeutungsvoll.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression der TLRs im eigenen Patientengut, bei Patienten mit Pankreas-, Kolorektalem- und Nierenzellkarzinom in Abhängigkeit der Tumorstadien zu analysieren.

2. Fragestellung

1. Werden Toll-like Rezeptoren im Tumorgewebe des Pankreas- und Nierenzellkarzinoms sowie des kolorektalen Karzinoms exprimiert?
2. Welche stadienabhängigen Unterschiede ergeben sich bei der Rezeptorexpression hinsichtlich ihrer Häufigkeit und ihres Vorkommens am Beispiel des Pankreas- und Nierenzellkarzinoms sowie des kolorektalen Karzinoms?
3. Gibt es bestimmte Expressionsmuster, die auf einem kausalen Zusammenhang mit dem zugrundeliegenden Tumorgeschehen schließen lassen?

3. Material und Methoden

3.1 Patientengut

3.1.1 Patienten mit Pankreaskarzinom

In vorliegender Arbeit wurden anhand einer retrospektiven Erhebung 44 Patienten mit der Diagnose eines Karzinoms des exokrinen Pankreas erfasst. In die Studie eingeschlossen wurden alle Patienten, die während des Zeitraumes vom 01.01.2002 bis 31.12.2005 in der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg mit der Diagnose eines exokrinen Pankreaskarzinoms behandelt und in unserer Tumorbank erfasst wurden. In einem zweiten Schritt erfolgte eine Subgruppenanalyse von 13 der insgesamt 44 untersuchten Patienten mit exokrinem Pankreaskarzinom. Dieser Schritt diente der ausführlicheren Analyse weiterer Parameter im Erkrankungsverlauf und wurde durch Einsicht in die Krankenakten vollzogen.

In dieser Arbeit wurden fünf Kategorien unterschieden: Im Gesamtkollektiv war der Tumor in 76 Prozent der Fälle (n=33) im Pankreaskopf lokalisiert. Zu jeweils 20 Prozent (jeweils n=9) fand sich die Neubildung im Bereich des Corpus und des Schwanzes. Bei 3 Prozent (n=1) war das gesamte Pankreas befallen, bei 1 Prozent (n=1) mehrere Teilbereiche.

Die Stadieneinteilung der erfassten Erkrankungsfälle erfolgte nach den Richtlinien der Union Internationale Contre le Cancer (UICC, 6.Auflage, 2002).

Tab. 3.1.1 TNM-Klassifikation und UICC-Stadiengruppierung des Pankreaskarzinoms

6. Auflage (seit 2002)	
TNM	
T1	begrenzt auf Pankreas = 2 cm
T2	begrenzt auf Pankreas = 2 cm
T3	jenseits Pankreas
T4	Truncus coeliacus, A. mesenterica sup.
N0	keine regionären Lymphknoten
N1	regionäre LK befallen
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
UICC	
IA	T1 N0 M0
IB	T2 N0 M0
IIA	T3 N0 M0
IIB	T1, T2, T3 N1 M0
III	T4 jedes N M0
IV	jedes T jedes N M1

TNM, klinische Klassifikation; T, Primärtumor; N, regionäre Lymphknoten; M, Fernmetastasen; UICC, Stadiengruppierung

Außer Acht gelassen wurde die aktuell gültige Unterscheidung zwischen UICC-Stadium IA und IB, d. h. die Unterscheidung, ob der Tumor im Durchmesser größer oder kleiner als 2 cm ist. So ergab sich ein zusammengefasstes Stadium I für alle Patienten, deren Tumor auf das Pankreas begrenzt war und die weder einen regionalen Lymphknotenbefall noch eine Fernmetastasierung zeigten. In Fällen, in denen keine pathologische Beurteilung erfolgen konnte, weil der Tumor nicht reseziert wurde, wurde die klinische Klassifikation verwendet. In allen anderen Fällen hatte die pathologische Klassifikation Vorrang. Die pT-, pN- und pM-Kategorien entsprechen den T-, N- und M-Kategorien.

Der Differenzierungsgrad der Tumoren wurde durch das histopathologische Grading festgestellt. Dabei wird eine Einteilung von 1 bis 4 vorgenommen.

Es gilt:

- G1: gut differenzierter Tumor
- G2: mäßig differenzierter Tumor
- G3: schlecht differenzierter Tumor
- G4: undifferenzierter oder entdifferenzierter Tumor

3.1.2 Patienten mit Nierenzellkarzinom

In dieser Arbeit wurden Daten von 100 Patienten mit histologisch gesichertem Nierenzellkarzinom analysiert. Zusätzlich wurden aus dem Gesamtkollektiv bei einer Subgruppe von 26 Patienten, die zwischen 01.01.2002 und 31.12.2005 operiert wurden, Tumorgewebeprobe bei der Primärtumoroperation entnommen und anschließend mittels Immunhistologie und Genanalyse untersucht. Für die Nierenzellkarzinome ist die histologische Diagnosesicherung erforderlich. Verfahren zur Bestimmung der T-, N- und M-Kategorien sind die klinische Untersuchung und bildgebende Verfahren. Die regionären Lymphknoten sind die hilären sowie die abdominalen paraaortalen und parakavalen Lymphknoten. Die Seitenlokalisation beeinflusst die N-Klassifikation nicht. Das histologische Grading von den Patienten war wie folgt:

- G1: gut differenzierter Tumor
- G2: mäßig differenzierter Tumor
- G3, G4: schlecht differenzierter/undifferenzierter Tumor

Die klinische Klassifikation erfolgte wie in der Tabelle 3.1.2 beschrieben.

Tab.3.1.2 Stadieneinteilung des Nierenzellkarzinoms

TNM	
T1	begrenzt auf Niere = 7 cm
T1a	= 4 cm
	> 4 cm
T2	begrenzt auf Niere = 7 cm
T3	Tumor breitet sich in größeren Venen aus oder infiltriert direkt Nebenniere oder perirenales Gewebe, jedoch nicht über die Gerota-Faszie hinaus
T3a	Nebenniere/perirenale Infiltration
T3b	Nierenvene(n), V. cava unterhalb Zwerchfell
T3c	V. cava oberhalb Zwerchfell
T4	Tumor infiltriert über die Gerota-Faszie hinaus
N0	keine regionären LK
N1	Metastase(n) in einem regionärem Lymphknoten
N2	Metastase(n) in mehr als einem regionärem Lymphknoten
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
UICC	
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T3 N0 M0
	T1, T2, T3 jedes N1 M0
IV	T4 N0, N1 M0
	jedes T N2... M0
	jedes T jedes N M1

TNM, klinische Klassifikation; T, Primärtumor; N, regionäre Lymphknoten; M, Fernmetastasen; UICC, Stadiengruppierung

3.1.3 Patienten mit kolorektalem Karzinom

In der vorliegenden Arbeit wurden Daten von 188 Patienten mit einem durchschnittlichen Lebensalter von $66 \pm 5,4$ Jahren und histologisch gesichertem kolorektalen Karzinom retrospektiv erhoben. Die UICC Klassifikation wurde für die Festlegung der Tumormorstadien herangezogen. Das Kollektiv umfasste R0-resezierte Patienten der Stadien I-IV nach UICC. Die Primärtumortherapie dieser Patienten erfolgte ausschließlich in der Chirurgischen Universitätsklinik Würzburg. Nach Entlassung aus der Klinik wurde ein Großteil der Patienten regelmäßig im Rahmen der Tumornachsorge (im Abstand von 3-6 Monaten) in der Chirurgischen Poliklinik gesehen; weitere Daten stammten von betreuenden Hausärzten. Zusätzlich wurden aus dem Gesamtkollektiv bei einer Subgruppe von 26 Patienten, Tumorgewebeproben bei der Primärtumoroperation entnommen und anschließend mittels Immunhistologie und Genanalyse untersucht. Das Normalgewebe (cDNA) als Vergleichsbasis für die Analyse der Genexpression im kolorektalen Karzinom wurde von der Firma Pharmingen (Heidelberg) käuflich erworben.

Tab. 3.1.3 UICC-Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms (überarbeitete Version von 01.01.2003).

	M0			M1
	pN0	pN1	pN2	
pT1	St. I	St. III A	St. III C	St. IV
pT2				
pT3	St. II A	St. III B		
pT4	St. II B			

pTNM, pathologische Klassifikation; T, Primärtumor;
N, regionäre Lymphknoten; M, Fernmetastasen

3.2 Immunhistologie

Um die Expression extrazellulärer Rezeptoren (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10) und intrazellulärer Rezeptoren (TLR 3, 7, 8, 9) zu analysieren, wurde eine Einzelfärbemethode (Single staining) durchgeführt. Dazu wurden Tumorgewebeschnitte von insgesamt 13 Patienten mit Pankreaskarzinom, 32 Patienten mit Nierenkarzinom und 24 Patienten mit kolorektalem Karzinom verschiedener UICC-Stadien verwendet. Die Analyse wurde sowohl auf Tumorgewebe als auch auf Normalgewebe durchgeführt. Das Prinzip bestand darin, dass ein spezifischer, aber unkonjugierter Primär-Antikörper (Ak) an das Gewebe bindet, welcher in einem nächsten Schritt mit einem Horseradish peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundär-Ak gebunden und sichtbar gemacht wird. Nachfolgende Tabelle 3.2 gibt einen Überblick über die verwendeten Primär-Ak, deren Verdünnung und Hersteller.

Tab.3.2 Zusammenfassende Darstellung der verwendeten Primär-Ak für die Immunhistologie und Angaben über Verdünnung und Hersteller der Ak.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
TLR-1	eBioscience (CA, USA) 14-9911 Clone GD2.F4	1:50
TLR-2	Alexis ALX-804-323-C050 (Grünberg, Germany) Clone TL2.1.	1:50
TLR-3	IMGENEX (San Diego, USA) IMG-315A	1:30
TLR-4	Biolegend (San Diego, USA) 312801	1:50
TLR-5	IMGENEX (San Diego, USA) IMG-644	1:20
TLR-6	BioVision (USA) 3556-100	1:50
TLR-7	IMGENEX (San Diego, USA) IMG-665	1:150
TLR-8	ProSci (CA, USA) 3281	1:150
TLR-9	IMGENEX (San Diego, USA) IMG-305A	1:200
TLR-10	Santa Cruz (Gilbertsville, USA) (V-20): sc-23577	1:25
TLR-11	ProSci (CA, USA) 3285	1:100
IgG	BD Pharmingen (Heidelberg, Germany) 610410	1:20

Im ersten Schritt wurden die Gefrierschnitte für 10 Minuten in Aceton (Fa. Deventer, Holland) fixiert und anschließend weitere 10 Minuten luftgetrocknet. Nach Waschen des Gewebes in Tris-NaCl-Puffer (Fa. Merck, Darmstadt) wurde der unkonjugierte Primär-Ak (Neo Makers, Fremont, CA) zugefügt und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer oder 1 Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine erneute Waschung mit Tris-NaCL-Puffer und anschließend die Applikation des HRP-konjugierten Sekundär-Ak (Dako, Glostrup, Dänemark), welcher für entweder 60 Minuten bei Raumtemperatur oder 18 Minuten bei 37°C in einer Wärmekammer inkubiert wurde. Dieser Enzym-Substrat-Komplex wurde nun mit einem Chromogen, Liquid Diaminobenzidin (DAB) Substrate Pack (Biogenex, San Ramon, CA), der sich auf dem Gewebe in einem 'bräunlichen' Farbton darstellt, detektiert (Abb.3.2.2). Es folgte eine erneute Waschung mit Tris-NaCL-Puffer. Abschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun (Fa. Merck, Darmstadt) durchgeführt und der Gewebeschnitt mit Glycerol (Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) fixiert. Als Kontrollfärbung diente die Negativkontrolle an Normalgewebe (N.G.), sowie die Immunglobulin-Isotyp Kontrolle (IgG).

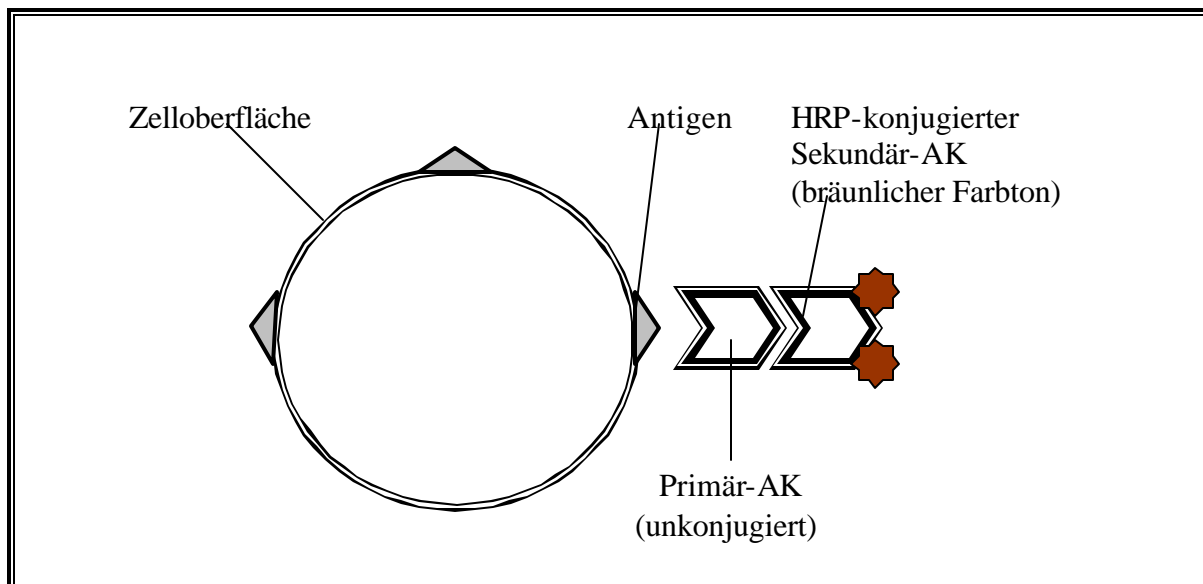


Abb.3.2 Schematische Darstellung der Nachweismethode mit dem Enzym-Substrat-Komplex bestehend aus Primär- und Sekundär-AK. Der Substratumsatz (DAB) durch das Enzym (HRP) stellt sich auf dem Gewebe als bräunlicher Farbton dar.

3.3 Real-Time-PCR Analyse zum Nachweis von Toll-like Rezeptor Genen im Tumorgewebe

Es wurde die Genexpression der Oberflächenmoleküle TLR1, 2, 4, 5, 6 und 10 und der intrazellulären Rezeptoren TLR3, 7, 8 und 9 aus Tumorgewebeproben von kolorektalen Karzinomen (23 Patienten), Nierenzellkarzinomen (32 Patienten) und Pankreaskarzinomen (13 Patienten) mittels Real-Time-PCR analysiert. Die genannten Gene sind typisch für Toll-like exprimierende Zellen.

Die RNA-Extraktion erfolgte wie oben beschrieben. cDNA wurde mit 2 µg von durch Hitze denaturierter RNA zubereitet. Es wurden die der Tabelle 3.3 zu entnehmenden Primer verwendet (Qiagen, Hilden).

Tab.3.3 Verwendete Primer (Qiagen Hilden) für die Real-Time-PCR zum Nachweis von Toll-like Rezeptoren (TLR 1-11) im Tumorgewebe. GAPDH diente als *housekeeping gene*

Gen	Primer
TLR1	QT 01009589
TLR2	QT 00236131
TLR3	QT 00007714
TLR4	QT 00035238
TLR5	QT 01009596
TLR6	QT 00216272
TLR7	QT 00030030
TLR8	QT 00215985
TLR9	QT 00015183
TLR10	QT 00205478
GAPDH	QT 00079247

Die optimale Primer-Konzentration wurde durch Titration bestimmt. Die quantitative Real-Time-PCR wurde als 2-Schritt-RT-PCR durchgeführt, wobei SYBR Green PCR Master Mix (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) mit 100 ng cDNA und 300 nM Primer in einem totalen Reaktionsvolumen von 50 µl verwendet wurde. Für die Durchführung der PCR galten die folgenden Bedingungen: Erhitzen auf 95°C für 10 Minuten, danach 40 Zyklen Erhitzen auf 95°C für 15 Sekunden und Abkühlen auf 60°C für 60 Sekunden.

Die genspezifischen Produkte wurden kontinuierlich mit dem ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gemessen. Die relative Quantifizierung erfolgte nach

Hersteller Angaben. Von jedem Patienten wurden zwei Proben untersucht und während der Datenanalyse durch einen passiven Referenzfarbstoff, der im SYBR Green PCR Master Mix enthalten war, normalisiert, um die Well-to-Well Fluoreszenzvariationen zu korrigieren.

Der durchschnittliche *Threshold cycle* (CT) Wert wurde als Zyklusnummer berechnet, an dem die Fluoreszenz des *Reporters* einen fixierten Schwellenwert erreichte. Die Differenz (delta CT) zwischen den durchschnittlichen CT-Werten der Proben in den *Target wells* und denen des *Housekeeping genes* GAPDH wurde bestimmt. Darauf folgte die Berechnung der Differenz zwischen den durchschnittlichen CT-Werten für jedes Target und dem delta CT-Wert der Kontrollprobe für dieses Target (delta delta CT). Der relative Quantifizierungswert, *fold change*, wurde ausgedrückt als $2^{-\text{delta delta CT}}$.

4. Ergebnisse

4.1 Immunhistologie

Um zu überprüfen, ob die Toll-like Rezeptoren 1 bis 11 (TLR1-11) bei der Tumorprogression eine Rolle spielen, wurde deren Expression an Kryostatschnitten des Tumorgewebes von Patienten verschiedener UICC-Stadien immunhistochemisch untersucht. Beim Nierenzellkarzinom und kolorektalen Karzinom wurde als Positivkontrolle eine humane Tumorzelllinie mit herangezogen: HT-29 (kolorektales Adenokarzinom, Primärtumor, Promochem, Wesel, Nummer HTB-38) und Caki2 (Nierenzellkarzinom, Primärtumor, Promochem, Nummer HTB-47).

Der Prozentsatz der Tumorzellfärbung für TLR1 bis 11 wurde in 20 nebeneinander liegenden Vergrößerungsfeldern (400x Vergrößerung) beurteilt und semiquantitativ (siehe Tabelle 4.1) eingeteilt. Zusätzlich wurden Kontrollfärbungen an nicht malignem Gewebe durchgeführt. Dazu wurden je 3 Normalgewebsschnitte gefärbt.

Tab.4.1 Bewertungskriterien für die Färbung

-	0-5%
(+)	5-15 %
+	15-20%
++	20-30 %
+++	>30%
*	ubiquitous

4.1.1 Toll-like Rezeptor-Expression im Pankreaskarzinom

Es ergaben sich keine signifikanten stadienspezifischen Unterschiede in der Expression von TLR1, TLR2 und TLR4, wobei allerdings ein Unterschied in der Expression zum Normalgewebe (NG) ersichtlich wurde (Tab. 4.1.1.1); TLR1: N.G. <5% vs. UICC I/II 18,6% vs. UICC III/IV 16,7%; TLR2 : N.G. <5% vs. UICC I/II 13,1% vs. UICC III/IV 10%; TLR4: N.G. <5% vs. UICC I/II 12,5% vs. UICC III/IV 10%.

Im Unterschied zu den bisher beschriebenen Rezeptoren TLR1 und TLR2, deren Liganden bakterielle Bestandteile darstellen, zeigten Rezeptoren, deren Liganden virale Bestandteile sind, große Differenzen. In hohen Tumorstadien war bei TLR3 (Abb.4.1.1.2 C vs. B, UICC III/IV 25% vs. UICC I/II 11,3%), TLR7 (Abb.4.1.1.3 C vs. B, UICC III/IV 35% vs. UICC I/II 26,3%) und TLR8 (Abb.4.1.1.4 C vs. B, UICC III/IV 26,7% vs. UICC I/II 12,5%) ein deutlicher Unterschied

in der Rezeptorexpression im Vergleich zu niedrigen Tumorstadien zu verzeichnen. Die Expression für Normalgewebe betrug dabei für TLR3 (Abb.4.1.1.2 A), TLR7 (Abb.4.1.1.3 A) und für TLR8 jeweils <5% (Abb.4.1.1.4 A und Tab.4.1.1.1).

Da die Antikörper von TLR10 und TLR11 mit den Kontrollgeweben milde Reaktionen eingingen (TLR10 bzw. TLR11 15%), ist entweder von einer Kreuzreaktion der Primärantikörper oder einer konstitutiven Expression der Rezeptoren am Pankreas auszugehen. TLR10 wurde im UICC-Stadium I/II von 27,9%, im UICC-Stadium III/IV von 37,5% sowie TLR11 im UICC-Stadium I/II von 29,3% und im Stadium UICC III/IV von 37,5% der Zellen exprimiert.

Die Expression von TLR5 und TLR6 war bereits in niedrigen Tumorstadien im Vergleich zum Normalgewebe für TLR5 (Abb.4.1.1.5 B vs. A, UICC I/II 26,3% vs. NG. <5%) und TLR6 (Abb.4.1.1.6 B vs. A, UICC I/II 31,4% vs. N.G. <5%) signifikant unterschiedlich. Die Expression für die UICC-Stadien III/IV betrug dabei für TLR5 16,3% (Abb.4.1.1.5 C) und TLR6 17,5% (Abb.4.1.1.6 C).

Die Tabelle 4.1.1.1 stellt die Ergebnisse der Einzelfärbungen im Normalgewebe und in den unterschiedlichen UICC-Stadien des Pankreaskarzinoms dar. Die relevanten Ergebnisse sind in der Tabelle schattiert dargestellt. Die Bezeichnung unterhalb der Toll-like Rezeptoren bezieht sich auf korrespondierende Liganden dieser Rezeptoren.

Tab.4.1.1.1 Ergebnisse der Einzelfärbungen im Normalgewebe und in den unterschiedlichen UICC-Stadien des Pankreaskarzinoms.

	N.G.	UICC I/II	UICC III/IV
	(%)	Tumor (%)	Tumor (%)
TLR1 (Peptidoglykane)	- <5.0	+ 18.6	+ 16.7
TLR2 (Peptidoglykane)	- <5.0	(+) 13.1	(+) 10.0
TLR3 (dsRNA) z.B. Rotaviren	- <5.0	(+) 11.3	++ 25.0
TLR4 (Lipopolysaccharide)	- <5.0	(+) 12.5	(+) 10.0
TLR5 (Flagellin) z.B. E.coli, Salmonella	- <5.0	++ 26.3	+ 16.3
TLR6 (Peptidoglykane) z.B. Staphylococcus sp., Streptococcus sp.	- <5.0	+++ 31.4	+ 17.5
TLR7 (ssRNA) z.B. Coxsackievirus, Mumpsvirus,HIV,Hep.C	- <5.0	++ 26.3	+++ 35.0
TLR8 (ssRNA) Eig.:z.B. Coxsackievirus, Mumpsvirus,HIV,Hep.C	- <5.0	(+) 12.5	++ 26.7
TLR9 (virale, bakt. CpG)	- <5.0	(+) 5.7	+ 15.5
TLR10 (unbekannter Ligand)	+ 15.0	++ 27.9	+++ 37.5
TLR11 (uropathogene Bakterien) z.B. Escherichia Coli,Klebsiella sp, Proteus sp, Serratia sp, Pseudomonas sp, andere Enterobakterien	+ 15.0	++ 29.3	+++ 37.5
IgG	- 0.0	- 0.0	- 0.0

Die relevanten Ergebnisse sind in der Tabelle schattiert dargestellt. N.G., Normalgewebe; TLR, Toll-like Rezeptor

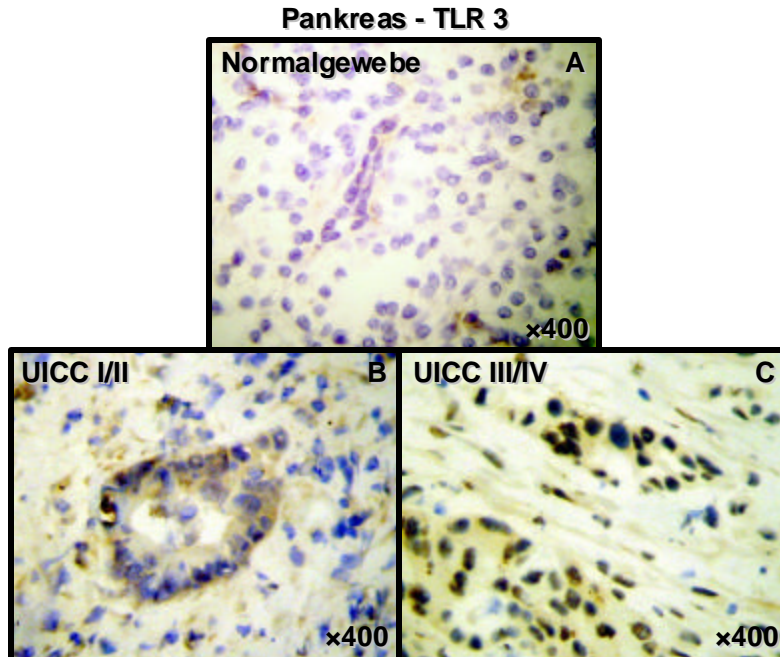


Abb.4.1.1.2 Expression von TLR3 im Normalgewebe (A), in niedrigen (B) und hohen Tumorstadien (C). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR3 war in hohen Tumorstadien im Vergleich zu niedrigen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. I/II).

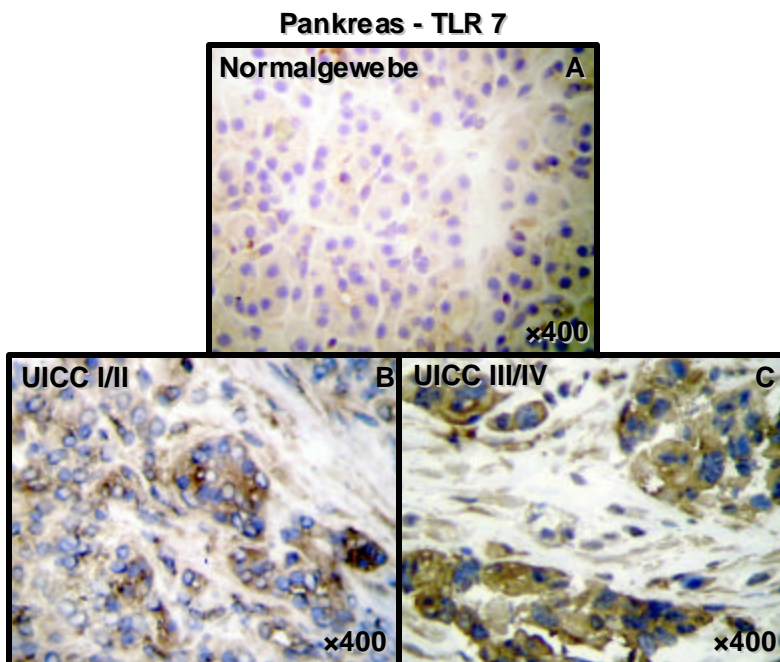


Abb.4.1.1.3 Expression von TLR7 im Normalgewebe (A), in niedrigen (B) und hohen Tumorstadien (C). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR7 war in hohen Tumorstadien im Vergleich zu niedrigen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. UICC I/II).

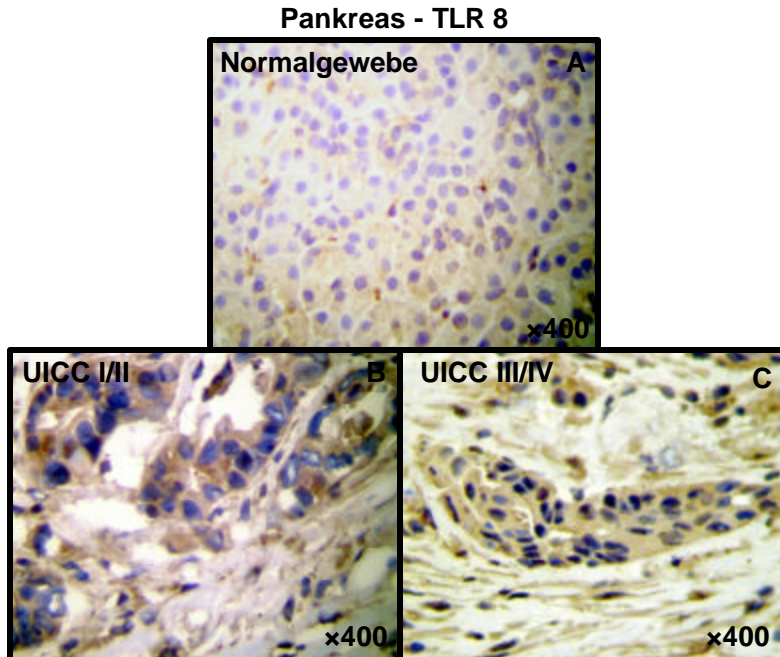


Abb.4.1.1.4 Expression von TLR8 in Normalgewebe (A), in niedrigen (B) und hohen Tumorstadien (C). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR8 war in hohen Tumorstadien im Vergleich zu niedrigen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. UICC I/II).

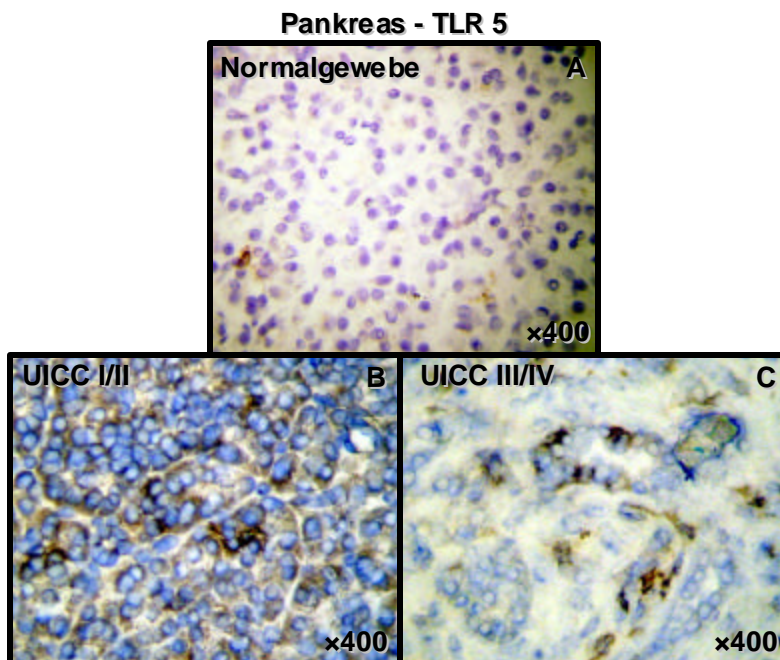


Abb.4.1.1.5 Expression von TLR5 in Normalgewebe (A), in niedrigen (B) und hohen Tumorstadien (C). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR5 war bereits in niedrigen Tumorstadien im Vergleich zu hohen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. UICC I/II).

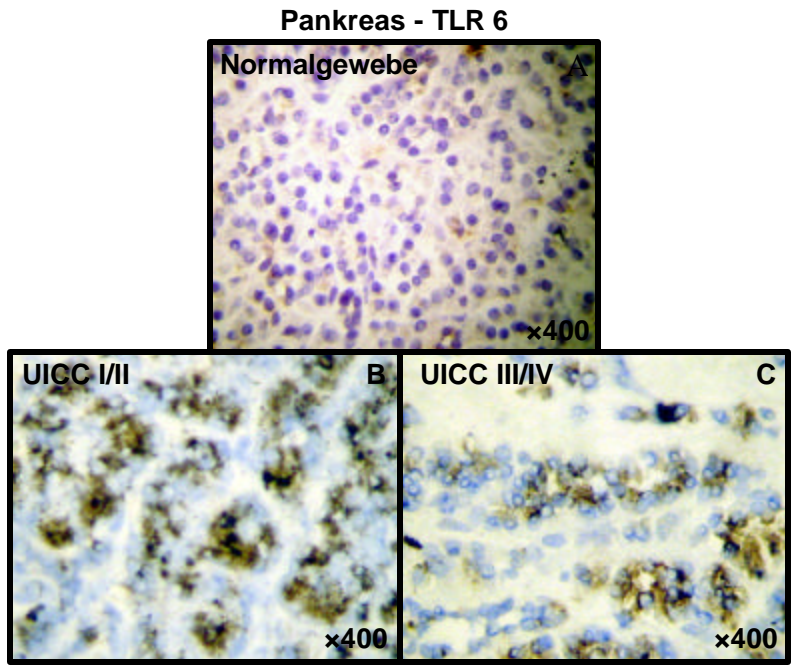


Abb.4.1.1.6 Expression von TLR6 in Normalgewebe (A), in niedrigen (B) und hohen Tumorstadien (C). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR6 war bereits in niedrigen Tumorstadien im Vergleich zu hohen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. UICC I/II).

4.1.2 Toll-like Rezeptor-Expression im Nierenzellkarzinom

Es ergaben sich keine signifikanten stadienspezifischen Unterschiede in der Expression von TLR3, TLR4 und TLR5, bei nur geringem Unterschied in der Expression zum Normalgewebe (Tab. 4.1.2.1): TLR3: N.G. 0% vs. UICC I/II 10,5% vs. UICC III/IV 10,5%; TLR4: N.G.0% vs. UICC I/II 3,3% vs. UICC III/IV 10,5%; TLR5: N.G.0% vs. UICC I/II 13,6% vs. UICC III/IV 13,9%;

Große Differenzen zeigten sich bei der Detektion von Rezeptoren, deren Liganden bakterielle Zellwandbestandteile darstellen. In hohen Tumorstadien war bei TLR1 (Abb. 4.1.2.2 D vs. C, UICC III/IV 25,1% vs. UICC I/II 15%), TLR2 (Abb. 4.1.2.3 D vs. C, UICC III/IV 28,2% vs. UICC I/II 11,8%) und TLR6 (Abb. 4.1.2.4 D vs. C, UICC III/IV 20,9% vs. UICC I/II 13,6%) ein deutlicher Unterschied in der Rezeptorexpression im Vergleich zu niedrigeren Tumorstadien zu verzeichnen: Die Proteinexpression für Normalgewebe betrug dabei für TLR1 <0% (Abb. 4.1.2.2 A), TLR2 0% (Abb. 4.1.2.3 A) und für TLR6 <5% (Abb. 4.1.2.4 A und Tab. 4.1.2.1).

Da die Antikörper von TLR10 und TLR11 mit den Normalgeweben milde Reaktionen eingingen (TLR10 bzw. TLR11 15%), ist auch am Nierengewebe entweder von einer Kreuzreaktion der Primärantikörper oder einer konstitutiven Expression der Rezeptoren auszugehen. TLR10 wurde im UICC-Stadium I/II von 16,4%, im UICC-Stadium III/IV von 18,6% sowie TLR11 im UICC-Stadium I/II von 17% und im UICC-Stadium III/IV von 22% der Zellen exprimiert.

Eine geringe Zunahme in der Expression war für Rezeptoren von viralen Liganden (TLR7, TLR8 und TLR9) in den höheren Tumorstadien zu verzeichnen; TLR7: N.G. <5% vs. UICC I/II 16,4% vs. UICC III/IV 19,6%; TLR8: Abb.4.1.2.5 A vs. C vs. D, N.G. <5% vs. UICC I/II 17,4% vs. UICC III/IV 20,6%; TLR9: Abb.4.1.2.6 A vs. C vs. D, N.G. <5% vs. UICC I/II 14,1% vs. UICC III/IV 23,6%.

Als Positivkontrolle wurde die Expression in der humanen Nieren-Tumorzelllinie Caki2 herangezogen (TLR1, Abb. 4.1.2.2 B; TLR2, Abb.4.1.2.3 B; TLR6, Abb.4.1.2.4 B; TLR8, Abb.4.1.2.5 B; TLR9, Abb.4.1.2.6 B).

Die Tab.4.1.2.1 stellt die Ergebnisse der Einzelfärbungen im Normalgewebe und in den unterschiedlichen UICC-Stadien des Nierenzellkarzinoms dar. Die relevanten Ergebnisse sind in

der Tabelle schattiert dargestellt. Die Bezeichnung unterhalb der Toll-like Rezeptoren bezieht sich auf korrespondierende Liganden dieser Rezeptoren.

Tab.4.1.2.1 Ergebnisse der Einzelfärbungen im Normalgewebe und in den unterschiedlichen UICC-Stadien des Nierenzellkarzinoms.

	N.G.	UICC I/II	UICC III/IV
	(%)	Tumor (%)	Tumor (%)
TLR1 (Peptidoglykane)	- 0.0	+ 15.0	++ 25.1
TLR2 (Peptidoglykane)	- 0.0	(+) 11.8	++ 28.2
TLR3 (dsRNA) z.B. Rotaviren	- 0.0	(+) 10.5	(+) 10.5
TLR4 (Lipopolysaccharide)	- 0.0	- 3.3	(+) 10.5
TLR5 (Flagellin) z.B. E.coli, Salmonella	- 0.0	(+) 13.6	(+) 13.9
TLR6 (Peptidoglykane) z.B. Staphylococcus sp., Streptococcus sp	- <5.0	(+) 13.6	++ 20.9
TLR7 (ssRNA) z.B. Coxsackievirus, Mumpsvirus, HIV, Hep.C	- <5.0	+ 16.4	+ 19.6
TLR8 (ssRNA) Eig.:z.B. Coxsackievirus, Mumpsvirus, HIV, Hep.C	- <5.0	+ 17.4	++ 20.6
TLR9 (virale, bakt. CpG)	- <5.0	(+) 14.1	++ 23.6
TLR10 (unbekannter Ligand)	+ 15.0	+ 16.4	+ 18.6
TLR11 (uropathogene Bakterien) z.B. <u>Escherichia Coli, Klebsiella sp.</u> Proteus sp, Serratia sp, Pseudomonas sp, andere Enterobakterien	+ 15.0	+ 17.0	++ 22.0
IgG	- 0.0	- 0.0	- 0.0

Die relevanten Ergebnisse sind in der Tabelle schattiert dargestellt. N.G., Normalgewebe; TLR, Toll-like Rezeptor

Niere - TLR 1

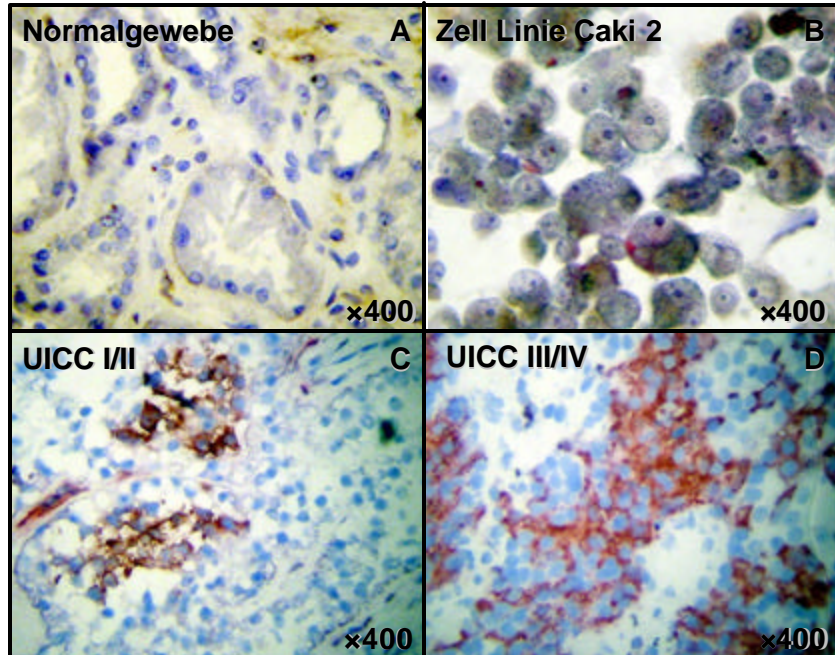


Abb.4.1.2.2 Expression von TLR1 im Normalgewebe (A), in der Tumorzelllinie Caki2 (B), in niedrigen Tumorstadien (C) und hohen Tumorstadien (D). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR3 war in hohen Tumorstadien im Vergleich zu niedrigen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. UICC I/II).

Niere - TLR 2

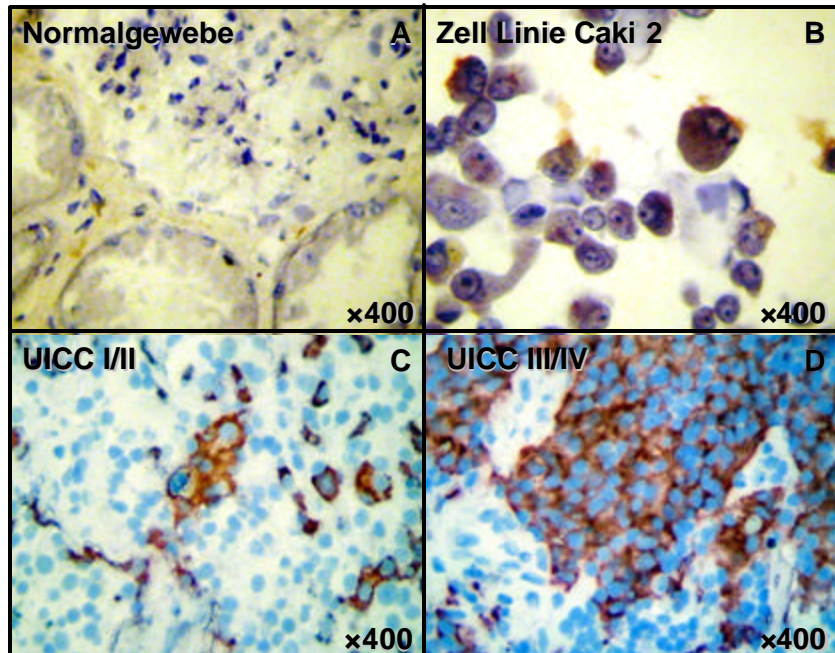


Abb.4.1.2.3 Expression von TLR2 im Normalgewebe (A), in der Tumorzelllinie Caki2 (B), in niedrigen Tumorstadien (C) und hohen Tumorstadien (D). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR2 war in hohen Tumorstadien im Vergleich zu niedrigen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. UICC I/II).

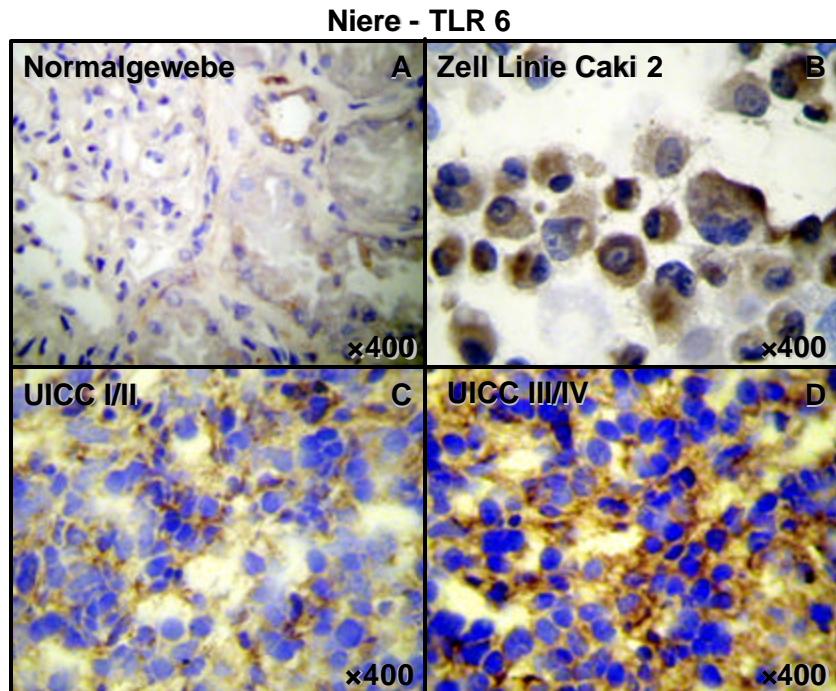


Abb.4.1.2.4 Expression von TLR6 im Normalgewebe (A), in der Tumorzelllinie Caki2 (B), in niedrigen Tumorstadien (C) und hohen Tumorstadien (D). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR6 war in hohen Tumorstadien im Vergleich zu niedrigen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. UICC I/II).

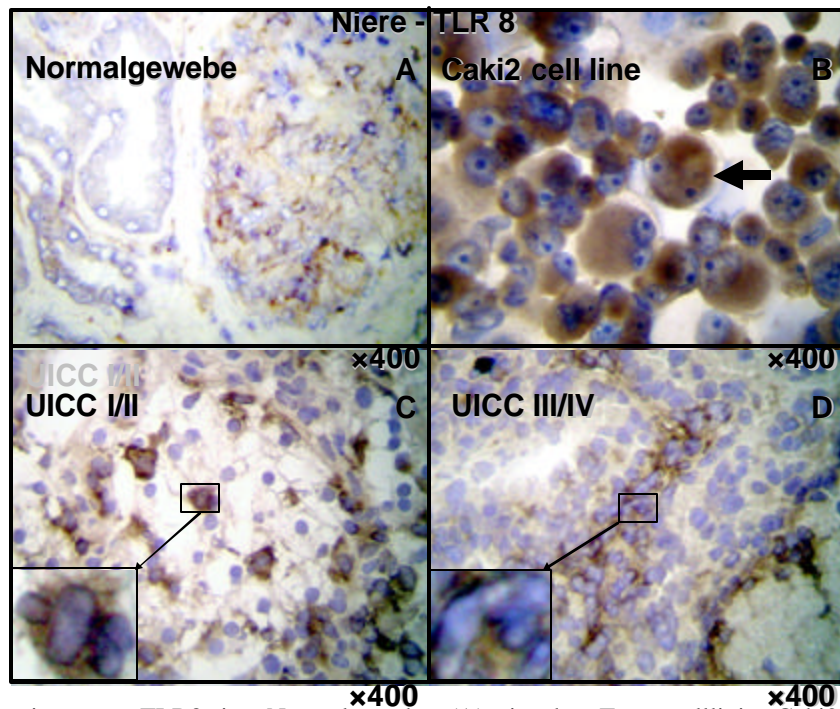


Abb.4.1.2.5 Expression von TLR8 im Normalgewebe (A), in der Tumorzelllinie Caki2 (B), in niedrigen Tumorstadien (C) und hohen Tumorstadien (D). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR8 war in hohen Tumorstadien im Vergleich zu niedrigen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. UICC I/II).

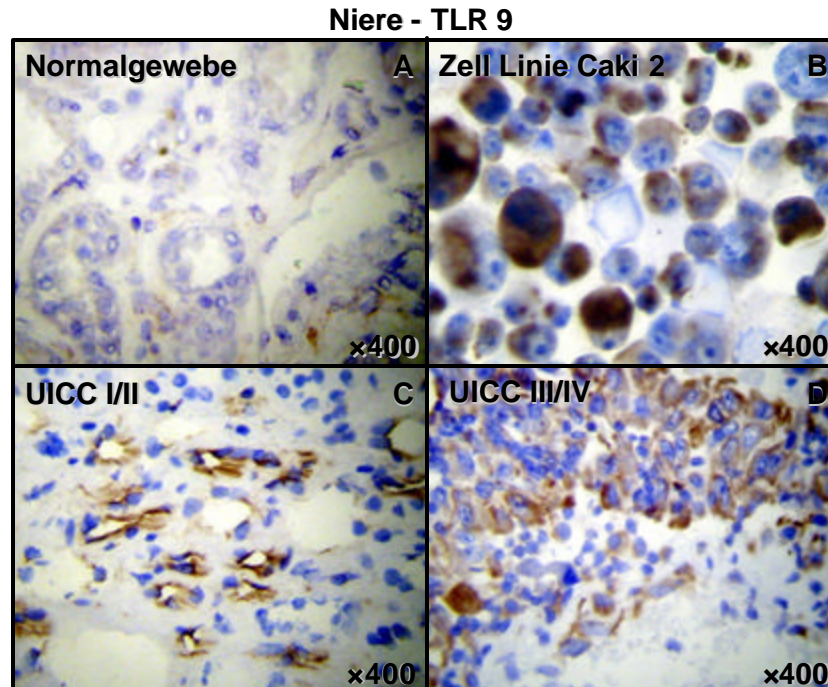


Abb.4.1.2.6 Expression von TLR9 im Normalgewebe (A), in der Tumorzelllinie Caki2 (B), in niedrigen Tumorstadien (C) und hohen Tumorstadien (D). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR9 war in hohen Tumorstadien im Vergleich zu niedrigen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. UICC I/II).

4.1.3 Toll-like Rezeptor-Expression im kolorektalen Karzinom

TLR1, TLR2 und TLR4 waren weder im Normalgewebe, noch im Tumorgewebe detektierbar (Tab. 4.1.3.1).

In hohen Tumorstadien zeigten sich große Differenzen bei der Detektion von TLR8 und TLR9 (Abb. 4.1.3.3 D). Hierbei war ein deutlicher Unterschied in der Rezeptorexpression im Vergleich zu niedrigeren Tumorstadien zu verzeichnen: TLR8 (Abb. 4.1.3.2 D vs. C, UICC III/IV 37,1% vs. UICC I/II 32,5%) und TLR9 (Abb. 4.1.3.3 D vs. C, UICC III/IV 31% vs. UICC I/II 26%); Die Expression für Normalgewebe betrug dabei für TLR8 (Abb.4.1.3.2 A) und TLR9 (Abb. 4.1.3.3 A und Tab.4.1.3.1) jeweils <5%.

Da die Antikörper von TLR6, TLR7 und TLR11 mit dem Normalgewebe milde Reaktionen eingingen (TLR6 15%, TLR7 5% und TLR11 15%), ist entweder von einer Kreuzreaktion der Primärantikörper oder von einer konstitutiven Expression dieser Rezeptoren am Kolon auszugehen. TLR6 wurde im UICC-Stadium I/II von 17,5%, im UICC-Stadium III/IV von 22,7%, TLR7 im UICC-Stadium I/II von 19,1% (Abb. 4.1.3.4 C), im UICC-Stadium III/IV von

25,5% (Abb. 4.1.3.4 D) sowie TLR11 im UICC-Stadium I/II von 17,5% und im UICC-Stadium III/IV von 20% der Zellen exprimiert.

Für die Expression für TLR5 zeigte sich weder im Vergleich zum Normalgewebe noch im stadienabhängigen Vergleich signifikante Unterschiede in den Tumorgeweben; TLR5: N.G. 0% vs. UICC I/II 7,1% vs. UICC III/IV 7,7%.

Eine Zunahme der Expression in TLR10 bei milder Reaktivität mit dem Normalgewebe war in höheren Tumorstadien zu verzeichnen: N.G. 10% vs. UICC I/II 18% vs. UICC III/IV 22,7%.

Als Positivkontrolle wurde die Expression in der humanen Tumorzelllinie HT-29 (kolorektales Adenokarzinom, Primärtumor) herangezogen (TLR8, Abb. 4.1.3.2 B; TLR9, Abb.4.1.3.3 B; TLR7, Abb. 4.1.3.4 B).

Die Tabelle 4.1.3.1 stellt die Ergebnisse der Einzelfärbungen im Normalgewebe und in den unterschiedlichen UICC-Stadien des kolorektalen Karzinoms dar. Die relevanten Ergebnisse sind in der Tabelle schattiert dargestellt. Die Bezeichnung unterhalb der Toll-like Rezeptoren bezieht sich auf korrespondierende Liganden dieser Rezeptoren.

Tab.4.1.3.1 Ergebnisse der Einzelfärbungen im Normalgewebe und in den unterschiedlichen UICC-Stadien des kolorektalen Karzinoms.

	N.G.	UICC I/II	UICC III/IV
	(%)	Tumor (%)	Tumor (%)
TLR1 (Peptidoglykane)	- 0.0	- 0.0	- 0.0
TLR2 (Peptidoglykane)	- 0.0	- 0.0	- 0.0
TLR3 (dsRNA) z.B. Rotaviren	- 0.0	(+) 11.5	(+) 12.3
TLR4 (Lipopolysaccharide)	- 0.0	- 0.0	- 0.0
TLR5 (Flagellin) z.B. E.coli, Salmonella	- 0.0	(+) 7.1	(+) 7.7
TLR6 (Peptidoglykane) z.B. Staphylococcus sp., Streptokokcus sp.	+ 15.0	+ 17.5	++ 22.7
TLR7 (ssRNA) z.B. Coxsackievirus, Mumpsvirus,HIV,Hep.C	- <5.0	+ 19.1	++ 25.5
TLR8 (ssRNA) Eig.:z.B. Coxsackievirus, Mumpsvirus, HIV, Hep.C	- <5.0	+++ 32.5	+++ 37.1
TLR9 (virale, bakt. CpG)	- <5.0	++ 26.0	+++ 31.0
TLR10 (unbekannter Ligand)	(+) 10.0	+ 18.0	++ 22.7
TLR11 (uropathogene Bakterien) z.B. <u>Escherichia Coli, Klebsiella sp.</u> Proteus sp, Serratia sp, Pseudomonas sp, andere Enterobakterien	+ 15.0	+ 17.5	++ 20.0
IgG	- 0.0	- 0.0	- 0.0

Die relevanten Ergebnisse sind in der Tabelle schattiert dargestellt. N.G., Normalgewebe; TLR, Toll-like Rezeptor

Kolon - TLR 8

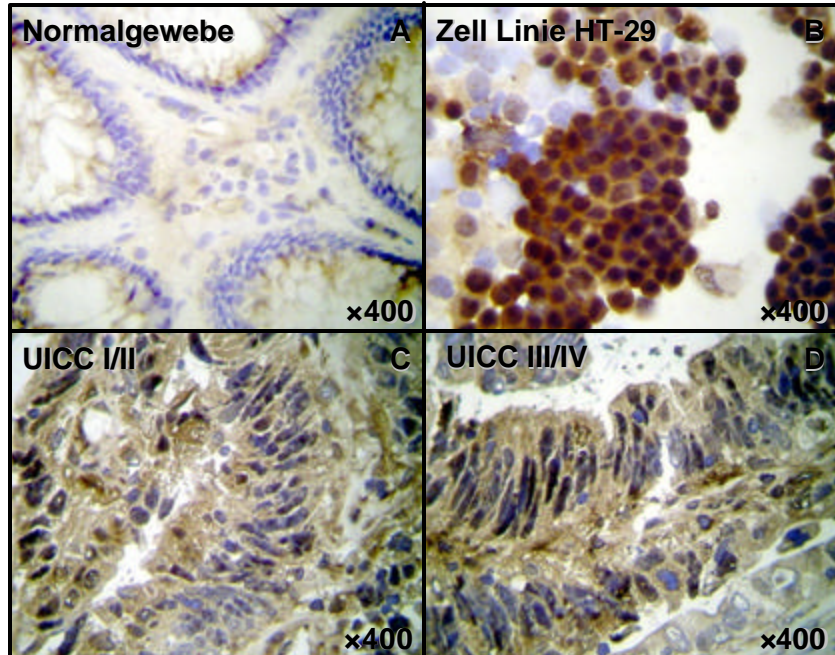


Abb.4.1.3.2 Expression von TLR8 im Normalgewebe (A), in der Tumorzelllinie Caki2 (B), in niedrigen Tumorstadien (C) und hohen Tumorstadien (D). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR8 war in hohen Tumorstadien im Vergleich zu niedrigen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. UICC I/II).

Kolon - TLR 9

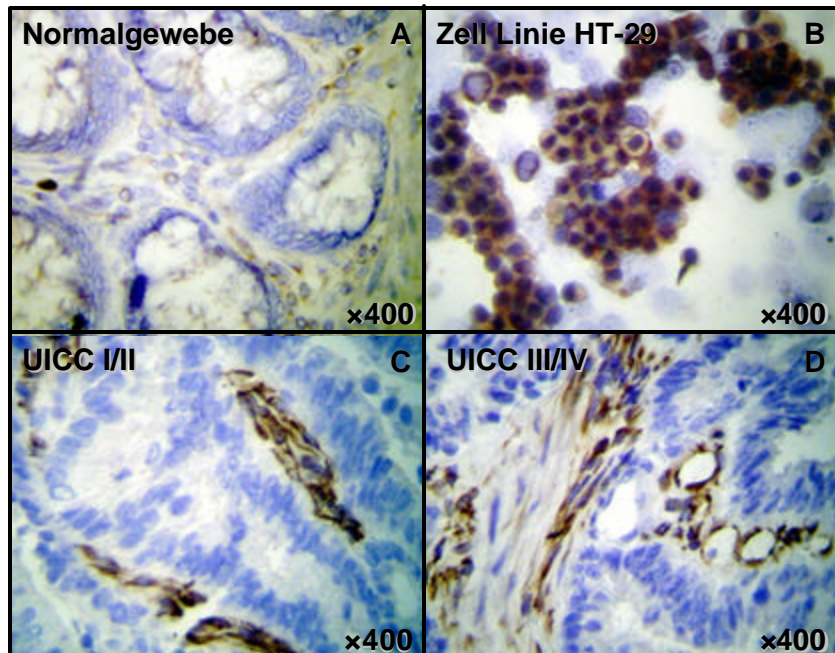


Abb.4.1.3.3 Expression von TLR9 im Normalgewebe (A), in der Tumorzelllinie Caki2 (B), in niedrigen Tumorstadien (C) und hohen Tumorstadien (D). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR9 war in hohen Tumorstadien im Vergleich zu niedrigen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. UICC I/II).

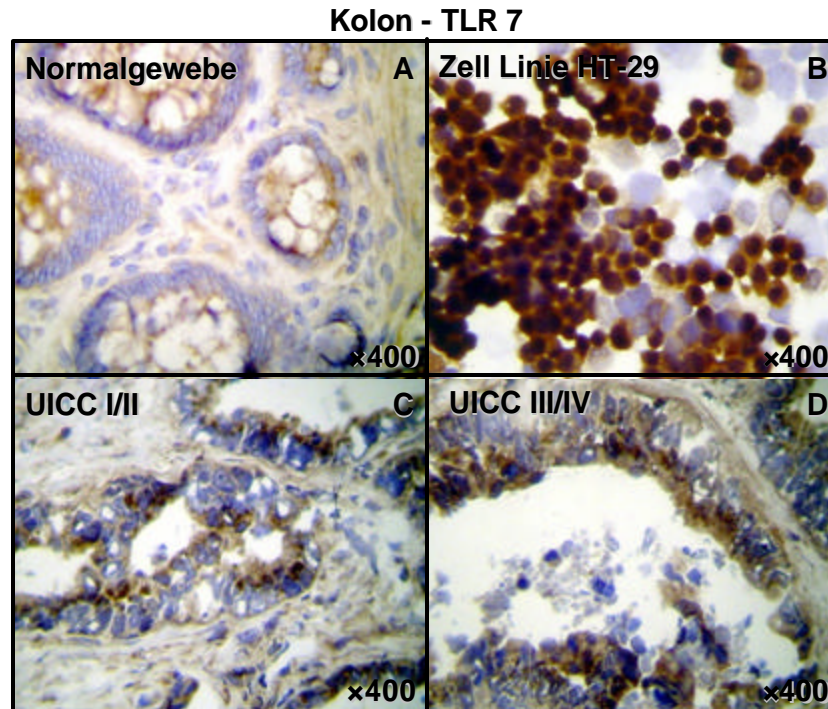


Abb.4.1.3.4 Expression von TLR7 im Normalgewebe (A), in der Tumorzelllinie Caki2 (B), in niedrigen Tumorstadien (C) und hohen Tumorstadien (D). Eine verstärkte Rezeptorexpression von TLR7 war in hohen Tumorstadien im Vergleich zu niedrigen Tumorstadien zu verzeichnen (UICC III/IV vs. UICC I/II). Im Normalgewebe (A) war eine nur milde Reaktion detektierbar.

4.1.4 Vergleich der Toll-like Rezeptor-Expression untersuchter Tumore

Im tumorspezifischen Vergleich fanden sich für die Expression von TLR1, TLR2 und TLR6 folgende Unterschiede: Im kolorektalen Karzinom war TLR1 und TLR2 nicht detektierbar, TLR6 wurde moderat exprimiert (UICC III/IV) (Tab. 4.1.3). Im Pankreaskarzinom zeigte sich dagegen bereits in frühen Stadien (UICC I/II) eine milde Expression von TLR1 und TLR2, die von einer deutlichen Expression von TLR6 begleitet wurde (Tab. 4.1.1). Das stärkste Vorkommen von TLR1 und TLR2 war im Nierenzellkarzinom zusammen mit einer moderaten TLR6 Expression zu verzeichnen (Tab. 4.1.2). Offen bleibt in diesem Zusammenhang die Frage, ob TLR1 antagonistisch auf die TLR2/TLR6 Interaktion wirkt oder synergistisch mit TLR2 zu einer pro-inflammatorischen Antwort führt.

Weder das Nierenzellkarzinom noch das kolorektale Karzinom zeigten eine nennenswerte Expression an TLR3 (Tab. 4.1.2 und Tab. 4.1.3). Beim Pankreaskarzinom hingegen fand sich ein deutliches Vorkommen dieses Rezeptors (Tab. 4.1.1).

Eine Expression an TLR4 war im kolorektalen Karzinom nicht zu beobachten. Beim Pankreaskarzinom und Nierenzellkarzinom gab es keine nennenswerte Expression.

Flagellin ist als nahezu ligandenspezifisch für TLR5 bekannt. Wie bei TLR3 war hier ebenfalls sowohl beim Nierenzellkarzinom als auch beim kolorektalen Karzinom TLR5 nur gering detektierbar (Tab. 4.1.2 und Tab. 4.1.3). Interessanterweise zeigte sich beim Pankreaskarzinom dafür eine starke Expression (Tab. 4.1.1).

Einzelstrang RNA (Single stranded RNA, ssRNA) von z. B. HIV, Influenza A und Hepatitis C sind natürliche Liganden für TLR7 und TLR8. Mit Unterschied zu den bisher genannten Toll-like Rezeptoren waren TLR7 und TLR8 in moderater (Nierenzellkarzinom) bis starker Expression (Pankreaskarzinom und kolorektales Karzinom) bei jedem Tumor detektierbar (Tab. 4.1.1, Tab.4.1.2 und Tab. 4.1.3). Am deutlichsten war das Vorkommen von TLR9 am kolorektalen Karzinom, moderat am Nierenzellkarzinom und nur mild beim Pankreaskarzinom ausgeprägt.

Bisher sind keine Liganden für TLR10 bekannt. Bei Initiation und Progression des Nierenzellkarzinoms scheint dieser Rezeptor eine untergeordnete Rolle zu spielen und unterschied sich nur unwesentlich zur Expression im Normalgewebe. Am deutlichsten wurde TLR10 im Pankreaskarzinom detektiert. Im kolorektalen Karzinom fand sich eine moderate Expression dieses Rezeptors (Tab. 4.1.1, Tab. 4.1.2 und Tab. 4.1.3).

Uropathogene Bakterien kennt man als Liganden für TLR11. Wie beim Pankreaskarzinom für TLR10 bereits festgestellt, erschließt sich auch für diesen Tumor die stärkste Expression für TLR11. Ein geringer Unterschied bei moderater Detektion zeigte sich sowohl im Nierenzellkarzinom als auch im kolorektalen Karzinom (Tab. 4.1.1, Tab. 4.1.2 und Tab. 4.1.3).

4.2 Real-Time-PCR

Die immunhistologischen Unterschiede in der Expression von Toll-like Rezeptoren wurden in einer Real-Time-PCR zum Nachweis von Toll-like Rezeptor Genen näher analysiert.

4.2.1 Ergebnisse der Gene expression im Pankreaskarzinom

Die Gene expression der Toll-like Rezeptoren im Normalgewebe wurde für jeden Marker auf den Wert Null normiert. Bereits in niedrigen Tumorstadien (UICC I/II) war beim Pankreaskarzinom immunhistologisch eine erhöhte Expression von TLR1, TLR2, TLR5 und TLR6 zu verzeichnen. Die Expression von Rezeptoren mit viralen Liganden (TLR3, TLR7, TLR8) war immunhistologisch in höheren Tumorstadien verstärkt nachweisbar (UICC III/IV). Eine erhöhte Genexpression war parallel dazu für TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 und TLR10 bei Tumorprogression (UICC III/IV) ersichtlich. Die Expression von TLR5 unterschied sich in allen Tumorstadien nur wenig vom Normalgewebe (Abb.4.2.1).

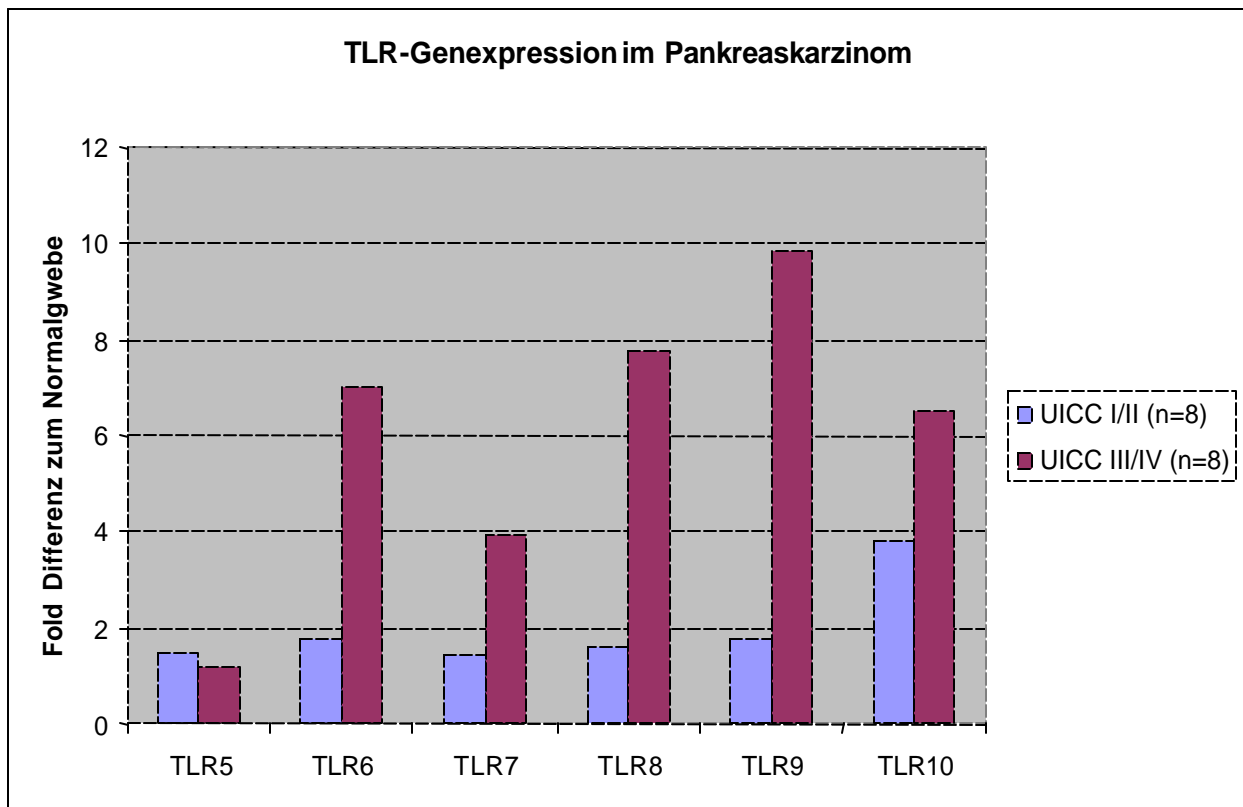


Abb.4.2.1 Real-time PCR Ergebnisse für TLR5-TLR10 im Pankreaskarzinom im Vergleich zum Normalgewebe. Eine erhöhte Genexpression war für TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 und TLR10 bei Tumorprogression (UICC III/IV) ersichtlich. Die Expression von TLR5 in den UICC-Stadien I/II, bzw. UICC III/IV unterschied sich nur gering vom Normalgewebe. Die Expression der TLRs im Normalgewebe wurde für jeden Marker auf den Wert Null normiert.

4.2.2 Ergebnisse der Genexpression im Nierenzellkarzinom

Die Genexpression der Toll-like Rezeptoren im Normalgewebe wurde für jeden Marker auf den Wert Null normiert. Erst in höheren Tumorstadien (UICC III/IV) war immunhistologisch eine erhöhte Co-Expression von TLR1, TLR2 und TLR6 erkennbar. TLR10 war im Tumorgewebe nur schwach nachweisbar. Immunhistologisch wurden die Rezeptoren mit ssRNA als Liganden (TLR7 und TLR8) ebenfalls erst in späteren Tumorstadien (UICC III/IV) detektiert.

Eine erhöhte Genexpression von TLR1, TLR2, TLR6 und TLR10 war bei Tumorprogression (UICC III/IV) im Vergleich zum Normalgewebe ersichtlich. In niedrigen Tumorstadien (UICC I/II) wurde eine geringe Genexpression detektiert. TLR10, dessen Ligand unbekannt ist, zeigte im Vergleich zur immunhistologischen Analyse eine starke Expression (Abb.4.2.2). Auf tumorinfiltrierenden Zellen ist dieser Rezeptor ebenfalls zu finden (B-Zellen, DCs, Makrophagen). Die Expression von TLR7, TLR8 und weniger bei TLR9 war ebenfalls in hohen UICC-Stadien deutlich.

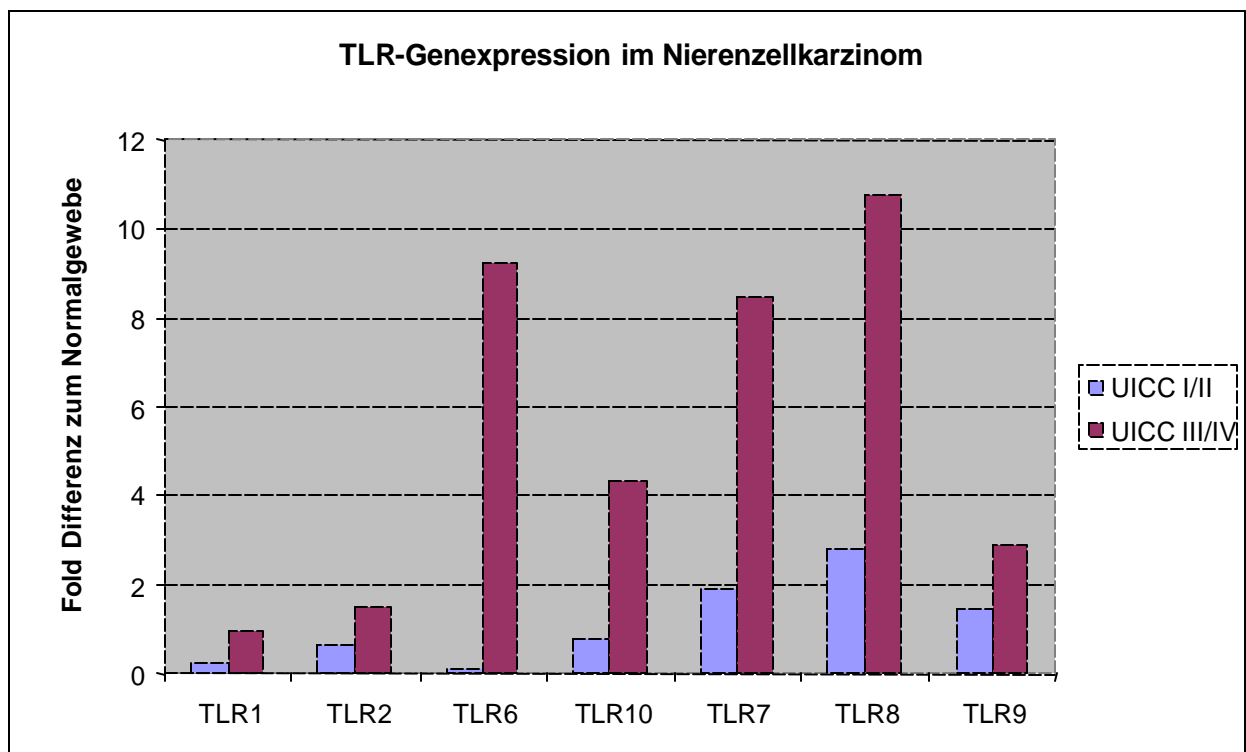


Abb.4.2.2 Real-time PCR Ergebnisse für TLR1, TLR2, TLR6, TLR10, TLR7, TLR8 und TLR9 im Nierenzellkarzinom im Vergleich zum Normalgewebe. Eine erhöhte Genexpression war für TLR1, TLR2, TLR6 und TLR10 bei Tumorprogression (UICC III/IV) ersichtlich. Die Expression von TLR7, TLR8 und TLR9 war ebenfalls in hohen UICC-Stadien deutlich. Die Expression der TLRs im Normalgewebe wurde für jeden Marker auf den Wert Null normiert.

4.2.3 Ergebnisse der Genexpression im kolorektalen Karzinom

Die Genexpression der Toll-like Rezeptoren im Normalgewebe wurde für jeden Marker auf den Wert Null normiert. Im kolorektalen Karzinom waren immunhistologisch insbesondere TLR8 und TLR9 in den hohen Tumorstadien (UICC III/IV) stark exprimiert. TLR10 war morphologisch im Unterschied zum Nierenzell- und Pankreaskarzinom ebenfalls nur in hohen Tumorstadien moderat exprimiert.

Eine stark hochregulierte Genexpression fand sich für die Toll-like Rezeptoren TLR7 und TLR8 in allen Tumorstadien. Insgesamt bestätigt sich die immunhistologisch detektierte Mehrexpression von TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 und TLR10 in der Real-time PCR (Abb.4.2.3).

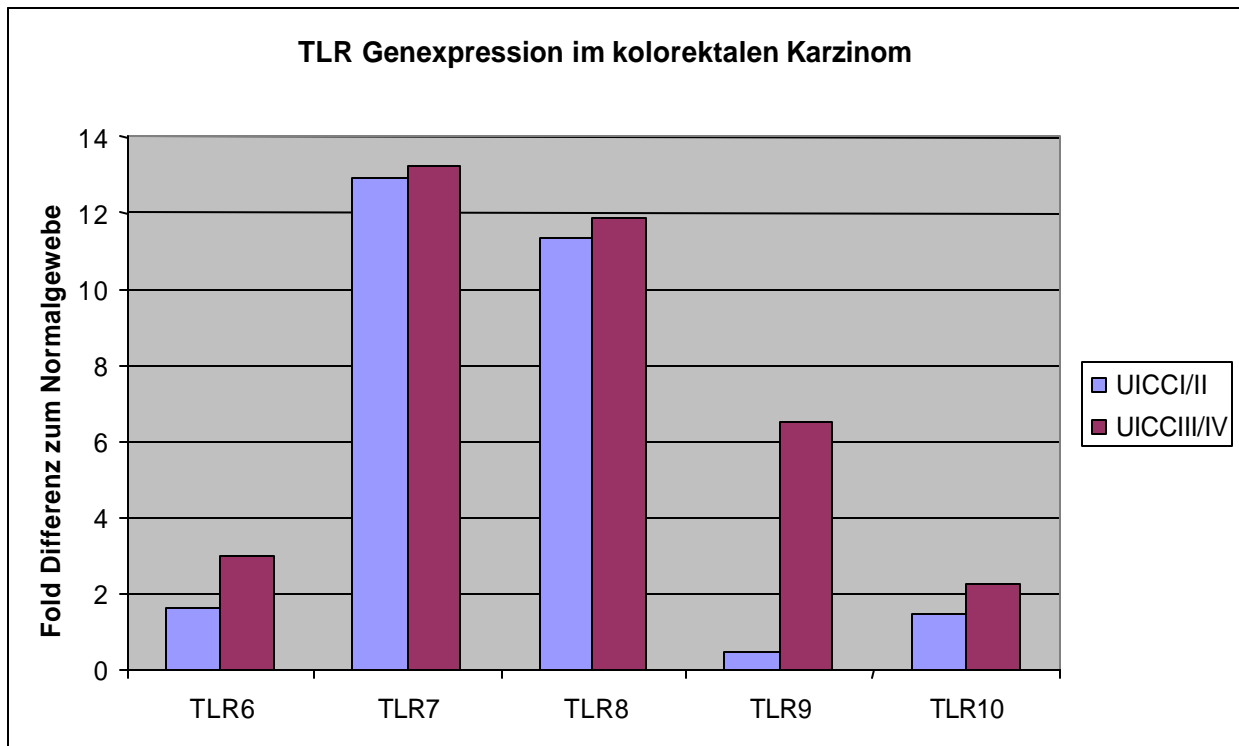


Abb.4.2.3 Real-time PCR Ergebnisse für TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 und TLR10 im kolorektalen Karzinom im Vergleich zum Normalgewebe. Eine erhöhte Genexpression war für TLR6, TLR7, TLR8 und TLR9 bei Tumorprogression (UICC III/IV) ersichtlich. In niedrigen Tumorstadien (UICC I/II) wurde eine geringere Genexpression detektiert. Die Expression der TLRs im Normalgewebe wurde für jeden Marker auf den Wert Null normiert.

4.3 Zusammenfassung der morphologischen und molekularen Ergebnisse

Immunhistologisch war bereits in niedrigen Tumorstadien (UICC I/II) im Pankreaskarzinom eine erhöhte Expression von TLR1, TLR2, TLR5 und TLR6 zu verzeichnen. Hauptsächliche Liganden sind Bakterienbestandteile. In höheren Tumorstadien (UICC III/IV) werden vor allem Rezeptoren exprimiert, deren natürliche Liganden virale RNA ist. TLR3 (dsRNA), TLR7 (ssRNA) und TLR8 (ssRNA) waren hierbei verstärkt gefunden worden. Ein Tumorwachstum, das zunächst von bakteriellen und schließlich viralen Liganden unterstützt wird, könnte damit vermutet werden. Unbeantwortet jedoch bleibt die Frage, ob TLR1 antagonistisch auf die TLR2/TLR6 Interaktion wirkt oder synergistisch mit TLR2 zu einer pro-inflammatorischen Antwort führt.

Im direkten Vergleich erscheint die Expression von Rezeptoren viraler Liganden (TLR3, TLR7, TLR8) stärker ausgeprägt zu sein, als die solcher Rezeptoren, deren Liganden bakterielle Zellbestandteile repräsentieren (TLR1, TLR2, TLR5 und TLR6). Dieses liesse für das Pankreaskarzinom eine Progression des Tumors durch virales Genom vermuten. Bakterielle Zellbestandteile spielen dabei vermutlich eine untergeordnete Rolle, wenngleich deren Einfluss auf das Tumorwachstum durch Stimulierung von TLR1, TLR2, TLR5 und TLR6 vermutet werden kann. Die molekulargenetischen Ergebnisse der Expression von TLR7, TLR8, TLR9 und TLR10 (Real-time PCR) bestätigen die Ergebnisse der immunhistologischen Analyse. Im Gegensatz zur immunhistologischen Analyse war die Genexpression für TLR6 erst im späteren Tumorverlauf stark erhöht. Zudem liessen sich keine Unterschiede in der Genexpression für TLR5 feststellen.

Beim Nierenzellkarzinom zeigte sich immunhistologisch eine andere Konstellation der Rezeptorexpression. Erst in höheren Tumorstadien (UICC III/IV) war eine erhöhte Expression von TLR1, TLR2 und TLR6 erkennbar. Auch hier liesse sich die Hypothese einer bakteriellen Tumorprogression aufstellen, die durch TLR9 (virale und bakterielle CpG Dinukleotide) unterstützt wird. Die Expression der Rezeptoren mit ssRNA als Liganden (TLR7 und TLR8) wurde ebenfalls erst im späteren Verlauf des Tumorwachstums (UICC III/IV) detektiert. Auch hier bleibt die Antwort auf die Frage offen, ob TLR1 antagonistisch auf die TLR2/TLR6 Interaktion wirkt oder synergistisch mit TLR2 zu einer pro-inflammatorischen Antwort führt.

Die molekulargenetischen Ergebnisse der Expression von TLR1, TLR2 und TLR6 (Real-time PCR) bestätigen die Ergebnisse aus der immunhistologischen Analyse. Eine erhöhte

Genexpression von TLR1, TLR2, TLR6 und TLR10 war bei Tumorprogression (UICC III/IV) im Nierenzellkarzinom ersichtlich. TLR10 zeigte im Vergleich zur immunhistologischen Analyse eine starke Expression. Auf tumorinfiltrierenden T-Zellen ist dieser Rezeptor ebenfalls zu finden. Die Expression von TLR7, TLR8 und TLR9 war ebenfalls in hohen UICC-Stadien des Nierenzellkarzinoms deutlich.

Wie beim Pankreaskarzinom könnte für das Nierenzellkarzinom eine Tumorprogression durch virales Genom vermutet werden. Zudem könnte einer bakteriellen Tumorprogression über TLR6, in Kooperation mit TLR2, bei dieser Tumorentität eine größere Bedeutung zukommen als beim Pankreaskarzinom.

Immunhistologisch waren im kolorektalen Karzinom bei vernachlässigbarer Expression im Normalgewebe insbesondere TLR8 und TLR9 in hohen Tumorstadien (UICC III/IV) deutlich nachweisbar. Auch hier könnte folglich die Hypothese der Tumorprogression über eine Stimulation der TLRs mittels viralem (TLR8, TLR9) und bakteriellem Genom (TLR9) angenommen werden. TLR10, dessen Ligand unbekannt ist, war im Unterschied zum Nierenzellkarzinom und Pankreaskarzinom nur schwach in Normalgewebe exprimiert und in hohen Tumorstadien moderat hochreguliert.

Die Ergebnisse der Genexpression im kolorektalen Karzinom (Real-time PCR) bestätigen die Ergebnisse der immunhistologischen Analyse einer Überexpression von TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 und TLR10 in höheren Tumorstadien. Eine deutlich erhöhte Expression zeigte sich auch hier für TLR7 und TLR8. Beim kolorektalen Karzinom kann eine deutlichere Polarität hinsichtlich viraler oder bakterieller Kausalität für eine Unterstützung im Tumorwachstum getroffen werden. TLR7 und TLR8, deren Liganden virale RNA darstellen, wurden mit deutlichem Abstand zu anderen Toll-like Rezeptoren detektiert.

Eine sehr starke Expression von TLR10 und TLR11 war im Pankreaskarzinom ersichtlich. Gleiches gilt für das Nierenzellkarzinom, dessen TLR10 und TLR11 Expression im Tumorgewebe jedoch wesentlich geringer war. Dennoch war eine moderate Expression von TLR11 im kolorektalen Karzinom in hohen Tumorstadien (UICC III/IV) zu verzeichnen. Die Bedeutung dieser Rezeptoren in Bezug auf das Tumorwachstum bleibt bislang ungeklärt.

5. Beantwortung der Fragestellung

1. Werden Toll-like Rezeptoren im Tumorgewebe des Pankreas- und Nierenzell-karzinoms sowie des kolorektalen Karzinoms exprimiert?

Es wurde bisher eine Vielzahl von Zellen beschrieben (z. B. Makrophagen), die Toll-like Rezeptoren exprimieren und zu einer Stimulierung der pro-inflammatorischen bzw. pro-viralen Antwort führen. Die Sekretion von TNF- α und anderer inflammatorischer Zytokine im Tumorgewebe (Daten nicht dargestellt) wären folglich als Antwort auf die Interaktion von PAMPs (z. B. virales Genom und virale/bakterielle Glykoproteine) mit den Toll-like Rezeptoren zu verstehen. Als Konsequenz eines chronisch inflammatorischen Reizes könnten langfristig irreversible Replikationsfehler der DNA auftreten. Damit würde auf der Basis kanzerogener Mutationen (z. B. Inaktivierung des p53 Suppressorgens oder Induktion von Onkogenen) die Tumorinitiation und -Progression begünstigt. Aus diesem Zusammenhang heraus ergibt sich die Hypothese, dass das Tumorwachstum auf dem Boden eines chronisch inflammatorischen Reizes durch Stimulierung von Toll-like Rezeptoren unterstützt wird. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression aller bisher bekannten Toll-like Rezeptoren im Pankreas-, Nierenzellkarzinom sowie im kolorektalen Karzinom zu untersuchen, um mögliche Rückschlüsse auf das Vorhandensein potentieller Liganden (z. B. Bakterien oder Viren) zu ziehen. Wir können schlussfolgern, dass durch die festgestellte, teilweise sehr starke Expression von Toll-like Rezeptoren im Pankreas- und Nierenzellkarzinom sowie auch im kolorektalen Karzinom einen Kausalzusammenhang zwischen einem chronisch inflammatorischen Reiz, durch TLRs vermittelt, als Antwort auf die Präsenz der Liganden und dem Tumorgeschehen vermuten lässt.

2. Welche stadienabhängigen Unterschiede ergeben sich bei der Rezeptorexpression hinsichtlich ihrer Häufigkeit und ihres Vorkommens am Beispiel des Pankreas- und Nierenzellkarzinoms sowie des kolorektalen Karzinoms?

Das Muster exprimierter Rezeptoren könnte einen Hinweis auf potentielle Liganden liefern. Daher erscheint es wichtig, nach Gemeinsamkeiten oder Unterschieden

hinsichtlich der Rezeptorexpression zu forschen, die einen möglichen Schluss auf die Pathogenese des Tumorwachstums zulassen.

Beim Pankreaskarzinom war bereits in niedrigen Tumorstadien (UICC I/II) eine erhöhte Expression von TLR1, TLR2, TLR5 und TLR6 zu verzeichnen. Hauptsächliche Liganden sind Bakterienbestandteile. In höheren Tumorstadien (UICC III/IV) werden vor allem Rezeptoren exprimiert, deren natürliche Liganden virale RNA ist. TLR3 (dsRNA), TLR7 (ssRNA) und TLR8 (ssRNA) waren verstärkt gefunden worden.

Beim Nierenzellkarzinom war immunhistologisch eine andere Konstellation der Rezeptorexpression ersichtlich. Erst in höheren Tumorstadien (UICC III/IV) wurden TLR1, TLR2 und TLR6 verstärkt exprimiert. Eine geringe Zunahme in der Expression war für Rezeptoren von viralen Liganden (TLR7, TLR8 und TLR9) in den höheren Tumorstadien außerdem zu verzeichnen.

Im kolorektalen Karzinom war bei geringer Expression in Normalgewebe insbesondere TLR8 und TLR9 in hohen Tumorstadien (UICC III/IV) immunhistologisch deutlich nachweisbar. TLR7 und TLR8, deren Liganden virale RNA sind, wurde mit deutlichem Abstand zu anderen Toll-like Rezeptoren detektiert.

3. Gibt es bestimmte Expressionsmuster, die auf einem kausalen Zusammenhang mit dem zugrundeliegenden Tumorgeschehen schließen lassen?

Beim Pankreaskarzinom war eine erhöhte Expression von TLR1, TLR2, TLR5 und TLR6 zu verzeichnen. Hauptsächliche Liganden sind Bakterienbestandteile. In höheren Tumorstadien (UICC III/IV) werden vor allem Rezeptoren exprimiert, deren natürliche Liganden virale RNA ist. TLR3 (dsRNA), TLR7 (ssRNA) und TLR8 (ssRNA) waren hierbei verstärkt gefunden worden. Ein Tumorwachstum, das zunächst von bakteriellen und schließlich viralen Liganden unterstützt wird, könnte damit vermutet werden.

Beim Nierenzellkarzinom zeigte sich eine andere Konstellation der Rezeptorexpression. Erst in höheren Tumorstadien (UICC III/IV) war eine erhöhte Expression von TLR1, TLR2 und TLR6 erkennbar. Auch hier liesse sich die Hypothese einer bakteriellen Tumorprogression aufstellen, die durch TLR9 (virale und bakterielle CpG Dinukleotide) unterstützt wird. Die Expression der Rezeptoren mit ssRNA als Liganden (TLR7 und TLR8) wurde ebenfalls erst im späteren Verlauf des Tumorwachstums (UICC III/IV) detektiert.

Wie beim Pankreaskarzinom könnte für das Nierenzellkarzinom eine Tumorprogression durch virales Genom vermutet werden. Zudem käme eine bakterielle Tumorprogression über TLR6, in Kooperation mit TLR2, bei dieser Tumorentität eine größere Bedeutung zu als beim Pankreaskarzinom.

Beim kolorektalen Karzinom waren insbesondere TLR7, TLR8 und TLR9 in hohen Tumorstadien (UICC III/IV) deutlich nachweisbar. Auch hier könnte folglich die Hypothese der Tumorprogression über eine Stimulation der TLRs mittels viralem (TLR7, TLR8, TLR9) und bakteriellem Genom (TLR9) angenommen werden.

Beim kolorektalen Karzinom kann eine deutlichere Polarität hinsichtlich viraler oder bakterieller Kausalität für eine Unterstützung im Tumorwachstum getroffen werden. TLR7 und TLR8, deren Liganden virale RNA darstellen, wurden mit deutlichem Abstand zu anderen Toll-like Rezeptoren detektiert.

6. Diskussion

Bis heute ist zur Expression und Funktion von Toll-like Rezeptoren (TLR) in Tumoren wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das Vorkommen von TLRs auf Tumorgewebe des Pankreas- und Nierenzellkarzinoms sowie des kolorektalen Karzinoms analysiert.

Bekannt sind bislang sowohl aktivierende als auch inhibierende Interaktionen von Toll-like Rezeptoren im Zusammenhang mit inflammatorischen Antworten (40, 119, 120). Auf der Suche nach einem funktionellen Mechanismus der Rezeptoren untereinander wurde eine Interaktion von TLR2 mit TLR1 und TLR6 beobachtet. So kann das Zusammenspiel von TLR1 und TLR2 zur Synthese pro-inflammatorischer Zytokine führen (7, 8, 40) oder aber eine Inaktivierung von TLR2 durch TLR1 bewirken (119). Ähnliches ist für den kooperativen Effekt von TLR2 und TLR6 beschrieben, der ebenfalls durch TLR1 gehemmt werden kann (120). Die genannten Rezeptoren sowie TLR4 können von einem breiten Spektrum an Liganden stimuliert werden, wohingegen andere Rezeptoren (TLR3, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9) eher ligandenspezifisch agieren (57, 59, 119, 121). Alle TLRs münden in Signalwege, deren Ergebnis die Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen ist (122).

Studien am Multiplen Myelom zeigten, dass TLR1, TLR2, TLR6, TLR7, TLR9 und TLR10 mit Proliferation und Überleben des Tumors in Verbindung gebracht werden können (123). TLR4, TLR5 und TLR9 sind beim Magenkarzinom beobachtet worden (124). Aus der Aktivierung von TLR4 am Ovarialkarzinom wurde ein gesteigertes Überleben, Tumorwachstum und Chemoresistenz abgeleitet (125). Dabei entdeckte man Paclitaxel als Liganden für TLR4. Aus der folgenden Aktivierung des Adapterproteins MyD88 ergab sich eine verminderte Apoptosefähigkeit für TLR4 exprimierende Tumorzellen. An Maus- und humanen Zelllinien des Kolon-, Lungen-, Mamma- und Prostatakarzinoms sowie des Melanoms wurde die Expression von TLR1 bis TLR6 und TLR9 beobachtet. Mit der Stimulierung von TLR4 gingen zahlreiche „Tumor Escape Mechanismen“ einher, z. B. die Expression von B7-H1 und B7-H2, die T-Zellen inaktivieren können (126). Nach Stimulation der murinen MC26 Tumorzelllinie mit LPS (Lipopolysaccharid) als natürlichen Liganden für TLR4 wurde eine erhöhte mRNA Expression der costimulierenden B7 Liganden nachgewiesen. Bei HIV-infizierten Patienten fand sich

ebenfalls eine erhöhte mRNA Expression von B7-H1 in peripheren mononukleären Blutzellen. Es wurde dabei allerdings keine Assoziation zu den TLRs gezogen (127).

In der eigenen Untersuchung am kolorektalen Karzinom war TLR1 und TLR2 nicht detektierbar, TLR6 wurde moderat exprimiert (UICC III/IV). Im Pankreaskarzinom zeigte sich dagegen bereits in frühen Stadien (UICC I/II) eine milde Expression von TLR1 und TLR2, die von einer deutlichen Expression von TLR6 begleitet wurde. Das stärkste Vorkommen von TLR1 und TLR2 wurde aber im Nierenzellkarzinom zusammen mit einer moderaten TLR6 Expression beobachtet. Die vorliegende retrospektive Analyse zielte dabei nicht darauf ab, zu klären, wie die Interaktion der Rezeptoren untereinander determiniert wird. Offen bleibt daher die Frage, ob TLR1 antagonistisch auf die Interaktion von TLR2/TLR6 wirkt oder synergistisch mit TLR2 zu einer pro-inflammatorischen Antwort führt. Natürlich kann das Zusammenspiel von TLR2 und TLR6 auch als Reaktion auf Gram-positive Erreger verstanden werden (128). Möglicherweise begünstigt ein chronisch inflammatorischer Prozess bei Pankreatitis und Nephritis das Risiko der Tumorentstehung und -Progression über eine chronische Aktivierung von NF- κ B (129). Folglich könnte eine verstärkte Expression von TLR1, TLR2 und TLR6 insbesondere beim Nierenzellkarzinom mit einer Tumorprogression einhergehen. Hinweise aus dem untersuchten eigenen Patientengut mit diesem Expressionsmuster gab es nicht. TLR6 spielt sowohl beim Pankreaskarzinom als auch beim kolorektalen Karzinom eine Rolle und begünstigt möglicherweise das Tumorwachstum.

Bezüglich der TLR3 Expression zeigten in der vorliegenden Arbeit weder das Nierenzellkarzinom noch das kolorektale Karzinom eine nennenswerte Akkumulation. Hinweise für die TLR3 Expression am untersuchten Patientengut gab es noch nicht. Beim Pankreaskarzinom hingegen fand sich ein deutliches Vorkommen dieses Rezeptors, dessen Ligand dsRNA ist (57, 130). Als mögliche natürliche Liganden seien Rotaviren (dsRNA) genannt, die sehr häufig gastrointestinale Erkrankungen (Diarrhoe, Erbrechen) insbesondere bei Kindern verursachen. Sie werden mit Pankreatitis und Diabetes mellitus Typ 1 in Verbindung gebracht (131). Persistenz des Erregers wurde bei chronischer Rotavirusinfektion und bei Kindern mit schwerem Immundefekt (AIDS) in Niere und Leber nachgewiesen (132, 133). Keine Angaben sind bislang für die Persistenz im Pankreas gefunden worden.

Eine Expression von TLR4 war im eigenen Patientengut mit kolorektalem Karzinom nicht detektierbar. Beim Pankreas- und Nierenzellkarzinom gab es eine nicht nennenswerte Expression zu beobachten. Entgegen der Studie von Kelly et al. (125) weist die eigene Arbeit auf keinen Zusammenhang zwischen TLR4 und dem Tumorwachstum hin.

Flagellin ist als nahezu ligandenspezifisch für TLR5 bekannt. Mögliche natürliche Liganden stellen beispielsweise *Salmonella species* (134) oder *Helicobacter pylori* (135) dar. Wie für TLR3 war im Patientengut der eigenen Arbeit TLR5 sowohl beim Nierenzellkarzinom als auch beim kolorektalen Karzinom nur schwach nachweisbar. Interessanterweise zeigte sich beim Pankreaskarzinom eine starke Expression.

Einzelstrang-RNA (ssRNA) von HIV, Influenza A und Hepatitis C sind natürliche Liganden für TLR7 und TLR8 (57, 59,121). Mit Unterschied zu den bisher genannten Toll-like Rezeptoren waren TLR7 und TLR8 im eigenen Patientengut in moderater (Nierenzellkarzinom) bis starker (Pankreaskarzinom und kolorektales Karzinom) Expression bei jedem Tumor detektierbar.

Am deutlichsten ausgeprägt war das Vorkommen von TLR9 im kolorektalen Karzinom, moderat im Nierenzellkarzinom und nur mild im Pankreaskarzinom zu beobachten. Als Liganden von TLR9 sind unmethylierte CpG (Cytosin-Guanin) Dinukleotide der DNA von viralen und bakteriellen Genomen zu nennen (56, 63, 64, 67, 121, 136). Es wurde gezeigt, dass *Helicobacter pylori* am Magenkarzinom über TLR2 und TLR9 die Angiogenese durch COX-2 Synthese induziert und somit die Tumorprogression (MAPK Signalweg) begünstigt (137).

Als natürliche Liganden für TLR9 werden unter anderem Herpesviridae (z.B. CMV, EBV) und Polyomaviren (z.B. BK Virus, JC Virus und SV-40 Virus) genannt (121), die im Körper persistieren und in der Bevölkerung eine hohe Durchseuchungsrate aufweisen. Bisher sind keine Liganden für TLR10 bekannt (6). Bei Initiation und Progression des Nierenzellkarzinoms scheint dieser Rezeptor eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Expression unterschied sich kaum zum Normalgewebe. Am deutlichsten wurde TLR10 in der eigenen Arbeit im Pankreaskarzinom detektiert. TLR10 war morphologisch im Unterschied zum Nierenzell- und Pankreaskarzinom ebenfalls nur in hohen Tumorstadien moderat exprimiert.

Uropathogene Bakterien sind bislang als Liganden für TLR11 bekannt (66). Wie beim Pankreaskarzinom für TLR10 in der eigenen Arbeit gezeigt, findet sich auch hier für TLR11 die stärkste Expression. Geringe Unterschiede bei insgesamt moderater TLR11 Expression werden sowohl im Nierenkarzinom als auch im kolorektalen Karzinom gesehen.

Alle TLRs münden in Signalwege, deren Ergebnis die Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen ist (122). Der stetigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei Vermittlung einer chronischen Entzündung wird eine zentrale Rolle in der Entstehung und Progression von Tumoren zugesprochen (129, 138, 139). Bekannt ist weiterhin, dass der NF- κ B Signalweg zur Induktion mitogener und antiapoptotischer (bcl-2, bcl-x_L) Wege führt, wie diese bereits am Pankreaskarzinom für das EGF-EGFR System beschrieben wurde (138).

Zusammenfassend sei auf die Bedeutung der Expression von Toll-like Rezeptoren insbesondere bei der Tumorprogression des Pankreas- und Nierenzellkarzinoms und des kolorektalen Karzinoms hingewiesen. Die dauerhafte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt zu inapparenten oder subklinisch ablaufenden inflammatorischen Reizen, die für die Tumorentstehung und -Progression maßgeblich erscheinen (140).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit weisen auf eine neue Rolle bei der Tumorprogression durch Toll-like Rezeptoren hin. Diese Arbeit zeigt, dass TLRs nicht nur wie in der Literatur beschrieben, die humorale Immunantwort stimulieren, sondern durch Expression auf oder in Tumorzellen ebenso Einfluss auf das Tumorzellwachstum nehmen können.

Die Daten lassen tumorspezifisch einen kausalen Zusammenhang zwischen der Expression von TLRs und viraler sowie bakterieller Vorgänge im Tumorzellpatienten in Bezug auf die Progression eines Tumors vermuten. Eine virale Pathogenese durch das Genom per se in Interaktion mit den TLRs lässt sich besonders bei Progression des Pankreaskarzinoms durch TLR3, TLR7 und TLR8 vermuten. Eine ähnliche Kausalität bei Progression der Tumorerkrankung ist vor allem durch Interaktion viraler Genome mit TLR7, TLR8 und TLR9 beim kolorektalen Karzinom zu vermuten.

Die Aktivierung von TLR7, TLR8 und TLR9 scheint beim Nierenzellkarzinom ebenfalls eine Rolle zu spielen. Beim Vergleich hinsichtlich der Expression von Rezeptoren, deren Liganden bakterielle Bestandteile darstellen, wie TLR1, TLR2 und TLR6, dominierten diese jedoch beim Nierenzellkarzinom. Ein eher bakterieller Kausalzusammenhang bei Tumorprogression könnte damit vermutet werden. Unterstützend kann auch beim Pankreaskarzinom eine Stimulation von

TLR5 durch das von Bakterien stammende Flagellin bereits in niedrigen UICC Stadien (UICC I/II) angenommen werden.

Diese Ergebnisse weisen auf eine Kombination einer bakteriell und viral mitbedingten Pathogenese beim Pankreaskarzinom hin. Ob dieses zur insgesamt schlechten Prognose und raschen Progression dieses bösartigen Tumors beiträgt, bleibt bislang unbeantwortet.

Der chronische Entzündungsreiz stellt folglich einen außerordentlich wichtigen Faktor bei der Tumorprogression dar. Diese mit der Zielsetzung der Arbeit verbundenen Erkenntnisse weisen somit neue Wege für die Tumorthherapie und den chronischen Entzündungsprozess insbesondere im Pankreas durch Blockierung von Toll-like Rezeptoren auf. Damit könnten Wachstum, Neoangiogenese und Metastasierung möglicherweise verlangsamt oder sogar verhindert werden.

7. Zusammenfassung

Die dauerhafte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt zu einem inflammatorischen Reiz, der für die Entstehung und Progression von Tumoren von großer Bedeutung ist. In diesem Zusammenhang wurde das Expressionsmuster von Toll-like Rezeptoren stadienabhängig für das Pankreas- und Nierenzellkarzinom sowie das kolorektale Karzinom analysiert.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit weisen auf eine besondere Rolle bei der Tumorprogression durch Toll-like Rezeptoren hin. Diese Arbeit zeigt, dass TLRs nicht nur wie bislang beschrieben, die humorale Immunantwort stimulieren, sondern durch Expression auf oder in Tumorzellen Einfluss auf das weitere Tumorstadium nehmen können.

Die Daten lassen damit schlussfolgern, dass je nach Tumorgewebe Toll-like Rezeptoren unterschiedlich stark exprimiert werden und eine bisher wenig berücksichtigte Kausalität hinsichtlich der Tumorprogression vermuten lassen. Eine virale Pathogenese durch das Genom per se in Interaktion mit den TLRs sei besonders bei Progression des Pankreaskarzinoms durch TLR3, TLR7 und TLR8 vermutet. Eine ähnliche Kausalität bei Progression sei vor allem durch Interaktion viraler Genome mit TLR7, TLR8 und TLR9 beim kolorektalen Karzinom vermutet.

Die Aktivierung von TLR7, TLR8 und TLR9 scheint beim Nierenzellkarzinom ebenfalls eine Rolle zu spielen. Auch ein bakterieller Faktor bei Tumorprogression kann vermutet werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine Kombination einer bakteriellen und viralen Pathogenese beim Pankreaskarzinom hin und liefern somit eine mögliche mitbegründende Kausalität für die schlechte Prognose und rasche Progression dieses bösartigsten Tumors.

Der chronische Entzündungsreiz stellt einen außerordentlich wichtigen Prozess bei Tumorprogression dar. Diese mit der Zielsetzung der Arbeit verbundenen Erkenntnisse weisen neue Wege für die Tumorthherapie auf, einen chronischen Entzündungsprozess durch Blockierung von Toll-like Rezeptoren zu unterbinden. Somit könnten Wachstum, Neoangiogenese und Metastasierung möglicherweise verlangsamt oder sogar verhindert werden.

Die Therapie maligner Erkrankungen mit herkömmlichen zytostatischen Methoden zielt vorwiegend auf die stoffwechselabhängigen Vorgänge der Zellproliferation ab. Es befindet sich aber nur ein relativ kleiner Anteil aller Tumorzellen in einer Proliferationsphase. Die Entdeckung und Differenzierung zellständiger, tumorassoziierter Antigene und die Herstellung spezifischer Antikörper stellt in diesem Zusammenhang ein neuartiges, zellphasenunabhängiges Wirkprinzip

dar. Das lässt auf eine effektivere und nebenwirkungsärmere Tumorthherapie hoffen. Bei verschiedenen Tumorerkrankungen erweist sich die Immuntherapie mit Antikörpern zunehmend als eine erfolgsversprechende Therapieform. Sie hat sich mittlerweile neben den herkömmlichen Behandlungsansätzen, der Operation, Chemotherapie und Bestrahlung, als vierte Säule fest etabliert. Insbesondere beim kolorektalen Karzinom sowie bei Lymphomen entwickelte sich die immunologische Tumorthherapie in den letzten Jahren von der experimentellen Phase zu einer Standardtherapie. Da die Expression von Toll-like Rezeptoren auf Tumoren, wie in der vorliegenden Arbeit gesehen, stark hochreguliert ist und eine vergleichsweise geringe Expression auf Normalgewebe ersichtlich war, eignen sich Toll-like Rezeptoren daher als potentielle Ziele für eine immunologische Tumorthherapie mit monoklonalen Antikörpern.

8. Ausblick

Die Therapie maligner Erkrankungen mit herkömmlichen zytostatischen Methoden zielt vorwiegend auf die stoffwechselabhängigen Vorgänge der Zellproliferation ab. Da sich aber immer nur ein relativ kleiner Anteil aller Tumorzellen in einer Proliferationsphase befindet, ermöglicht die Entdeckung und Differenzierung zellständiger, tumorassoziierter Antigene und die Herstellung spezifischer Antikörper ein neuartiges, zellphasenunabhängiges Wirkprinzip. Das lässt auf eine effektivere und nebenwirkungsärmere Tumorthherapie hoffen, wie dies bereits vor über 100 Jahren von Paul Ehrlich angedacht wurde, Tumore mit spezifischen Antikörpern zu therapieren ("magic bullet").

Bei verschiedenen Krebserkrankungen erweist sich die Immuntherapie mit Antikörpern immer mehr als eine erfolgversprechende Therapieform. Sie hat sich mittlerweile neben den herkömmlichen Behandlungsansätzen, der Operation, der Chemotherapie und der Bestrahlung, als vierte Säule fest etabliert. Insbesondere beim kolorektalen Karzinom sowie bei Lymphomen entwickelte sich die immunologische Tumorthherapie in den letzten Jahren von der experimentellen Phase zunehmend zu einer Standardtherapie. Das Behandlungsprinzip basiert auf der Erkenntnis, dass Antikörper bestimmte Zielstrukturen auf den Tumorzellen erkennen und gezielt angreifen können; das Wachstum der Tumorzellen wird gehemmt, und die Sterblichkeit der Patienten kann deutlich verringert werden. Das Besondere an dem Behandlungsverfahren ist, dass es im Vergleich zu den konventionellen Therapien geringere toxische Nebenwirkungen aufweist.

Da die Expression von Toll-like Rezeptoren auf Tumoren stark hochreguliert ist und eine vergleichsweise geringe Expression auf Normalgewebe ersichtlich war, eignen sich daher diese Toll-like Rezeptoren als potentielle Ziele für eine immunologische Tumorthherapie mit monoklonalen Antikörpern. Weitere Studien sind nötig, um dieser Annahme stärkeren Zuspruch verleihen zu können.

9. Literaturverzeichnis

1. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA: Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; 284(5418):1313-8
2. Janeway CA, Jr.: The role of self-recognition in receptor repertoire development. Members of the Janeway Laboratory. *Immunol Res* 1999; 19(2-3):107-18
3. Medzhitov R, Janeway C, Jr.: Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343(5):338-44
4. Aderem A, Underhill DM: Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:593-623
5. Janeway CA, Jr., Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216
6. Medzhitov R: Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(2):135-45
7. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M: IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118(3):285-96
8. Roncarolo MG, Levings MK: The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12(6):676-83
9. Yu P, Rowley DA, Fu YX, Schreiber H: The role of stroma in immune recognition and destruction of well-established solid tumors. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(2):226-31
10. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY: Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005; 22(3):329-41
11. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10(9):909-15
12. Jiang H, Chess L: An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004; 114(9):1198-208
13. Hu D, Ikizawa K, Lu L, Sanchirico ME, Shinohara ML, Cantor H: Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol* 2004; 5(5):516-23
14. Cantor H: Reviving suppression? *Nat Immunol* 2004; 5(4):347-9
15. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25).

- Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155(3):1151-64
16. Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY: Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Immunity* 2004; 21(2):267-77
 17. Samy ET, Parker LA, Sharp CP, Tung KS: Continuous control of autoimmune disease by antigen-dependent polyclonal CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the regional lymph node. *J Exp Med* 2005; 202(6):771-81
 18. Suffia IJ, Reckling SK, Piccirillo CA, Goldszmid RS, Belkaid Y: Infected site-restricted Foxp3⁺ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med* 2006; 203(3):777-88
 19. Nishikawa H, Kato T, Tanida K, Hiasa A, Tawara I, Ikeda H, Ikarashi Y, Wakasugi H, Kronenberg M, Nakayama T, Taniguchi M, Kuribayashi K, Old LJ, Shiku H: CD4⁺ CD25⁺ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(19):10902-6
 20. Nishikawa H, Kato T, Tawara I, Saito K, Ikeda H, Kuribayashi K, Allen PM, Schreiber RD, Sakaguchi S, Old LJ, Shiku H: Definition of target antigens for naturally occurring CD4⁽⁺⁾ CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; 201(5):681-6
 21. Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, Roncarolo MG: Human CD25⁺CD4⁺ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med* 2002; 196(10):1335-46
 22. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G: Human CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med* 2002; 196(2):247-53
 23. Sakaguchi S: Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:531-62
 24. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH: Regulatory CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001; 61(12):4766-72

25. Viguiier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L: Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 2004; 173(2):1444-53
26. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH: Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 2002; 196(2):255-60
27. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA: The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86(6):973-83
28. Hoffmann JA, Reichhart JM: *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 2002; 3(2):121-6
29. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(2):588-93
30. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA, Jr.: MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998; 2(2):253-8
31. Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A: The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 1998; 187(12):2097-101
32. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B: Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(10):3516-21
33. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S: Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169(1):10-4
34. Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Lobet Y, Anguita J, Schoen RT, Medzhitov R, Fikrig E, Flavell RA: Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* 2002; 8(8):878-84

35. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ: Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274(25):17406-9
36. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11(4):443-51
37. Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ: Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999; 163(7):3920-7
38. Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT: Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 2001; 167(1):416-23
39. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A: The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; 401(6755):811-5
40. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(25):13766-71
41. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'Amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A: Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164(11):5998-6004
42. Meng G, Rutz M, Schiemann M, Metzger J, Grabiec A, Schwandner R, Lippa PB, Ebel F, Busch DH, Bauer S, Wagner H, Kirschning CJ: Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 2004; 113(10):1473-81
43. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640):394-7
44. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to

- lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; 162(7):3749-52
45. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282(5396):2085-8
 46. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H: Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164(2):558-61
 47. Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T, Ohno N, Tamura H, Shibata K, Akashi S, Miyake K, Sugawara S, Takada H: *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol* 2002; 46(7):503-12
 48. Takeda K, Akira S: Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17(1):1-14
 49. Hornef MW, Frisan T, Vandewalle A, Normark S, Richter-Dahlfors A: Toll-like receptor 4 resides in the Golgi apparatus and colocalizes with internalized lipopolysaccharide in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2002; 195(5):559-70
 50. Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT: Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med* 2001; 194(1):79-88
 51. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A: The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410(6832):1099-103
 52. Gewirtz AT, Simon PO, Jr., Schmitt CK, Taylor LJ, Hagedorn CH, O'Brien AD, Neish AS, Madara JL: *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J Clin Invest* 2001; 107(1):99-109
 53. Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrett SJ, Beutler B, Schroeder L, Nachman A, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A: A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 2003; 198(10):1563-72

54. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S: Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13(7):933-40
55. Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S: Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002; 3(6):499
56. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S: Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3(2):196-200
57. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S: Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303(5663):1526-9
58. Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, Cottam HB: Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(11):6646-51
59. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C: Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004; 303(5663):1529-31
60. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA: Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(15):5598-603
61. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ: Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194(6):863-9
62. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A: Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; 416(6881):603-7
63. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A: Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 198(3):513-20

64. Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M: Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004; 103(4):1433-7
65. Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H: CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *Embo J* 1998; 17(21):6230-40
66. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S: A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303(5663):1522-6
67. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408(6813):740-5
68. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB: Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(16):9237-42
69. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G: Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168(9):4531-7
70. Kadowaki N, Antonenko S, Liu YJ: Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c⁻ type 2 dendritic cell precursors and CD11c⁺ dendritic cells to produce type I IFN. *J Immunol* 2001; 166(4):2291-5
71. Vasilakos JP, Smith RM, Gibson SJ, Lindh JM, Pederson LK, Reiter MJ, Smith MH, Tomai MA: Adjuvant activities of immune response modifier R-848: comparison with CpG ODN. *Cell Immunol* 2000; 204(1):64-74
72. Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, Ozaki Y, Tomizawa H, Akira S, Fukuhara S: Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 2002; 195(11):1507-12

73. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC: Innate immune responses to LCMV infections: natural killer cells and cytokines. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 263:7-27
74. Le Bon A, Tough DF: Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol* 2002; 14(4):432-6
75. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S: Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002; 169(12):6668-72
76. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S: Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; 301(5633):640-3
77. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A: Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(25):14459-63
78. Barton GM, Medzhitov R: Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270:81-92
79. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW: Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000; 1(5):398-401
80. Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, Akira S: TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 1999; 231(1-2):59-65
81. Hornung V, Schlender J, Guenther-Biller M, Rothenfusser S, Endres S, Conzelmann KK, Hartmann G: Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J Immunol* 2004; 173(10):5935-43
82. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougerolles A, Endres S, Hartmann G: Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 2005; 11(3):263-70

83. Bourke E, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A: The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* 2003; 102(3):956-63
84. Janssens S, Beyaert R: A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 2002; 27(9):474-82
85. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11(1):115-22
86. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF, Akira S: Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2000; 164(2):554-7
87. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413(6857):732-8
88. Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, Dadgostar H, Dempsey P, Wu T, Rao G, Sun R, Haberland M, Modlin R, Cheng G: IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 2002; 17(3):251-63
89. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S: Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001; 167(10):5887-94
90. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R: The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002; 420(6913):329-33
91. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T: TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003; 4(2):161-7
92. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Jr., Medzhitov R, Flavell RA: IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002; 110(2):191-202
93. Janssens S, Beyaert R: Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* 2003; 11(2):293-302
94. O'Neill LA: Wanted: a molecular basis for specificity in toll-like receptor signal transduction. *Mol Cell* 2002; 10(5):969-71

95. O'Neill LA: Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: a role for Mal? *Trends Immunol* 2002; 23(6):296-300
96. Gordis L, Gold EB: Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Surg* 1984; 8(6):808-21
97. Morgan RG, Wormsley KG: Progress report. Cancer of the pancreas. *Gut* 1977; 18(7):580-96
98. John TG, Greig JD, Carter DC, Garden OJ: Carcinoma of the pancreatic head and periampullary region. Tumor staging with laparoscopy and laparoscopic ultrasonography. *Ann Surg* 1995; 221(2):156-64
99. Foitzik T, Buhr HJ: [New aspects in the pathophysiology of chronic pancreatitis]. *Chirurg* 1997; 68(9):855-64
100. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L: Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 1993; 328(20):1433-7
101. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Lankisch PG: Chronic pancreatitis and other risk factors for pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28(3):673-85, x
102. Steer ML, Waxman I, Freedman S: Chronic pancreatitis. *N Engl J Med* 1995; 332(22):1482-90
103. Parkin DM, Muir CS: Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ* 1992(120):45-173
104. Coleman MP, Esteve J, Damiecki P, Arslan A, Renard H: Trends in cancer incidence and mortality. *IARC Sci Publ* 1993(121):1-806
105. Midgley R, Kerr D: Colorectal cancer. *Lancet* 1999; 353(9150):391-9
106. Gudjonsson B: Carcinoma of the pancreas: critical analysis of costs, results of resections, and the need for standardized reporting. *J Am Coll Surg* 1995; 181(6):483-503
107. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2):74-108
108. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319(9):525-32
109. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW: APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359(6392):235-7

110. Cho KR, Vogelstein B: Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 16G:137-41
111. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B: p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50(23):7717-22
112. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO: Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 1990; 323(18):1228-33
113. Thomson DM, Krupcey J, Freedman SO, Gold P: The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 64(1):161-7
114. Wiggers T, Arends JW, Volovics A: Regression analysis of prognostic factors in colorectal cancer after curative resections. *Dis Colon Rectum* 1988; 31(1):33-41
115. Dawson LA, Franssen E, Davey P: Postoperative borderline elevated CEA predicts for earlier relapse in patients with rectal cancer receiving adjuvant postoperative therapy. *Cancer J Sci Am* 1999; 5(6):374-9
116. Giatromanolaki A, Stathopoulos GP, Tsiobanou E, Papadimitriou C, Georgoulas V, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI: Combined role of tumor angiogenesis, bcl-2, and p53 expression in the prognosis of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1999; 86(8):1421-30
117. Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA: Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 1986; 25(3):473-6
118. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al.: Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247(4938):49-56
119. Janssens S, Beyaert R: Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(4):637-46
120. Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB: Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 2001; 166(1):15-9
121. Pawar RD, Patole PS, Wornle M, Anders HJ: Microbial nucleic acids pay a toll in kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291(3):F509-16

122. Barton GM, Medzhitov R: Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003; 300(5625):1524-5
123. Bohnhorst J, Rasmussen T, Moen SH, Flottum M, Knudsen L, Borset M, Espevik T, Sundan A: Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 2006; 20(6):1138-44
124. Schmausser B, Andrusis M, Endrich S, Muller-Hermelink HK, Eck M: Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2005; 295(3):179-85
125. Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S, Visintin I, Rutherford T, Mor G: TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res* 2006; 66(7):3859-68
126. Huang B, Zhao J, Li H, He KL, Chen Y, Chen SH, Mayer L, Unkeless JC, Xiong H: Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res* 2005; 65(12):5009-14
127. Trabattoni D, Saresella M, Biasin M, Boasso A, Piacentini L, Ferrante P, Dong H, Maserati R, Shearer GM, Chen L, Clerici M: B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression. *Blood* 2003; 101(7):2514-20
128. Dionigi R, Rovera F, Dionigi G, Diurni M, Cuffari S: Infected pancreatic necrosis. *Surg Infect (Larchmt)* 2006; 7 Suppl 2:S49-52
129. Wood CB, Bradbrook RA, Blumgart LH: Chronic pancreatitis in childhood associated with mumps virus infection. *Br J Clin Pract* 1974; 28(2):67-9
130. Rizzardi GP, Tambussi G, Lazzarin A: Acute pancreatitis during primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1997; 336(25):1836-7
131. Coulson BS, Witterick PD, Tan Y, Hewish MJ, Mountford JN, Harrison LC, Honeyman MC: Growth of rotaviruses in primary pancreatic cells. *J Virol* 2002; 76(18):9537-44
132. Gilger MA, Matson DO, Conner ME, Rosenblatt HM, Finegold MJ, Estes MK: Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J Pediatr* 1992; 120(6):912-7
133. Saulsbury FT, Winkelstein JA, Yolken RH: Chronic rotavirus infection in immunodeficiency. *J Pediatr* 1980; 97(1):61-5

134. Sebastiani G, Leveque G, Lariviere L, Laroche L, Skamene E, Gros P, Malo D: Cloning and characterization of the murine toll-like receptor 5 (Tlr5) gene: sequence and mRNA expression studies in Salmonella-susceptible MOLF/Ei mice. *Genomics* 2000; 64(3):230-40
135. Smith MF, Jr., Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB: Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* 2003; 278(35):32552-60
136. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R: Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006; 7(1):49-56
137. Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Chen CC: *Helicobacter pylori*-Induced invasion and angiogenesis of gastric cells is mediated by cyclooxygenase-2 induction through TLR2/TLR9 and promoter regulation. *J Immunol* 2005; 175(12):8242-52
138. Mimeault M, Brand RE, Sasson AA, Batra SK: Recent advances on the molecular mechanisms involved in pancreatic cancer progression and therapies. *Pancreas* 2005; 31(4):301-16
139. Tsan MF: Toll-like receptors, inflammation and cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16(1):32-7
140. Killeen SD, Wang JH, Andrews EJ, Redmond HP: Exploitation of the Toll-like receptor system in cancer: a doubled-edged sword? *Br J Cancer* 2006; 95(3):247-52

10. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
APC	Adenoma-polyposis-coli Gen
CD	Cluster of Differentiation, Nomenklatur diverser Antigene
CEA	Carcino-Embryonales-Antigen
CMV	Cytomegalievirus
COX-2	Cyclooxygenase-2
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
Ct	Threshold cycle
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritic cell, Dendritische Zelle
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Double stranded RNA, Doppelstrang RNA
EBV	Epstein Barr-Virus
EGF	Epithelial Growth Factor, epithelialer Wachstumsfaktor
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor, Rezeptor für den epithelialen Wachstumsfaktor
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
Hep.	Hepatitis
HIV	Humane Immundeficiency Virus, humanes Immundefizient Virus
Hsp	Heat shock protein, Hitzeschockprotein
HSV	Herpes Simplex Virus
HRP	Horseradish peroxidase
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IκB	Klasse von Inhibitorproteinen
IL	Interleukin
IRF3	Interferon Regulatory Transcription Factor 3

IRAK	IL1 Receptor Associated Kinase
ISRE	IFN-stimulated Response Element
JNK	C-Jun N-terminale Kinasen
LAM	Lipoarabinomannan
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MDC	Myeloide dendritische Zellen
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-B
N.G.	Normalgewebe
NK	Natürliche Killerzellen
PAMP	Pathogen associated Molecular Pattern
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRR	Pattern Recognition Receptors
RIG1	Retinoid-inducible Gene 1
IRF	Interferon Regulatory Factor 3
RNA	Ribonukleinsäure
ssRNA	Single stranded RNA, Einzelstrang RNA
TGF	Transforming growth factor, transformierender Wachstumsfaktor
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF Receptor associated Factor
TRIF	Toll/IL-1 Receptor (TIR)-Domain-containing Adapter inducing IFN-beta
UICC	Union International Contre Cancer
5-FU	5-Fluorouracil

Persönliche Daten

Name: Fertinger
Vorname: Julia Jeanette
Geburtsdatum: 08.09.1978
Geburtsort: Bad Windsheim
Nationalität: deutsch
Eltern: Roman und Edith Fertinger
Geschwister: André, Albrecht und Judith Fertinger
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1985-1989 Grundschule Scheinfeld
1989-1998 Gymnasium Scheinfeld
Schulabschluss: Abitur

Praktikum

November/
Dezember 1998 Pflegepraktikum am Krankenhaus Martha-Maria in Nürnberg

Hochschulausbildung

Mai 1999 Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität-Erlangen-Nürnberg
März 2000 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
Februar 2002 Ärztliche Vorprüfung
September 2003 Studienortwechsel an die Bayerische Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
November 2005 Promotionsarbeit, Universitätsklinikum Würzburg, Chirurgische Klinik und Poliklinik, Molekulare Onkoimmunologie, Prof. Dr. A. M. Waaga-Gasser
Dezember 2005 Staatsexamen
Seit Februar 2006 Allgemeinzahnärztliche Tätigkeit in Markt Einersheim

Würzburg, Januar 2007

Julia Fertinger

Meiner Doktormutter, Frau **Professor Dr. Ana Maria Waaga-Gasser**, und meinem Doktorvater, **Herrn PD Dr. Martin Gasser**, danke ich besonders für die Überlassung des Themas, die hilfreiche Anleitung zur selbständigen wissenschaftlichen Tätigkeit und Ausarbeitung dieser Arbeit. Ganz herzlich möchte ich mich bei Ihnen zudem für die *stetig intensive Betreuung* während meiner experimentellen Tätigkeiten im Versuchslabor, sowie den vielen guten Anregungen bei der schriftlichen Ausfertigung danken. Die *außerordentlich gute Unterstützung* sowohl bei der Versuchskonzeption, als auch deren *unermüdliche Diskussionsbereitschaft* haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. *Ohne sie wäre die vorliegende Arbeit in dieser Form sicherlich nicht möglich gewesen.*

Im Übrigen gilt mein Dank ebenso dem wissenschaftlichen Mitarbeiter des onkoimmunologischen Labors, Herrn Martin Grimm, für die Hilfe und Betreuung beim experimentellen Arbeiten im Labor und seinem regen Interesse am Fortgang dieser Arbeit.